

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
katedra parazitologie

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Parazitologie



Bc. Aneta Šimáčková

Role železa ve virulenci *Acanthamoeba castellanii*
The role of iron in the virulence of *Acanthamoeba castellanii*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 21. 4. 2022

.....

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala Róbertu Štuřákovi za odborné vedení této práce, ochotu a cenné rady. Velké poděkování patří všem členům laboratoře, především Janu Machovi a Ronaldu Malychovi za jejich trpělivost a vřelý přístup při laboratorních experimentech. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

Abstrakt

Železo je nezbytná živina pro všechny živé organismy. Má zásadní úlohu ve virulenci patogenních bakterií i parazitických eukaryot. I když je železo hojným prvkem v organismu hostitele, není pro parazita snadné ho získat. Schopnost parazitů vyvolat onemocnění závisí z velké části na tom, jak účinné mechanismy pro získání železa vyvinuli.

Tato práce se zabývá vlivem železa na virulenci *Acanthamoeba castellanii*. Je to volně žijící améba, která za výjimečných situací může u člověka vyvolat smrtelné zánětlivé onemocnění mozku nebo člověku poškodit zrak. Kultivací se savčími buňkami se nám povedlo prokázat vliv železa na virulenci améby za využití průtokové cytometrie. Na základě fluorescenčního značení jsme lokalizovali protein AC_IDIP (Iron-Deprivation Induced Protein) v cytosolu. Tento protein byl také izolován a byla proti němu vytvořena polyklonální protilátka, která byla použita ke sledování vlivu dostupnosti železa na hladinu AC_IDIP. Pomocí komparativní proteomické analýzy jsme byli schopni sledovat změny v proteomu *A. castellanii* v závislosti na zdroji živin. Identifikovali jsme velké množství proteinů, jež měly změněnou hladinu za podmínky, kde zdrojem živin byly savčí buňky. Jednalo se zejména o cytoskeletální proteiny. Oproti tomu zastoupení proteinů obsahujících železo, nebo se na jeho metabolismu podílejících, bylo mezi ovlivněnými proteiny velmi nízké, což pro nás bylo neočekávané.

Abstract

Iron is an essential nutrient for all living organisms. It plays a crucial role in the virulence of pathogenic bacteria as well as parasitic eukaryotes. Although iron is an abundant element in the host organism, it cannot be easily obtained by the parasite. The ability of parasites to induce disease depends largely on how efficient the mechanisms for iron acquisition have evolved.

This thesis deals with the effect of iron on the virulence of *Acanthamoeba castellanii*. It is a free-living amoeba that, in exceptional situations, can cause fatal inflammatory brain disease or damage a person's vision. Culturing with mammalian cells allowed us to demonstrate the effect of iron on amoeba virulence using flow cytometry. Based on fluorescent labeling, we localized the protein AC_IDIP (Iron-Deprivation Induced Protein) in the cytosol. This protein was also isolated and a polyclonal antibody was raised against it and used to monitor the effect of iron availability on the AC_IDIP level. Using comparative proteomic analysis, it was possible to monitor changes in the *A. castellanii* proteome depending on the nutrient source. Altered levels of many proteins were detected under conditions where mammalian cells were the nutrient source. These were mainly cytoskeletal proteins. In contrast, the proportion of proteins containing iron or those involved in its metabolism was very low among the affected proteins, which was unexpected.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Železo jako faktor virulence.....	2
2.1.1	Bakterie	2
2.1.2	Protista	4
2.2	<i>Acanthamoeba</i>	6
2.2.1	Faktory virulence	8
2.2.1.1	Adheze	10
2.2.1.2	Fagocytóza	11
2.2.1.3	Extracelulární proteázy	11
2.2.2	Železo jako faktor virulence.....	12
3	Cíle práce	14
4	Materiál a metody	15
4.1	Příprava polyklonální protilátky proti proteinu AC_IDIP	15
4.1.1	Použité plazmidy	15
4.1.2	Amplifikace genu	15
4.1.3	Izolace a klonování DNA fragmentů	16
4.1.4	Transformace do bakterií	16
4.1.5	Indukce proteinové exprese.....	18
4.1.6	Izolace proteinu za denaturačních podmínek	19
4.1.7	Imunizace potkana	21
4.1.8	Testování protilátky metodou western blot.....	21
4.1.8.1	Příprava lyzátů <i>A. castellanii</i>	22
4.1.9	Purifikace protilátky v nativních podmínkách	23
4.2	Transfekce proteinu AC_IDIP	24
4.3	Komparativní proteomická analýza	25
4.3.1	Kultivace buněk	25
4.3.1.1	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	25
4.3.1.2	Fibroblasty BJ a Fibrosarkomy HT-1080.....	26

