

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká Fakulta**



**Ověření působení fosfanátů acyklických nukleosidů  
na fosforibozyl transferázy 6-oxo purinů u**  
*Trypanosomy brucei*

Bakalářská práce

**Zuzana Kotrbová**

Školitelka: RNDr. Alena Zíková Ph. D.

**České Budějovice 2012**

Kotrbová, Z., 2012 Ověření působení fosfanátů acyklických nukleosidů na fosforibozyl transferázy 6-oxo purinů u *Trypanosomy brucei*. (Validation of acyclic nucleoside phosphanates as inhibitors of 6-oxo purine phosphorybosyltransferases in *Trypanosoma Brucei*. Bc. Thesis in Czech)- 36.p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

The aim of this study was to create RNAi double-knockdown of two enzymes HGPRT and XPRT and to determine if these enzymes are essential for growth of the bloodstream stage of *Trypanosoma brucei*. Further, we aim to investigate the intracellular localization of these two enzymes using digitonin fractionation and immunofluorescent assay. In addition, cytotoxicity screen of three selected acyclic nucleoside phosphanates was performed using *T. brucei* cell line overexpressing HGPRT and XPRT enzymes to validate their putative targets.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 26. Dubna 2012

.....  
Zuzana Kotrbová

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla v první řadě poděkovat své školitelce Aleně Zíkové za její vedení, naučení základní technik a ochotu pomoci vždy, když jsem to potřebovala. Dále bych chtěla poděkovat Karolíně a Míše, které mi ukázaly základní metody a vždy se mi snažily zodpovědět mé dotazy. Ráda bych také poděkovala paní doktorce Daně Hockové z Ústavu Organické chemie a Biochemie za poskytnutí inhibitorů použitých v této práci.

Také mé díky patří celému ostatnímu kolektivu – Brianovi, Ance, Monice a Hance za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat Míše, Dádovi a celé své rodině za morální podporu a porozumění. Ještě bych chtěla poděkovat Cecilovi za každodenní ranní buzení, které mě motivovalo k práci.

# Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Základní informace o Trypanosomě brucei.....	1
1.2 Purinová záchranná cesta (Purine salvage pathway, PSP).....	2
1.3 6-oxopurin fosforibosyltransferázy.....	4
1.4 Fosfanáty acyklických nukleosidů (acyclic nucleoside phosphonates, ANP).....	6
2 CÍLE:.....	8
3 Materiály a Metody.....	9
3.1 Navržení oligonukleotidů pro amplifikaci úseku genu TbHGPRT a celých čtecích rámců genů TbHGPRT a TbXPRT. ....	9
3.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	10
3.1.1.1 Princip.....	10
3.1.1.2 Postup.....	10
3.1.2 Izolace DNA z gelu.....	11
3.1.3 Ligace do pGEM-Teasy plazmidu.....	11
3.1.4 Transformace do XL1-Blue Esterichia coli.....	12
3.1.5 Izolace plazmidové DNA.....	12
3.1.6 Restrikční reakce.....	12
3.1.7 Ligace do plazmidů p2T7-177 a pTv5.....	13
3.1.8 Linalizace plazmidu p2T7-177/TbHGPRT/TbXPRT a pTv5/TbHGPRT a pTv5/XPRT pro potřeby elektroporace.....	14
3.1.9 Elektroporace linearizovaného plazmidu p2T7-177/TbHGPRT/TbXPRT a pTv5/TbHGPRT a pTv5/XPRT do krevních stádií T. brucei.....	15
3.1.10 Selekcce pomocí antibiotik.....	16
3.1.11 Kultivace T. brucei.....	16
3.2 Růstové křivky.....	16
3.2.1 Princip.....	16
3.2.2 Postup.....	17
3.3 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS PAGE) a Westernový přenos.....	17
3.3.1 Princip.....	17
3.3.2 Postup.....	17
3.4 Buněčná sublokalizace tagovaných proteinů.....	18

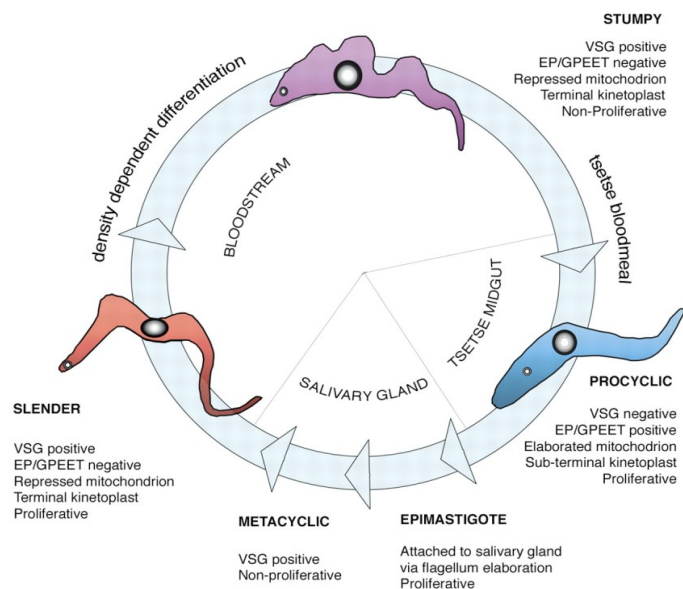
3.4.1	Digitoninová frakcionace.....	18
3.4.1.1	Princip.....	18
3.4.1.2	Příprava frakce celých buněk.....	18
3.4.1.3	Příprava mitochondriální a cytozolické frakce.....	18
3.4.1.4	Westernový přenos.....	19
3.4.2	Lokalizace proteinů v buňce metodou imunofluorescence (IFA).....	19
3.4.2.1	Princip.....	19
3.4.2.2	Postup.....	20
3.5	Alamar blue esej.....	20
3.5.1	Princip.....	20
3.5.2	Sklízení buněk.....	21
3.5.3	Inkubace s fosfanáty acyklických nukleosidů.....	21
3.5.4	Inkubace buněk s resazurinem.....	22
3.5.5	Zpracování dat.....	22
4	Výsledky.....	23
4.1	Identifikace genů pro HGPRT a XPRT v genomu T. brucei.....	23
4.2	Příprava konstruktů za účelem o umlčení TbHGRPT a TbXPRT genové exprese a za účelem overexprese TbHGPRT a TbXPRT v krevním stádiu T. brucei.....	23
4.3	Double knock-down (DKO) RNAi pro TbHGPRT/TbXPRT geny.....	24
4.3.1	Analýza růstového fenotypu u DKO RNAi buněčné linie.....	24
4.4	Pilotní exprese v5-tagovaných TbHGPRT a TbXPRT proteinů.....	25
4.5	Vnitrobuněčná lokalizace TbHGPRT_v5 a TbXPRT_v5 proteinů.....	25
4.5.1	Digitoninová frakcionace.....	26
4.5.2	Lokalizace TbHGPRT_v5 a TbXPRT_v5 proteinů pomocí imunofluorescenční esej.....	27
4.6	Alamar blue esej.....	29
5	Diskuse a závěr.....	32
6	Literatura.....	34

# 1 Úvod

## 1.1 Základní informace o *Trypanosomě brucei*

*Trypanosoma brucei* je parazitický prvok patřící mezi bičíkovce řádu Kinetoplastida, kam se také řadí *T. cruzi* a druhy rodu *Leishmania*. Rozeznáváme tři poddruhy *T. brucei*: *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense*. *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense* jsou odpovědné za africkou spavou nemoc v 36 zemích v západní a centrální Africe, což jsou nejchudší rozvíjející se státy. *T. b. gambiense* je zodpovědná za více než 90% onemocnění. Spavá nemoc má devastující vliv na lidské zdraví. Každý rok se nakazí 0,5 miliónů lidí a 70 000 zemře na následek této nemoci, přestože jsou léčeni. *T. b. brucei* napadá skot i divoká zvířata a způsobuje nemoc zvanou nagana. Tato nemoc způsobuje značné hospodářské škody a ekonomické ztráty na skotu, protože v oblastech, kde se vyskytuje, se téměř skot nedá chovat, a lidé v této oblasti pak trpí nedostatkem masa a mléka. (<http://www.who.int/en/>)

Ve svém životním cyklu střídá *T. brucei* odlišná prostředí. Tento parazit má dva hostitele, savce a mouchu tsetse (*Glossina spp.*). Díky obrovským rozdílům mezi hostiteli prochází *T. brucei* buněčnými změnami jak v morfologii, tak v metabolismu. V mouše tsetse se usadí v gastrointestinálním traktu jako procyklické stádium. Odtud přechází do slinných žláz, kde se připraví na přenos do nového savčího hostitele. U savců se vyskytuje volně v krvi jako krevní stádium, které je schopno se vyhnout imunitní odpovědi pomocí proměnlivých povrchových glykoproteinů (VSG) (McCulloch, 2004), (Pays *et al.*, 2004). Toto stádium je s postupným rozšířením infekce nahrazováno neproliferačním krátkým stádiem, které je nachystáno na nasátí mouchou tsetse a cyklus se uzavírá (obr. 1.1) (Mathhews *et al.*, 2004).



**Obr. 1.1: Životní cyklus *T. Brucei*.**

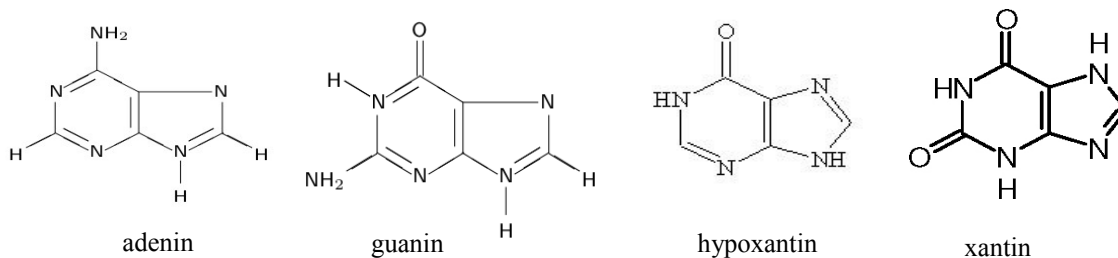
Trypanozómy proliferují v krevním řečišti savce. Tyto buňky exprimují na svém povrchu speciální VSG plášť, který jim pomáhá vyhnout se reakci imunitního systému. S rostoucím počtem parazitických buněk se začínají objevovat krátká (stumpy) stádia, která se nemůžou dělit a jsou připravena k přenosu do mouchy tsetse. Po nasátí krve s *T. brucei* vektorem se buňky začnou proliferovat v gastrointestinálním traktu. Procyclická forma exprimuje na

povrchu rozdílný povrchový plášť z procyklínů. Po ustálení je *T. brucei* uvězněna v dělení a přesouvá se do slinných žláz, které dosáhne jako stádium epimastigóta. Tyto proliferující buňky se nakonec přemění v neproliferativní metacyklické formy, které znovu získají VSG plášť a jsou připravené k přenosu do nového hostitele (Matthews, 2005).

Dosavadní léčba je zatím neefektivní, protože léky mají nízkou účinnost a jsou vysoce toxické (Croft *et al.*, 2005). Proto je potřebné najít lék, který vyléčí tuto nemoc. Slibnou metodou se zdá být zablokování 6-oxopurin ribozyltransferázy, která je součástí purinové záchranné cesty (Berg *et al.*, 2010b).

## 1.2 Purinová záchranná cesta (Purine salvage pathway, PSP)

Purin, který je na obrázku (obr. 1.2), je důležitý pro život všech organismů. Purinové nukleotidy slouží jako prekurzory nukleových kyselin, modulátory enzymové aktivity, je součástí koenzymů jako jsou ATP, GTP, NADH, koenzym A a slouží jako prekurzor druhého posla (cyklická AMP) (Berg *et al.*, 2010b).



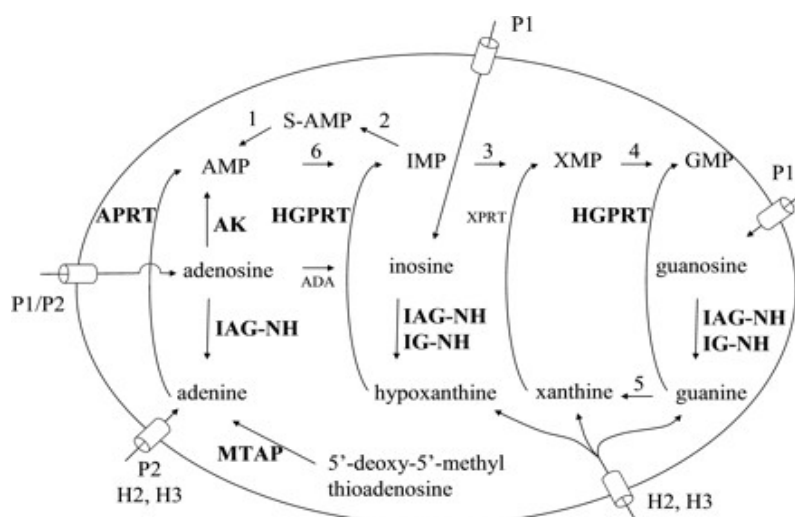
**Obr. 1.2: Purinové nukleobáze.**

Purinové nukleotidy mohou být syntetizovány dvěma cestami: pomocí *de novo* biosyntézy nebo pomocí „záchranné“ cesty. Cestou *de novo* vzniká inosin monofosfát z jednoduchých prekurzorů jako je glycin (Berg *et al.*, 2010b). Záchranná cesta využívá

endogenního nebo exogenního zdroje purinových bází a jejich nukleosidů z okolního prostředí. Skoro všichni jednobuněční parazité, včetně *T. Brucei*, jsou na rozdíl od savců neschopni syntetizovat puriny *de novo*, a protože jsou puriny nezbytné pro jejich přežití, jsou zcela závislí na purinové záchranné cestě (purine salvage pathway - PSP). Proto je o PSP hovořeno jako o potenciálním cíli léčiv proti jednobuněčným parazitům. Purinové nukleobáze jako je hypoxantin a xantin jsou neustále produkovány u lidí a ostatních savců při katabolismu purinových nukleotidů. Parazité dokáží vzít, přeměnit a zabudovat různé formy purinů, ale i mezi parazity a jimi přijímanými molekulami jsou značné rozdíly. Pro *T. brucei* a *T. cruzi*, což je parazit Jižní Ameriky způsobující Chagasovu chorobu, a který je přenášen plošticemi rodu *Rhodnius*, je pořadí záchranné účinnosti adenin > hypoxantin > guanin > xantin. Stejně pořadí je získáno pro nukleosidy (Berg *et al.*, 2010a). Hlavní zdroj purinů v krvi je hypoxantin, adenosin se tu objevuje ve značně menších koncentracích (Vodnala *et al.*, 2008).

