

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce
**Detekce hemu u parazitických prvoků skupiny
Trypanosomatidae**

Julie Kovářová

Vedoucí práce: Mgr. Luděk Kořený

České Budějovice 2010

Kovářová J. (2010): Detekce hemu u parazitických prvoků skupiny Trypanosomatidae. [Heme detection in parasitic protists of the group Trypanosomatidae]. Bachelor Thesis, in Czech. 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This study deals with detection of heme in three different species of the group Trypanosomatidae: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens*. The main goal was to improve the current knowledge about heme metabolism in *Phytomonas serpens*. It was found that *P. serpens* does not require heme for growth, though it does ingest it if available.

Tato práce byla podpořena grantem SGA 2008/003.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 29. 4. 2010

.....

Julie Kovářová

Poděkování

Děkuji Lud'kovi Kořenému za skvělé téma, vedení práce a nekonečnou ochotu pomoci a poradit. Děkuji Romanu Sobotkovi za ohromnou pomoc a zasvěcení do tajů HPLC. Děkuji Mírovi Oborníkovi za možnost pracovat v Laboratoři molekulární taxonomie. Děkuji Juliu Lukešovi za velmi podnětné připomínky a cenné rady. Děkuji svým rodičům za veškerou podporu a pochopení. Děkuji všem, kteří přispěli různě velkými střípky, bez nichž bych tuto práci nikdy neslepila dohromady.

Obsah

1. Literární přehled	1
1.1 Kinetoplastida.....	1
1.2 Trypanosomatidae	3
1.3 <i>Trypanosoma brucei</i>	4
1.4 <i>Leishmania tarentolae</i>	7
1.5 <i>Phytomonas serpens</i>	9
1.6 Hem	12
1.6.1 Syntéza hemu.....	12
1.6.2 Hem u trypanosomatid	13
2. Cíle práce.....	15
3. Metodika.....	16
3.1 Kultury.....	16
3.2 Detekce hemu pomocí HPLC.....	18
3.3 Detekce hemu na proteinech	19
3.3.1 Nativní gelová elektroforéza	19
3.3.2 Blotování gelu na membránu a barvení.....	20
3.3.3 SDS-PAGE	21
3.4 Růstové křivky	22
3.5 PCR	22
3.6 RT-PCR.....	23
4. Výsledky	24
4.1 Kultivace	24
4.2 HPLC.....	24
4.3 Nativní gelová elektroforéza	29
4.4 SDS-PAGE.....	30
4.5 Růstové křivky	32
4.6 PCR	33
5. Diskuze	34
6. Závěr	38
7. Seznam použité literatury.....	39

1. Literární přehled

1.1 Kinetoplastida

Jednobuněčná eukaryota řádu Kinetoplastida využívají velmi široké rozpětí různých životních strategií. Najdeme zde parazity obratlovců, bezobratlých, prvoků i rostlin, ale také volně žijící druhy (Simpson a kol., 2002; Campbell a kol., 2003). Zástupce kinetoplastid můžeme rozdělit na volně žijící nebo parazitická Bodonina se dvěma bičíky a výhradně parazitická Trypanosomatina (= čeleď Trypanosomatidae) s jedním bičíkem (Callahan a kol., 2002). Organismy spadající do druhé skupiny se ještě dále rozlišují podle svého životního cyklu. Monogenetické druhy (*Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas*, *Wallaceina*, *Leptomonas*) parazitují pouze na jednom hostiteli, zatímco digenetické druhy (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Endotrypanum*) střídají dva hostitele. Většinou je to obratlovec (savci, ptáci, plazi) a hmyzí přenašeč (Podlipaev, 2000). Paraziti během života procházejí složitými životními cykly v odlišných prostředích, kdy výrazně mění stavbu své buňky i způsob získávání energie.

V buňce kinetoplastid najdeme všechny orgány charakteristické pro eukaryotické organismy, nicméně některé z nich jsou značně atypické. Alespoň během části života mají jeden nebo dva bičíky. Mitochondrie je pouze jedna, její vnitřní struktura se během životního cyklu může měnit, často se zjednodušuje uspořádání vnitřních krist (v závislosti na daném druhu) (Matthews, 2005). Její DNA je kondenzovaná do tělíska zvaného kinetoplast. Odtud pochází i název pro celý řád. Kinetoplastová DNA je uspořádána do sítě sestávající se z několika maxikroužků propojených s tisíci minikroužky. Větší kroužky kódují běžné mitochondriální geny (Maslov a kol., 1999; Campbell a kol., 2003). V nich se velmi často nacházejí chyby, které jsou opraveny během procesu nazývaném RNA editing, při němž dochází k inserci či delecii uridinových bazí. V tomto procesu slouží jako templát tzv. guide RNA, kódovaná na minikroužcích (Campbell a kol., 2003). Rozsah úprav mRNA se mění během životního cyklu parazita, závisí na konkrétním stádiu a s ním souvisejícím typem metabolismu (Matthews, 2005).

Jaderný genom je ve srovnání s ostatními eukaryoty výjimečně úsporný. Typická je vysoká hustota genů, mohou se překrývat a neobsahují téměř žádné introny (Simpson a kol., 2002). Neobvyklá DNA je také transkribována velmi neobvyklým způsobem. Vznikají z ní dlouhé úseky multicistronické pre-mRNA, které jsou dále upravovány v procesu *trans-splicing* na konečnou mRNA (Liniger a kol., 2001). Dochází ke spojování dvou různých

exonů transkribovaných ze dvou různých chromozomů, první úsek je splice leader sekvence, která je připojena k 5'-konci každé nově syntetizované mRNA (Campbell a kol., 2003; Landfear, 2003). Společně s připojováním 7-methylguanosu a polyadenylového úseku na pre-mRNA se jedná o způsob posttranskripční genové regulace (Donelson a kol., 1999). Množství proteinů v buňce při polycistronní transkripci přibližně odpovídá počtu kopií daného genu (Campbell a kol., 2003). Na rozdíl od bakteriálních operonů, zde není pravděpodobné, že by kódovaly funkčně příbuzné proteiny (Campbell a kol., 2003).

Další zajímavostí kinetoplastid je prostorové rozmístění metabolických drah v buňce, především díky organelám zvaným glykozómy, vzniklým pravděpodobně z peroxizómů. V jejich lumen probíhá glykolýza (kromě posledních tří reakcí, jež jsou lokalizovány v cytoplazmě (Tielens a Van Hellemond, 1998; Lamour a kol., 2005)), glukoneogeneze, u druhů *Leishmania* a *Phytomonas* i β -oxidace mastných kyselin (Hannaert a kol., 2003) a ještě některé další biosyntetické dráhy nebo jejich části. Hlavní výhodou, kterou glykozómy přinášejí, představuje prostorové rozdělení buňky. Jejich membrána je pro většinu metabolitů, metabolických meziproduktů i pro energetické molekuly ATP a NAD(P)H nepropustná. Poměr ATP/ADP i NADH/NAD⁺ je uvnitř organely odlišný od cytoplazmatického, takže zde probíhající metabolické dráhy jsou částečně nezávislé na ostatních (Tielens a Van Hellemond, 1998; Hannaert a kol., 2003). Díky tomu, že tyto organely obsahují charakteristické enzymy, jejichž složení mohou velmi rychle a snadno obměňovat (Hannaert a kol., 2003), umožňují organismům vysokou metabolickou flexibilitu. Michels a kol. (2000) pomocí počítačových modelů testovali, jakou výhodu glykozómy přinášejí. Ukázali, že umožňují organismu vyrovnat se s akumulací glukózy (a osmotickým tlakem, který způsobuje) a také přežít dlouhodobější hladovění, což je pro parazity bezpochyby velmi výhodné.

1.2 Trypanosomatidae

Pro trypanosomatida je charakteristická přítomnost menšího kinetoplastu a pouze jednoho bičíku ukotveného v bičíkové kapse (Callahan a kol., 2002). Ten může být také spojený s buňkou po celé délce, a pak vzniká undulující membrána. Někteří z těchto parazitů procházejí složitými životními cykly, kdy napadají krevsající hmyz a následně obratlovce (*Trypanosoma*, *Leishmania*), případně rostliny (*Phytomonas*). Zástupci dalších rodů parazitují pouze na hmyzu (Podlipaev, 2000). Komplikované životní strategie s sebou přinášejí výrazné změny prostředí, buňky proto využívají různé mechanismy přizpůsobení se k nim. Jedním z nich je střídání různých morfologických stádií (amastigot, trypomastigot, promastigot, epimastigot, opistomastigot, choanomastigot), rozlišovaných od sebe podle vzájemné pozice jádra a kinetoplastu a délky undulující membrány (Matthews, 2005). Další adaptací je přítomnost acidokalcinomů (Docampo a Moreno, 2001). Jedná se o membránové orgány charakteristické kyselým vnitřním prostředím. Obsahují vysoké koncentrace fosfátů a na ně vázané kovové kationty: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} . Funkce acidokalcinomů spočívá pravděpodobně v ukládání energie a kationtů a v konečném důsledku i v odolávání environmentálnímu stresu (Michels a kol., 2000; Docampo a Moreno, 2001).

Přestože jsou v mitochondrii vždy přítomné alespoň některé komplexy dýchacího řetězce, většinu energie získávají trypanosomatida pravděpodobně substrátovou fosforylací (aerobní fermentací) (Tielens a Van Hellemond, 1998; Lamour a kol., 2005; Lukeš a kol., 2005). Jako hlavní zdroj energie slouží glukóza, ale paraziti během životního cyklu přizpůsobují svůj energetický metabolismus dostupnosti substrátu a některá hmyzí stádia mohou využívat také určité aminokyseliny např. prolin (Tielens a Van Hellemond, 1998; Lamour a kol., 2005). Glykolýza funguje vždy, několik prvních reakcí probíhá zpravidla v glykozómech (Tielens a Van Hellemond, 1998). U ostatních eukaryot se vyskytuje jev zvaný Pasteurův efekt, kdy je glykolýza inhibována kyslíkem. Tento mechanismus je velmi výhodný, protože při aerobních podmínkách je efektivnější metabolismus, který využívá i dýchací řetězec (Cazzulo, 1992). Pro parazity žijící v prostředí bohatém na glukózu taková regulace očividně není nutná. Vznikající pyruvát je často, ale ne vždy dále odbouráván v dýchacím řetězci v mitochondrii (Tielens a Van Hellemond, 1998). V první části elektron-transportního řetězce jsou zapojeny membránové enzymy (glycerol-3-fosfát-dehydrogenáza (G3PDH), komplexy I a II), aby přenášely elektrony na ubichinon/ubichinol. Odtud jsou přečerpány přes komplexy III a IV na kyslík (Tielens a Van Hellemond, 1998). Někteří

zástupci trypanosomatid mají k tomuto klasickému dýchacímu řetězci navíc ještě další dva enzymy: trypanozomovou alternativní oxidázu (TAO) (Fang a Beattie, 2003) a NADH-dehydrogenázu typu II (NDH2) (Fang a Beattie, 2002). TAO je ubichinolová oxidáza, jež není spojena s oxidativní fosforylací a jejímž konečným produktem je voda (Chaudhuri a kol., 1998). Je rezistentní vůči kyanidu, ale senzitivní k salicylhydroxamové kyselině (SHAM) (Chaudhuri a kol., 1998).

1.3 *Trypanosoma brucei*

Trypanozomy jsou nejnebezpečnějšími parazity z této skupiny. *Trypanosoma brucei* způsobuje onemocnění dobytka v subsaharské Africe zvané nagana. Její poddruhy *T. b. gambiense* a *T. b. rhodensiense* vyvolávají spavou nemoc u člověka. Mezi savčími hostiteli jsou tyto trypanozomy přenášeny mouchou tse-tse (*Glossina* sp.) (Matthews, 2005). Hlavní příčinou závažnosti nemoci a problémů při hledání vhodné metody léčby je antigenní variace – periodické přepínání exprese mezi geny kódujícími různé povrchové proteiny (Matthews, 2005). To umožňuje parazitovi opakovaně unikat imunitnímu systému savčího hostitele.

Během životního cyklu se jednotlivá stádia trypanozom liší rozdílnou morfologií, složením povrchových proteinů i energetickým metabolismem. Krevní forma (trypomastigot) má protáhlou „slender“ buňku, dělí se a se stoupající koncentrací buněk v hostiteli se přeměňuje na „stumpy“, která je připravená na další změny. Po vstupu do mouchy prochází procyklická forma aktivním dělením ve střevě a diferenciací v dalších částech trávicího traktu. Nakonec migruje až do slinných žláz, kde se znovu dělí. Takzvaní epimastigoti jsou svými bičíky přichyceni k epitelu slinných žláz, dokud se nepřemění na metacyklické trypomastigoty a neuvolní se, aby mohli infikovat savce. Celý cyklus trvá 3 – 5 týdnů (Vickerman a kol., 1988; Matthews, 2005).

Krevní forma obsahuje výrazně redukovanou mitochondrii bez fungujícího Krebsova cyklu, pro příjem energie je tedy závislá čistě na glykolýze (Tielens a Van Hellemond, 1998; Michels a kol., 2000). Glukóza je uvnitř glykozómu odbourávána na 3-fosfoglycerát, který se v cytosolu dále degraduje na konečný produkt pyruvát (Tielens a Van Hellemond, 1998). Redoxní potenciál je v glykozómech udržován v rovnováze pomocí glycerol-3-fosfátového výměníku a alternativní oxidázy přítomných v mitochondriální membráně (Tielens a Van Hellemond, 1998).

Z enzymů dýchacího řetězce je u krevní formy přítomná pouze glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (G3PDH), SHAM-senzitivní trypanozomová alternativní oxidáza (TAO), NADH dehydrogenáza typu II (NDH2) a ATP-syntáza (Tielens a Van Hellemond, 1998; Besteiro a kol., 2005). G3PDH přenáší elektrony do ubichinon/ubichinolové zásobárny a redukovaný ubichinol je dále donorem elektronů pro TAO (Tielens a Van Hellemond, 1998). Výlučná přítomnost této oxidázy v parazitovi oproti savcům z ní dělá významný cíl pro chemoterapii. V takto zjednodušeném dýchacím řetězci nevzniká žádné ATP. Komplex V, ATP-syntáza v buňkách sice přítomná je, ale plní přesně opačnou funkci než u většiny organismů. Vytváří membránový potenciál na mitochondriální membráně za spotřeby ATP (Schnauffer a kol., 2005; Brown a kol., 2006).

U hmyzí formy se sice nachází kompletní dýchací řetězec, přesto ale zůstává substrátová fosforylace hlavním zdrojem ATP (Bochud-Alleman a Schneider, 2002; Lukeš a kol., 2005). Jedná se zřejmě o adaptaci na hypoxické podmínky panující v trávicí soustavě hmyzu. Na kyslíku nezávislá substrátová fosforylace probíhá v mitochondrii dvěma možnými způsoby. První zprostředkovává sukcinyl-CoA syntáza v citrátovém cyklu, kdy vzniká sukcinát a ATP, ne GTP jako u většiny organismů (Bochud-Alleman a Schneider, 2002; Lamour a kol., 2005). Druhou možnost vytváří acetát:sukcinát CoA transferáza (ASCT cyklus) produkující acetát (Bochud-Alleman a Schneider, 2002). Pokud nefunguje jenom citrátový cyklus, nebo jenom ASCT cyklus, buňky se dál množí. Nicméně po přerušení obou dvou metabolických cest se růst zastaví (Bochud-Alleman a Schneider, 2002). Pyruvát vzniklý glykolýzou vstupuje dále do ASCT cyklu nebo do citrátového cyklu a odpadními látkami jsou potom acetát a oxid uhličitý (Tielens a Van Hellemond, 1998; Bochud-Alleman a Schneider, 2002). Lamour a kol. (2005) považují za esenciální místa produkce ATP navíc ještě fosfoglycerát kinázu a pyruvát kinázu v cytosolu. Krebsův cyklus tedy není pro přežití organismu nezbytný, ačkoliv v mitochondrii funguje (Tielens a Van Hellemond 1998; Lamour a kol., 2005).