4.3.2	Inaktivace bakterií.....	26
4.3.3	Růstová analýza <i>A. castellanii</i> s bakteriemi.....	27
4.3.4	Kokultivace <i>A. castellanii</i> s fibrosarkomy	27
4.3.5	Příprava vzorků na proteomickou analýzu.....	28
4.4	Testování vlivu železa na kokultivaci <i>A. castellanii</i> se savčími buňkami	29
4.4.1	Růstová analýza fibroblastů	29
4.4.2	Měření cytotoxicity	30
4.4.3	Zjišťování virulence pomocí průtokové cytometrie.....	31
5	Výsledky	33
5.1	Charakterizace nově identifikovaného proteinu AC_IDIP	33
5.1.1	Purifikace proteinu AC_IDIP.....	33
5.1.2	Testování protilátky	35
5.1.3	Purifikace protilátky.....	36
5.1.4	Denzitometrie.....	37
5.2	Lokalizace proteinu AC_IDIP.....	38
5.3	Vliv železa na virulenci <i>A. castellanii</i> při kokultivaci se savčími buňkami.....	39
5.3.1	Měření cytotoxicity	39
5.3.2	Fluorescenčně značené fibrosarkomy	41
5.3.3	Testování média pro kokultivace	42
5.3.4	Stanovení virulence pomocí průtokové cytometrie.....	43
5.4	Komparativní proteomická analýza <i>A. castellanii</i> při různém zdroji živin.....	45
5.4.1	Bakterie jako zdroj živin	45
5.4.2	Fibrosarkomy jako zdroj živin	46
5.4.3	Vyhodnocení proteomické analýzy.....	47
6	Diskuze.....	50
7	Závěr	54
8	Seznam použitých zkratk.....	55
9	Seznam použité literatury.....	56
10	Seznam příloh	67

1 Úvod

Železo je čtvrtým nejčastěji zastoupeným prvkem v zemské kůře a je nezbytné pro růst prakticky všech živých organismů. Uplatňuje se v mnoha životně důležitých funkcích, zejména ve skladování a transportu kyslíku, ale má i funkci katalyzátoru při transportu elektronů. Železo je důležité jak pro parazity, tak i jejich hostitele. Jelikož volné železo může být pro buňky toxické, vyskytuje se u savců vázané ve speciálních molekulách. A to především v transferinu, laktoferinu a feritinu. Zároveň je tímto způsobem dosaženo antimikrobiální ochrany. Volné železo se v tělních tekutinách téměř nevyskytuje, což komplikuje parazitickým organismům jejich přežívání a vyvolání infekce. Schopnost parazita přežít v hostiteli má spojitost s tím, jak účinné mechanismy pro získání železa z hostitelských molekul vyvinul a od toho se odvíjí i následný průběh a závažnost infekce. Zatímco na výzkum zisku železa a jeho metabolismu u patogenních bakterií je zaměřeno velké množství studií, u parazitických protist je dnes stále poměrně málo informací a je v této oblasti prostor k objevování.

Acanthamoeba castellanii studována v této diplomové práci je toho názorným příkladem. Získávání železa touto amébou a jeho následný metabolismus není objasněn stejně jako jeho vliv na virulenci. Akantaméba je všude přítomná améba, se kterou se běžně dostáváme do kontaktu. Tato améba je označována jako amfizoická, jelikož je ve většině případů volně žijícím organismem a patogenezi u hostitele vyvolává jen zřídka. V ojedinělých případech může u imunosuprimovaných osob vyvolat až smrtelné zánětlivé onemocnění mozku granulomatózní amébovou encefalitidu (GAE). Častějším onemocněním je infekce oka nazývaná amébová keratitida (AK), která může vést až ke ztrátě zraku.