Záchrana hostitelových purinů začíná přesunem přes plazmatickou membránu parazita (*T. brucei*), nebo je-li parazit intracelulární (*T. cruzi*, *Leishmania spp*, *Plasmodium*) přes parazitoforní membránu vakuoly a hostitelovu plazmatickou membránu. Puriny do parazita vstoupí buď jako nukleobáze, nebo jako nukleosidy. Ačkoliv je prostá difuze purinu možná, častěji je přenášen aktivně pomocí přenašečů (de Koning and Jarvis, 1997).

Přítomnost PSP je nutná pro všechna stádia *T. brucei*. Potřebné enzymy PSP u *T. brucei* jsou na obrázku (obr. 1.3).



**Obr. 1.3: Purinová záchranná cesta krevní formy *T. brucei*.** Inosin-adenosin-guanosin nukleosid hydroláza (IAG-NH), inosin-guanosin nukleosid hydroláza (IG-NH), methylthioadenin fosforyláza (MTAP), adenin fosforibozyl transferáza (APRT), hypoxantin-guanin fosforibozyl transferáza (HGPRT) a adenosin kináza (AK) (Berg *et al.*, 2010b).

Nukleosid hydroláza (NH), methylthioadenin fosforyláza (MTAP) a fosforibozyltransferáza (PRT) patří mezi N-ribozyltransferázy, které katalyzují reakce a mají

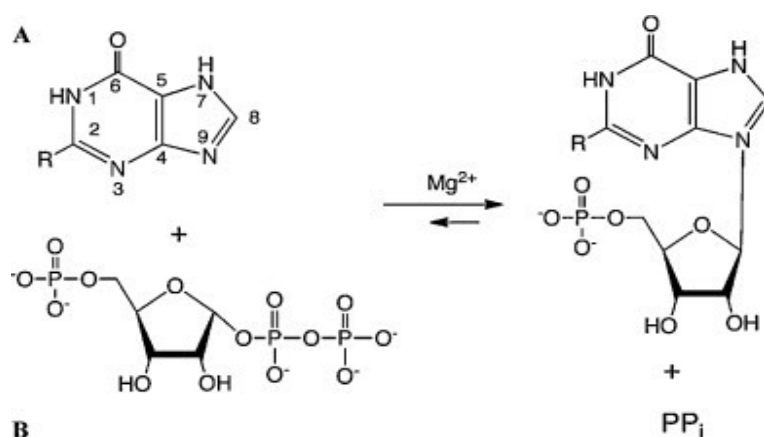


společné rysy: přenášejí purin z nebo na ribózu popřípadě deoxyribózu. NH a MTAP jsou považovány za štípací enzymy, které ke své práci používají nukleofil. Štípají glykosidické vazby mezi nukleovou bází a cukrovým zbytkem ribozylem. U *T. brucei* byly objeveny 2 typy NH: specifická k purinovým nukleosidům (IAG-NH), která preferuje inosin, adenosin a guanosin jako substráty a 6-oxopurin specifická IG-NH s větší afinitou ke guanosinu a inosinu (Versees *et al.*, 2001). Aktivita NH nebyla objevena u savčích buněk, a proto může být NH dobrý cíl pro vyvíjecí se léčiva proti trypanozomám (Berg *et al.*, 2010a). PRT je spojovací enzym a následuje po aktivitě NH a MTAP. Přenese katalytickou aktivitou fosforibózovou jednotku na volnou nukleobázi jako je adenin, guanin, hypoxantin a xantin. PRT byly objeveny u mnoho parazitů a také u savčích buněk. Rozdíly specifity těchto enzymů jsou ale odlišné u různých druhů. Jediný xantin není substrátem savčí PRT, ale zároveň je výhodným substrátem pro několik parazitických PRT enzymů včetně *T. brucei*, a proto může být tento enzym inhibován selektivním léčivem (Berg *et al.*, 2010a).

PSP je potenciální cíl pro vyvíjecí se léky proti parazitům. Navržené inhibitory jsou nejčastěji zaměřeny proti IAG-NH, MTAP a AK, ačkoliv inhibice těchto enzymů může být obejita příjmem nukleobází. Tyto purinové báze (xantin, hypoxantin, guanin, adenin) mohou být pozměněny do odpovídajících nukleotidů pomocí APRT, HGPRT a XPRT (fosforibozyl transferázy). Podle této hypotézy může parazit přežít na jednoduchém zdroji purinu jako je adenin nebo hypoxantin, protože tyto puriny mohou být přeměněny v odvětvení IMP. V tomto oddělení mohou být vytvořeny všechny další nukleotidy, jako jsou AMP, XMP, GMP. Zdá se, že purinový záchranný systém *T. brucei* je značně všestranný a inhibice jednotlivého enzymu nebude dostatečná k zabití parazita a bude nutné zavést kombinovanou inhibici několika inhibitory (Berg *et al.*, 2010b). Tato práce se zabývá studiem 6-oxopurin fosforibozyl transferáz (HGPRT a XPRT) u krevního stádia *T. brucei*.

### 1.3 6-oxopurin fosforibosyltransferázy

6-oxopurin PRTázy patří do skupiny 10 enzymů, které jsou odpovědné za syntézu purinových nukleotidů, pyrimidinových nukleotidů, NAD a u bakteriích a nižších eukaryot histidinu a tryptofanu. Reakce, které katalyzuje 6-oxopurin PRTáza, jsou ukázány na obrázku (obr. 1.4). Pro katalytickou reakci musí být přítomen dvojmocný kovový iont, většinou hořčík  $Mg^{2+}$ . Mechanismus působení lidského HGPRT je v pořadí: Prib-PP.  $Mg^{2+}$  se váže první a poté následuje purinová báze. Pyrofosfát se potom z komplexu odloučí a objeví se nukleosid monofosfát v přechodném kroku. Je velice pravděpodobné, že takto fungují všechny 6-oxopurin PRTázy (de Jersey *et al.*, 2011).



**Obr. 1.4: Reakce katalyzovány pomocí 6-oxopurin PRTázami.** Přírodně vyskytující báze jsou guanin (R je -NH<sub>2</sub>), hypoxantin (R je -H) a xantin (R je -OH).

Společný rys ve struktuře 6-oxopurin PRTázy je přítomnost velké flexibilní smyčky, která je složena z 10-20 zbytků aminokyselin a která se uzavírá kolem aktivní strany během katalytické reakce. Podle jedné z hypotéz je role této smyčky pomoci stabilizovat přenos a ochránit vazbu Prib-PP (Krahn *et al.*, 1997).

6-oxopurin PRTázy z různých organismů mohou být rozděleny podle rozdílné specifitě ke třem přírodně se vyskytujícím bázím: guanin, hypoxantin a xantin. Některé enzymy mohou využívat všechny tři báze, některé jen dvě a některé mají specifitu jen k jedné (de Jersey *et al.*, 2011). Mnoho organismů má jen jednu 6-oxopurin PRTázu, která se ukazuje dostačující k syntéze všech potřebných nukleosidů monofosfátů, které potřebují k přežití.

Vývoj léčiv proti 6-oxopurin PRTázám může být dokázáno dvěma postupy. První je použití katalytických vlastností enzymů k přeměně exogenních analogů bází na mononukleotidy toxické pro parazity. Druhá možnost je inhibovat samotné enzymy (de Jersey *et al.*, 2011). 6-oxopurin PRTáza existuje ve všech organismech a má u všech organismů společné strukturní a katalytické rysy, ale jsou tu značné rozdíly mezi substrátovou specifitou, katalytickou účinností a důležitostí v životním cyklu určitého organismu. Je možné, že by inhibitory 6-oxopurin PRTázy mohly působit na jednobuněčné či bakteriální původce různých onemocnění, a proto inhibitory 6-oxopurin PRTáz mají potenciál stát se účinným léčivem. V případě, že by inhibitor působil i na lidskou PRTázu, není se třeba obávat letálních účinků na lidskou buňku, protože lidé, kteří zdědili částečný defekt v aktivitě HGPRT, vedou normální život, i když aktivita enzymu klesne na 3% (Yu *et al.*, 2012). Proto by částečná inhibice lidského HGPRT pomocí léků proti prvokům neměla výrazně ovlivnit život nakaženého člověka.

V buňce *Leishmania donovani*, prvoka způsobující viscerální leishmaniózu, jsou stejné

enzymy jako u trypanozómy: HGPRT, APRT a XPRT (Boitz and Ullman, 2006a). Enzymy HGPRT a XPRT byly u leishmánie překvapivě lokalizovány do glykozómu (Shit *et al.*, 1998), subbuněčné organely jedinečnou pro leishmánie a podobné prvky včetně trypanozómy (Michels *et al.*, 2006). U leishmánie bylo také prokázáno, že HGPRT a XPRT jsou esenciální (Boitz and Ullman, 2006a), což je možné i u *T. brucei*.

6-oxopurin PRTáza byla prostudována u původce malárie, což je nezávažnější lidské parazitické onemocnění na světě. Toto onemocnění způsobují parazitičtí prvoci rodu *Plasmodium* (Schmidt and Roberts, 2009). Genom *Plasmodium falciparum* obsahuje stejně jako *T. brucei* tři klíčové enzymy: adenosin deaminázu (ADA), purin nukleosid fosforylázu (PNP) a hypoxantin-guanin-xantin fosforibozyltransferázu (HGXPRT) (6-oxopurin PRTáza) (Zhao *et al.*, 2012). U *P. falciparum* je rozhodující zdroj purinu hypoxantin (Abdelwahab *et al.*, 2012), jenž je substrátem pro reakce katalyzované HGXPRT (Abdelwahab *et al.*, 2012). Produktem této reakce jsou purinové nukleosidy monofosfáty, a proto byly navrženy a prozkoumány třídy nukleotidových analogů fosfanáty acyklických nukleosidů (ANPs) jako potencionální inhibitory tohoto enzymu (Keough *et al.*, 2009).

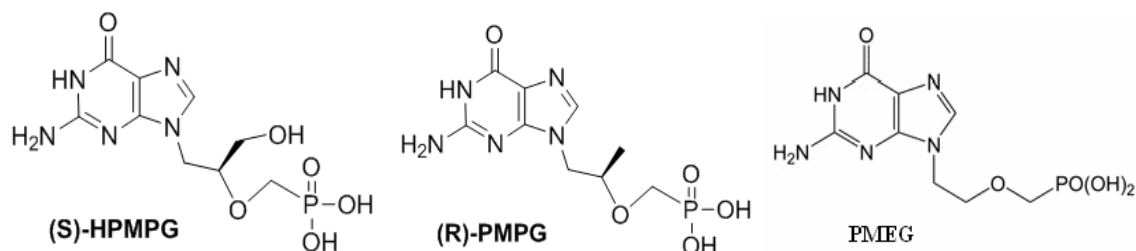
## 1.4 Fosfanáty acyklických nukleosidů (acyclic nucleoside phosphonates, ANP)

ANP jsou 2-(fosfonoalkoxy)alkylové deriváty purinových a pyrimidinových bází obsahující část izopolárního éteru fosfometylu místo esteru nukleosidové fosfátové skupiny. Chemické a farmaceutické vlastnosti ANP jsou objektem intenzivních studií, protože by mohly působit jako antivirotika (Holý, 2005).

ANP mají stejně jako mononukleotidy GMP a IMP purinovou bázi a fosfátovou skupinu napodobující 5'-fosfátovou skupinu napojující se na ribózu. ANP se liší od mononukleotidů třemi základními charakteristikami. První vlastností je, že ester kyslíku je ve fosfátové skupině nahrazen uhlíkem. Tímto se vyloučí enzymatická defosforylace nebo chemická hydrolyza. Druhým rozdílem je fakt, že atom kyslíku v acyklickém řetězci je posunut. Klasické uspořádání atomů je u nukleotidů C-O-P, kdežto a u ANP je to O-C-P, a tudíž uspořádání ANP je ve srovnání s normálním nukleotidem mnohem více odolné vůči degradaci. Poslední rozdíl je v absenci glykosidické vazby, což ještě zvyšuje odolnost vůči biologické degradaci. Další výhodou je ve flexibilní struktuře, která umožňuje změny konformace, aby co nejvíce vyhovovala aktivnímu místu enzymu (De Clercq and Holy, 2005).

Když se mononukleotid vzniklý katalytickou reakcí naváže na aktivní místo enzymu 6-oxopurin PRTázy, smyčka umožňující navázání značně změní strukturu enzymu, což umožní navázání 5'- fosfátové skupiny. Stejná změna nastane, když se na ní naváží fosfanáty acyklických nukleosidů, které utvoří stejnou vodíkovou vazbu mezi atomem kyslíku a enzymem jako mononukleotid vzniklý katalytickou reakcí. Nicméně změna konformace způsobí nefunkčnost enzymu (Keough *et al.*, 2009).

ANP jsou v současné době intenzivně studovány díky jejich cytotoxickým účinkům k buňkám plazmódia (Hockova *et al.*, 2009) (Keough *et al.*, 2009). V minulosti bylo také ukázáno, že některé typy ANP (např. S HPMPA) také inhibují růst buněk *T. b. rhodosiense*, *T. b. gambiense* a *T. b. Brucei* (Kaminsky *et al.*, 1998), (Kaminsky *et al.*, 1996). S rostoucí vědomostí ohledně způsobu vazby ANP na enzymy PSP a možností geneticky modifikovat buňky *T. b. brucei* jsme se rozhodli obnovit tyto studie. ANP jsou syntetizovány bývalou laboratoří Prof. Holého v Ústavu organické chemie a biochemie. Do současné chvíle jsme otestovali více než 50 různých ANP, z nichž některé vykazovaly cytotoxickou aktivitu vůči krevní formě *T. brucei* v nanomolárních či nízkých mikromolárních koncentracích. V této práci byly blíže studovány tři typy fosfanátů acyklických nukleosidů obsahující guanin (Obr. 1.5).