Výhradně oxidativní fosforylace je využita pro produkci ATP až při nedostatku glukózy (Lamour a kol., 2005). Zatímco krevní forma je závislá na tomto sacharidu jako hlavním zdroji energie, procyklici umějí využít také prolin a méně threonin (Lamour a kol., 2005). Glukóza zůstává preferovaným zdrojem uhlíku, negativně reguluje prolinový metabolismus (Lamour a kol., 2005). S velkou pravděpodobností se jedná o další adaptaci na prostředí hmyzího střeva, kde se koncentrace cukrů výrazně mění v závislosti na množství nasáté krve, zatímco prolin je poměrně stabilním zdrojem (Lamour a kol., 2005). Tato

aminokyselina podporuje substrátovou fosforylaci v citrátovém cyklu, a tím pádem i oxidativní fosforylaci (Lamour a kol., 2005).

Stádium procykliků neobsahuje pouze alternativní oxidázový systém, ale i klasický, kyanid-senzitivní dýchací řetězec s cytochromy (Tielens a Van Hellemond, 1998; Besteiro a kol., 2005; Opperdoes a Michels, 2008). V dýchacím řetězci jsou tedy přítomné dvě terminální oxidázy: TAO (jejíž exprese je ale výrazně potlačena) a ke kyanidu senzitivní cytochrom *c*-oxidáza (komplex IV) (Tielens a Van Hellemond, 1998; Chaudhuri a kol., 2005). Na ubiquinonu je přenos elektronů rozvětven, mohou odtud téct buď přes klasickou, na cytochromu závislou cestu, nebo přes TAO (Chaudhuri a kol., 1998). Přítomnost komplexu I (NADH-dehydrogenáza) byla dlouhou dobu nejasná. Důkaz citlivosti k rotenonu a piercidinu, inhibitorům komplexu I, nasvědčuje faktu, že NADH-dehydrogenáza u procykliků přítomná je, jen její podjednotkové složení se liší od savčího typu (Opperdoes a Michels, 2008). Experimentální zablokování ATP-syntázy přivodilo pouze nepatrný dopad na růst buněk a nijak neovlivnilo produkci ATP v médiu bohatém na glukózu (na rozdíl od již zmiňované substrátové fosforylace) (Lamour a kol., 2005).

Takto významné biochemické změny mezi jednotlivými stádii jsou spojeny se změnami i na buněčné úrovni. V krevní formě mitochondrie postrádá krystalizaci a je zablokována. Po přeměně na procykliky expanduje vnitřní membrána do rozvětvené sítě s diskoidálními krystaly, objevuje se citrátový cyklus a cytochromový řetězec, což se projevuje citlivostí ke kyanidu (Vickerman a kol., 1988). Krevní trypanostigoti mohou přijímat specifické proteiny z krevní plazmy endocytózou do bičíkaté kapsy (Vickerman a kol., 1988). Exprese genových sad pro proměnlivé povrchové glykoproteiny (VSG) umožňuje krevním trypanozomám antigenní proměnlivost, při vstupu do mouchy obě tyto schopnosti ztrácejí (Vickerman a kol., 1988), VSG se vymění za procyklin (Matthews, 2005). Přejít z energetického metabolismu z krevní, závislé na glykolýze, na procyklickou formu nastává již v savčím hostiteli. Tyto trypanozomy jsou tedy preadaptovány na život uvnitř hmyzího vektoru s předpokladem, že je nasaje s krví (Tielens a Van Hellemond, 1998).

Kinetoplastové geny z maxikroužků jsou transkribovány během všech životních stádií, ale výrazně se liší množství jejich transkriptů (Vickerman a kol., 1988). Editování RNA je regulováno v závislosti na vývojovém stádiu, například mRNA pro podjednotku II cytochrom *c*-oxidázy je editována do správného čtecího rámce jen v procyklicích (Matthews, 2005).

1.4 *Leishmania tarentolae*

Leishmania je parazitický rod zahrnující řadu druhů rozšířených v tropických oblastech téměř celého světa a známý především v souvislosti s nemocí leishmaniázou. Pod toto označení spadá široká škála onemocnění od infekcí bez zjevných projevů, přes kožní až po vážné viscerální a smrtelné choroby jako je například nemoc kala-azar (Vannier-Santos a kol., 2002). Forma infekce je určena především druhem parazita, ale průběh a symptomy ovlivňuje také vrozená i získaná imunita hostitele (Ivens a kol., 2005). Kromě člověka napadají leishmánie celou řadu savčích hostitelů a jsou známi i parazité plazů (Vannier-Santos a kol., 2002). Přenášeny jsou komáry ze skupiny Phlebotominae, ve Starém Světě rodem *Phlebotomus* a v Novém *Lutzomyia* (Podlipaev, 2000). Žijí v jejich trávicí soustavě jako extracelulární paraziti ve formě takzvaných promastigotů, kteří mají protáhlé buňky pohybující se pomocí bičíku. Stávají se infekčními za 7 – 8 dní, během kterých prodělávají diferenciaci a přeměnu v trávicím traktu hmyzu (morfologické změny, biochemické modifikace, aktivita molekul buněčného povrchu) a postupně migrují do slinných žláz (Vannier-Santos a kol., 2002).

Nákaza začíná, když na obratlovci hmyzí vektor saje krev a infikuje jej promastigoty. Složky ze slin nebo slinných žláz přenašeče podporují úspěšnost infekce (inhibice imunitní odpovědi v místě inokulace parazita) (Vannier-Santos a kol., 2002). Buňky procházejí složitými morfologickými a biochemickými změnami, jejichž výsledkem je amastigot, bezbičíkaté nepohyblivé stádium. To je fagocytózou pohlceno do makrofágů, do takzvané parazitoformní vakuoly. Zde panují velmi specifické podmínky, především pH se pohybuje v hodnotách kolem 5. K takovému životu má parazit četná přizpůsobení: membránová H^+ -ATP-syntáza udržuje cytoplazmu leishmánie neutrální, membránové transportéry a mimobuněčné enzymy (nukleázy, kyselá fosfatázy, gp63) pravděpodobně usnadňují příjem a degradaci živin, protonový elektrochemický potenciál na membráně pohání aktivní transport glukózy a prolinu do buňky (Vannier-Santos a kol., 2002).

Jako zdroj energie využívají promastigoti prolin, což je pravděpodobně významná adaptace pro přežití ve střevě komára v nasáté krvi, bohaté na tuto aminokyselinu (Vannier-Santos a kol., 2002). Hlavními produkty metabolismu jsou acetát, pyruvát a sukcinát, zatímco jen malá část živin je kompletně oxidována v Krebsově cyklu až na oxid uhličitý (Tielens a Hellemond, 1998). Současně vzniká i NADH, který je zpětně oxidován v dýchacím řetězci (Tielens a Van Hellemond, 1998). Obdobně jako u procyklického stádia *T. brucei* a u většiny eukaryotických buněk funguje v mitochondrii Krebsův cyklus a klasický dýchací řetězec,

kteřý využívá kyslík jako konečný akceptor elektronů (Ivens a kol., 2005). Leishmánie na rozdíl od ostatních trypanosomatid postrádají alternativní oxidázu (Tielens a Van Hellemond, 1998). Všechna životní stádia mají metabolismus velmi podobný (Tielens a Van Hellemond, 1998). V porovnání s *T. brucei* se mnohem více spoléhají na dýchací řetězec, proto dokážou v anaerobních podmínkách promastigoti fungovat jen do omezené míry. Během anoxie se metabolismus zablokuje, buňky se líně hýbou nebo jsou úplně netečné, nerozmnožují se (Tielens a Van Hellemond, 1998). Podobný stav může vyvolat i hladovění. Takováto schopnost zablokovat vlastní metabolismus vratným způsobem umožňuje leishmáníi přežít nepříznivé podmínky, které občas nastávají během jejich vývoje v přenašeči (Tielens a Van Hellemond, 1998).

Během dlouhodobého pěstování v kultuře se pravděpodobně mohou ztrácet určité sekvence kódující specifické rodiny gRNA z minikroužků kinetoplastu. Vyplývá to z porovnání dvou kmenů *L. tarentolae*: UC je již 55 let pěstovaný v kultuře, zatímco LEM125 je nedávno izolovaný z přírody (Thiemann a kol., 1994). Transkripty G1 (odpovídá ND8), G2 (=ND9), G3, G4 a G5 (=ND3) byly detekovány pouze u kmenu LEM 125. Jako vysvětlení se nabízí, že u kmenu UC chybí příslušná gRNA pro editování. V souladu s těmito výsledky je i fakt, že kmen UC není senzitivní k rotenonu (inhibitor komplexu I), zatímco LEM 125 je (Thiemann a kol., 1994).

Paraziti ovládají komplexní arzenál unikových mechanismů a strategií, které jim umožňují přežití v různých, často nepříznivých podmínkách vyvolaných obranným systémem obratlovčího hostitele. Patří mezi ně například různé možnosti k odbourání volných toxických radikálů (obdobné jako u savců): účast thiol-prezentujících molekul jako je trypanothion, polyaminy, zvýšená exprese ornithin dekarboxylázy (Vannier-Santos a kol., 2002). Ty jsou zároveň potencionálními cíly pro chemoterapii. Agens způsobující leishmaniózu je především hlavní povrchová peptidáza, zvaná gp63 (neboli leishmaniolysin = promastigote surface peptidase) (d'Avila-Levy a kol., 2006). Na buněčném povrchu jsou dále velmi hojné lipofosfoglykany a glykoinositolfosfolipidy (McConville a Ferguson, 1993).

Druh *Leishmania tarentolae*, dále zahrnutý v této práci, parazituje na gekonech, například *Tarentola annularis* (Basile a Peticca, 2009).

1.5 *Phytomonas serpens*

První rostlinná trypanosomatida objevil Lafont se svým spolupracovníkem Davidem v roce 1909, když mikroskopovali latex z rostliny *Euphorbia pilulifera* (Camargo, 1999). Nový organismus dostal jméno *Leptomonas davidi*. Jako reakce na tento objev se v krátké době objevily zprávy o dalších trypanosomatidech nalezených v latexu různých rostlin napříč kontinenty. Ve 30. letech 20. století se Stahel zabýval poškozenými kávovníky a v jejich floému našel opět zástupce těchto prvoků. V 70. letech byli nalezeni i v rostlinách kasavy (*Manihot esculenta*), kávovníku (*Coffea* sp.) i kokosových a olejových palem (*Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*). O deset let později byly publikovány nálezy z dužnatého ovoce (rajčata, fíky, moruše, citrusy ad.) (Camargo, 1999). Není jasné, o jaké konkrétní rody nebo druhy se jednalo, všechny tyto organismy si jsou morfologicky velmi podobné, často byly zařazovány taxonomicky nesprávně a přejmenovávány. Zpočátku nebyl tento prvok považován za patogena, dokud se neprokázala spojitost s chorobami hospodářských plodin (nekróza floému u kávovníku, žloutnutí a hnědnutí listů u palem („marchitez sopressiva“, „hartrot“) apod.) (Camargo a kol., 1990). Poškození se totiž projevuje, pouze pokud jsou paraziti přítomni ve floému, v latexu se jeví jako neškodní (Camargo a kol., 1990).

Druh *Phytomonas serpens* se přirozeně vyskytuje v plodech rajčat (*Solanum lycopersicum*) a pravděpodobně i v ovoci anona (*Annona cherimola*), kmeny parazitů z tohoto ovoce si jsou fylogeneticky bližší navzájem než s ostatními zástupci rodu *Phytomonas* (Fernández-Becerra a kol., 1996). Mezi jednotlivými rostlinami jsou prvoci přenášeni prostřednictvím hmyzu ze skupiny Hemiptera, potvrzený je přenos např. plošticí *Phthia picta* (Conchon a kol., 1989).

Stavba buňky je obdobná jako u ostatních trypanosomatid (jádro, jedna mitochondrie s kinetoplastem, bičík vyrůstající z bičíkové kapsy). Pozoruhodná je u *Phytomonas serpens* její morfologická plasticita a velký polymorfismus. Buňky mohou být kulovité až podlouhlé a protáhlé, většinou několikrát překroucené podle podélné osy těla. Velikost dosahuje rozpětí 4-16 μm (Camargo, 1999; Sanchez-Moreno a kol., 1992). Výjimečný je pro tento druh také výrazně vyšší podíl glykozómů přítomných v buňce oproti příbuzným zástupcům (Sanchez-Moreno a kol., 1992).

Velmi zajímavý je u *Phytomonas serpens* energetický metabolismus. Naprostá většina energie pro fungování buňky je získávána glykolýzou (Tielens a Van Hellemond, 1998). Taková životní strategie je umožněna díky velmi bohatému a výživnému prostředí, jako je

floémové vodivé pletivo, sladké ovoce a mléčnice. Prvok vylučuje z buňky hydrolytické enzymy podílející se na degradaci polysacharidů a disacharidů, kterými odbourává celulózu, škrob, tím pádem i buněčné stěny rostlinných buněk (Sanchez-Moreno a kol., 1992). Vzniklé hexózy, především glukóza, potom slouží jako zdroj energie a uhlíku (Tielens a Van Hellemond, 1998; Sanchez-Moreno a kol., 1992). Canepa a kol. (2007) studovali transport cukrů a aminokyselin do buňky. Detekovali vysoké rychlosti přenosu glukózy a fruktózy, prolinu, argininu, cysteinu a glutamátu. Tyto výsledky podle autorů odpovídají charakteristickému znaku pro parazity, jakým je ztráta biosyntetických drah v evoluci a jejich náhrada transportními systémy. Hlavním důkazem tohoto typu metabolismu je fakt, že organismus není citlivý ke kyanidu (inhibitor komplexu IV dýchacího řetězce), ale nepřežije přidání salicylhydroxamové kyseliny (SHAM), inhibitoru alternativní oxidázy (Tielens a Van Hellemond, 1998; Fernández-Becerra a kol., 1997). Glykolytické enzymy se nacházejí v glykozómech, jejichž vysoký počet v buňce je tedy pro organismus výhodný (Hannaert a kol., 2003). *Phytomonas* nemá funkční Krebsův cyklus (Tielens a Van Hellemond, 1998; Maslov a kol., 1999), mitochondrie je výrazně potlačena, čemuž odpovídají i neobvykle řídké krysty na vnitřní membráně (Camargo, 1999). Odpadními produkty metabolismu jsou za aerobních podmínek kyselina octová a ethanol, kyselina octová vzniká stejně jako u ostatních trypanosomatid v ASCT cyklu (Sanchez-Moreno a kol., 1992; Tielens a Van Hellemond, 1998). Parazit přežívá velmi dobře i za anaerobních podmínek, produkuje potom především ethanol, glycerol a oxid uhličitý (Chaumont a kol., 1994).

Samostatnou otázkou je, jak vypadá metabolismus parazita uvnitř hmyzího vektora. Předpokládá se, že je závislý na aminokyselinách, především prolinu, stejně jako je tomu u *T. brucei* (Lamour a kol., 2005). Je ovšem velmi obtížné tuto domněnku experimentálně potvrdit. Almeida a kol. (2003) prokázali přítomnost mimobuněčné metaloproteinázy u *P. francai*, jež by mohla prvokovi sloužit k odbourávání proteinů jako zdroje energie.