Tato práce si klade za cíl zjistit, jak železo ovlivňuje virulenci akantaméby. Pro pochopení patogeneze je také důležité objasnit, jaké struktury potřebuje améba k přeměně z volně žijícího organismu na patogenní, což se pokusíme demonstrovat za využití kultivace se savčími buňkami. Takové poznatky by mohly přispět k nalezení nové terapie proti tomuto neobvyklému patogenu a ukázat na jaké molekuly by mohla být terapie cílena.

2 Literární přehled

2.1 Železo jako faktor virulence

Přestože je železo hojně se vyskytujícím prvkem na zemi, není ho snadné z prostředí získat. Nejčastěji se s ním setkáváme v oxidované formě, kdy se stává nerozpustným ve vodných roztocích (Neilands, 1981). Hladina volného železa v organismu je příliš nízká na to, aby pokryla nároky mikroorganismů na růst a invazi hostitelů (Bullen et al., 1978). Mikroorganismy tak musí využívat speciální mechanismy, pomocí nichž jsou schopni železo od hostitele získávat a jejich virulence je ovlivněna těmito procesy.

Lidé i ostatní savci udržují hladinu volného železa v těle v co nejnižší koncentraci, aby se ubránili jeho toxicitě, a většina iontů železa je proto vázána specifickými molekulami. Tento systém vázání železa zajišťuje také velmi účinnou antimikrobiální ochranu neboli nutriční imunitu (Skaar, 2010). Transferin je glykoprotein, který váže železo v krevním oběhu a transportuje ho do cílových buněk v různých tkáních (Aisen & Leibman, 1972). Dalším glykoproteinem vázajícím železo ve formě Fe^{3+} iontů je laktoferin. Vyskytuje se v mateřském mléce, žluči a slzách. Intracelulárně je železo součástí molekul feritinu.

Při infekci dochází ke snížení extracelulárního železa makrofágy. Přesunem železa z fagozomů na cytoplazmatické feritiny makrofágy také zabraňují množení mikroorganismů (Ganz, 2009). Náchylnost k infekci předurčuje to, v jakém stavu je imunitní systém hostitele. Nutriční imunita je narušena u lidí s genetickým onemocněním, jako je talasémie a primární hemochromatóza, jelikož mají zvýšenou hladinu železa. Tito jedinci jsou více náchylní k infekcím (Ganz & Nemeth, 2006).

2.1.1 Bakterie

Přežití, růst a vyvolání infekce bakteriemi v hostiteli vyžaduje, jako jednu z hlavních adaptací, aktivovat dráhy vedoucí k zisku železa. Je to z toho důvodu, že železo není volně dostupné, na rozdíl od ostatních živin získávaných od hostitele. Patogenní bakterie vyvinuly pro tento účel mnoho specifických mechanismů, kterými vyvazují železo z molekul, nebo využívají celé tyto molekuly hostitele. Tyto mechanismy umožňují bakteriím množit se v hostiteli, a zvyšují tak jejich virulenci (de Lorenzo & Martinez, 1988). Vliv železa na virulenci bakterií se prokázal u zvířat. V situaci, kdy byla zvířata krmena dietou s nízkým obsahem železa, zvýšila se jejich odolnost vůči bakteriální nákaze. Opačná situace nastala při dodání železa pro vyrovnání jeho hladiny v séru (Puschmann & Ganzoni, 1977; Hart et al., 1982).