**Obr. 1.5: Fosfanáty acyklických guanosinů použité v této práci.**

PMEG - 2-(fosfonometoxyetyl)guanin

S HPMPG (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonylmetoxypropyl)guanin

R PMPG (R)-9-(2-fosfonometoxypropyl)guanin

## 2 CÍLE:

1. Metodou RNAi umlčet expresi genů TbHGPRT a TbXPRT v jedné buněčné linii krevního stádia *T. Brucei*.
2. Lokalizovat overexprimované proteiny TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5 v buňkách krevního stádia *T. Brucei*.
3. Otestovat inhibiční aktivitu tří fosfanátů acyklických nukleosidů (PMEG, S HPMPG, R PMPG) v buňkách exprimujících TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5.

### 3 Materiály a Metody

#### 3.1 Navržení oligonukleotidů pro amplifikaci úseku genu TbHGPRT a celých čtecích rámců genů TbHGPRT a TbXPRT.

**TbXPRT sekvence (Tb927.10.1390):**

```
pT_XPRT FW  
ATGCACTCGGGCCATCCTCTCAAACCGAACTTTGTTGGCAGGGATGCTGACGAAATGTTACGGTTGATGGCAGATC  
ATATCCCATGGCGGAAAGTGTGTGCGCCACGGAGAGCACAATTCACCGAAGCATGAAGGAAATGGCACAGACGCTTG  
CCAACGCTTACAAGACACTTAAGCACCGCGATACCCACAATAAGGGTAATAGCGCATTGGCCCCAATCACCGATGAA  
AATCCACTAATTATTATTTCTGTCTGAAGGGCAGTTATATTTTACGGCAGACATGGTTCGTTACCTTGGAGACTG  
TGGGCTACCTAACGTTGTGGACTTTATACGCATTACTTCATACAGGGGAACCACGAAAAGCAGTGGCACCGTGCAGG  
TGCTGGATAACCTGCGCTTCACTGAATTAACGGGGAAACATGTACTTATTATGGAAGACATTGCCGACACGGGGCGT  
ACAATGAAGCTTTTGGTGGAGAAGATCCGCCGGGAGTACCGACCTGCCAGTTTGAAGGTGTGCGTACTTGTGGACAA  
GCCCCGTGGTTCGCGTTGTGGACTTTAAGCCGAATTTGTTTGCCTGACTGCACCAACTAGATACGTGGTTGGTTACG  
GCTTCGAGGTGAATGACAGGTACAGGAACTACCGTCACGTCTTTGTTTTAAACCGGAGTATGCGAAACGGTACCCG  
pT_XPRT Rev  
AGCAAATTGTAA
```

Primery pro zaklonování genu do pTv5 vektoru jsou vyznačeny červeně, modře je vyznačena oblast genu, která byla zaklonována do vektoru p2T7-177 v rámci jiné práce (Martina Aistleitner, bakalářská práce, 2012).

**TbHGPRT sekvence (Tb927.10.1400):**

```
pT_HGPRT FW  
ATGGAACCAGCTTGCAAAATCAGACTTCGCAACGAGTGTCTCTTTACAGAGGCAGAACTACACACTCGCATGCGCGG  
TGTGGCGCAGCGTATTGCCGATGACTACAGCAACTGCAATTTGAAGCCACTTGAAAATCCTCTGGTAATTGTGTCTG  
TATTGAAGGGCAGCTTCGTCTTCACTGCTGACATGGTTTCGATTCTTGGTGATTTTGGCGTCCCCACACGTGTGGAA  
TTCTACGGGCCTCGTCATATGGTCACGATACTAAAAGTTGTGGTCGAGTTGACGTGAAGGCTGACGGTCTTTGTGA  
CATCCGCGGCAAACATGTCTTGTGTTTGGAGGATATACTTGATACTGCGCTGACGTTGAGGGAAGTGGTGGACAGCT  
TGA AAAAGAGCGAACCCGCGAGCATTA AAACCTCGTGGCTATCGAC  
TbHGPRT DKO Rev  
AAACCCGGTGGACGTAAAATACCTTTCACT  
GCGGAATACGTTGTGGCGGATGTTCCCAATGTGTTTCGTGGTTGGCTACGGGTTGGATTACGACCAATCATAACCGTGA  
GGTGGCTGATGTTGTAATCCTAAAACCGAGCGTGTATGAAACATGGGGAAAGGAACTTGAGCGGAGGAAGGCCGCTG  
pT_HGPRT Rev  
GAGAAGCCAAGCGGTAA
```

Červeně jsou vyznačeny primery pro zaklonování do expresního vektoru pTv5. Modře jsou označeny primery, které byly použity pro zaklonování TbHGPRT do vektoru

p2T7-177/TbXPRT. Pro namnožení genu pomocí PCR byly navrženy následující primery (tab. 3.1 a 3.2).

**Tab. 3.1: Navržené primery genu TbHGPRT pro potřebu RNA interference.**

Jméno primeru	Sekvence
TbHGPRT DKO Fw (HindIII)	5' <b>AAGCTT</b> ACGACTTCGCAAC
TbHGPRT DKO Rev (HindIII)	5' <b>AAGCTT</b> GTTCGATAGCCACG

**Tab. 3.2: Navržené primery genů TbXPRT a TbHGPRT pro potřebu overexpresce.**

Jméno primeru	Sekvence
TbXPRT Fw (Hind III)	<b>AAGCTT</b> ATGCACTCGGGCCATC
TbXPRT Rev (BamHI)	<b>GGATCC</b> CAATTTGCTCGGGTAC
TbHGPRT Fw (Hind III)	<b>AAGCTT</b> ATGGAAACCAGCTTGC
TbHGPRT Rev (BamHI)	<b>GGATCC</b> CCGCTTGGCTTCT

Tučně jsou označena restrikční místa.

### 3.1.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

#### 3.1.1.1 Princip

Polymerázová řetězová reakce je rychlá a snadná metoda sloužící k namnožení úseku DNA, která využívá vzájemné komplementarity bází.

#### 3.1.1.2 Postup

Reakce probíhala v 50  $\mu$ l (tab. 3.3).

**Tab. 3.3: PCR reakce.**

Genomická DNA (50 ng)	3 $\mu$ l
10x PCR pufr	5 $\mu$ l
DNTPs (10 nM)	1 $\mu$ l
Fw primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Rev primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Taq polymeráza (1 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
MiliQ H <sub>2</sub> O	38 $\mu$ l

Program:

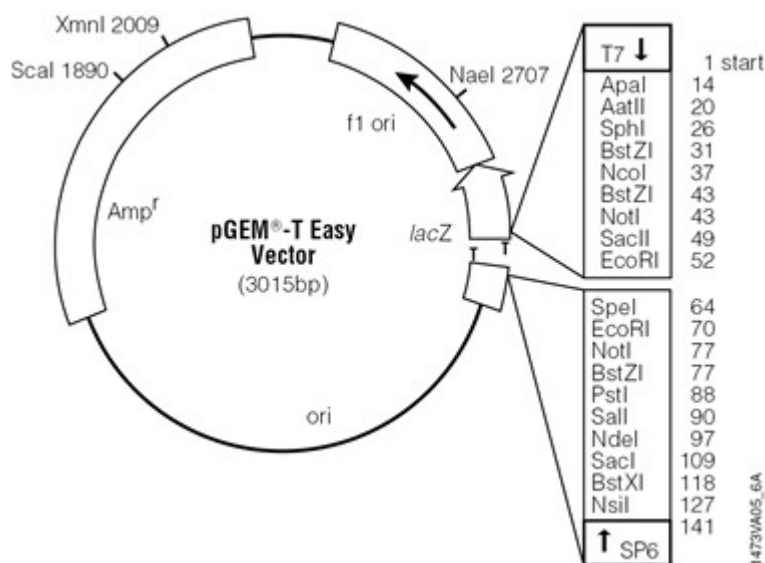
- |    |                  |                |       |
|----|------------------|----------------|-------|
| 1. | Denaturace       | 96°C 5 minut   | } 30x |
| 2. | Denaturace       | 94°C 1 minuta  |       |
| 3. | Nasedání primerů | 55°C 1 minuta  |       |
| 4. | Polymerace       | 72°C 1,5 minut |       |
| 5. | Polymerace       | 72°C 10 minut  |       |

### 3.1.2 Izolace DNA z gelu

Velikost PCR produktu byla zkontrolována na agarózovém gelu, který byl připraven smícháním 0,8g agarózy a 80 ml pufru TAE (2 M Tris-base, 5,71 % ledová kyselina octová, 5 mM EDTA ph 8), zahřátím v mikrovlnné troubě a po vychladnutí přidáním 2 µl etídia bromidu (5 mg/ml). Z gelu byl následně produkt vyizolován podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

### 3.1.3 Ligace do pGEM-T easy plazmidu

Přenosný systém pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega) byl použit podle firemních instrukcí. Mapa plazmidu je na obrázku (obr. 3.1).



Obr. 3.1: Mapa komerčního plazmidu pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega).

Ligace probíhala v 10 µl (tab. 3.4).



**Tab. 3.4: Ligační reakce.**

T4 DNA 2x pufr	5 $\mu$ l
Insert	3 $\mu$ l
Plazmid pGEM-T easy	1 $\mu$ l
T4 DNA ligáza	1 $\mu$ l

Reakce byla inkubována hodinu na stole.

### 3.1.4 Transformace do XL1-Blue *Esterichia coli*

Kompetentní buňky (XL1-Blue *E.coli*) byly ponechány 10-20 minut na ledě, aby šetrně rozmrzly. Bylo přidáno 5  $\mu$ l ligační reakce k 50  $\mu$ l kompetentních buněk. Buňky byly znova 10-20 minut inkubovány na ledě a jemně promíchány. Poté následoval tepelný šok při 42°C a 45 sekundách ve vodní lázni. Následně byly buňky umístěny na 2 minuty na led. K nim bylo přidáno 250  $\mu$ l sterilního SOC (2 % tryton, 0,5 % kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukózy) a buňky byly inkubovány jednu hodinu při 37°C v třepačce. Mezitím bylo na ampicilínovou misku (100  $\mu$ g/ml) naneseno 50  $\mu$ l IPTG (100 mM) a 30  $\mu$ l X-galu (200 mg/ml), protože plazmid pGEM<sup>®</sup>-T easy nese geny pro modrobílou selekci, a poté byly rozetřeny všechny buňky na misku. Miska byla inkubována 16 hodin v 37°C.

### 3.1.5 Izolace plazmidové DNA

Miniprep: Jedna narostlá kolonie byla přenesena do 3 ml LB média (1 % trypton, 1 % NaCl, 0,5 % kvasný extrakt) s ampicilínem (100  $\mu$ g/ml). Poté byla ponechána v třepačce při 37°C 15 hodin, aby narostla. Následně byla plazmidová DNA vyizolována podle kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Midiprep: Byl použit stejný postup jako u miniprepu, akorát bylo použito 100 ml LB média a plazmidová DNA byla vyizolována pomocí kitu GenElute<sup>(tm)</sup> HP plazmid Midiprep kit (Sigma).

### 3.1.6 Restrikční reakce

Restrikce probíhala podle schématu v tabulkách (tab 3.5 a 3.6).

**Tab. 3.5: Restrikční reakce TbHGPRT pro potřeby RNAi.**

Plazmidová DNA	20 $\mu$ l
10x pufr	5 $\mu$ l
Enzym HindIII	1 $\mu$ l
MiliQ H <sub>2</sub> O	24 $\mu$ l

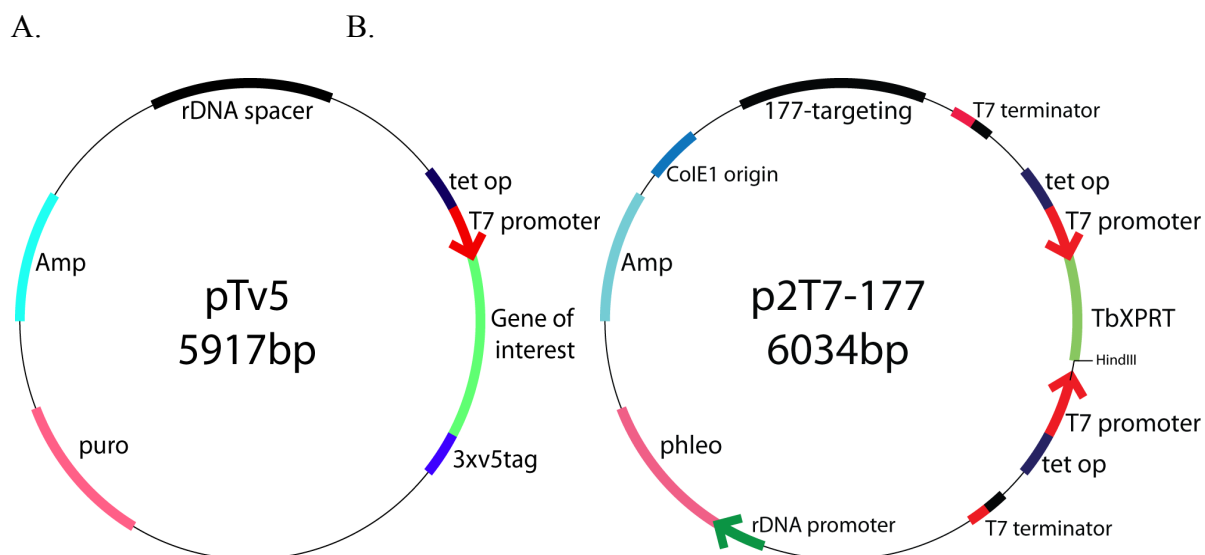
**Tab. 3.6: Restrikční reakce TbXPRT a TbHGPRT pro potřeby overexprese.**

Plazmidová DNA	20 $\mu$ l
Enzym BamHI	1 $\mu$ l
Enzym HindIII	1 $\mu$ l
10xPufr	3 $\mu$ l
MiliQ H <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l

Reakce probíhala 1,5 hodin při 37°C. Celá reakce byla ověřena na 1 % agarózovém gelu. Gen byl z gelu vyizolován podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

### 3.1.7 Ligace do plazmidů p2T7-177 a pTv5

Mapy pTv5 plazmidu (Flaspohler *et al.*, 2010) a p2T7-177 plazmidu (Wickstead *et al.*, 2002) jsou na obrázku (obr 3.2).