Neobvyklý metabolismus *P. serpens* je provázán s četnými molekulárními a biochemickými aspekty. V kinetoplastu na maxikroužku chybí geny pro komplexy II (sukcinát-dehydrogenáza) a III (cytochrom *c*-reduktáza) dýchacího řetězce, podjednotky I-III komplexu IV (cytochrom *c*-oxidáza) a pro apocytochrom *b* (Maslov a kol. 1999; Nawathean a Maslov, 2000). Odpovídající proteinové komplexy tito autoři ani nenalezli analýzou nativních polyakrylamidových gelů. Nepodařilo se detekovat ani gen pro podjednotku IV cytochrom *c*-oxidázy, který se běžně nalézá v jaderné DNA (Nawathean a Maslov, 2000). Potvrzena byla přítomnost genů pouze pro všechny podjednotky komplexu I (NADH-dehydrogenáza), ATP-syntázu, a ribozomální RNA (Maslov a kol., 1999). Tyto geny se vyskytují v genomu ve

stejném pořadí a směru jako u zástupců *Trypanosoma brucei* a *Leishmania tarentolae*, což nasvědčuje předpokladu, že chybějící geny byly sekundárně deletovány (Maslov a kol., 1999). Nawathean a Maslov (2000) nenalezli geny pro podjednotky I a II cytochrom *c*-oxidázy na jejich obvyklé pozici na maxikroužku, ani nikde jinde v buňce. Stejně tak pomocí metody Northern blotting nedetekovali odpovídající mRNA. Ve shodě s těmito poznatky jsou i výsledky diplomové práce Benkovičové (2007). Měřila aktivity jednotlivých komplexů dýchacího řetězce a u komplexů III a IV získala téměř nulové hodnoty, zatímco u ostatních určitou aktivitu naměřila. V nativních gelech detekovala NADH-dehydrogenázu i NDH2, sukcinát-dehydrogenázu a ATP-syntázu. Jiný přístup zvolili Pappas a kol. (2005), kteří provedli analýzu expressed sequence tags (EST) z knihovny cDNA. Nalezli především velký podíl genů pro transportéry glukózoové rodiny, dále některé z enzymů glykolýzy, Krebsova cyklu i dýchacího řetězce. Z prvních čtyř komplexů klasického dýchacího řetězce se v mitochondrii *P. serpens* nachází tedy pouze komplex I, NADH-dehydrogenáza. Kromě již zmíněných genů, byla v buňce detekována i odpovídající mRNA, která dokládá přítomnost funkčního transkripčního aparátu a editace RNA (Maslov a kol., 1999). Dalšími důkazy je potlačení enzymu jeho inhibitory a imunologická detekce (González-Halphen a Maslov, 2004). Autoři našli v buňce kromě tohoto komplexu ještě alternativní NADH-dehydrogenázu typu 2 (NDH2). Jejich výsledky potvrdili a enzymy dále charakterizovali Čermáková a kol. (2007). Výjimkou je podjednotka ND8 komplexu I, jejíž mRNA se u kmene 1G (izolovaného z plošnice *Phthia picta*) edituje jen částečně, zatímco u kmenů 9T a TCC231 (izolované z plodů rajčat (Jankevicius a kol., 1989)) probíhají úpravy normálně (Nawathean a Maslov, 2000). Autoři pokládají tuto podjednotku za nepotřebnou pro parazita trvale žijícího v kultuře.

Velmi zajímavý je i imunologický pohled na *P. serpens*. U *Phytomonas* byla prokázána přítomnost obdobných povrchových proteinů, jaké se nacházejí u *T. cruzi* a u leishmání (Santos a kol., 2006). Předchozí imunizace myši prvokem *P. serpens* poskytuje částečnou imunitní odpověď proti *T. cruzi* (Santos a kol., 2007). Velmi zajímavá je otázka, co se stane, pokud člověk nebo zvíře pozřou ovoce nakažené rostlinnými trypanosomatidy. Santos a jeho spolupracovníci (2007) předpokládají, že by to mohlo vést k přípravě imunitní odpovědi a ovlivnit vývoj nemoci, pokud by byl dotyčný následně infikován *T. cruzi*. Považují proto *P. serpens* za vhodného kandidáta pro vývoj vakcíny proti trypanosomatidům.

1.6 Hem

Hem, tetrapyrrolová porfyrinová molekula s vázaným atomem železa ve svém středu, je jednou z nejvýznamnějších prostetických skupin v živých systémech, nachází se ve velmi širokém spektru proteinů a slouží k řadě rozmanitých funkcí: vazba a transport kyslíku (hemoglobin a myoglobin), aktivace kyslíku (cytochrom P450), metabolismus peroxidů a odpověď na oxidativní stres (peroxidázy a katalázy), biosyntéza oxidu dusnatého, přenos elektronů (cytochromy), oxidační reakce a detoxifikace, syntéza a detekce dvouatomárních plynů jako je CO a NO. Jako regulační molekula ovlivňuje buněčnou diferenciaci a genovou expresi na úrovni transkripce, translace, udržování proteinové stability, cílení proteinů (Panek a O'Brian, 2002; Rao a kol., 2005; Cheek a Dawson, 2007).

Podle postranních funkčních skupin na tetrapyrrolovém cyklu rozlišujeme různé typy hemu. V přírodě nejčastější je hem *b* (hemin, protohem IX). Slouží jako prostetická skupina myoglobinu, hemoglobinu, cytochromu P450, cytochrom *c*-oxidázy ad. Molekula hemu *a* má navíc na porfyrinovém jádru navázanou farnesylovou a formylovou skupinu. Podobnou strukturu má i hem *o*, který je zároveň meziproduktem při syntéze hemu *a* z hemu *b*. Hem *c* je jako jediný vázaný k proteinům kovalentní thioesterovou vazbou vytvořenou mezi postranními řetězci porfyrinu a sírou v cysteinech peptidového řetězce (Cheek a Dawson, 2007).

1.6.1 Syntéza hemu

V organismech vzniká hem prostřednictvím hemové biosyntetické dráhy sestávající z 8 kroků. První krok, syntéza 5-aminolevulinové kyseliny může probíhat dvěma různými způsoby, ale zbývajících sedm reakcí je zprostředkováno vždy stejnými, dobře konzervovanými enzymy (Rao a kol., 2005). Výsledným produktem hemové biosyntetické dráhy je hem *b*, který je dále metabolizován prostřednictvím hem *o*-syntázy a hem *a*-syntázy až na hem *a* (Morrison a kol., 2005). V závislosti na konkrétním organismu a buněčném typu mohou meziprodukty hemové dráhy sloužit také k syntéze dalších tetrapyrrolových molekul: různé typy chlorofylu, sirohem, vitamín B12, chloriny atd. (Panek a O'Brian, 2002; Rao a kol., 2005).

Jsou známi zástupci eukaryot, kteří nemají hemovou syntetickou dráhu, ale jedná se vesměs o parazity nebo organismy schopné získávat hem z prostředí: klíš'ata, určitá nematoda, *Caenorhabditis elegans* ad. (Braz a kol., 1999; Rao a kol., 2005; Kořený a kol., 2010). Podobnou skupinu, která šla ještě dál, tvoří vesměs paraziti nebo anaerobně žijící prvoci (*Giardia*, *Trichomonas*, *Entamoeba* ad.), kteří také nejsou schopni hem syntetizovat. Tyto organismy mají redukované mitochondrie a energii nezískávají oxidativní fosforylací, takže nepotřebují cytochromy (Kořený a kol., 2010). O ostatních hemových proteinech těchto zástupců není mnoho známo.

1.6.2 Hem u trypanosomatid

Trypanosomatida se zkoumají a zároveň i uměle kultivují již dlouhou dobu. Takže je obecně známým faktem, že jednou z esenciálních složek růstových médií je hem (případně hemin apod.) (da Silva a Roitman, 1990). Například u leishmánie je možné hem v médiu nahradit protoporfyrinem IX (Akilov a kol., 2007), což nasvědčuje přítomnosti ferochelátázy (poslední enzym syntézy hemu inkorporující železo do protoporfyrinové molekuly) v buňkách. Tu a další z enzymů detekovali Srivastava a kol. (1997). Naopak Sah a kol. (2002) testovali v pokusech s transgenními leishmániemi přítomnost tří dalších enzymů a získali pouze negativní výsledky. V genomu byly nalezeny geny pro poslední tři kroky této dráhy (Berriman a kol., 2005; Kořený a kol., 2010). Pro leishmánii jako vnitrobuněčného parazita je možná snazší transportovat do buněk prekurzory než samotný hem.

V genomu trypanozom nebyl nalezen žádný z genů hemové biosyntetické dráhy (Berriman a kol., 2005; Kořený a kol., 2010). V biochemických analýzách nedetekovali Lombardo a kol. (2003) aktivitu žádného ze tří testovaných enzymů ani několika meziproductů. Na rozdíl od leishmánie, při kultivaci trypanozom nelze dodávání hemu nahradit jeho prekurzorem protopofyrinem IX, takže zde s nejvyšší pravděpodobností chybí i ferochelátáza (Lara a kol., 2007).

Další zástupci trypanosomatid (*Crithidia deanei*, *C. oncopelti*, *C. desouzai*, *Blastocrithidia culicis*, *Herpetomonas roitmani*) také nemají sami o sobě schopnost syntetizovat hem. Obsahují ale uvnitř buněk bakteriální endosymbionty, kteří jim dodávají hem nebo meziproducty jeho syntézy (Sah a kol., 2002; Kořený a kol., 2010). Můžeme je

tedy kultivovat v definovaném médiu bez hemu. Chang (1974) experimentálně dokázal, že po přidání antibiotik se endosymbioti ztrácejí a *C. oncopelti* pro přežití hem potřebuje.

Da Silva a Roitman (1990) s překvapením zjistili, že do definovaného média pro *P. serpens* není zapotřebí dodávat hem. Vyloučili, že by se zde stejně jako u výše zmíněných druhů nacházeli bakteriální endosymbionti, neboť nebyli elektronovou mikroskopií nikdy pozorováni. Navíc kultura bez problémů roste v přítomnosti antibiotik. Autoři tedy navrhnou hypotézu, že *P. serpens* obsahuje eukaryotického endosymbionta, jež byl dosud zaměňován za buněčnou organelu. Dalším možným vysvětlením by byla přítomnost celé hemové biosyntetické dráhy. Pak by byla *P. serpens* jediným dosud známým trypanosomatidem s kompletní hemovou syntetickou dráhou a původ jejích genů by byl velmi zajímavý. Anebo je *P. serpens* prvním známým eukaryotickým organismem schopným žít bez hemu.

Prozkoumat možnosti syntézy hemu u *P. serpens* je předmětem této práce.

2. Cíle práce

- Porovnat přítomnost hemu v buňkách *Leishmania tarentolae*, *Phytomonas serpens*, procyklické *Trypanosoma brucei*.
- Provéřit výše zmíněné hypotézy o metabolismu hemu u *P. serpens*.
- Sledovat růst kultury *P. serpens* v závislosti na dostupnosti hemu.
- Ověřit přítomnost genu pro ferochelátazu (poslední enzym hemové biosyntetické dráhy) v genomu *P. serpens*.

3. Metodika

3.1 Kultury

Buňky *Phytomonas serpens* jsem pěstovala v definovaném médiu (Tab. II) podle da Silvy a Roitmana (1990) s přidáním penicilinu (2,5 U/ml) a streptomycinu (2,5 µg/ml), při stálé teplotě 27 °C. Část kultury rostla v tomto médiu s přidáním heminem (Sigma-Aldrich) v množství 5 µg/ml.

Kulturu procyklických buněk *Trypanosoma brucei* jsem pěstovala v médiu SDM-79 (Tab. I) (Brun a Schönenberger, 1979) s přidáním penicilinu (2,5 U/ml), streptomycinu (2,5 µg/ml), hygromycinu (50 µg/ml) a neomycinu (15 µg/ml), také při 27 °C.

Leishmania tarentolae jsem kultivovala v BHI médiu (Bacto Brain Heart Infusion BD) připraveném v množství 37 g/l s přidáním heminem (Sigma-Aldrich) (5 µg/ml), penicilinem (2,5 U/ml) a streptomycinem (2,5 µg/ml); také při 27 °C.

Buňky jsem počítala vždy pomocí Particle Count and Size Analyzer (Beckman Z2 Coulter). U *T. brucei* bylo nastaveno rozmezí velikostí 3,5 – 7,7 µm (Tl = 3,5 µm , Tu = 7,7 µm) a pro kultury *P. serpens* a *L. tarentolae* 2,0 – 4,5 µm (Tl = 2,0 µm , Tu = 4,5 µm).

Tab. I: Složení média SDM-79 podle: Brun a Schönenberger, 1979.

<u>SDM-79, 1 l</u>	
Graceho médium s L-glutaminem, bez NaCO ₃ (GIBCO)	2 g
glukóza	1 g
HEPES	8 g
MOPS	5 g
NaHCO ₃	2 g
kyselina pyrohroznová	100 mg
L-alanin	200 mg
L-arginin	100 mg
L-glutamin	300 mg
L-methionin	70 mg
L-fenylalanin	80 mg
L-prolin	600 mg
L-serin	60 mg
L-aurin	160 mg
L-threonin	350 mg
L-tyrosin	100 mg
adenosin	10 mg
guanosin	10 mg

D-glukosamin-HCl	50 mg
kyselina listová	4 mg
kyselina <i>p</i> -aminobenzoová	2 mg
biotin	0,2 mg
hemin	7,5 mg
fetální hovězí sérum (FBS) (PAA)	100 ml
pH = 7,3	

Tab. II: Složení definovaného média pro *Phytomonas serpens* podle: da Silva a Roitman, 1990.

<u>Definované médium pro <i>Phytomonas serpens</i>, 1 l</u>	
glukóza	20 g
β -glycerolfosfátdisodná sůl	5 g
kyselina citronová	0,5 g
citrát draselný	10 g
kyselina jablečná	0,2 g
kyselina jantarová	1 g
MgCO ₃	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
adenin	0,02 g
L-arginin HCl	0,4 g
L-fenylalanin	0,2 g
L-histidin	0,3 g
L-isoleucin	0,2 g
L-leucin	0,2 g
L-lysin HCl	0,1 g
L-methionin	0,2 g
L-tyrosin ethyl ester	0,2 g
L-threonin	0,1 g
L-tryptofan	0,1 g
L-valin	0,2 g
DL-serin	0,2 g
L-glutamin	0,2 g
kyselina listová	2 mg
nikotinamid	2 mg
pantotenát vápenatý	2 mg
riboflavin PO ₄ · H ₂ O, Na	1,2 mg
pyridoxamin 2 HCl	0,6 mg
thiamin HCl	0,6 mg
biotin	8 μ g
inositol	30 mg
stopové prvky (1000x)	1 ml
pH = 6,7	

3.2 Detekce hemu pomocí HPLC

Metoda vysokotlakové kapalinové chromatografie (HPLC) nám umožňuje velmi precizně kvantifikovat nekovalentně vázané formy hemu (hem *a*, *b*, *o*) u studovaných buněk. Hem je z buněk nejprve extrahován a poté separován na uhlíkaté C18 koloně (stacionární fáze) pomocí mobilní fáze představované dvěma různě polárními roztoky, jejichž vzájemný poměr se mění. Vzorek je tak rozdělen na jednotlivé složky dle jejich odlišné polarit. V průběhu separace je mobilní fáze spektrofotometricky analyzována v celém viditelném spektru. Díky standardům je známo, v jakém čase migrují jednotlivé formy hemu i jak vypadá jejich spektrum.

U všech studovaných organismů jsem stanovila obsah vnitrobuněčného hemu metodou HPLC. U obou kultur *P. serpens* i procyklické kultury *T. brucei* jsem použila vždy 5×10^9 buněk, u kultury *L. tarentolae* dvojnásobné množství, tedy 1×10^{10} buněk. Abych odstranila zbytky média a následnou analýzu provedla pouze z buněčného obsahu, promyla jsem buňky 3x opakovaně roztokem PBS (Tab. III) a centrifugovala (18 000 g, 5 min, 4 °C). K peletu jsem přidala ~ 10 % objemu silikátových kuliček (velikost 0,1 mm) a 1 ml zásaditého methanolu (s 0,2 % NH_4OH), do kterého se vymyje většina nepolárních sloučenin, nikoli však hem. Směs jsem protřepala na MiniBeadBeateru a následně centrifugovala (21 000 g, 10 min, 4 °C). Tuto extrakci metanolem jsem 3x zopakovala. Pro extrakci hemu z buněk jsem k peletu přidala 1 ml roztoku kyselého ledového acetonu (90 % aceton, 2 % HCl, 8 % H_2O) a směs jsem znovu protřepala a centrifugovala (21 000 g, 10 min, 4 °C). Poté jsem odebrala supernatant a nechala jej odpařit ve vakuové odparce do objemu přibližně 250 μl .