Bakterie disponují dvěma až třemi aktivními mechanismy pro získávání železa současně. Jedna z hlavních cest získání železa je využití chelátorů železa sideroforů. Tyto molekuly jsou schopné získávat železo z komplexů vázajících železo a konkurovat tímto způsobem hostitelským transportním molekulám transferinu a laktoferinu (Neilands, 1981, 1982). Je to umožněno tím, že siderofory produkované bakteriemi jsou nízkomolekulární látky s vysokou afinitou k Fe^{3+} iontům (Bagg & Neilands, 1987). Přes specifické transportní proteiny na buněčném obalu se siderofory s navázaným železem dostávají do buňky (Ratledge & Dover, 2000). Produkce sideroforů bakteriemi je složitý proces, do něhož se zapojuje velké množství genů. Nejčastěji jsou popisovány geny NRPS (neribozomální peptidové syntetázy), které jsou zachovány mezi různými druhy bakterií (Crosa & Walsh, 2002; Hider & Kong, 2010). Ukazuje se, že jedna bakterie nemusí syntetizovat pouze jeden siderofor, ale může jich pro získání železa využívat více (Balado et al., 2015). Většina bakterií má kromě produkce svých vlastních sideroforů pro získání železa i schopnost využívat siderofory produkované jinými bakteriemi. Tyto tzv. xenosiderofory jsou pak důležité v interakcích mezi jednotlivými mikroorganismy, jelikož schopností pohltit tyto molekuly si konkurují v příjmu železa (Kramer et al., 2020). Repertoár působení sideroforů na hostitelský organismus a zpětná reakce hostitele je znázorněna na **Obr. 1**. Je patrné, že soupeření hostitele s patogeny je komplikovaný proces.



Obr. 1. Modulace dostupnosti železa bakteriálními siderofory.

Červené šipky znázorňují vliv bakteriálních sideroforů na virulenci samotných bakterií, ale působí i na bakterie přítomné v hostiteli, se kterými si konkurují v příjmu železa. Působí také na udržování rovnováhy železa v buňkách hostitele, slizniční imunitu a lokální bakteriální niku. Černé šipky znázorňují následnou reakci organismu hostitele na působení sideroforů. Narušení homeostázy ovlivňuje imunitu sliznic. Ta dále ovlivňuje bakteriální mikroflóru ve střevě a může dojít k narušení zdraví hostitele a vyvolání onemocnění. Obrázek byl převzat a upraven z Ellermann a Arthur (2017).

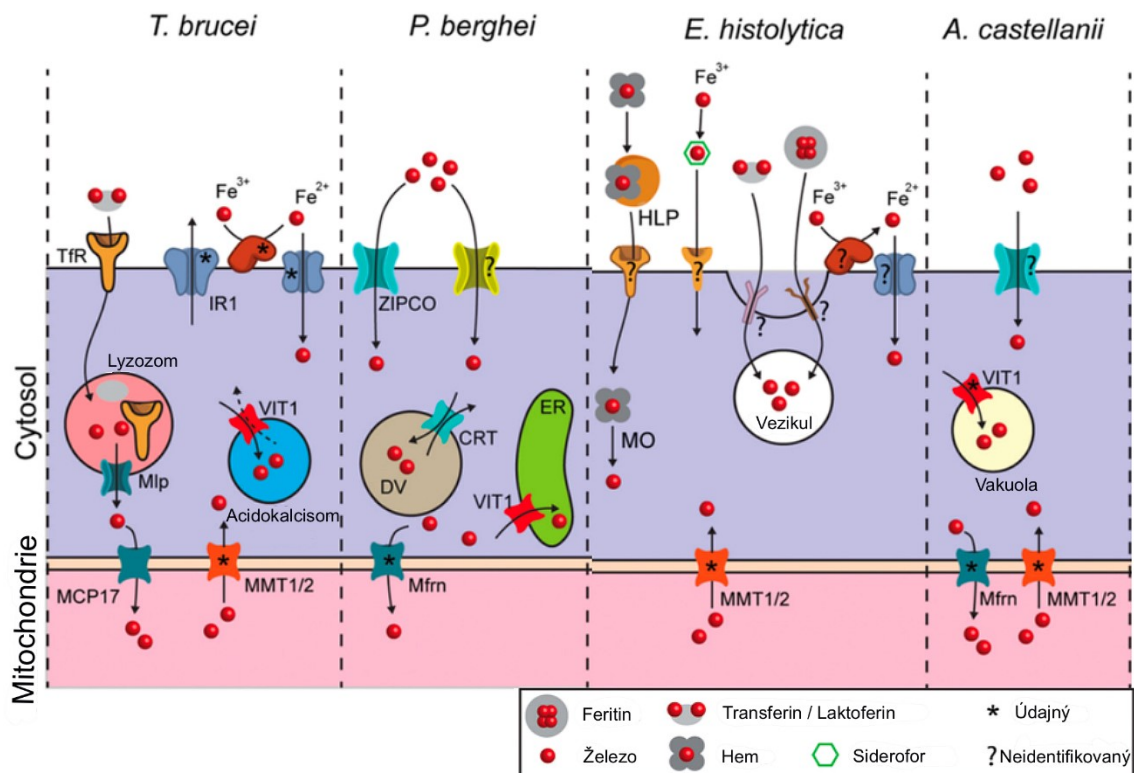
Kromě vylučování sideroforů mohou bakterie vylučovat také hemofory. Pomocí těchto molekul získávají železo vázané v hostitelském hemu a hemoglobinu (Wandersman & Stojilkovic, 2000). Studie na zvířecích modelech prokázaly, že schopnost bakterií využívat železo z těchto molekul má vliv na virulenci bakterií (Stojilkovic et al., 1995; Thompson et al., 1999).