**Obr. 3.2. Mapy vektorů pTv5 (A) a p2T7-177 (B).**

Před použitím byl plazmid p2T7-177, do kterého již byl zaklonován úsek genu TbXPRT, rozstříhnut pomocí restrikčního enzymu Hind III (tab. 3.7). Plazmid pTv5 byl štípan pomocí restrikčních enzymů HindIII a BamHI (tab. 3.8).

**Tab. 3.7: Restrikce p2T7-177.**

P2T7-177/TbXPRT	10 $\mu$ l
10x pufr	5 $\mu$ l
Enzym HindIII	1 $\mu$ l
MiliQ H <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l

**Tab. 3.8: Restrikce pTv5.**

pTv5	10 $\mu$ l
Enzym BamHI	1 $\mu$ l
Enzym HindIII	1 $\mu$ l
10xPufr	3 $\mu$ l
MiliQ H <sub>2</sub> O	15 $\mu$ l

Reakce probíhala 1,5 hodin při 37°C. Po restriční reakci byl plazmid p2T7-177/TbXPRT ošetřen pomocí enzymu alkalické fosfatázy (CIP, Fermentas), aby se předešlo religaci plazmidu v dalším kroku. Reakce probíhala 1,5 hodin při 37°C. Následně byla spolu s restrikcí pTv5 ověřena na agarózovém gelu. Z něho byl produkt vyizolován podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Následovala ligace v 10 µl (tab. 3.9, 3.10, 3.11).

**Tab. 3.9: Ligační reakce pro TbHGPRT do plazmidu P2T7-177.**

	ligace	kontrola
T4 DNA 10x pufr	1 µl	1 µl
Insert (12,8 ng/µl)	4 µl	0 µl
Plazmid P2T7-177/TbXPRT (75 ng/µl)	4 µl	4 µl
T4 DNA ligáza	1 µl	1 µl
MiliQ H <sub>2</sub> O	0 µl	4 µl

**Tab. 3.10: Ligační reakce pro TbXPRT do pTv5.**

	Ligace	Kontrola
T4 DNA 10x pufr	1 µl	1 µl
Insert (8 ng/µl)	7 µl	0 µl
Plazmid pTv5 (222,7 ng/µl)	1 µl	1 µl
T4 DNA ligáza	1 µl	1 µl
MiliQ H <sub>2</sub> O	0 µl	7 µl

**Tab. 3.11: Ligační reakce pro TbHGPRT do pTv5.**

	Ligace	Kontrola
T4 DNA 10x pufr	1 µl	1 µl
Insert (59,6 ng/µl)	2,5 µl	0 µl
Plazmid pTv5 (222,7 ng/µl)	2 µl	2 µl
T4 DNA ligáza	3 µl	3 µl
MiliQ H <sub>2</sub> O	3,5 µl	6 µl

Pro transformaci do bakterií bylo použito 5 µl z ligační reakce a transformace probíhala dále podle předchozího schématu. Zaklonování bylo ověřeno pomocí PCR, či restriční analýzy.

### **3.1.8 Linearizace plazmidu p2T7-177/TbHGPRT/TbXPRT a pTv5/TbHGPRT a pTv5/XPRT pro potřeby elektroporace**

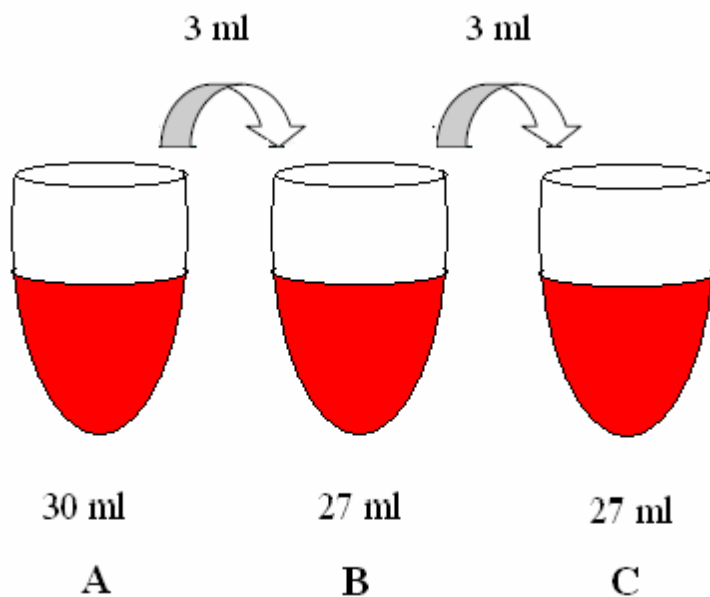
Před elektroporací byl plazmid naštípán pomocí enzymu NotI. Tento enzym štípe v oblasti rDNA spaceru (u plazmidu pTv5), či v oblasti minichromozomů 177 (u p2T7-177). Tato linearizace je nezbytná pro cílenou homologní rekombinaci do těchto úseků DNA v genomu *T. brucei*. Bylo použito 1,5 µl enzymu pro 6 µl DNA (přibližně 20 µg). Celá

reakce probíhala v 50-ti  $\mu\text{l}$  a při  $37^\circ\text{C}$  přes noc. Linearizovaný konstrukt byl přečištěn pomocí 5  $\mu\text{l}$  3 M sódium acetátu (pH 5.3) a 125  $\mu\text{l}$  96 % etanolu. Reakce byla protřepána a ponechána v  $-20^\circ\text{C}$  po 2 hodiny. Po stočení byl pelet promyt pomocí 70 % etanolu, sterilně vysušen na vzduchu a rozsuspendován v 25  $\mu\text{l}$  MiliQ  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **3.1.9 Elektroporace linearizovaného plazmidu p2T7-177/TbHGPRT/TbXPRT a pTv5/TbHGPRT a pTv5/XPRT do krevních stádií *T. brucei***

Byla použita linie single marker (SM), která má pod G418 selekcí ve svém genomu vneseny dva geny: T7 polymerázu a tetracyklinový represor. Tyto geny umožňují inducibilní expresi ať už dsRNA (v případě p2T7-177 plazmidu), nebo tagovaného protein (v případě pTv5 plazmidu). Tento kmen roste pod selekcí na G-418 o koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (HMI 9/G).

$3 \times 10^7$  buněk krevního stadia SM *T. brucei* bylo šetrně sklizeno pomocí centrifugace (1300xg po 10 minut). Pelet byl promyt v 20 ml sterilního PBS-G (5,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , 3,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,145 M NaCl, 3,3 mM glukózy) a rozsuspendován v 100  $\mu\text{l}$  v AMAXA lidském T-buněčném roztoku. K buňkám bylo poté přidáno 10  $\mu\text{g}$  linearizovaného plazmidu. Směs buněk a plazmidu byla přenesena do kyvety a elektroporována pomocí přístroje ECM650 v nastavení X-001. Buňky byly přeneseny do 30 ml HMI-9/G média, 3 ml média bylo přeneseno k 27 ml média a tento proces byl ještě jednou zopakován (obr. 3.3). Výsledkem byly tři kultury označené A, B, C o hustotě  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  buněk/ml. Každé ředění bylo rozděleno po 1 ml na 24 jamkovou misku a inkubováno 16 h při  $37^\circ\text{C}$ .



Obr. 3.3: Schéma ředění buněk po elektroporaci.

### 3.1.10 Selekcce pomocí antibiotik

Po 16 hodinách bylo do každé jamky přidáno 1 ml HMI-9/G média s phleomycinem, aby jeho konečná koncentrace byla v jamce 2,5 µg/ml (HMI-9/G/Ph) pro plazmid p2T7\_177 a s puromycinem o konečné koncentraci 0,1 µg/ml (HMI-9/G/Pu) pro plazmid pTv5. Misky byly inkubovány při 37°C, dokud neproběhla selekcce pomocí antibiotik. V buňkách, které přežily, došlo úspěšně k homologní rekombinaci linearizovaného plazmidu do genomu, a proto byly rezistentní na selekční antibiotikum..

### 3.1.11 Kultivace *T. brucei*

Krevní forma buněk rostla v HMI-9 médiu v 37°C a pod 5 % CO<sub>2</sub> (Hirumi *et al.*, 1997).

## 3.2 Růstové křivky

### 3.2.1 Princip

Tato metoda se používá k porovnání růstu buněk, ve kterých byla spuštěna RNAi s buňkami neindukovanými. Pokud je růst indukovaných buněk zpomalen, či zastaven, gen se považuje za esenciální.

### 3.2.2 Postup

Buňky s plazmidem p2T7\_177 byly nechány růst v 5ml v HMI-9/G/Ph médiu a jejich hustota byla měřena každých 24 hodin pomocí Beckham Coulter Z2 Particle Coulter. Startovací kultura měla hustotu  $1 \times 10^5$  buněk/ml a buňky byly rozředěny každý den na začínající koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk/ml. Bylo počítáno celkem šest buněčných linií RNAi DKO TbHGPRT/TbXPRT, tři indukované a tři neindukované. Buňky byly počítány po 8 dní.

## 3.3 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS PAGE) a Westernový přenos

### 3.3.1 Princip

Westernový přenos je analytická metoda, která se používá k zjištění určitého proteinu. Prvně se proteiny rozdělí polyakrylamidovou elektroforézou a poté jsou proteiny pomocí elektrického pole přeneseny na membránu. Na membráně jsou hledané proteiny označeny specifickými protilátkami. Na rozdíl od DNA jsou proteiny více různorodé co se týče tvaru, náboje a velikosti. Proto se proteiny denaturují pomocí SDS-PAGE. Takto se rozpadnou komplexy složené z více proteinů, všechny proteiny dostanou díky SDS-PAGE záporný náboj a budou se pohybovat v elektrickém poli podobně jako DNA na základě velikosti. Rozdělené proteiny můžeme označit specifickými protilátkami, ale ty bohužel nefungují v polyakrylamidovém gelu. Proto rozdělené proteiny přeneseme elektrickým přenosem na nitrocelulózovou membránu. Poté membránu promýváme v roztoku specifické protilátky pro náš hledaný protein. Po vymytí primární protilátky je navázaná protilátka spojená s antigenem označena sekundární protilátkou, která se naváže na antigen primární protilátky a nese specifický enzym. Protein je pak zviditelněn barevnou reakcí pomocí enzymu sekundární protilátky.

### 3.3.2 Postup

Bylo stočeno  $5 \times 10^7$  buněk dvou linií, exprimující TbXPRT\_v5 a TbHGPRT\_v5 při 4°C a 1300xg. Médium bylo odstraněno a k buňkám byl přidán 1ml PBS-G. Buňky s PBS-G byly stočeny při 4°C a 1300xg. Supernatant byl odstraněn a buňky byly rozpuštěny ve 100  $\mu$ l PBS (5,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , 3,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,145 M NaCl). Poté, co k nim bylo přidáno 50  $\mu$ l SDS-PAGE loading dye (63 mM Tris HCl, 10 % Glycerol, 2 % SDS, 0.0025 % Bromophenol Blue, pH 6.8), byly povařeny 7 minut při 97°C, aby se jim rozpustily buněčné stěny. Pak bylo 30  $\mu$ l lyzátu ( $1 \times 10^7$  buněk) od každého vzorku nanášeno na 12 % polyakrylamidový gel. Všechny vzorky včetně markeru projížděly gelem současně.

Proteiny byly přeneseny na membránu pomocí elektrického pole. Membrána s proteiny byla přes noc uchována v 5% roztoku mléka v 1xPBS-T (5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O, 3,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 0,145 M NaCl, 0,05% Tween) přes noc. Další den byla membrána inkubována hodinu při pokojové teplotě s komerční primární protilátkou, myši anti-V5 s rozředěním 1:2000 v PBS-T. Poté byla 3x10 minut promyta v PBS-T. Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou anti-myš spojenou s peroxidázou s rozředěním 1:2000 v PBS-T po jednu hodinu při pokojové teplotě a poté byla znovu promyta 3x 10 minut v PBS-T. Po promytí byl signál zjištěn pomocí záznamového zařízení pro chemiluminiscenci LAS 3000. Celý postup byl zopakován několikrát a nejlepší signál byl použit k dokumentaci.

### **3.4 Buněčná sublokalizace tagovaných proteinů**

Úkolem této práce bylo zjistit lokalizaci proteinů vzniklých expresí TbXPRT a TbHGPRT.

#### **3.4.1 Digitoninová frakcionace**

##### **3.4.1.1 Princip**

Digitonin je rostlinný glykosid a zároveň se dá použít jako detergent, který spolehlivě rozpustí tuky, nejvíce cholesterol. V nízkých koncentracích rozpouští buněčné membrány bohaté na cholesterol (například plazmatické membrány) tím, že vyvolá velké póry. Ve větších koncentracích funguje jako klasický detergent a rozpustí všechny membrány.

Krevní stádium *T. brucei* obsahuje mitochondrii a glykozóm. Pomocí digitoninu jdou tyto orgány snadno oddělit od cytozolu a zbylých organel. Touto metodou ale ovšem nejde určit, jestli je hledaný protein v glykozómu nebo mitochondrii. Proteinové frakce jsou následně ověřeny SDS PAGE a Westernovým přenosem.

##### **3.4.1.2 Příprava frakce celých buněk**

Bylo stočeno 1x10<sup>7</sup> indukovaných buněk exprimujících TbXPRT\_v5 a HGPRT\_v5 při 4°C a 1300xg po dobu 10 minut. Po odebrání média byly nechány buňky na ledě. Buňky byly rozsuspendovány v 1 ml PBS-G. Buňky s PBS-G byly stočeny při 4°C a 1300xg po dobu 10 minut. Supernatant byl opatrně odstraněn. Buňky byly rozsuspendovány v 100 µl PBS. Poté, co k nim bylo přidáno 50 µl 3xSDS-PAGE loading dye, byly povařeny 7 minut při 97°C.