Z takto připraveného vzorku jsem odebrala 100 μl a dále analyzovala pomocí HPLC (Agilent-1200, Agilent) za použití RP kolony Nova-Pak C18 (velikost částic 4 μm , 3,9 x 150 mm; Waters). Odlišné formy hemu byly separovány lineárním gradientem roztoku B (40 % aceton, 60 % methanol) v roztoku A (30 % methanol v 0,5 M roztoku octanu amonného) v rozmezí od 50 % do 80 % roztoku B. Separace probíhala po dobu 30 min s průtokem 1 ml/min a při teplotě 40 °C. Jednotlivé typy hemu byly detekovány pomocí DAD detektoru (diode array detector) (Agilent-1200, Agilent) a kvantifikovány pomocí standardu heminu (Sigma-Aldrich).

Tab. III: Složení roztoku PBS.

<u>Roztok PBS, 1l</u>	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	3,21 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
pH = 7,4	

3.3 Detekce hemu na proteinech

3.3.1 Nativní gelová elektroforéza

S cílem detekovat jak nekovalentně, tak i kovalentně vázaný hem na proteinech jsem provedla nativní gelovou elektroforézu vzorků *L. tarentolae* a obou dvou kultur *P. serpens*. Použila jsem přibližně 1×10^8 buněk. Buňky jsem smíchala s 200 μ l pufru B (Tab. IV) a silikátovými kuličkami (velikost 0,1 mm, \sim 50 % objemu vzorku), protřepala na MiniBeadBeateru a následně centrifugovala (21 000 g, 10 min, 4 °C). Tento postup jsem 3x zopakovala a průběžně odebírala supernatant, který jsem následně použila jako rozpustnou frakci. Stočené membrány byly resuspendovány v pufru B a solubilizovány 2 % dodecyl-maltosidem po dobu 15 min. Vzorky jsem poté centrifugovala (21 000 g, 10 min, 4 °C) a supernatant použila jako membránovou frakci.

Tab. IV: Složení pufru B.

<u>pufr B</u>
25 mM MES NaOH
10 mM CaCl ₂
25 % glycerol
pH = 6,5

Nedenaturační polyakrylamidovou elektroforézu (PAGE) jsem provedla s komerčním gelem 4-16 % NativePAGE Bis-Tris Gel System (Invitrogen). Zaostřovací gel jsem ponořila do katodového pufru (Tab. V). Separační gel byl v anodovém pufru (50mM Bis-Tris/HCl, pH = 7,0). Na gel jsem nanasla vždy 20 μ l každého vzorku. Elektroforéza probíhala při napětí 10 V/cm při teplotě 4 °C.

Tab.V: Složení katodového pufru.

<u>Katodový pufr</u>
50 mM Tricine 15 mM Bis-Tris/HCl 0,02 % dodecyl-maltosid 0,05 % deoxycholát sodný pH = 7,0

3.3.2 Blotování gelu na membránu a barvení

Následně jsem vzorky z gelu přeblotovala na PVDF membránu. PVDF membránu jsem nejdříve namočila do methanolu na dobu 10 s, poté promyla v destilované vodě (5 min) a následně 10 min v karbonátovém pufru (Tab. VI). Blotování probíhalo v karbonátovém pufru při 40mA a 4 °C přes noc. Poté jsem membránu promyla v TTBS (Tab. VII) a následně blokovala v roztoku 0,2 % roztokem Tween (Tab. VIII) po dobu 60 min. Poté jsem ji 2x opláchla puftrem TTBS, redestilovanou vodou a osušila.

Hemové proteiny ve vzorcích jsem detekovala chemiluminiscencí pomocí SuperSignal Femto Kit (Pierce) jako substrátu. Tento kit je navržen pro imunologické značení, reaguje se sekundárními protilátkami, jež obsahují křenovou peroxidázu. Využívá se peroxidázové aktivity, která je vlastní všem typům hemu. Proto je možné tuto metodu využít pro detekci jakéhokoliv formy hemu (Feissner a kol., 2003). Inkubace se substrátem probíhala po dobu 5 min, chemiluminiscenci jsem detekovala pomocí systému Fuji LAB 4000 s dobou expozice 30 min.

Pro kontrolu blotování jsem membránu dále barvila pomocí Poinceau (0,1 % v 5 % kyselině octové) a následně opláchla v destilované vodě.

Proteiny na nativním gelu byly detekovány pomocí Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich). Gel jsem inkubovala v roztoku 40 % methanolu, 10 % kyseliny octové a 0,1 % Coomassie Brilliant Blue a poté odbarvila roztokem 7 % kyseliny octové, 10 % methanolu.

Tab. VI: Složení karbonátového pufru.

<u>Karbonátový pufr</u>
3 mM Na ₂ CO ₃ 10 mM NaHCO ₃ 10 % MeOH

Tab. VII: Složení roztoku TTBS.

<u>TTBS</u>
10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,2 % Tween 20 pH = 7,6

Tab. VIII: Složení blokovacího roztoku.

<u>Blokovací roztok, 500 ml</u>
10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1g Tween 20 pH = 7,6

3.3.3 SDS-PAGE

Pro účely detekce hemu *c* (kovalentně vázaný na proteiny), jsem vyzkoušela také metodu polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Použila jsem *L. tarentolae* a *P. serpens* pěstovanou v přítomnosti heminu, obou dvou organismů jsem měla $1,5 \times 10^9$ buněk, které jsem následně rozdělila do několika vzorků o různých koncentracích. Stejně jako při předchozí metodě i tentokrát jsem buňky nejprve opakovaně promyla v PBS (Tab. III) a pelet resuspendovala v 1 ml pufru B (Tab. IV). Konečné vzorky nanášené na gel obsahovaly 2,5 μ l 0,6 M TCEP (*tris*(2-karboxyethyl)fosfin), 1,5 μ l 20 % SDS, gradient 1 – 8 μ l buněk ($\sim 3 \times 10^8$ až $2,5 \times 10^9$ buněk) a pufr B (Tab. IV) doplněný do výsledného objemu 15 μ l.

Vlastní elektroforéza probíhala v 4-15 % gelu (Tab. IX), zpočátku 15 min při 100 V a 8 mA, následně při 150 V a 15 mA. Blotování a detekci hemu na membráně jsem provedla podle postupu popsáném v kapitole 3.3.2.

Tab. IX: Gel pro SDS-PAGE.

	4 % zaostřovací gel	15 % separační gel
H ₂ O	1,4 ml	2,3 ml
30 % akrylamid	330 µl	5,0 ml
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	-	2,5 ml
1 M Tris HCl (pH 6,8)	250 µl	-
20 % SDS	20 µl	100 µl
TEMED	2 µl	4 µl
10 % APS (persulfát amonný)	20 µl	100 µl

3.4 Růstové křivky

U *P. serpens* jsem sledovala růst počtu buněk v průběhu několika dní a ze získaných údajů vypracovala růstové křivky. Buňky jsem počítala pomocí Particle Count and Size Analyzer (Beckman Z2 Coulter) v rozmezí velikostí 2,0 – 4,5 µm (Tl = 2,0 µm , Tu = 4,5 µm). Takto jsem vyhodnotila kulturu pěstovanou s přidavkem heminu i bez něj. Také obě dvě tyto kultury s přidáním H₂O₂ o koncentraci 100 µM. Všechny kultury rostly při stálé teplotě 27 °C, kultivační nádoby byly umístěné na třepačce. Během pokusu jsem buňky několikrát ředila novým médiem (ředěno 2-3x každých 1-2 dny) , abych získala růstové křivky v exponenciální fázi růstu v delším časovém úseku, naměřené počty buněk jsem následně vynásobila odpovídajícím počtem ředění.

3.5 PCR

Metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) jsem se pokusila amplifikovat gen pro ferochelátázu za použití primerů navržených podle *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. major* a *Crithidia* sp. ATCC 30255 (Tab. X). Z buněk *L. tarentolae* a *P. serpens* jsem izolovala DNA pomocí kitu GenScript TissueDirect Multiplex PCR Systém. Reakce probíhala v gradientovém termocycleru při standardních podmínkách a za různých nasedacích teplot pro primery.

Získané produkty jsem elektroforeticky rozdělila na 1 % agarózovém gelu, odkud jsem je vyizolovala pomocí Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) a dále zaklonovala do

komerčního plazmidu (pGEM-T Easy, Promega). Zaklonované produkty jsem transformovala do kompetentních buněk (kmen XL-1). Pomocí PCR za použití plazmidových primerů (M13 forward a M13 reverse) jsem si ověřila přítomnost produktů v koloniích. Z pozitivních kolonií jsem vyizolovala plazmidovou DNA za použití QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Sekvenační reakce a analýza sekvencí byla provedena v servisní laboratoři (Laboratoř genomiky, ÚMBR, Biologické centrum AVČR, v.v.i.).

3.6 RT-PCR

Přítomnost a expresi genu pro ferochelátázu u *Phytomonas serpens* jsem zjišťovala rovněž pomocí metody Reverse Transcription PCR (RT-PCR).

Z buněk jsem vyizolovala RNA pomocí TRI Reagent (MRC) podle manuálu výrobce. Dále jsem použila M-MLV Reverse Transcriptase Rnase H Minus (Promega) k získání cDNA. Tu jsem použila pro PCR a postupovala obdobně jako při použití genomové DNA.

Tab. X: Primery použité pro PCR (F = forward, R = reverse).

F1	5'- TGG GCA CSA CGA CTG CAC CAA C-3'
F2	5'- TTC GCA GKT TCC TGC GCG AGT T-3'
F3	5'- CTT TCC GAT CGC CGR GTC-3'
F4	5'- GGC TTT YTC RTG CCR TTR CGC CC-3'
R1	5'- GGC GCC ATG GCA AAY CAG A-3'
R2	5'- GGT CTC CAC ACA GTC CAC AGC AAA GCC-3'
R3	5'- GTC YCT GTC GTT GAG GCA SGG-3'

4. Výsledky

4.1 Kultivace

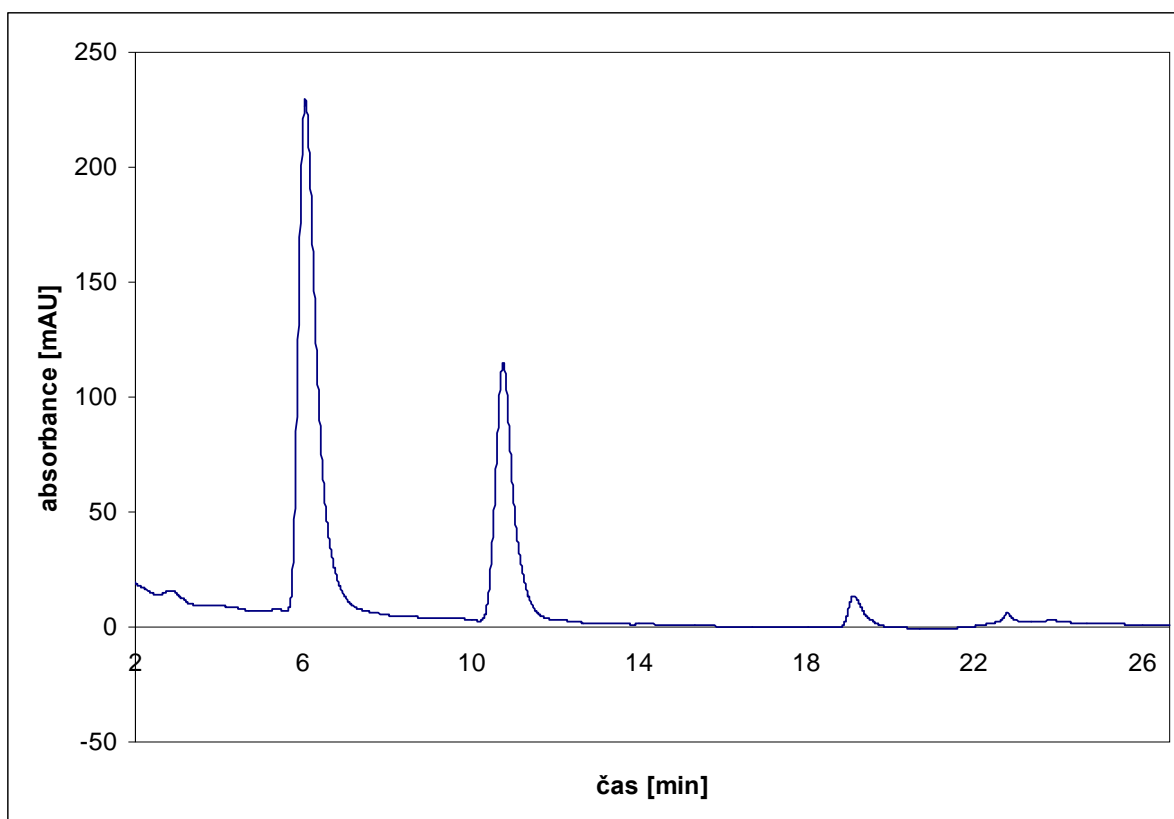
Podarilo se nám udržet kulturu *Phytomonas serpens* přibližně 1 rok v nepřetržité kultuře v definovaném médiu bez hemu. To je jednoznačný důkaz, že tento organismus pro přežití nepotřebuje získávat hem z média.

4.2 HPLC

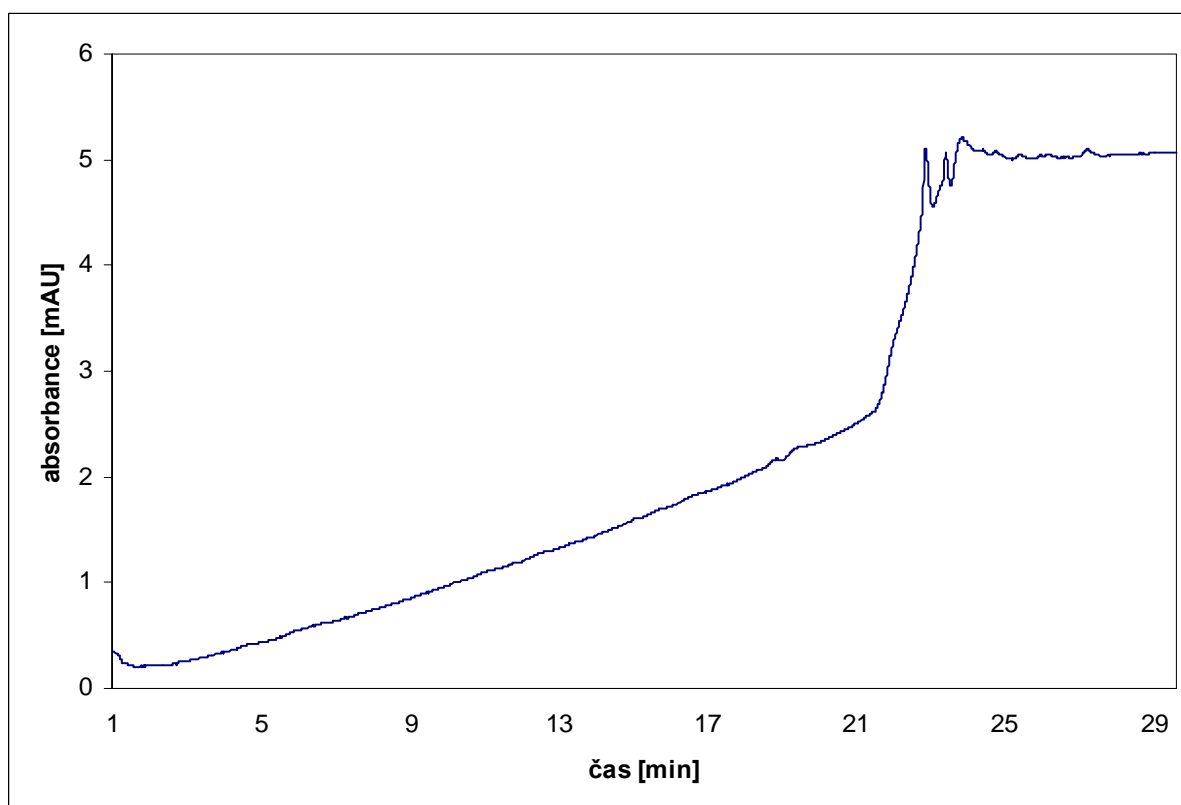
Ve výsledných grafech z HPLC analýzy kultur *P. serpens* pěstované v přítomnosti heminu, *L. tarentolae* a procyklické formy *T. brucei* jsou vidět zřetelné píky v 7. a 11. minutě a jeden méně jasný a různě vysoký v 20. minutě (obr. 1, 2, 3). Z bližší analýzy je patrné, že se jedná opravdu o hem, výsledné časy a maximální absorbance při vlnové délce 400 nm odpovídají hodnotám známým pro hem (Barros a kol., 2002). Konkrétně se jedná o hem *b* v 7. minutě (obr. 4), hem *a* v 11 minutě (obr. 6) a hem *o* ve 20. minutě. Pro tato spektra jsem u všech studovaných organismů získala obdobné výsledky. Pro podložení tohoto tvrzení jsem provedla i HPLC analýzu bakterie *Escherichia coli* (obr. 5), pro niž jsou tyto údaje známe a je pro ni typické vysoké zastoupení hemu *o* (Puustinen a Wikström, 1991; Saiki 1993). Získané výsledky dobře korelují se studovanými trypanosomatidy. Dále jsem testovala i čistý vzorek heminu (Sigma-Aldrich) a dle předpokladu je v grafu patrný pouze jeden výrazný pík v čase 7 minut odpovídající hemu *b* (obr. 7). Spektrum tohoto vzorku je shodné se vzorky trypanosomatid (obr. 4, 6 a 8).