Některé bakterie nepotřebují vylučovat specifické molekuly pro získání železa, jelikož mají na svém povrchu specifické receptory přímo pro železo vázající molekuly hostitele (Cornelissen, 2003). Tato vlastnost byla pozorována například u bakterie *Neisseria*, která je schopná získávat železo přímo z transferinu nebo laktoferinu bez potřeby produkce sideroforů. Dalším příkladem jsou *Moraxella catarrhalis* a *Actinobacillus pleuropneumoniae* se specifickými receptory pro vazbu železa z transferinu.

Organismus hostitele má mechanismy, jimiž brání bakteriálním procesům vedoucím k získání železa. Například při produkci sideroforů reaguje hostitel produkcí proteinu lipokalin-2, který se váže na tyto molekuly, a znemožní tak patogenu železo přijmout. Lipokaliny-2 se ale váží pouze na vybrané siderofory, a nejsou tak schopny zabránit všem těmto mechanismům (Flo et al., 2004). Hostitel a bakterie vedou neustálý boj o tuto mikroživinu a její získání je podmíněno mnoha aspekty.

2.1.2 Protista

Mnohem méně informací o vlivu železa na virulenci, v porovnání s bakteriemi, je dostupných u parazitických protist. Je popsáno několik mechanismů, jimiž narušují homeostázu železa v hostiteli a ohrožují jeho obranný systém. Existují tři základní systémy, kterými mohou eukaryotické buňky získávat železo, což shrnují Mach a Šuťák (2020). Buňky produkují Fe^{3+} reduktázu, kterou redukují Fe^{3+} z prostředí na Fe^{2+} . Následně jsou tyto ionty dopraveny do buňky přes specifické transportéry. Druhou cestou je přítomnost receptorů pro železo vázající proteiny jako je transferin, prostřednictvím nichž dojde k endocytóze holo-transferinu z krevní plazmy. Třetí cestou je získání železa z hemu nebo hemoglobinu po rozpadu erytrocytu nebo ze sideroforů (Mach & Šuťák, 2020). Na **Obr. 2** je znázorněn zdroj železa a jeho následný transport u vybraných parazitických protist.



Obr. 2. Zdroj železa a jeho transport u vybraných parazitických protist.

Tfr – transferinový receptor, IR1 – regulátor železa 1, Mlp – mukolipin, VIT1 – transportér železa ve vakuole 1, MCP17 – mitochondriální nosič 17, MMT1/2 – mitochondriální kovový transportér 1/2, ZIPCO – protein obsahující doménu ZIP (zinkový transportní protein), CRT – transportér rezistence na chlorochin, DV – trávicí vakuola, ER – endoplazmatické retikulum, Mfrn – mitoferrin, HLP – homolog hemoferu. Obrázek byl převzat a upraven podle Mach a Šuťák (2020).