##### **3.4.1.3 Příprava mitochondriální a cytozolické frakce**

Bylo stočeno 1x10<sup>8</sup> buněk při 4°C a 1300xg po dobu 10 minut. Po odebrání média byly

necháány buňky na ledě. Buňky byly rozsuspendovány v 5 ml PBS-G a poté k nim bylo přidáno PBS-G do objemu 14 ml. Buňky s PBS-G byly stočeny při 4°C a 1300xg po dobu 10 minut. Médium bylo opatrně odstraněno. Buňky byly rozsuspendovány v 1 ml PBS-G. Buňky s PBS-G byly stočeny při 4°C a 1300xg po dobu 10 minut. Médium bylo opět opatrně odstraněno. Pelet byl rozsuspendován v 500 µl SoTE (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,6 M sorbitol, 0,4% EDTA) a poté bylo přidáno 500 µl SoTE s 0,03% digitoninu. Buňky byly inkubovány 5 minut na ledě a stočeny při 4°C a 3000xg po dobu 3 minut. Supernatant (cytozolická frakce) byl opatrně přenesen do nové ependorfovy zkumavky. 200 µl bylo odebráno do nové zkumavky a bylo k nim přidáno 100 µl 3x SDS-PAGE loading dye. Organelový pelet byl rozsuspendován ve stejném objemu PBS, jako bylo odebráno cytozolické frakce, a 200 µl (mitochondriální frakce) bylo odebráno a k nim bylo přidáno 100 µl 3x SDS-PAGE loading dye. Oba vzorky byly povařeny 7 minut při 97°C.

#### **3.4.1.4 Westernový přenos**

Frakce byly naneseny na 12 % polyakrylamidový gel a dále postup probíhal stejně, jako je popsáno výše. Primární protilátky byly použity anti-V5, anti-enoláza, anti-hexokináza (všechny ředění 1:1000) a anti-Hsp70 (ředění 1:500). Sekundární protilátky byly použity anti-králík (anti-enoláza, anti-hexokináza) a anti-myš (anti-Hsp70, anti-V5).

### **3.4.2 Lokalizace proteinů v buňce metodou imunofluorescence (IFA)**

#### **3.4.2.1 Princip**

Imunofluorescence je metoda světelné mikroskopie. Tato technika využívá specifitu protilátky k jejímu antigenu a je vizualizována pomocí fluorochromu, nejčastěji fluorescein a rhodamin. Fluorochromy absorbují světlo určité délky a emitují světlo o vyšší vlnové délce. K vyhodnocení pokusu se používá fluorescenční mikroskop se zdrojem UV záření a excitačními filtry.

Tato metoda se dá využít na tkáně, buněčné kultury i jednotlivé buňky a může sloužit k prozkoumání rozmístění proteinů, glykanů a malých biologických i nebiologických molekul. Jsou dva základní typy: přímá a nepřímá. Přímá využívá jednoduchou protilátku. Nepřímá využívá primární a sekundární protilátku. Primární se naváže na cílenou molekulu nebo protein. Sekundární, která nese fluorochrom, rozpozná primární a naváže se na ní. Na jednu primární protilátku se může navázat několik sekundárních, čímž se signál výrazně zesílí.



### 3.4.2.2 Postup

Do každé jamky 24 jamkové misky bylo umístěno krycí sklíčko, na které bylo nanášeno 20  $\mu\text{l}$  poly-L-Lysinu v ředění 1:10 v MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$ . Miska byla nechaná v 37 °C po 1 hodinu, aby se roztok vypařil. Poté byla krycí sklíčka promyta 3x v 1xPBS.

Buňky exprimující TbXPRT\_v5 a TbHGPRT\_v5 byly indukovány tetracyklinem 24 hodin. Neindukované buňky byly použity jako negativní kontrola. Bylo stočeno  $7,8 \times 10^7$  indukovaných buněk a  $1,9 \times 10^7$  neindukovaných buněk po dobu 10 minut a při 1300xg a 4°C. Médium bylo opatrně odstraněno a buňky byly rozuspendovány v 1 ml PBS-G. Buňky v PBS-G byly přeneseny do ependorfovy zkumavky. Buňky byly znovu stočeny 10 minut (1300xg a 4°C), poté bylo PBS-G opatrně odstraněno, buňky byly resuspendovány v 200  $\mu\text{l}$  1xPBS a fixovány pomocí 200  $\mu\text{l}$  7,4 % formaldehydu v 1xPBS. Na každé sklíčko bylo nanášeno 40  $\mu\text{l}$  buněk ve formaldehydu a po 15 minutách byl formaldehyd odstraněn. Nanesené buňky byly 3x promyty ve 100  $\mu\text{l}$  1xPBS. Poté k buňkám bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  01 % Tritonu X-100 v 1xPBS na 10 minut. Po 10 minutách bylo médium odstraněno a buňky promyty 3x v 100  $\mu\text{l}$  1xPBS. Následně bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  5,5% FBS v 1xPBS-T blokujícího roztoku. Buňky byly inkubovány s pufrům 45 minut. Pufr byl odebrán a buňky byly promyty 2x ve 100  $\mu\text{l}$  1xPBS. Buňky byly inkubovány 1 hodinu se 40  $\mu\text{l}$  roztoku 3% BSA v 1xPBS-T s primárními protilátkami. Každá linie byla inkubována s anti-V5 a anti-hexokinázou respektive s anti-V5 a anti-enolázou. Všechny protilátky byly ředěny 1:200. Poté byly buňky promyty 3x ve 100  $\mu\text{l}$  1xPBS-T a 2x ve 100  $\mu\text{l}$  1xPBS. Sekundární protilátky byly ředěny 1:400 v roztoku 3% BSA v 1xPBS-T. Použité protilátky byly komerční, kozí anti-myší značená Texas Red<sup>®</sup>-X (Molecular Probes, Invitrogen) proti myší anti-V5 protilátce a kozí anti-králík značená FITC (Sigma) proti polyklonálním protilátkám anti-hexokinázy a anti-enolázy. K buňkám bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku a inkubace trvala opět hodinu ve tmě. Poté byly buňky promyty 3x ve 100  $\mu\text{l}$  1xPBS-T a 2x ve 100  $\mu\text{l}$  1xPBS. Sklíčka byla následně prohlédnuta fluorescenčním mikroskopem a nejlepší obrázky byly zdokumentovány. Fotky z mikroskopu byly upraveny ve photoshopu.

## 3.5 Alamar blue esej

### 3.5.1 Princip

Buněčná proliferaci je měřitelná pomocí alamar blue esej. Tato metoda zahrnuje speciální oxidačně-redukční indikátor resazurin, který je indikátor buněčného metabolismu. Resazurin jako takový není fluorescentní, nicméně může být zredukován na silně

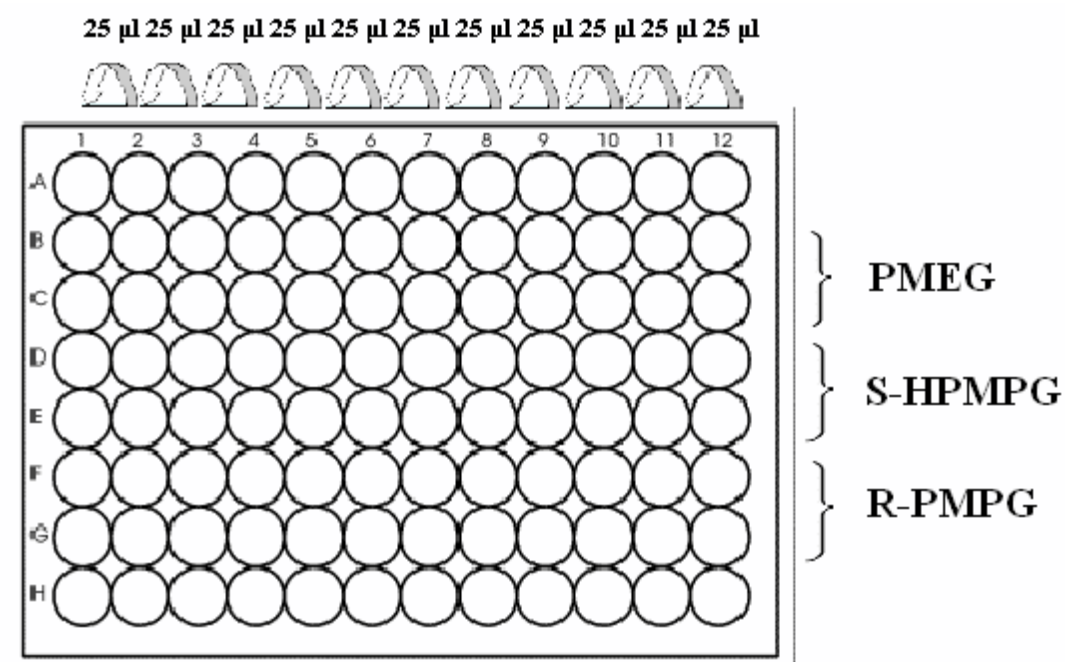
fluorescentní resofurin. Tato esej je právě založena na schopnosti živých, metabolicky aktivních buněk přeměnit resazurin na fluorescentní resofurin. Intenzita fluorescence je tak přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk. U *T. brucei* je tato esej velmi často využívána ke skríningu potenciálních farmak (Raz *et al.*, 1997).

### 3.5.2 Sklizení buněk

Pro každý gen byly připraveny pTv5/TbHGPRT a pTv5/TbXPRT dvě buněčné linie, jedna indukována tetracyklinem (IND) a druhá neindukována (NON). Pro každou misku bylo připraveno  $2 \times 10^5$  buněk/ml tak, aby v každé jamce bylo  $1 \times 10^4$  buněk.

### 3.5.3 Inkubace s fosfanáty acyklických nukleosidů

Byly použity 96 jamkové misky (Pro každou linii jedna). Do každé z jamek 2-12 bylo napipetováno 100  $\mu$ l média. Do jamky 1 bylo napipetováno 75  $\mu$ l média. Do jamky 12 bylo napipetováno 25  $\mu$ l příslušného ANP o koncentraci 1 M. 25  $\mu$ l média společně s ANP bylo postupně přeneseno do každé jamky, čímž vzniklo ředění 5. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l buněk. Schéma postupu je na obrázku (obr. 3.4). Buňky byly inkubovány 24 hodin v 37°C a pod 5 % CO<sub>2</sub>.



Obr. 3.4: Schéma ředění fosfanátů acyklických nukleosidů.

### **3.5.4 Inkubace buněk s resazurinem**

Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 20  $\mu$ l sterilního roztoku resazurinu (100  $\mu$ g/ml). S roztokem resazurinu byly buňky inkubovány 12 a 24 hodin. Fluorescence vzorků byla přečtena pomocí Tecan Infinite za použití fluorescenční excitační vlnové délky 540-570 nm (vrchol 570 nm) a fluorescenční emise v rozmezí 580-610 nm (vrchol 585 nm).

### **3.5.5 Zpracování dat**

Získaná data byla zpracována pomocí softwaru GraphPad Prism za použití nelineární regrese a sigmodiální dose-response analýzy.

## 4 Výsledky

### 4.1 Identifikace genů pro HGPRT a XPRT v genomu *T. brucei*.

Gen pro TbHGPRT (Tb927.10.1400) byl anotován v genomu *T. Brucei* ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), jelikož tento gen byl již v minulosti identifikován a charakterizován (Allen and Ullman, 1993). Gen pro TbXPRT (Tb927.10.1390) byl identifikován pomocí homológního vyhledávání (BLAST search) za použití XPRT proteinové sekvence z *L. donovani* a *L. major* (Jardim *et al.*, 1999) (obr. 4.1).

```
Ld      ---MLPTHSCCKGFVDAQGRVFDVGREYPMASGIVATEDVIQTNIKAMAHTIAKDYKSLSH
Lm      ---MLPNHSCCKGFVDAQGRVFDVGREYPMASGIVATEDVIQANIKAMANTIAKDYKSLSH
TbXPRT  MHSQHPLKPNFVGRDADGNVTVDGRSYPMAESVVATESTIHRSMKEMAQTLANAYKTLKH
          *  :.      **:*.* *****.....:*****.:  :.* **:*:*:*  **:*.*

Ld      RDARLSPSTAETAEEAAEAPISYDNPLIIISVLKGSYIFTSDFIRYLGDCGLPHVVDF
Lm      RDVRLSPG---TAATAEAAEAPISYDNPLIIISVLKGSYIFTSDFIRYLGDCGLPHVVDF
TbXPRT  RDTHNK-----GNSALAPITDENPLIIISVLKGSYIFTADMVRYLGDCGLPNVVDF
          **.:.      .:.* ***: :*****:*****:*****:*****:*****

Ld      VRLASYNSTGKSTGQISMLAGLRFENLRGKHVLIIVEDVCDGSRGTLRFLRDIYIMEKFQPKS
Lm      VRLASYNSTGKSTGQISMLAGLRFENLRGKHVLIIVEDVCDGSRGTLRFLRDIYIMEKFQPKS
TbXPRT  IRITSYRGTTKSSGTQVLDNLRFTLTKGKVLIMEDIADTGRMKNLVEKIRREYRPAS
          :*:***. *.*:* :.*.* ***: * *****:***:***:***:***: * : * :*:.*

Ld      IKTLVMVNKEQAARKVDFDPEYFCLAGPNKYIVGYGFEVNDRYRDLRHILILRDGEATRY
Lm      VKTLVMVNKEQAARKLDFDPEYFCLAGPNKYIVGYGFEVNDRYRDLRHIFILRDGEATRY
TbXPRT  LKVCVLVDKP-GGRVVDFKPEFVCLTAPTRYVVGYGFEVNDRYRNYRHVFLKPEYAKRY
          :*.* **:*:* ..* :**.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***.*

Ld      PAKL
Lm      PAKL
TbXPRT  PSKL
          *:*:**
```

Obr. 4.1: Alignment proteinových sekvencí pro enzym XPRT z *T. brucei* (Tb), *L. donovani* (Ld) a *L. major* (Lm). Alignment byl vytvořen pomocí programu CLUSTAL W (1.83).