Ve výsledku analýzy kultury *P. serpens* pěstované v definovaném médiu bez hemu není patrný žádný z typů hemu ani při velmi detailním měřítku (obr. 9).

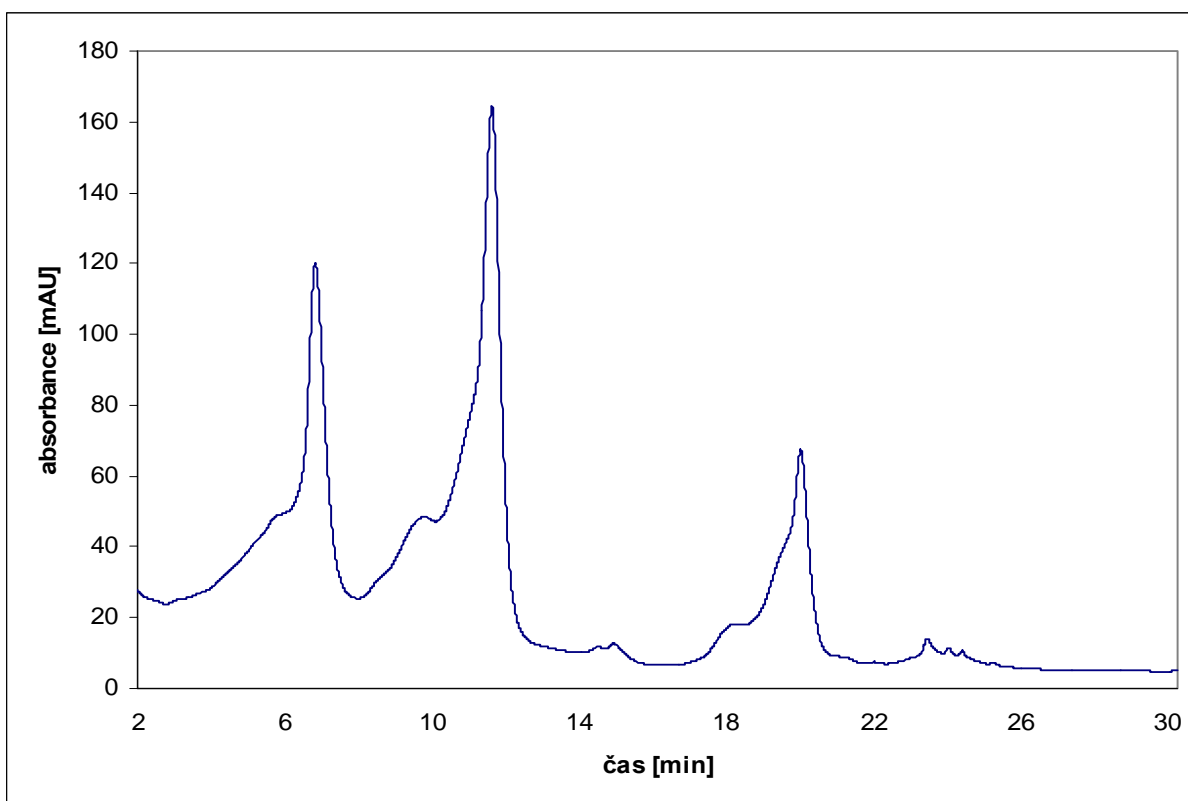
Díky tomu, že jsem všechny analýzy prováděla z přesně stanoveného množství buněk, mohla jsem porovnávat i maximální hodnoty jednotlivých píků, které odrážejí skutečné množství hemu přítomného v buňkách. U *P. serpens* jsou výrazně nejnižší, tedy i množství hemu v buňkách je výrazně nižší než u ostatních kultur (obr. 1). Naopak *L. tarentolae* obsahuje v buňkách několikanásobně vyšší množství hemu (obr. 2). I když vezmeme na vědomí, že jsem použila pro analýzu dvojnásobné množství buněk, tento rozdíl zůstává stále výrazný.



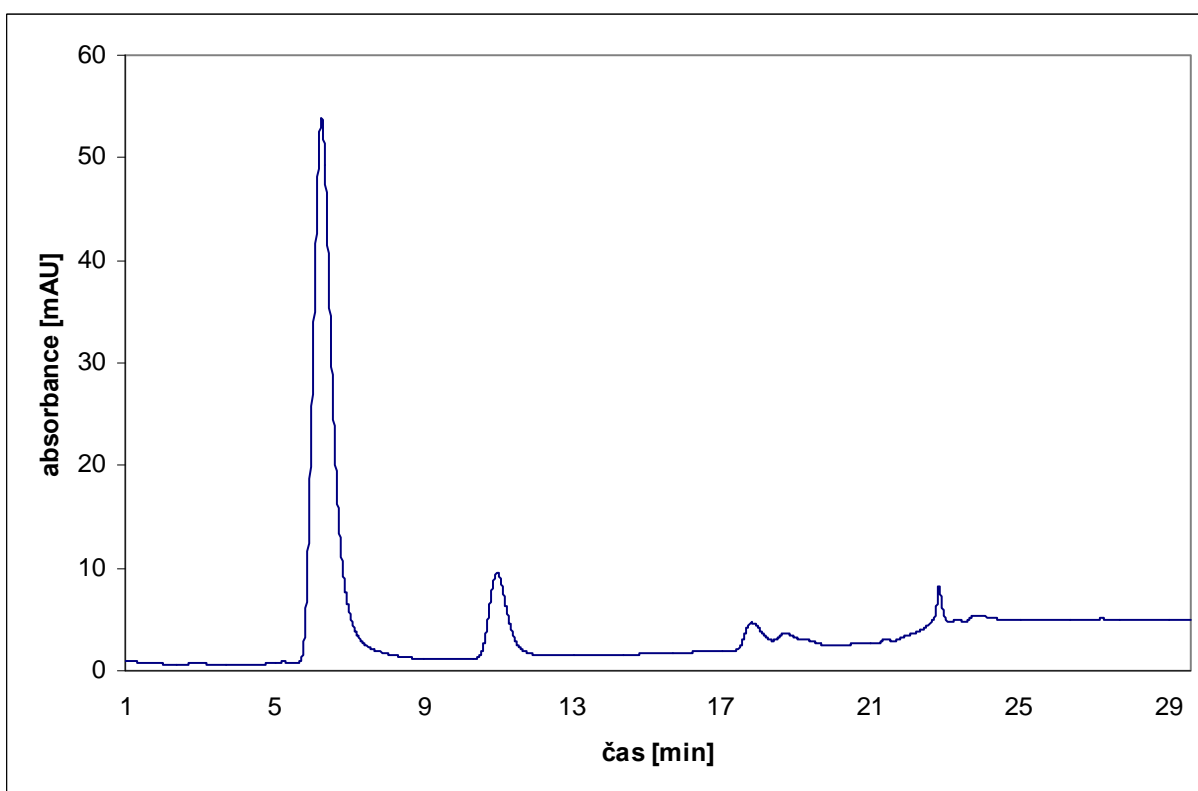
Obr. 1: Analýza buněk *P. serpens* pěstovaných v definovaném médiu s přidaným heminem, vlnová délka = 400nm.



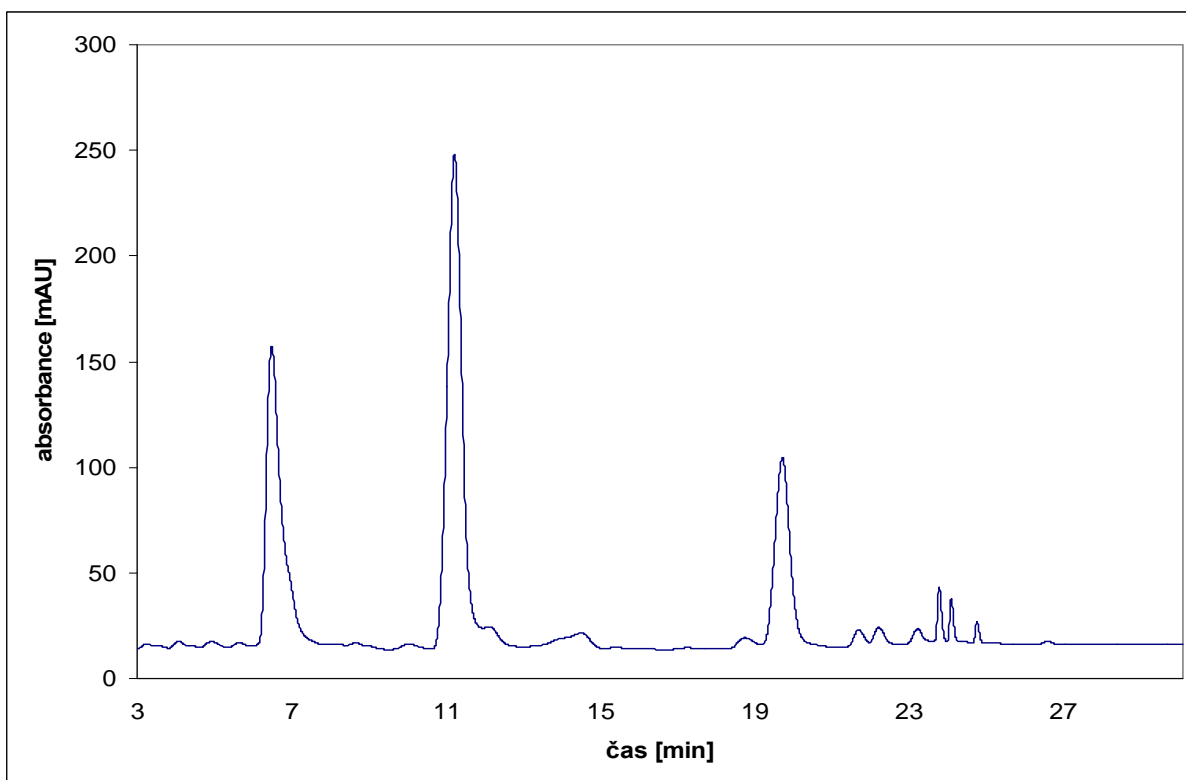
Obr. 9: Analýza buněk *P. serpens* z definovaného médiu bez heminu, vlnová délka = 400nm.



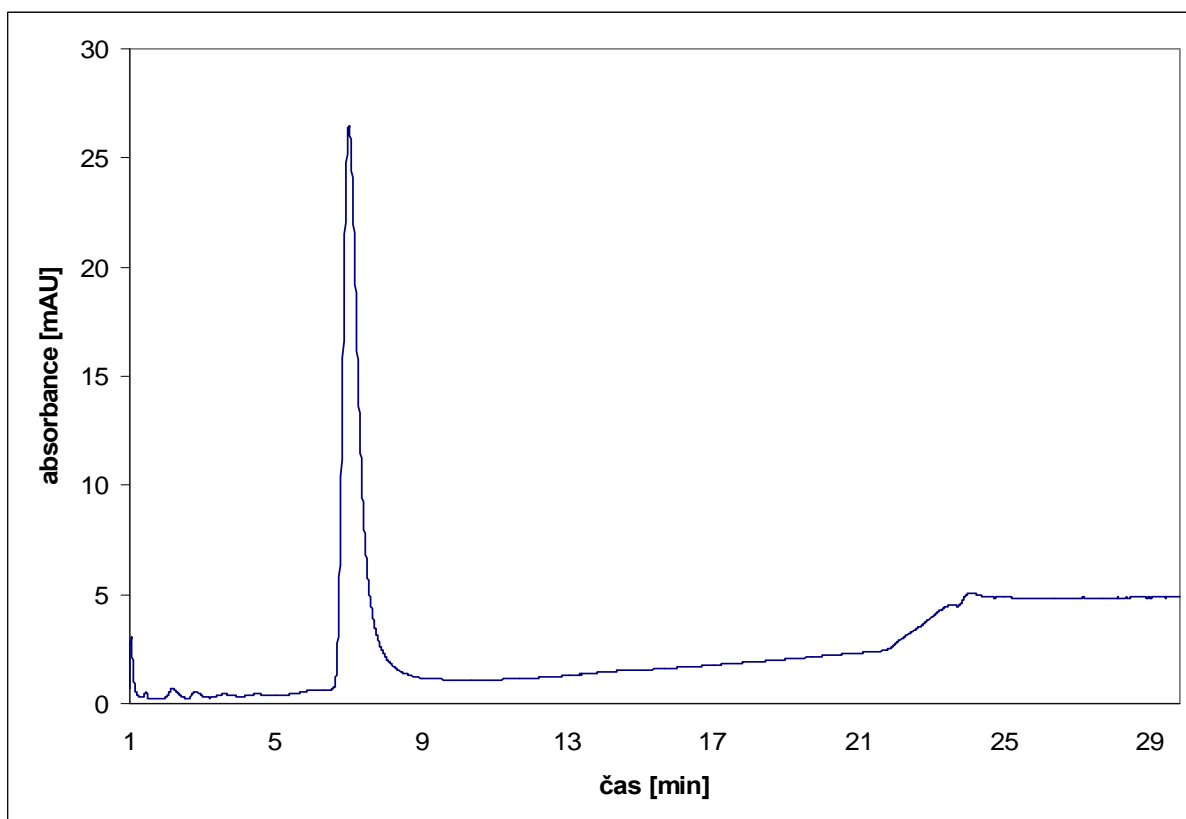
Obr. 2: Analýza buněk *L. tarentolae*, vlnová délka = 400nm. Píky nejsou úplně ostré a maximální hodnoty tedy úplně neodpovídají skutečnosti. Je to pravděpodobně způsobeno koncentrací soli ve vzorku, na níž je HPLC analýza velmi citlivá.