Například *Entamoeba histolytica* využívá několik cest vedoucích k získání železa (Hernández-Cuevas et al., 2014). Tato améba se vyskytuje v hostiteli v různých tkáních s odlišnou dostupností železa, proto má více mechanismů, jak ho získat. Améba produkuje homology bakteriálních hemoferů, pomocí nichž váže hemoglobin a hem (Cruz-Castañeda et al., 2011). Také produkuje transportní proteiny z rodiny p-glykoproteinů 5, ABC (ATP Binding Cassette) transportérů a rodiny MFT, které mají určitou homologii s bakteriálními siderofory, a umožňují tak redukovat a získávat železo (Hernández-Cuevas et al., 2014). Na povrchu buňky má *E. histolytica* specifické receptory, pomocí nichž může vázat proteiny hostitele, a to holo-transferin, holo-laktoferin, feritin a hemoglobin, a získávat železo přímo z nich (Leon-Sicairos et al., 2005). Tento prvek může získat také z erytrocytů, které dokáže celé pohltnout a degradovat je hemolysinem a fosfolipázami (López-Soto et al., 2009b).

Ani u parazitů, jako je *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* nebo *Plasmodium* působící onemocnění u velké části populace, není zcela objasněn zdroj a systém, jakým železo přijímají. Transferin je využíván jako zdroj železa v hostiteli *T. brucei*, jelikož ta má na svém povrchu, přesněji v periflagelární kapse, specifické receptory pro tento protein. Procyklická stádia

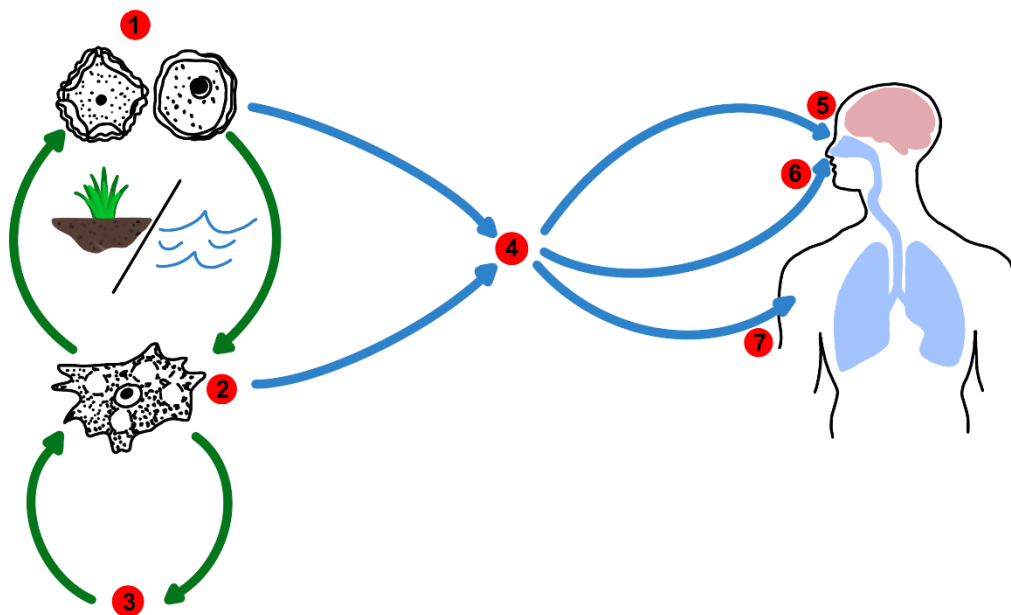
T. brucei musí mít jiné mechanismy pro získání železa, jelikož v hmyzím vektoru není dostupný transferin. Získávají zde železo z různých železitých komplexů ve dvou krocích. Nejprve dochází k redukci iontů železa z Fe^{3+} na Fe^{2+} a následně je transportováno do buňky (Mach et al., 2013). Jelikož *Leishmania* je intracelulární parazit, je schopna získávat železo přímo z transferinu, který ho dodává hostitelské buňce. Produkuje reduktázy (LIT1), které redukují Fe^{3+} ionty uvolněné z transferinu na Fe^{2+} a transportéry (ZIP LIT1) je přenesou do cytosolu (Huynh et al., 2006; Flannery et al., 2011). Tento parazit v extracelulární formě promastigotů je schopný získávat železo z laktoferinu, hemu a hemoglobinu (Chang & Chang, 1985; Wilson et al., 1994; Sengupta et al., 1999). Původci malárie *Plasmodium* se v hostiteli vyskytují také intracelulárně. Z erytrocytů, které napadají, získávají hemoglobin, ale využívají ho k zisku aminokyselin. Hem je uložen do potravní vakuoly ve formě pro buňku netoxického krystalického hemozoinu (Sullivan et al., 1996). Železo z hemu není pravděpodobně využíváno, nebo se dosud nepopsaly způsoby, jak by z této nerozpustné molekuly *Plasmodium* železo získávalo. Jaký zdroj železa *Plasmodium* využívá zůstává stále záhadou (Clark et al., 2013). U jaterního stádia *Plasmodium* se ukazuje, že parazité potřebují pro získání železa protein ZIPCO. Při jeho deficienci byl zhoršen růst a životaschopnost merozoitů v játrech a tento protein by tak mohl být cílem terapie proti těmto stádiím (Sahu et al., 2014).