### 4.2 Příprava konstruktů za účelem o umlčení TbHGPRT a TbXPRT genové exprese a za účelem overexprese TbHGPRT a TbXPRT v krevním stádiu *T. brucei*

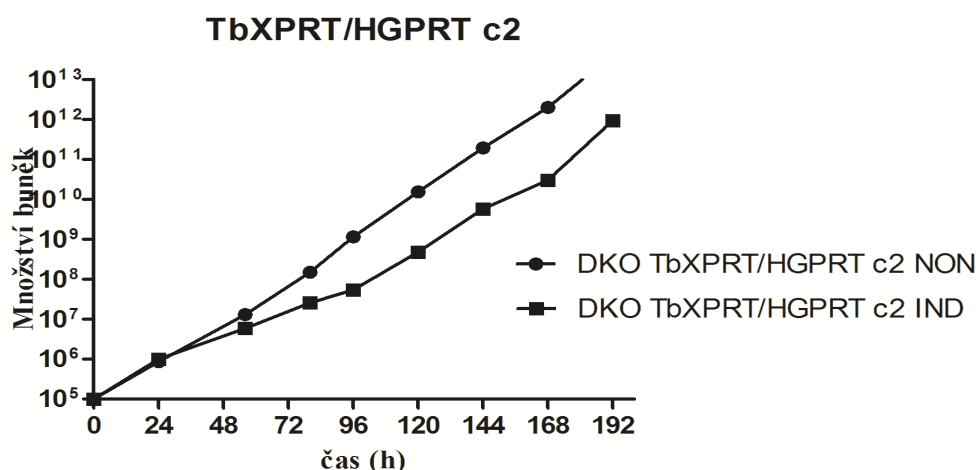
Pomocí PCR reakce byly namnoženy celé otevřené čtecí rámce enzymů TbHGPRT a TbXPRT pro účely overexprese a část genu TbHGPRT pro účely RNAi. Všechny produkty byly následně ověřeny na agarózovém gelu. Z něho byly následně vyizolovány pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), zaklonovány do pGEM-Teasy plazmidu a transformovány do XL1-Blue *E. coli*. Z narostlých buněčných kolonií byla vyizolována plazmidová DNA pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN. Úspěšnost klonování

byla ověřena restrikcí enzymem HindIII pro plazmid pGEM-Teasy/TbHGPRT (RNAi) a enzymy HindIII a BamHI pro plazmidy pGEM-Teasy/TbXPRT a pGEM-Teasy/TbHGPRT (overexpresse). Elektroforéza v agarózovém gelu ukázala velikost části genu HGPRT okolo 400 bp pro klonování do RNAi vektoru a velikost celých čtecích rámců (okolo 600 bp) pro XPRT a HGPRT za účelem klonování do pTv5 vektoru. Tyto velikosti odpovídaly očekávaným velikostem. Produkty byly opět vyizolovány z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). TbHGPRT byl zaklonován do plazmidu p2T7-177, který již obsahoval část genu pro TbXPRT (Martina Aistleitner, bakalářská práce, 2012). Tímto byl vytvořen plazmid p2T7-177/HGPRT/XPRT pomocí něhož bude možno umlčet expresi obou genů zároveň. TbHGPRT a TbXPRT byly jednotlivě zaklonovány do plazmidu pTv5 pro účely overexpresse. Úspěšnost klonování byla ověřena sekvenací. Plazmidy byly následně linalizovány pomocí enzymu NotI a elektroporovány do krevního stádia SM *T. brucei*.

### 4.3 Double knock-down (DKO) RNAi pro TbHGPRT/TbXPRT geny

#### 4.3.1 Analýza růstového fenotypu u DKO RNAi buněčné linie

Růstový fenotyp indukovaných a neindukovaných linií nesoucích RNAi vektor s fragmenty genu pro HGPRT a XPRT byl sledován po 8 dní. Po indukcii tetracyklinem do výsledné koncentrace 1  $\mu\text{g/ml}$  byla množství buněk pravidelně měřeno pomocí přístroje Beckman Coulter Z2 Particle Coulter. Startovací kultura měla hustotu  $1 \times 10^5$  buněk/ml a buňky byly rozředěny každý den na začínající koncentraci  $1 \times 10^5$ . Z naměřených hodnot byl sestaven graf (obr. 4.2).

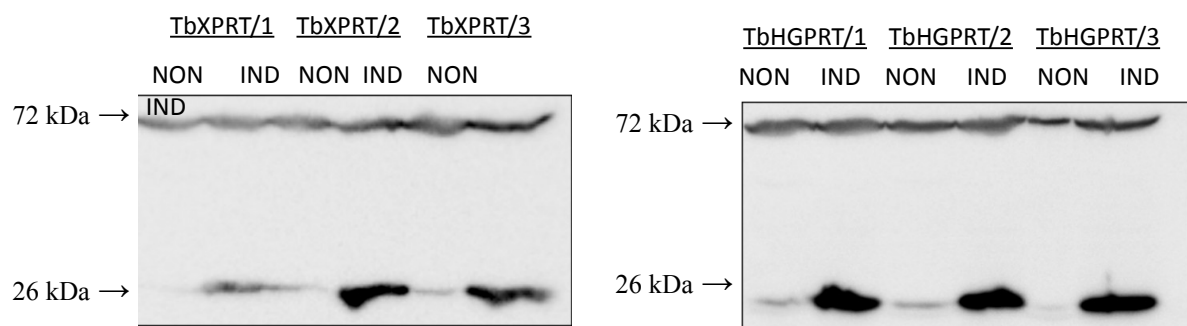


Obr. 4.2: HGPRT a XPRT geny jsou esenciální pro krevní stádium *T. brucei*. NON neindukované buňky, IND indukované buňky.

Růstové křivky linií nesoucích RNAi konstrukty pro oba cílové geny ukázaly pokles růstu již druhý den po RNAi indukci, nicméně čtvrtý den se růst indukovaných buněk již obnovil a růstový fenotyp posléze zanikl.

#### 4.4 Pilotní exprese v5-tagovaných TbHGPRT a TbXPRT proteinů

Overexprese genů pro HGPRT a XPRT byla spuštěna pomocí tetracyklinu a buňky byly sklizeny po 24 hodinách. Buněčné lyzáty indukovaných a neindukovaných linií byly rozděleny pomocí SDS-PAGE gelu a tagované proteiny byly ověřeny pomocí Westernového přenosu a reakcí s protilátkou proti v5 konci. Tímto způsobem bylo ověřeno, že cílené TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5 proteiny jsou v buňce syntetizovány po přidání tetracyklinu do média. Výsledky westernových přenosů jsou na obrázcích (obr 4.3 a 4.4).



**Obr. 4.3: Westernová analýza nadprodukce proteinu genu TbXPRT po 24 hodinách.** Lyzáty byly nanesené na 12% polyakryl amidový gel. Velikost proteinu odpovídá očekávané velikosti, což je 26 kDa. Monoklonární protilátka proti mitochondriálnímu proteinu Hsp70 ukazuje rovnoměrné nanesení na gel.

**Obr. 4.4: Westernová analýza nadprodukce proteinu genu TbHGPRT po 24 hodinách.** Lyzáty byly nanesené na 12% polyakryl amidový gel. Velikost proteinu odpovídá očekávané velikosti, což je 23 kDa. Monoklonární protilátka proti mitochondriálnímu proteinu Hsp70 ukazuje rovnoměrné nanesení na gel.

Ze všech obrázků je patrné, že nanesení lyzátů na polyakrylamidový gel bylo rovnoměrné a že tudíž výsledky nejsou zkreslené špatným nanesením na gel a overexprese obou genů proběhla úspěšně. Klony TbHGPRT/1 a TbXPRT/1 byly ponechány na další pokusy.

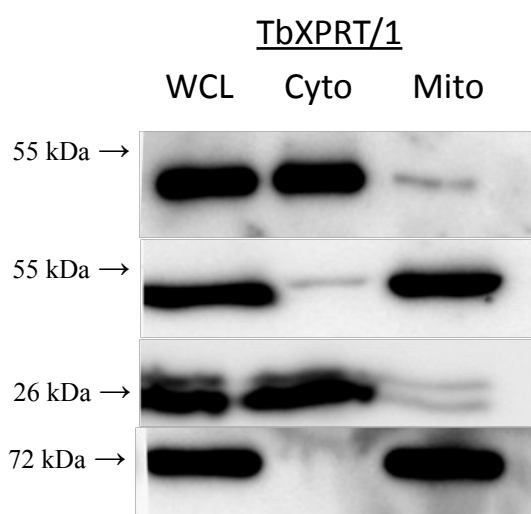
#### 4.5 Vnitrobuněčná lokalizace TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5 proteinů

U *T. brucei* je lokalizace PSP neznámá. Z tohoto důvodu jsme použili geneticky modifikované linie exprimující TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5 proteiny ke zjištění jejich

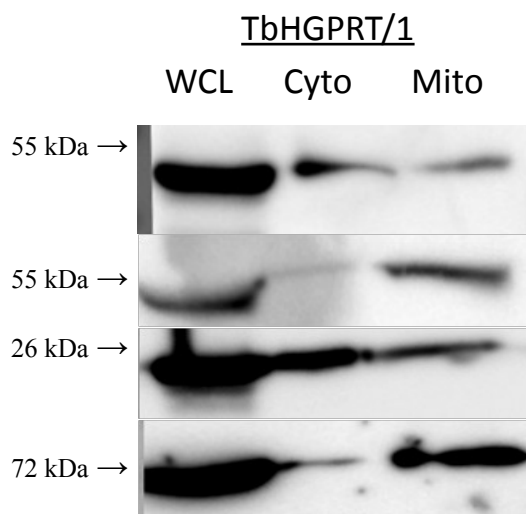
vnitrobuněčné lokalizace. K tomuto účelu jsme použili dvě metody: digitoninovou frakcionaci buňky a detekci proteinu pomocí imunofluorescence.

#### 4.5.1 Digitoninová frakcionace

Tato metoda byla použita ke zjištění lokalizaci enzymů HGPRT a XPRT. Touto metodou se dá zjistit, jestli se nachází protein v cytozolu nebo v organelách, jako je mitochondrie nebo glykozóm, protože digitonin rozpustí plazmatickou membránu, ale subbuněčné membrány, jako je membrána mitochondrie nebo glykozómu, zůstanou neporušené. Takto se dají jednotlivé buněčné frakce oddělit. Výsledky digitoninových frakcionací jsou na obrázcích (obr. 4.5 a 4.6).



**Obr. 4.5: Digitoninová frakcionace klonu TbXPRT\_v5/1.** První blot enoláza (47 kDa, cytosolický marker), druhý blot hexokináza (50 kDa, glykozomální marker), třetí blot TbXPRT\_v5 (26 kDa, cílový protein), čtvrtá blot Hsp70 (71 kDa, mitochondriální marker). WCL – celkový buněčný lyzát, Cyto – cytosolický vzorek, Mito – vzorek obsahující membránové proteiny.

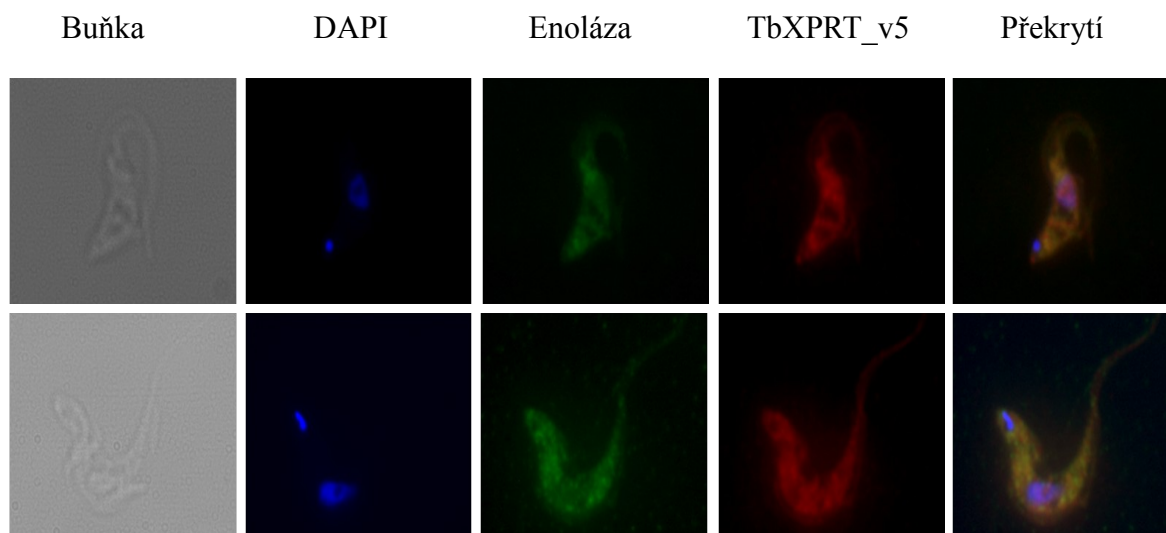


**Obr. 4.6: Digitoninová frakcionace klonu TbHGPRT\_v5/1.** První blot enoláza (47 kDa, cytosolický marker), druhý blot hexokináza (50 kDa, glykozomální marker), třetí blot TbHGPRT\_v5 (26 kDa, cílový protein), čtvrtá blot Hsp70 (71 kDa, mitochondriální marker). WCL – celkový buněčný lyzát, Cyto – cytosolický vzorek, Mito – vzorek obsahující membránové proteiny.