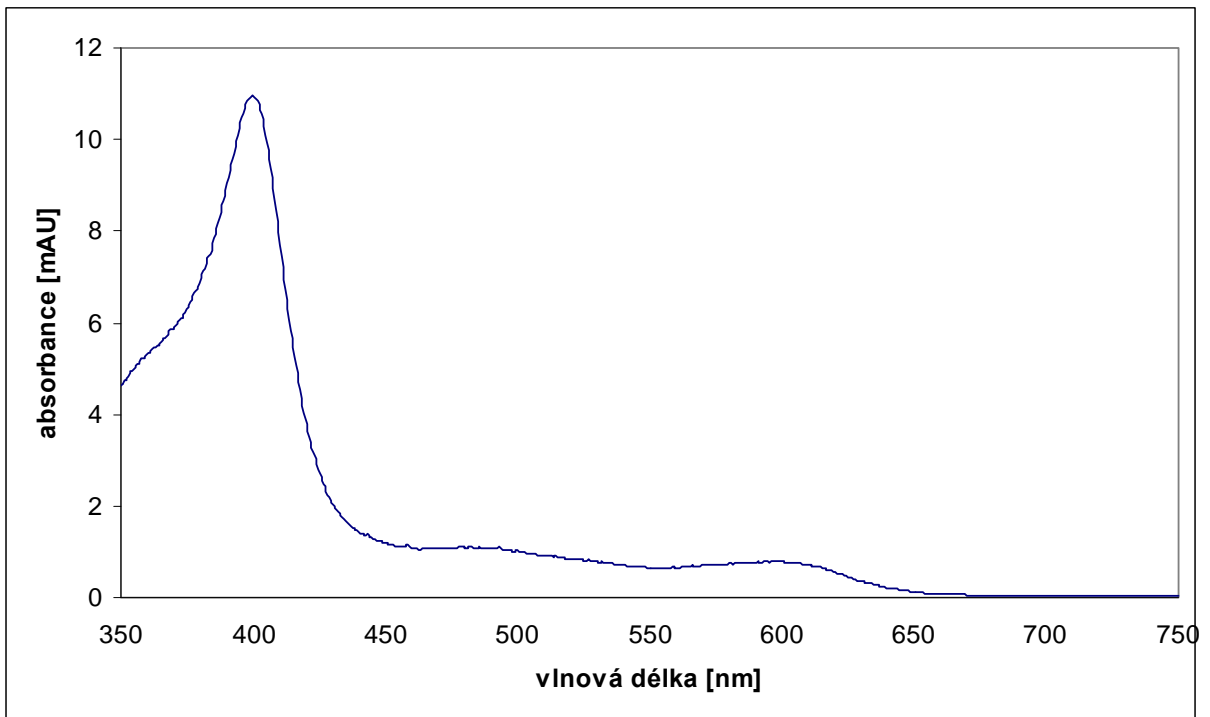
Obr. 3: Analýza procyklických buněk *T. brucei*, vlnová délka = 400nm.



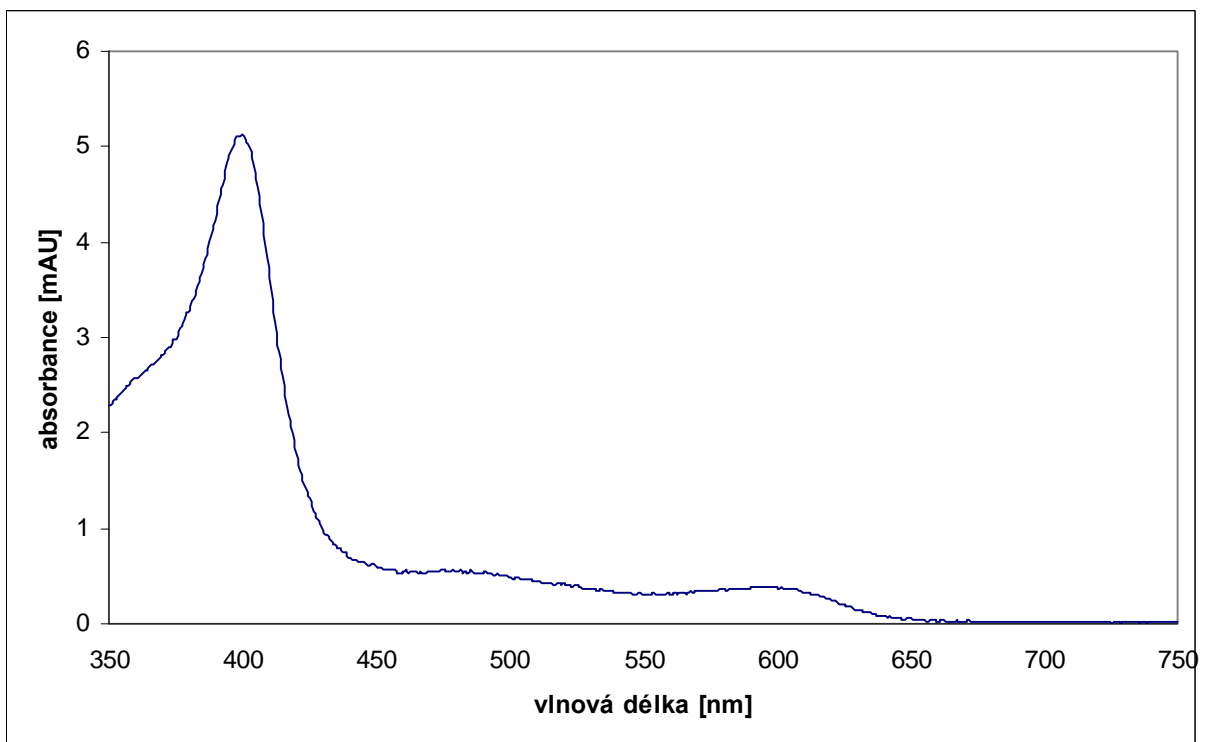
Obr. 5: Analýza buněk *E. coli*, vlnová délka = 400nm.



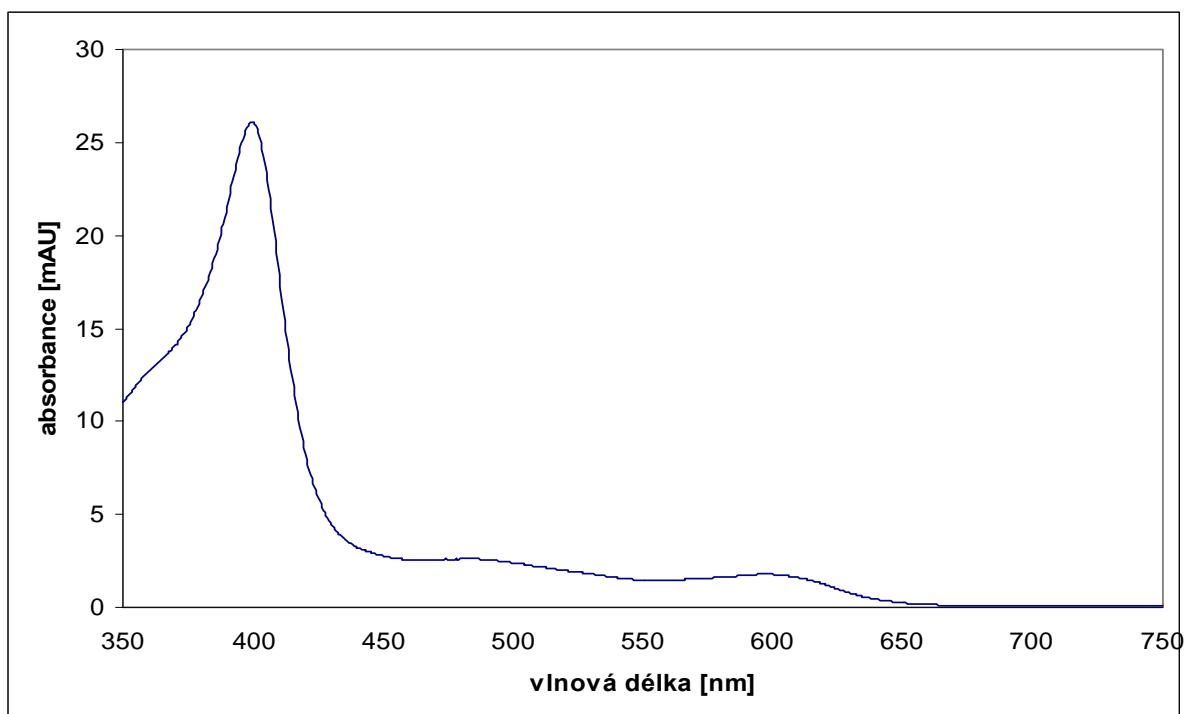
Obr. 7: Standard heminu (Sigma), vlnová délka = 400nm.



Obr. 4: Hem *b* z kultury *P. serpens* pěstované s heminem. Spektrum v čase 7 min.



Obr. 6: Hem *a* z kultury *P. serpens* pěstované s heminem. Spektrum v čase 11 min.

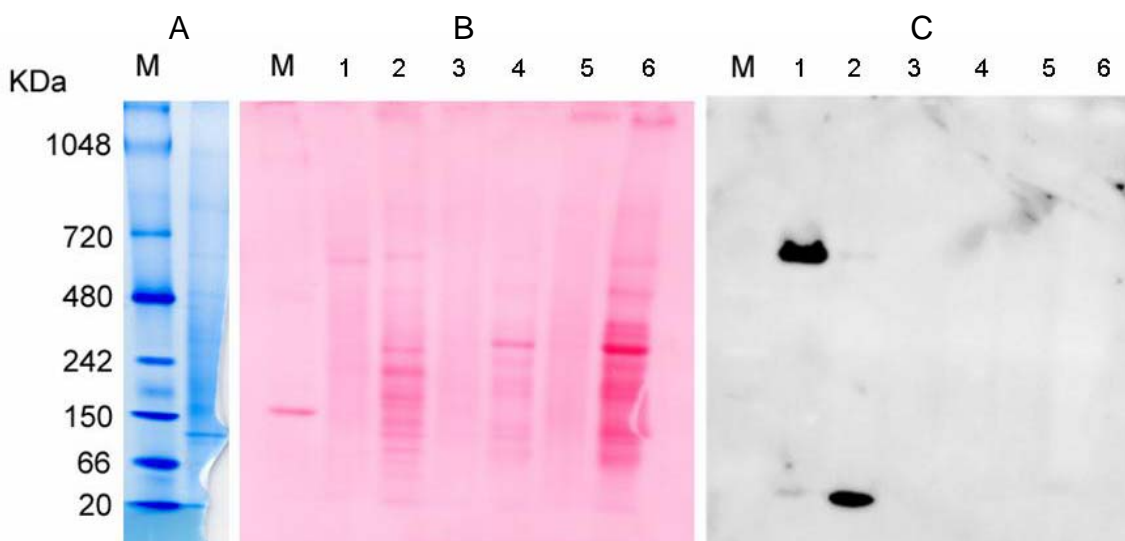


Obr. 8: Hemin (Sigma-Aldrich). Spektrum v čase 7 min.

4.3 Nativní gelová elektroforéza

V předchozí analýze HPLC jsem se zabývala přítomností hemu typů *a* a *b* u různých zástupců trypanosomatid. Nežískala jsem tak ale žádné informace o hemu *c*, který je vázaný na proteiny kovalentní vazbou, a proto jej nelze pomocí HPLC detekovat. Abych zjistila, zda je hem u *P. serpens* vázaný na proteiny, přistoupila jsem k metodě nativní gelové elektroforézy (a blotování na membránu) u kultur *L. tarentolae* a dvou výše zmiňovaných kultur *P. serpens*.

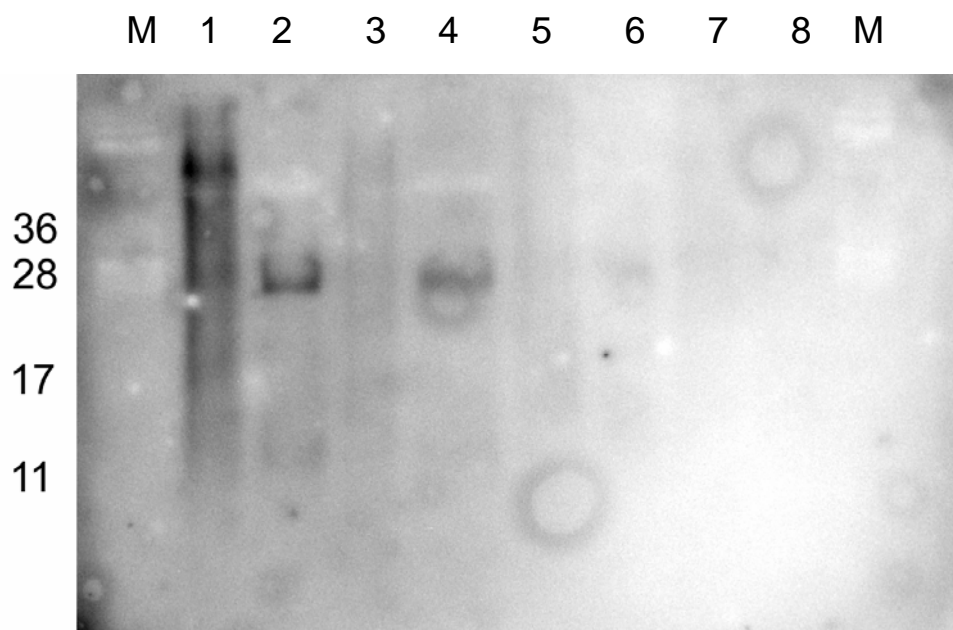
Pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue jsem prokázala přítomnost membránových proteinů na gelu ve vzorku *P. serpens* (pěstované v přítomnosti heminu) (obr. 10A). Pokračovala jsem tedy dále a vzorky z gelu přeblotovala na membránu, z obr. 10B je zřejmé, že se proteiny u všech vzorků na membránu opravdu přenesly. Provedla jsem tedy i značení chemiluminiscencí s cílem detekovat hem. U vzorků *L. tarentolae* z membránové i rozpustné frakce jsou vždy jasné signály značící přítomnost hemu v buňkách. Pravděpodobně se jedná o hem *c*, zatímco hem typu *a* i *b* se z proteinů vyvázal i za nedenaturačních podmínek. V žádném ze vzorků *P. serpens* (membránová a rozpustná frakce z kultur pěstovaných s heminem i bez heminu) není patrný žádný signál (obr. 10C).



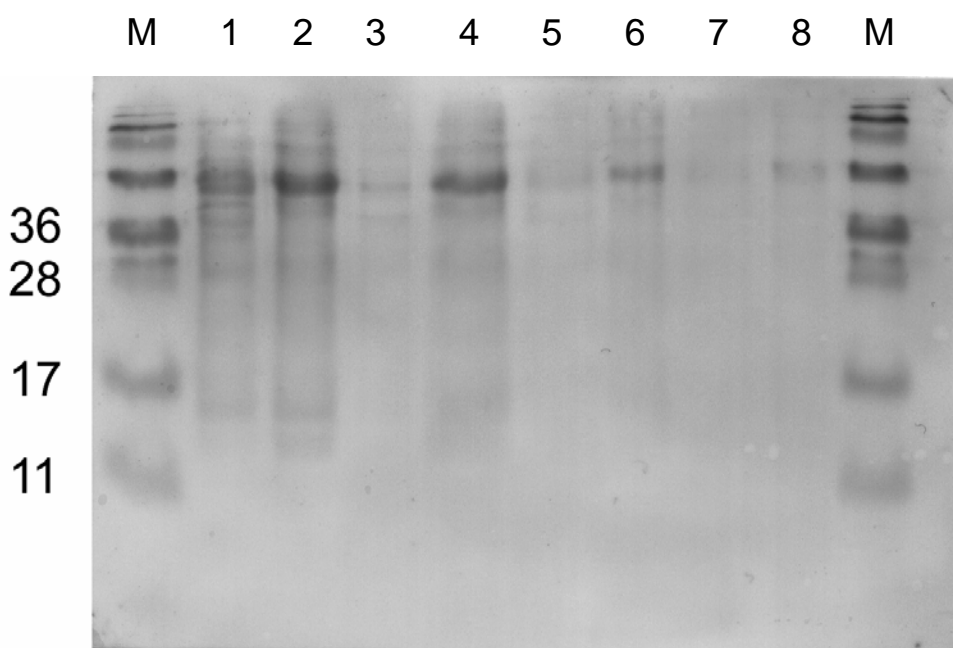
Obr. 10: A - gel obarvený Coomassie Brilliant Blue: *P. serpens* (pěstovaná v přítomnosti heminu) membránová frakce, M - marker
 B: membrána barvená na proteiny: 1- membránová frakce *L. tarentolae*, 2 – rozpustné proteiny *L. tarentolae*, 3 - membránová frakce *P. serpens* s heminem, 4 – rozpustná frakce *P. serpens* s heminem, 4 – membránová frakce *P. serpens* bez heminu, 5 – rozpustná frakce *P. serpens* bez heminu, M - marker
 C: membrána barvená chemiluminiscencí: stejné vzorky jako v předchozí části

4.4 SDS-PAGE

Pro další analýzu získaných výsledků jsem vyzkoušela polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v přítomnosti dodecylsírnanu sodného (SDS-PAGE). Vzorky jsem značila chemiluminiscencí a opět se ukázal výrazný signál pouze u *L. tarentolae* (obr. 11). Jasný je signál v oblasti 30 kDa, méně jasný o velikosti asi 12 kDa. Další vzorky byly z kultury *P. serpens* pěstované v přítomnosti heminu, ani při nejvyšší koncentraci buněk ($8 \mu\text{l} \approx 2 \times 10^6$ buněk) se neukázal jasný signál. Barvení membrány pomocí Poinceau (obr. 12) potvrdilo, že se všechny vzorky na membránu opravdu přeblotovaly.



Obr. 11: SDS-PAGE membrána barvená chemiluminiscencí, 1, 3, 5, 7 – *L. tarentolae*; 2, 4, 6, 8 – *P. serpens* pěstovaná v přítomnosti heminu. Množství buněk ve vzorcích: 1,2 – 8 μ l; 3, 4 – 4 μ l; 5,6 – 2 μ l; 7, 8 – 1 μ l; M - marker.



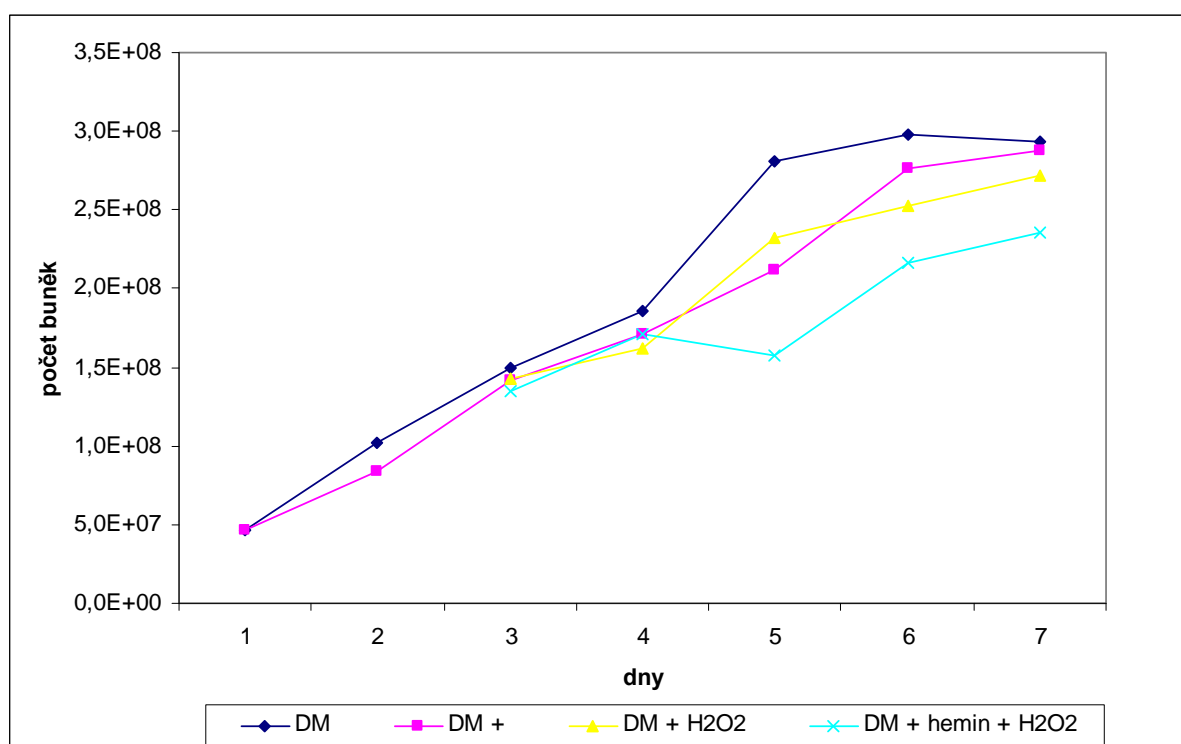
Obr. 12: Membrána z obr. 11 barvená pomocí Ponceau pro detekci proteinů. Vzorky stejně jako na obr. 11.

4.5 Růstové křivky

Po zjištění, že *P. serpens* nemusí mít v buňkách žádný hem, jsem přistoupila k pokusu porovnat růst kultur v médiích lišících se pouze obsahem heminu.

Po dobu 7 dnů jsem sledovala růst dvou různých kultur *P. serpens*: kultury pěstované v čistém definovaném médiu a kultury z definovaného média s přidaným heminem. Naměřené hodnoty jsou vyneseny v grafu na obr. 15. Abych mohla sledovat reakci těchto dvou odlišných kultur na oxidativní stres, přidala jsem k části z nich navíc 100 μM H_2O_2 .

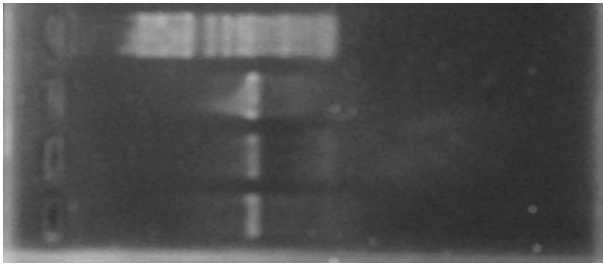
Naměřené množství buněk se nijak výrazně neliší v závislosti na přidaném heminu. Oxidativní stres vyvolaný peroxidem vodíku neměl výrazný efekt na žádnou z kultur.



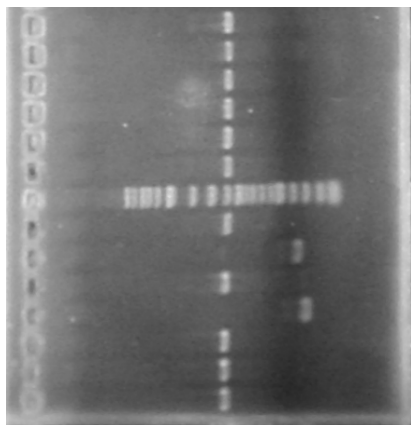
Obr. 15: Růstová křivka 4 různých kultur *P. serpens*: DM = kultura pěstovaná v definovaném médiu, DM+ = kultura pěstovaná v definovaném médiu s přidaným heminem, DM + H_2O_2 = kultura pěstovaná v definovaném médiu s přidaným 100 μM H_2O_2 , DM + hemin + H_2O_2 = kultura pěstovaná v definovaném médiu s přidaným heminem a 100 μM H_2O_2 . Hodnoty jsou průměry ze dvou souběžných opakování.

4.6 PCR

Gen pro ferochelatázu byl úspěšně amplifikován a následně osekvenován pouze z genomové DNA *L. tarentolae* (obr. 13, 14). U vzorků z *P. serpens* se mi podařilo amplifikovat pouze nespecifické produkty, ačkoliv jsem se snažila metodu různými způsoby optimalizovat a použila jak z genomovou DNA, tak i metodu RT-PCR.



Obr. 13: Gelová elektroforéza produktů získaných reakcí PCR při použití DNA *L. tarentolae*.



Obr. 14: Gelová elektroforéza produktů získaných reakcí PCR z buněk *E. coli*, potvrzení přítomnosti inzertů v plazmidech.

5. Diskuze

Už da Silva a Roitman (1990) si všimli, že není zapotřebí přidávat do definovaného média pro *P. serpens* žádný hem. To jsem potvrdila tím, že se mi podařilo udržet nepřetržitou kulturu po dobu zhruba jednoho roku v definovaném médiu bez heminu i jeho prekurzorů. Výše zmínění autoři zamítli jako vysvětlení přítomnost prokaryotického symbionta. Koneckonců, kultura roste velmi dobře i s antibiotiky, na rozdíl od *Crithidia oncopelti*, která opravdu získává hem od bakteriálních endosymbiontů (Chang, 1974). Zmiňovaní autoři navrhnou originální vysvětlení, že by v buňkách mohl být přítomný eukaryotický endosymbiont, kterého si jen doposud nikdo nevšiml. Dalším možným vysvětlením by byla přítomnost celé hemové biosyntetické dráhy. Pak by ovšem *P. serpens* byla prvním známým zástupcem trypanosomatid, který tuto dráhu má, a původ jejích genů by byl velmi zajímavým tématem. Rovněž velmi pozoruhodná je ta možnost, že *P. serpens* nepotřebuje hem ke svému životu vůbec.

Z výsledků analýzy HPLC můžeme jednoznačně konstatovat, že pokud se *P. serpens* pěstuje v médiu bez hemu, neobsahuje v buňkách žádný hem *a* ani *b* (obr. 9). V kultuře není možné detekovat ani minimální množství hemu i za použití velmi senzitivní metody jakou je HPLC. Zároveň ale, pokud se hemin do média přidá, organismus je schopný jej transportovat do buněk. V analýze kultury *P. serpens* pěstované v přítomnosti hemu jsem získala dva jasné píky odpovídající hemu typů *b* a *a* (obr. 1). S největší pravděpodobností jsou tedy buňky schopné přijatý hem *b* dále metabolizovat přes hem *o*-syntázu a hem *a*-syntázu až na hem *a*.

Stále jsme ale nemohli vyloučit, zda kultury neobsahují také hem *c*, který je kovalentně vázaný na proteiny (Cheek a Dawson, 2007) a metodou HPLC se tedy nedá detekovat. Proto jsem kultury podrobila SDS-PAGE. Výsledky jasně ukázaly, že hem *c* je přítomný u *L. tarentolae*, ale nebyl detekován u *P. serpens* pěstované s heminem (obr. 11). Tento závěr je celkem logický, neboť hem *c* se nachází pouze v proteinech dýchacího řetězce (Reedy a kol., 2008) a ten u *P. serpens* chybí (Tielens a Van Hellemond, 1998).

S cílem potvrdit a dále rozvést výsledky HPLC jsem přistoupila k nativní gelové elektroforéze. Chtěla jsem zjistit, zda je hem přítomný v buňkách také vázán do proteinů. V tomto ohledu metoda selhala, neboť se podařilo detekovat signál pouze u buněk *L. tarentolae* a u žádné z kultur *P. serpens* (obr. 10). Označené hemové proteiny obsahují s největší pravděpodobností jako kofaktor opět hem *c*. Díky kovalentní vazbě je spolehlivě detekovatelný, zatímco zbývající dva nekovalentně vázané typy hemu se pravděpodobně

vlivem vnějších podmínek během analýzy z proteinů odštěpily. Navíc jeden ze signálů *L. tarentolae* se dle velikosti shoduje při použití dvou různých metod (obr. 10 a 11).

Kombinací výše zmíněných přístupů jsem došla k závěru, že v buňkách *P. serpens* nemusí být přítomný hem *a*, *b* ani *c*. Takže můžeme vyloučit hypotézu, že by tento zástupce trypanosomatid měl celou hemovou biosyntetickou drahou a stejně tak i alternativní možnost zahrnující endosymbionta. Zároveň ale platí, že pokud má *P. serpens* hem dostupný z prostředí, dokáže jej transportovat do buněk a pravděpodobně i dále metabolizovat. Snažila jsem se tedy zjistit, zda organismus tento kofaktor také zabudovává do proteinů. Při použití metody nativní elektroforézy byly ale podmínky stále moc drsné a nekovalentní vazby se rozštěpily. V budoucnu bude tedy nutné zvolit jiný přístup, např. LDS-PAGE.

Zajímalo nás také, zda hemin přidaný do média nějak podporuje růst kultur *P. serpens*. Proto jsem měřila počet buněk dvou kultur v médiích, jež se od sebe lišila pouze přítomností heminu. Ze získaných údajů jsem vypracovala růstové křivky. Ve výsledném grafu (obr. 15) není vidět výrazný rozdíl mezi těmito dvěma kulturami. Nejenže je *P. serpens* schopná přežít bez hemu, ale je schopná se bez tohoto koenzymu normálně množit a trvale růst. Zároveň z mých výsledků ale nevyplývá, že by přidaný hemin znatelně zvýšil růst kultury.

Abych ověřila hypotézu, zda buňka hem využívá pro obranu proti oxidativnímu stresu (např. peroxidázy), měřila jsem také růstové křivky v podmínkách oxidativního stresu. Přidaný peroxid vodíku nijak výrazně neovlivnil růst ani jedné ze dvou studovaných kultur nebo je potlačil přibližně stejně, naměřené rozdíly nejsou nijak výrazné. Je možné, že buňky ovládají další mechanismy obrany proti oxidativnímu stresu a nespolehají se na okolní zdroje heminu. Jedním z těchto dalších mechanismů může být například superoxid dismutáza, nehemový metaloenzym podílející se na obraně proti oxidativnímu stresu, který byl u *Phytomonas* detekován (Marín a kol., 2004) Existují i katalázy (jedny z hlavních enzymů zabraňujících oxidativnímu stresu), které využívají místo hemu jako kofaktor mangan (Rochat a kol., 2006) Získané výsledky bude nutné dále ověřit a pokus zopakovat za různých podmínek.

Hem potenciálně přítomný v buňkách *P. serpens* slouží s největší pravděpodobností jako kofaktor cytosolických enzymů (peroxidázy, katalázy ad.). Méně pravděpodobná je představa, že buňky tento hem pouze nespecificky přijímají, ale není inkorporován do proteinů. Tuto možnost se bohužel nepodařilo výše popsány metodami prověřit.

S ohledem na druhy *Leishmania* a *Crithidia*, které mají poslední tři enzymy hemové biosyntetické dráhy, je stále možné i to, že příslušné geny jsou přítomné i v genomu *P. serpens*, ale nejsou exprimovány nebo nejsou jejich produkty funkční. Proto jsem u *P. serpens*

pomocí PCR hledala gen pro ferochelatázu, poslední z enzymů hemové biosyntetické dráhy. Právě tento gen jsem zvolila záměrně kvůli případu leishmánie, která nemá celou hemovou dráhu, ale jen poslední tři kroky (Berriman a kol., 2005). Takže pokud by *P. serpens* měla alespoň některé z genů pro syntézu hemu, s největší pravděpodobností by mezi nimi byla právě ferochelatáza. Nicméně přestože se nám podařilo ji detekovat u *L. tarentolae*, u *P. serpens* byly veškeré pokusy s různě nastavenými podmínkami vždy neúspěšné. Na základě těchto negativních výsledků považuji za velmi nepravděpodobné, že by byl v genomu *P. serpens* přítomný některý z genů pro hemovou biosyntetickou dráhu, naprosto vyloučit tuto možnost ovšem nelze. Případně by mohla mít nějaký s velmi pozměněnou sekvencí. To je velmi nepravděpodobné vzhledem ke skutečnosti, že u příbuzných druhů (*Leishmania*, *Crithidia*) jsou tyto sekvence velmi konzervativní .

Zkrátka, *P. serpens* hem k životu nepotřebuje. Ze získaných dat tedy vyplývá, že se jedná o první známý eukaryotický organismus schopný žít bez hemu. Jsou známi živočichové, především paraziti, kteří postrádají hemovou biosyntetickou dráhu (klíšťata, některá nematoda, hlenky, háďátka *Caenorhabditis elegans* ad.), ale získávají hem od svých hostitelů (Kořený a kol., 2010). Zároveň musíme vzít na vědomí, že někteří z nich (*Trichomonas*, *Giardia*, *Entamoeba* ad.) stejně jako *P. serpens* nemají dýchací řetězec a energii získávají pouze glykolýzou. Nové informace o těchto prvocích vyplynuly z osekvenování genomů: žádný z genů hemové syntetické dráhy nebyl nalezen, u *Trichomonas vaginalis* se nepodařilo identifikovat žádný protein, který by využíval hem jako kofaktor (Doležal a kol., 2007), u *Giardia intestinalis* byl identifikován homolog flavohemoglobinu (Smith a kol., 1998). Je tedy možné, že ani tito prvoci hem ke svému životu nepotřebují. Tento předpoklad se ale v současnosti nedá snadno ověřit, neboť se u zmíněných parazitů těžko získává axenická kultura, natož aby byli kultivováni v definovaném médiu.