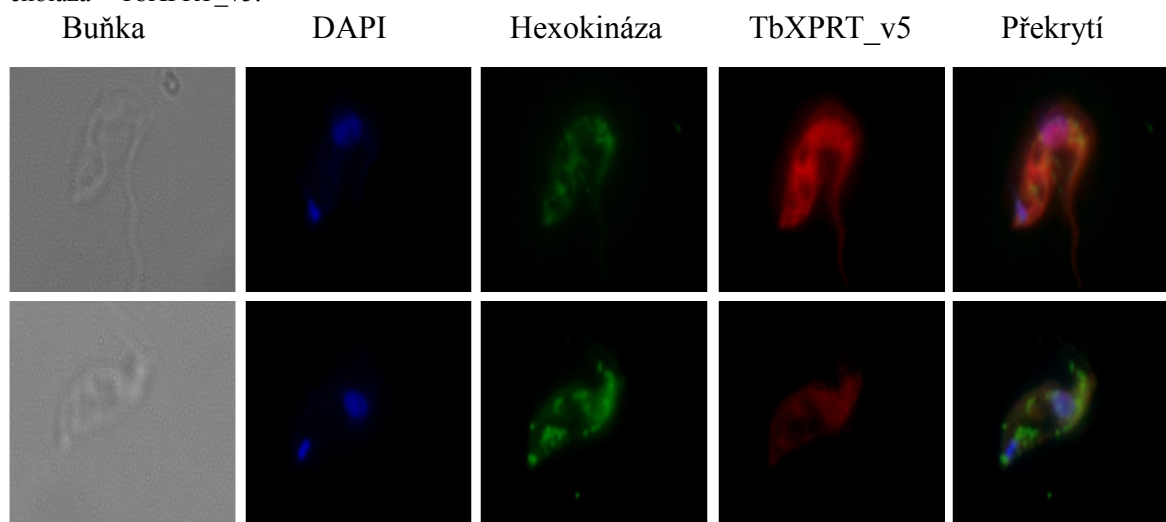
Enoláza je cytosolický marker. Hexokináza je marker glykozómu a Hsp70 je mitochondriální protein. Srovnáním umístěním tagovaných proteinů s hexokinázou, Hsp70 a enolázou je vidět, že cílové proteiny jsou ve stejné frakci jako je enoláza. Proto výsledky digitoninové frakcionace ukazují, že oba tagované proteiny TbXPRT\_v5 a TbHGPRT\_v5 jsou pravděpodobně lokalizovány v cytozolu.

#### 4.5.2 Lokalizace TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5 proteinů pomocí imunofluorescenční eseje

Protože metodou digitoninové frakcionace nelze rozlišit lokalizaci mezi mitochondrií a glykozómem, byla použita metoda imunofluorescence. Touto metodou se dá určit lokalizace tagovaných proteinů v celých neporušených buňkách. Fotky z imunofluorescenční eseje jsou na obrázcích (obr. 4.7, 4.8, 4.9 a 4.10).

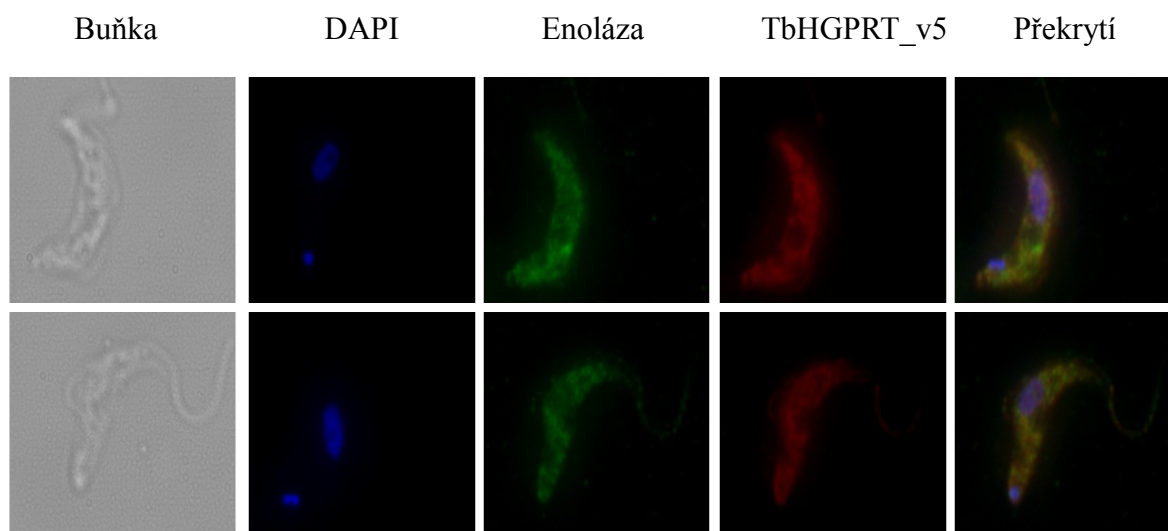


**Obr. 4.7: Indukované buňky exprimující TbXPRT\_v5, enoláza, ředění 1:200.** DAPI-4',6-diamidino-2-fenylindol se silně váže na DNA, kinetoplast a jádro. Enoláza byla použita jako cytozolická kontrola. TbXPRT\_v5 vypadá stejně jako enoláza, z čehož lze soudit, že je tento protein cytozolický. Překrytí-DAPI + enoláza + TbXPRT\_v5.

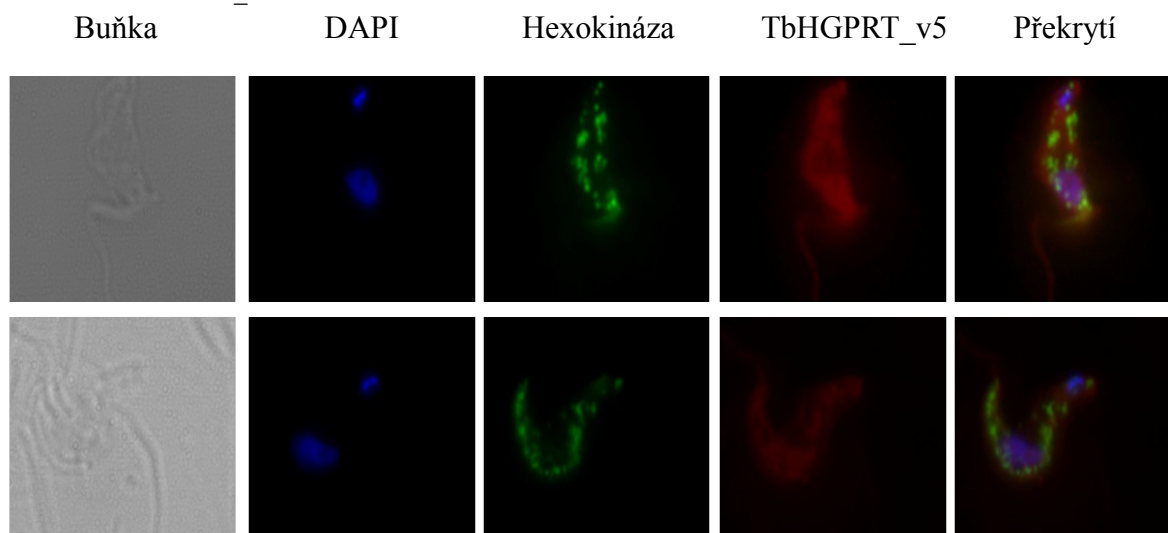


**Obr. 4.8: Indukované buňky exprimující TbXPRT\_v5, hexokináza, ředění 1:200.** DAPI-4',6-diamidino-2-fenylindol se silně váže na DNA, kinetoplast a jádro. Hexokináza byla použita jako glykozomální kontrola. TbXPRT\_v5 nevypadá stejně jako hexokináza, z čehož lze soudit, že je tento protein cytozolický. Překrytí-DAPI + hexokináza + TbXPRT\_v5.





**Obr. 4.9: Indukované buňky exprimující TbHGPRT\_v5, enoláza, ředění 1:200.** DAPI-4',6-diamidino-2-fenylindol se silně váže na DNA, kinetoplast a jádro. Enoláza byla použita jako cytozolická kontrola. TbHGPRT\_v5 vypadá stejně jako enoláza, z čehož lze soudit, že je tento protein cytozolický. Překrytí-DAPI + enoláza + TbHGPRT\_v5.

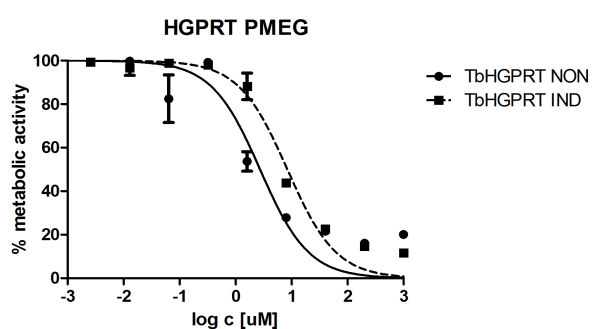


**Obr. 4.10: Indukované buňky exprimující TbHGPRT\_v5, hexokináza, ředění 1:200.** DAPI-4',6-diamidino-2-fenylindol se silně váže na DNA, kinetoplast a jádro. Hexokináza byla použita jako glykozomální kontrola. TbHGPRT\_v5 nevypadá stejně jako hexokináza, z čehož lze soudit, že je tento protein cytozolický. Překrytí-DAPI + hexokináza + TbHGPRT\_v5.

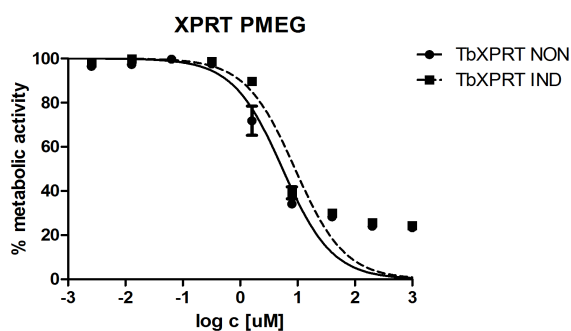
Cílový protein je označen červeně, glykozóm a cytozol jsou zvýrazněny zeleně. Jádro a kinetoplast (organely obsahující DNA) jsou označeny modře. Porovnáním lokalizace tagovaných proteinů s hexokinázou (marker glykozómu) a enolázou (marker cytozolu) je vidět, že tagované proteiny mají stejnou lokalizaci jako cytozol. Pokud fotografie na sebe přiložíme (Překrytí), je vidět společná lokalizace oranžově. Mnohem více oranžové je vidět právě na obrázku se zvýrazněným cytozolem, než s glykozómem, proto byla lokalizace určena do cytozolu.

## 4.6 Alamar blue esej

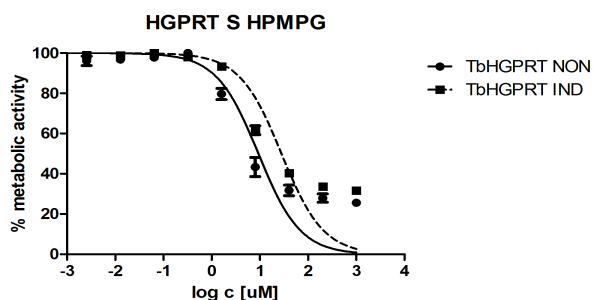
Metodou, jak dokázat, že fosfanáty acyklických nukleosidů inhibují 6-oxopurin ribozyltransferázu, byla alamar blue esej za použití buněčných liniích pTv5/TbHGPRT a pTv5/TbXPRT. Tato metoda je založená na schopnosti živých, metabolicky aktivních buněk přeměnit resazurin na fluorescentní resofurin. Množství živých buněk se dá následně změřit pomocí fluorescenční čtečky. Použité fosfanáty acyklických nukleosidů byly: PMEG, S HPMPG a R PMPG. Buňky byly indukované tetracyklinem a následně bylo sledováno, jak fosfanáty acyklických nukleosidů působí na indukované a neindukované linie. Byla také zjišťována hodnota EC<sub>50</sub> a její změna. Pokud by u indukovaných buněk značně narostla, znamenalo by to, že testovaný inhibitor působí na daný overexprimovaný protein, jelikož je potřeba větší koncentrace inhibitoru pro stejný cytotoxický účinek. Výsledky v podobě grafu zpracované pomocí softwaru GraphPad Prism jsou na obrázcích (obr. 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 a 4.16).



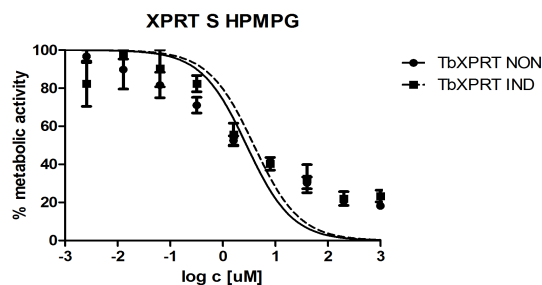
Obr. 4.11: Působení PMEG na enzym HGPRT.



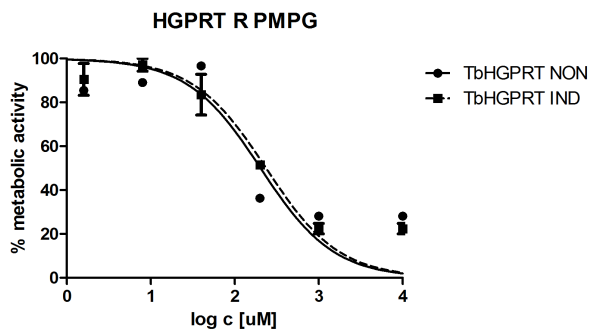
Obr. 4.12: Působení PMEG na enzym XPRT.



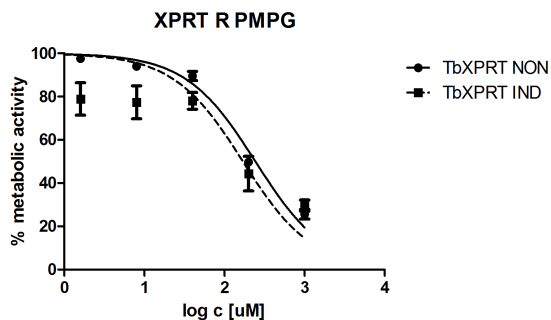
Obr. 4.13: Působení S HPMPG na enzym HGPRT.



Obr. 4.14: Působení S HPMPG na enzym XPRT.



Obr. 4.15: Působení R PMPG na enzym HGPRT.



Obr. 4.16: Působení R PMPG na enzym XPRT.

Srovnání změny EC50 je ukázáno v tabulce (tab. 4.1).

Tab. 4.1: Změny IC50 pro jednotlivé inhibitory.

Buněčná linie	PMEG EC 50 [ $\mu$ M]	S HPMPG EC 50 [ $\mu$ M]	R PMPG EC 50 [ $\mu$ M]
pTv5/TbHGPRT NON	<b>2.4±0.5</b>	<b>4.1±0.5</b>	193±11
pTv5/TbHGPRT tagged IND	<b>7.5±1.1</b>	<b>7±1.2</b>	263±42
pTv5/TbXPRT NON	1.9±1	2.4±1.4	220±74
pTv5/TbXPRT tagged IND	3.3±1.5	2.5±0.7	180±31

Z grafů a tabulky je patrné, že tyto tři fosfanáty acyklických nukleosidů působily více na enzym HGPRT. Toto je pochopitelné, jelikož základem těchto sloučenin je guanin, nikoliv xantin. Z grafů je také patrné, že se křivka u indukovaných linií posunula doprava a tudíž buňky exprimující TbHGPRT\_v5 byly odolnější. Nejúčinnější se z fosfanátů acyklických nukleosidů ukázal PMEG, u něhož se EC50 dokonce ztrojnásobila po indukci exprese TbHGPRT\_v5. V případě inhibitoru S HPMPG se EC50 u indukovaných buněk zvýšila dvakrát. Žádné významné zvýšení nebylo pozorováno v případě R PMPG. Nicméně tento inhibitor působí na buňku až při vysokých koncentracích, a tudíž nebude dále ani zkoumán.

V dalších pokusech by bylo dobré zkusit další ANP sloučeniny, které mají stejný zbytek,

ale na místě guaninu by byl xantin. Tyto sloučeniny jsou už pro naši laboratoř dostupné a budou v budoucnu vyzkoušeny na buněčné linii pTv5/XPRT.

## 5 Diskuse a závěr

V této práci jsem se zaměřila na dva proteiny, které by měly být esenciální pro *T. brucei* díky jejich roli v metabolismu purinů (Berg *et al.*, 2010b). Na základě homologie genu Tb927.10.1390 s *L. donovani* a *L. major* XPRT jsme tento gen určili jako domnělou XPRT. Gen Tb927.10.1400 byl již v genomové databázi *T. brucei* (www.genedb.org) anotován jako HGPRT (Allen and Ullman, 1993). Tyto predikce mohou být experimentálně podpořeny, pokud se ukáže, že domnělá TbXPRT má vyšší afinitu vůči xantinu, kdežto TbHGPRT má vyšší afinitu vůči guaninu a hypoxantinu. V rámci jiné bakalářské práce (Martina Aistleitner, Cytotoxicity screen of the acyclic nucleoside phosphonates against bloodstream stage of *Trypanosoma brucei* and validation of their putative target HGXPRT enzymes, 2012) jsme ukázali, že jednotlivé umlčení těchto proteinů nevedlo k růstovému fenotypu. Tento výsledek ukazuje na známý fakt, že i když afinita těchto enzymů vůči různým substrátům je různá, mohou katalyzovat přeměnu všech 6-oxo purinů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro umlčení obou genů zároveň. Růstové křivky ukázaly, že DKO RNAi indukované buňky vykazovaly již od druhého dne růstový fenotyp, který se prohluboval až do čtvrtého dne. Pátý den po RNAi indukci došlo k obnovení růstu indukovaných buněk, což je typické pro RNAi linie krevního stádia, u kterých je umlčen esenciální gen. V těchto případech buňky ztrácí svou vnímavost vůči indukci RNAi (např. mutací T7 promotoru, tet represoru apod.) a přestanou produkovat dsRNA. Nicméně z pozorovaného růstového fenotypu lze usoudit, že oba proteiny jsou esenciální pro krevní stádium *T. brucei*. Podobná situace byla také sledována u *L. donovani*, kdy knockouty jednotlivých genů pro HGPRT a XPRT nevyústily v růstový fenotyp, nicméně vypnutí obou genů zároveň bylo letální pro buňky *L. Donovani* (Boitz and Ullman, 2006a), (Boitz and Ullman, 2006b). V případě naší studie RNAi u *T. brucei* je nutné zmínit fakt, že RNAi nebyla ověřena ani metodou Northern blotingu (detekce mRNA cílového genu v neindukovaných a indukovaných buňkách), ani metodou western blotu, jelikož specifické protilátky detekující *T. brucei* HGPRT a XPRT nejsou dostupné. Ověření účinnosti RNAi je naplánované do budoucna.

Druhým úkolem této práce bylo zjistit, kde jsou lokalizovány HGPRT a XPRT enzymy. PSP byla poměrně intenzivně studována v buňkách *L. Donovani* (Shih *et al.*, 1998), kde tyto proteiny byly lokalizovány do glykozómu prvně pomocí konfokální mikroskopie a následně byla lokalizace ověřena také imunofluorescenční mikroskopií (Shih *et al.*, 1998). Pro lokalizaci do glykozómu u *L. donovani* také svědčí terminální C-konec, tripeptid Ser-Lys-Val, který je vyžadován při lokalizaci do glykozómu. Vytvořením mutanta *L. donovani*, který

tento konec neměl, se tento předpoklad potvrdil (Inoue *et al.*, 2005). Lokalizace v této práci u *T. brucei* byla určena pomocí dvou se doplňujících metod: digitoninové frakcionace a imunofluorescenční eseje. Frakcionace pomocí digitoninu ukázala na lokalizaci v cytozolické, nikoliv v membránové frakci. Cytozolická lokalizace byla také ukázána metodou imunofluorescence in situ, kde signál pro TbHGPRT\_v5 a TbXPRT\_v5 proteiny nekolokalizoval s glykozomálním markerem, enzymem hexokinázou. Tyto výsledky jsou v rozporu se studií provedenou na leishmáníích (Shih *et al.*, 1998). Zde je třeba zmínit, že lokalizace proteinů do glykozómu, je určována na základě C- nebo N-terminálního signálu. Je zcela možné, že v případě HGPRT a XPRT je terminální signál umístěn na C-terminálním konci, a tudíž byl schován díky přítomnosti C-terminální v5 tagu. V budoucnu bude tedy třeba exprimovat v buňkách *T. brucei* N-terminálně tagované HGPRT a XPRT a zmíněnými metodami studovat jejich buněčnou lokalizaci znovu. Je také možné, že overexprese byla natolik silná, že většina tagovaného proteinu nebyla do glykozómu importována, a tudíž signál byl změřen především v cytozolické frakci. V tomto případě nižší koncentrace indukční látky, nebo změna promotoru by pomohla snížit expresi cílených proteinů.

Třetím úkolem této práce bylo zjistit, zda tři fosfanáty acyklických nukleosidů (PMEG, S HPMPG, R PMPG) inhibují jejich potenciální cíl, enzym HGPRT či XPRT. Tento pokus ukázal, že sloučenina PMEG a S HPMPG inhibuje růst krevního stádia v mikromolárním množství, R PMPG je slabší inhibitor působící na buňku v daleko větších koncentracích. Buněčná linie exprimující domnělou HGPRT byla odolnější vůči účinku inhibitoru, jelikož změřená EC50 hodnota byla až 3x větší ve srovnání s buňkami neindukovanými. Oproti tomuto výsledku buněčná linie exprimující potenciální XPRT nebyla významně více odolná vůči účinku PMEG, S HPMPG a R PMPG. Tyto výsledky ukazují, že vybrané fosfanáty acyklických nukleosidů mají větší afinitu pro enzym HGPRT, než pro enzym XPRT, což je v souladu s jejich funkcí, jelikož všechny fosfanáty acyklických nukleosidů měly jako hlavní strukturní jednotku guanin. Proto v budoucnu plánujeme vyzkoušet jiné fosfanáty acyklických nukleosidů, které budou mít ve své struktuře zabudovaný xantin. Tyto látky by měly lépe inhibovat enzym XPRT a v kombinaci s fosfanáty acyklických guanosinů, které už byly úspěšně vyzkoušeny, by mohly být vhodnými inhibitory krevního stádia *T. brucei*.

## 6 Literatura

- Abdelwahab, N. Z., A. T. Crossman, L. Sullivan, M. A. Ferguson & M. D. Urbaniak, (2012) Inhibitors incorporating zinc-binding groups target the GlcNAc-PI de-N-acetylase in *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness. *Chem Biol Drug Des* **79**: 270-278.
- Allen, T. E. & B. Ullman, (1993) Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* **21**: 5431-5438.
- Berg, M., L. Kohl, P. Van der Veken, J. Joossens, M. I. Al-Salabi, V. Castagna, F. Giannese, P. Cos, W. Versees, J. Steyaert, P. Grellier, A. Haemers, M. Degano, L. Maes, H. P. de Koning & K. Augustyns, (2010a) Evaluation of nucleoside hydrolase inhibitors for treatment of African trypanosomiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1900-1908.
- Berg, M., P. Van der Veken, A. Goeminne, A. Haemers & K. Augustyns, (2010b) Inhibitors of the purine salvage pathway: a valuable approach for antiprotozoal chemotherapy? *Curr Med Chem* **17**: 2456-2481.
- Boitz, J. M. & B. Ullman, (2006a) A conditional mutant deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **281**: 16084-16089.
- Boitz, J. M. & B. Ullman, (2006b) *Leishmania donovani* singly deficient in HGPRT, APRT or XPRT are viable in vitro and within mammalian macrophages. *Mol Biochem Parasitol* **148**: 24-30.
- Croft, S. L., M. P. Barrett & J. A. Urbina, (2005) Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* **21**: 508-512.
- De Clercq, E. & A. Holy, (2005) Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 928-940.
- de Jersey, J., A. Holy, D. Hockova, L. Naesens, D. T. Keough & L. W. Guddat, (2011) 6-oxopurine phosphoribosyltransferase: a target for the development of antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* **11**: 2085-2102.
- de Koning, H. P. & S. M. Jarvis, (1997) Purine nucleobase transport in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is mediated by two novel transporters. *Mol Biochem Parasitol* **89**: 245-258.
- Flaspohler, J. A., B. C. Jensen, T. Saveria, C. T. Kifer & M. Parsons, (2010) A novel protein kinase localized to lipid droplets is required for droplet biogenesis in trypanosomes.

- Eukaryot Cell* **9**: 1702-1710.
- Hirumi, H., S. Martin, K. Hirumi, N. Inoue, H. Kanbara, A. Saito & N. Suzuki, (1997) Short communication: cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. evansi* in a serum-free medium. *Trop Med Int Health* **2**: 240-244.
- Hockova, D., A. Holy, M. Masojdkova, D. T. Keough, J. de Jersey & L. W. Guddat, (2009) Synthesis of branched 9-[2-(2-phosphonoethoxy)ethyl]purines as a new class of acyclic nucleoside phosphonates which inhibit *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Bioorg Med Chem* **17**: 6218-6232.
- Holy, A., (2005) Synthesis of acyclic nucleoside phosphonates. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **Chapter 14**: Unit 14 12.
- Inoue, M., Y. Nakamura, K. Yasuda, N. Yasaka, T. Hara, A. Schnauffer, K. Stuart & T. Fukuma, (2005) The 14-3-3 proteins of *Trypanosoma brucei* function in motility, cytokinesis, and cell cycle. *J Biol Chem* **280**: 14085-14096.
- Jardim, A., S. E. Bergeson, S. Shih, N. Carter, R. W. Lucas, G. Merlin, P. J. Myler, K. Stuart & B. Ullman, (1999) Xanthine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. Molecular cloning, biochemical characterization, and genetic analysis. *J Biol Chem* **274**: 34403-34410.
- Kaminsky, R., B. Nickel & A. Holy, (1998) Arrest of *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. brucei brucei* in the S-phase of the cell cycle by (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine ((S)-HPMPA). *Mol Biochem Parasitol* **93**: 91-100.
- Kaminsky, R., C. Schmid, Y. Grether, A. Holy, E. DeClercq, L. Naesens & R. Brun, (1996) (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine [(S)-HPMPA]: a purine analogue with trypanocidal activity in vitro and in vivo. *Trop Med Int Health* **1**: 255-263.
- Keough, D. T., D. Hockova, A. Holy, L. M. Naesens, T. S. Skinner-Adams, J. Jersey & L. W. Guddat, (2009) Inhibition of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase by acyclic nucleoside phosphonates: a new class of antimalarial therapeutics. *J Med Chem* **52**: 4391-4399.
- Krahn, J. M., J. H. Kim, M. R. Burns, J. R. Parry, H. Zalkin, and J. L. Smith, (1997) Coupled formation of an amidotransferase interdomain ammonia channel and a phosphoribosyltransferase active site. *Biochemistry*. **36(37)**:11061-11068
- Matthews, K. R., (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*



**118**: 283-290.

- Matthews, K. R., J. R. Ellis & A. Paterou, (2004) Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol* **20**: 40-47.
- McCulloch, R., (2004) Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol* **20**: 117-121.
- Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman & V. Hannaert, (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1463-1477.
- Pays, E., L. Vanhamme & D. Perez-Morga, (2004) Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol* **7**: 369-374.
- Raz, B., M. Iten, Y. Grether-Buhler, R. Kaminsky & R. Brun, (1997) The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. *Acta Trop* **68**: 139-147.
- Schmidt, G. D. & L. S. Roberts, (2009) *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Companies, New York.
- Shih, S., H. Y. Hwang, D. Carter, P. Stenberg & B. Ullman, (1998) Localization and targeting of the *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome. *J Biol Chem* **273**: 1534-1541.
- Versees, W., K. Decanniere, R. Pelle, J. Depoorter, E. Brosens, D. W. Parkin & J. Steyaert, (2001) Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *J Mol Biol* **307**: 1363-1379.
- Vodnala, M., A. Fijolek, R. Rofougaran, M. Mosimann, P. Maser & A. Hofer, (2008) Adenosine kinase mediates high affinity adenosine salvage in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **283**: 5380-5388.
- Wickstead, B., K. Ersfeld & K. Gull, (2002) Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **125**: 211-216.
- Yu, Z., Y. Liu & Z. Li, (2012) Structure-function relationship of the Polo-like kinase in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*.
- Zhao, Y., Q. Wang, Q. Meng, D. Ding, H. Yang, G. Gao, D. Li, W. Zhu & H. Zhou, (2012) Identification of *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors by pharmacophore- and docking-based virtual screening and synthesis. *Bioorg Med Chem* **20**: 1240-1250.