Zatím jsou známy pouze prokaryotické organismy, které nepotřebují hem k životu např. *Enterococcus faecalis* (Frankenberg a kol., 2002). Pro některé řady bakterií platí, že hem k životu nepotřebují, ale pokud jim je dodán, indukuje vznik cytochromů a přechod na oxidativní respiraci namísto substrátové fosforylace (Gaudu a kol., 2002; Pedersen a kol., 2008).

Z výše popsaných výsledků si tedy můžeme vytvořit představu, jak *P. serpens* funguje v přirozeném prostředí. Protože žije v prostředí velmi bohatém na cukry, mohla si dovolit ztratit dýchací řetězec a tím pádem i cytochromy. Pokud nepotřebuje nejvýznamnější hemové proteiny, pravděpodobně nestojí za to udržovat si nějakých osm enzymů a k nim všechny potřebné geny. Pravděpodobně tedy nespolehá na vnější zdroje hemu (o nichž nemáme tušení,

jak jsou velké nebo stálé), ale využívá jiné mechanismy obrany proti oxidativnímu stresu, než jsou hemové peroxidázy. Pokud budeme ale vycházet z předpokladu, že hem je v živých systémech naprosto esenciální a všudypřítomnou molekulou, dojdeme k hypotéze, že se v parazitovaných rostlinných buňkách nachází v nemalém množství a pro *P. serpens* je běžně dostupný. Bohužel stále nevíme, k čemu jej pak využívá. Nejpravděpodobnější možností se zdá být obrana proti oxidativnímu stresu, ačkoliv to mé pozorování nepotvrdilo. Této druhé teorii nasvědčují výsledky z HPLC analýzy kultury pěstované s heminem. Na jejich základě můžeme předpokládat, že buňky ovládají nejen určitý transportní systém pro hem, ale také enzymatický aparát pro syntézu hemu *a*.

Úplně nezajímavé nejsou ani výsledky získané analýzou zbývajících dvou zástupců trypanosomatid. Data z HPLC odpovídají skutečnému množství hemu obsaženého v buňkách. Díky tomu, že jsem vždy použila přesně stanovené množství buněk, můžeme jednotlivé výsledky navzájem porovnávat. Procyklické stádium *T. brucei* obsahuje přibližně dvojnásobné množství hemu *b* než *P. serpens* s heminem. To můžeme jednoduše vysvětlit tím, že toto stádium trypanozomy získává energii prostřednictvím dýchacího řetězce, kde je zastoupení hemových proteinů pravděpodobně nejvyšší. V buňkách *L. tarentolae* je podíl hemu ještě výrazně vyšší (I pokud vezmeme na vědomí, že jsem použila dvojnásobné množství buněk). Tento výsledek je poměrně překvapivý a nelze jej jednoduše vysvětlit.

Z membrány získané z SDS-PAGE a následně značené chemiluminiscencí specificky pro hem můžeme vyčíst dva signály. Protože touto metodou se dá detekovat pouze hem *c*, považuji získané signály za cytochrom *c*, v podstatě jediný protein využívající jako kofaktor hem *c* (Reedy a kol., 2008). Jasný signál v oblasti 30 kDa odpovídá stejně velkému proteinu detekovanému i nativní elektroforézou, jedná se nejspíš o cytochromu *c1* (Niebisch a Bott, 2001). Druhý, méně jasný signál velký 12 kDa pokládám za cytochrom *c* (Cázares-Delgadillo a kol., 2007).

6. Závěr

Porovnála jsem množství hemu mezi *Trypanosoma brucei*, *Leishmania tarentolae* a dvěma kulturami *Phytomonas serpens* lišících se dostupností hemu. Dokázala jsem, že *P. serpens* dokáže žít a růst bez hemu. Tím se stává prvním známým eukaryotickým organismem, který nepotřebuje tento kofaktor. Zároveň ale, pokud hem ke kultuře přidáme, je transportován do buněk a dále metabolizován. Nepodařilo se mi dokázat, zda je tento kofaktor inkorporován do proteinů a k jakému účelu jej *P. serpens* využívá.

K dalšímu výzkumu hemových proteinů bude nutné zvolit nové přístupy. Ačkoliv se mi to nepodařilo potvrdit, nejpravděpodobnějším způsobem využití hemových proteinů se zdá být obrana vůči oxidativnímu stresu. Bude nutné tento pokus zopakovat a optimalizovat podmínky.

7. Seznam použité literatury

Akilov, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K., and Hasan, T.(2007). Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Experimental Dermatology* 16, 651-660.

Almeida, F.V., Branquinha, M.H., Giovanni-de-Simone, S., and Vermelho, A.B. (2003). Extracellular metalloproteinase activity in *Phytomonas francai*. *Parasitology Research* 89, 320-322.

Basile, G., and Peticca, M. (2009). Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology* 43, 273-278.

Barros, M.H., Nobrega, F.G. and Tzagoloff, A. (2002). Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8887-10002.

Benkovičová, V. (2007). Dýchací reťazec Euglenozoid. Diplomová práca, Univerzita Komenského v Bratislavě.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renault, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.

Besteiro, S., Barrett, M., Riviere, L., and Bringaud, F. (2005). Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *TRENDS in Parasitology* 21, 185-191.

Bochud-Alleman, N., and Schneider, A. (2002). Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 32849-32854.

Braz, G., Coelho, H.S.L., Masuda, H., Oliviera, P.L. (1999). A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Current Biology* 9, 703-706.

Brown, S.V., Hosking, P., Li, J., and Williams, N. (2006). ATP Synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell* 5, 45-53.

Brun, R., and Schönenberger, M. (1979). Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Tropica* 36, 289-292.

Callahan, H.A., R, L.W., and J, N.E. (2002). Molecular taxonomy of the suborder Bodonina (order Kinetoplastida), including the important fish parasite, *Ichtyobodo necator*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49, 119-128.

Camargo, E.P. (1999). *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advances in Parasitology* 42, 29-112.

Camargo, E.P., Kastelein, P., and Roitman, I. (1990). Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitology Today* 6, 22-25.

- Campbell, D.A., Thomas, S., and Sturm, N.R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and Infection* 5, 1231-1240.
- Canepa, G.E., Carrillo, C., Armesto, A.R., Bouvier, L.A., Miranda, M.R., and Pereira, C.A. (2007). *Phytomonas*: Transport of amino acids, hexoses and polyamines. *Experimental Parasitology* 117, 106-110.
- Cázares-Delgado, J., Maik, A., Ganem-Rondero, A., Quintanar-Guerrero, D. and Kalia, Y.N. (2007). Transdermal delivery of cytochrome C-A 12,4 kDa protein-Across intact skin by constant-current iontophoresis. *Pharmaceutical Research* 24, 1360-1368.
- Cazzulo, J.J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB Journal* 6, 3153-3161.
- Conchon, I., Campaner, M., Sbravate, C., and Camargo, E.P. (1989). Trypanosomatids, Other Than *Phytomonas* Spp Isolated and Cultured from Fruit. *Journal of Protozoology* 36, 412-414.
- Čermáková, P., Verner, Z., Man, P., Lukeš, J., and Horváth, A. (2007). Characterization of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in the trypanosomatid *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida). *FEBS Journal* 274, 3150-3158.
- d'Avila-Levy, C.M., Santos, L.O., Marinho, F.A., Dias, F.A., Lopes, A.H., Santos, A.L., and Branquinha, M.H. (2006). Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: Possible role in the insect interaction. *Current Microbiology* 52, 439-444.
- Docampo, R., and Moreno, S.N. (2001). The acidocalcisome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33, 151-159.
- Doležal, P., Dancis, A., Lesuisse, E., Sutak, R., Hrdý, I., Embley, T.M., and Tachezy, J. (2007). Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryotic Cell* 6, 1431-1438.
- Donelson, J.E., Gardner, M.J., and M, E.-S.N. (1999). More surprises from *Kinetoplastida*. *PNAS* 96, 2579-2581.
- Fang, J., and Beattie, D. (2002). Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry* 41, 3065-3072.
- Fang, J., and Beattie, D. (2003). Alternative oxidase present in porocyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 294-302.
- Feissner, R., Xiang, Y. and Kranz, R.G. (2003). Chemiluminescent-based methods to detect subpicomole levels of *c*-type cytochromes. *Analytical Biochemistry* 315, 90-94.
- Fernández-Becerra, C., Osuna, A., Muller, E., Dollet, M., and Sánchez-Moreno, M. (1996). Characterization of *Phytomonas* isolated from fruits by electrophoretic isoenzymes and kinetoplast-DNA analysis. *FEMS Microbiology Letters* 145, 463-468.
- Fernández-Becerra, C., Sánchez-Moreno, M., Osuna, A., and Opperdoes, F.R. (1997). Comparative aspects of energy metabolism in plant Trypanosomatids. *Journal of Eukaryotic*

Microbiology 44, 523-529.

Frankenberg, N., Moser, J. and Jahn, D. (2003). Bacterial heme biosynthesis and its technological application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 115-127.

Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, S., Tremblay, J., Rezaiki, L., Lamberet, G., Sourice, S., Duwat, P., and Gruss, A. (2002). Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 263-269.

González-Halphen, D., and Maslov, D.A. (2004). NADH-ubiquinone oxidoreductase activity in the kinetoplasts of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Parasitology Research* 92, 341-346.

Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., and Michels, P.A. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2.

Chang, K. (1974). Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*. *Journal of Protozoology* 21, 699-707.

Chaudhuri, M., Ajayi, W., and Hill, G.C. (1998). Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 95, 53-68.

Chaudhuri, M., Ott, R.D., Saha, L., Williams, S., and Hill, G.C. (2005). The trypanosome alternative oxidase exists as a monomer in *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Parasitology Research* 96, 178-183.

Chaumont, F., Schanck, A.N., Blum, J.J., and Opperdoes, F.R. (1994). Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characiasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67, 321-331.

Cheek, J., and Dawson, J.H. (2007). Coenzymes: Haem. In: Cox, M.M., and Phillips, G.N. Jr. (Ed.), *Handbook of Proteins: Structure, Function and Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 569-576.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Lee, M., Aggarwal, G., Berriman, M. *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science* 309, 436-471.

Jankevicius, J.V., Jankevicius, S.I., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L.A., Teixeira, M.M.G., Freymuller, E. and Camargo, E.P. (1989). Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *Journal of Protozoology* 36, 265-271.

Kořený, L., Lukeš, J., and Oborník, M. (2010). Evolution of the heme synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? *International Journal for Parasitology* 40, 149-156.

Lamour, N., Riviere, L., Coustou, V., Coombs, G.H., Barrett, M.P., and Bringaud, F. (2005). Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 280, 11902-11910.

Landfear, S.M. (2003). Trypanosomatid transcription factors: Waiting for Godot. *PNAS* 100, 7-9.

- Lara, F.A., Sant'Anna, C., Lemos, D., Laranja, G.A.T., Coelho, M.G.P., Salles, I.R., Michel, A., Oliveira, P.L., Cunha-e-Silva, N., Salmon, D., *et al.* (2007). Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355, 16-22.
- Liniger, M., Bodenmüller, K., Pays, E., Gallati, S., and Roditi, I. (2001). Overlapping sense and antisense transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology* 40, 869-878.
- Lombardo, M.E., Araujo, L.S., and Batlle, A. (2003). 5-aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 1263-1271.
- Lukeš, J., Hashimi, H., and Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current Genetics* 48, 277-299.
- Marín, C., Hitos, A.B., Rodríguez-González, I., Dollet, M., and Sánchez-Moreno, M. (2004). *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiology Letters* 234, 69-74.
- Maslov, D.A., Nawathean, P., and Scheel, J. (1999). Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 99, 207-221.
- Matthews, K.R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 118, 283-290.
- McConville, M.J., and Ferguson, M.A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochemical Journal* 294, 305-324.
- Michels, P.A., Hannaert, V., and Bringaud, F. (2000). Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - new data and views. *Parasitology Today* 16, 482-489.
- Morrison, M., Cricco, J., and Hegg, E. (2005). The biosynthesis of heme O and heme A is not regulated by copper. *Biochemistry* 44, 12554-12563.
- Nawathean, P., and Maslov, D.A. (2000). The absence of genes for cytochrome *c* oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Current Genetics* 38, 95-103.
- Niebisch, A. and Bott, M. (2001). Molecular analysis of the cytochrome *bcl-aa3* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *cI*. *Archives of Microbiology* 175, 282-294.
- Opperdoes, F.R., and Michels, P.A. (2008). Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends in Parasitology* 24, 310-317.
- Panek, H., and O'Brian, M.R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* 148, 2273-2282.
- Pappas, G.J., Benabdellah, K., Zingales, B., and González, A. (2005). Expressed sequence

- tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 142, 149-157.
- Pedersen, M.B., Garrigeus, Ch., Tuphile, K., Brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., Mollgaard, H., Gaudu, P., and Gruss, A. (2008). Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: Identification of a heme-responsive operon. *Journal of Bacteriology* 190, 4903-4911.
- Podlipaev, S.A. (2000). InsectTrypanosomatids: the need to know more. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 517-522.
- Puustinen, A. and Wikstrom, M. (1991) The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *PNAS* 88, 6122-6126.
- Rao, A.U., Carta, L.K., Lesuisse, E., and Hamza, I. (2005). Lack of heme synthesis in free-living eukaryote. *PNAS* 102, 4270-4275.
- Reedy, Ch.J., Elvekrog, M.M. and Gibney, B.R. (2008). Development of a heme-protein structure-electrochemical function database. *Nucleic Acid Research* 36, D307-D313.
- Rochat, T., Gratadoux, J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., and Guchte, M.v. d. (2006) Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an Efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Applied and environmental Microbiology* 72, 5143-5149.
- Sah, J.F., Ito, H., Kolli, B.K., Peterson, D.A., and Sassa, S. (2002). Genetic Rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 14902-14909.
- Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K. and Anraku, Y. (1993). *In vitro* heme *o* synthesis by the *cyoE* gene product from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 26041-26045.
- Sanchez-Moreno, M., Laszity, D., Coppens, I., and Opperdoes, F.R. (1992). Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54, 185-200.
- Santos, A.L., Branquinha, M.H., and d'Avila-Levy, C.M. (2006). The ubiquitous gp63-like metalloproteinase from lower trypanosomatids: in the search for a function. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 78, 687-714.
- Santos, A.L., d'Avila-Levy, C.M., Elias, C.G., Vermelho, A.B., and Branquinha, M.H. (2007). *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes and Infection* 9, 915-921.
- Schnauffer, A., Clark-Walker, G.D., Steinberg, A.G., and Stuart, K. (2005). The F₁-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *EMBO Journal* 24, 4029-4040.
- Silva, J.B.T.d., and Roitman, I. (1990). Growth of *Phytomonas serpens* in defined medium; Nutritional requirements. *Journal of Protozoology* 37, 521-523.

- Simpson, A.G., Lukeš, J., and Roger, A.J. (2002). The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2071-2083.
- Smith, M.W., Aley, S.B., Sogin, M., Gillin, F.D., and Evans, G.A. (1998). Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 95, 267-280.
- Srivastava, P., Sharma, G.D., Kamboj, K.K., Rastogi, A.K., and Pandey, V.C. (1997). Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 171, 65-68.
- Thiemann, O.H., Maslov, D.A., and Simpson, L. (1994). Disruption of RNA editing in *Leishmania tarentolae* by the loss of minicircle-encoded guide RNA genes. *The EMBO Journal* 13, 5689-5700.
- Tielens, L., and Van Hellemod, J. (1998). Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitology Today* 14, 265-271.
- Vannier-Santos, M., Martiny, A., and de Souza, W. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: Invading and evading. *Current Pharmaceutical Design* 8, 297-318.
- Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K.A., and Turner, C.M.R. (1988). Biology of African trypanosome in the tsetse fly. *Biology of the Cell* 64, 109-119.