2.2 *Acanthamoeba*

Akantaméba je jednobuněčný organismus řazený do skupiny Amoebozoa. Je to všudypřítomná améba s výskytem ve vzduchu, půdě, sladké i slané vodě. Byla nalezena i ve chlorovaných bazénech, odpadních vodách a klimatizacích, a to bez rozdílů mezi rozvojovými a vyspělými státy (de Jonckheere, 1991; Martinez, 1991). Jelikož tato améba je ve většině případů volně žijícím organismem a k nákaze člověka dochází jen ojediněle, je zařazena mezi amfizoické améby spolu s *Balamuthia mandrillaris* a *Naegleria fowleri* (Page, 1988). Akantaméba má dvě morfologické formy, vegetativní stádium trofozoita a odolné stádium cysty. Améby tvoří cysty za nepříznivých podmínek vlivem nedostatku živin, nepříznivých teplot nebo pH. Stádia dvoustěnných cyst jsou vysoce odolná vůči působení dezinfekčních prostředků a jsou schopna přežít a zachovat si svou patogenitu až po dobu několika let (Mazur et al., 1995; Khan, 2006). Za příznivých podmínek se améby excystují na stádia trofozoitů a jejich populace narůstá asexuálně binárním dělením (Band & Mohrlok, 1973). Jsou to měňavkové organismy pohybující se za pomoci typických panožek tzv. akantopodií, což jsou široké lobopodie s trnovými výběžky (Sawyer & Griffin, 1975). Akantopodie jsou využívány nejen k pohybu, ale i k přichycení se k povrchům a zejména k zisku potravy. Akantaméba se živí bakteriemi, kvasinkami, ale i jinými eukaryoty (Rodríguez-Zaragoza, 1994). K jejich pohlcení dochází

dvěma mechanismy: specificky fagocytózou na základě receptorů nebo nespecificky pinocytózou při pohlcování buněk (Bowers & Olszewski, 1972; Allen & Dawidowicz, 1990).

Žijeme v prostředí, kde se dostáváme do styku s akantamébou velmi často. Bylo prokázáno, že až 80 % imunokompetentních osob má v krvi sérové protilátky proti této amébě (Chappell et al., 2001). Počty zaznamenaných onemocnění, které akantaméby způsobují, jsou však ojedinělé, jelikož imunitní systém se proti účinkům tohoto patogenu umí účinně bránit. Jsou popsány tři cesty průniku trofozoitů a cyst akantaméby do savčích hostitelů, průnik poškozenou pokožkou, vdechnutí do dolních dýchacích cest s následným rozsevem do CNS a poslední možností je infekce oka (**Obr. 3**). Akantaméba je původcem vzácného, ve většině případů smrtelného, onemocnění GAE vyskytujícího se jen u imunodeficientních osob. Při tomto onemocnění dochází k ložiskovému zánětu mozku, na který není dostupná žádná účinná kauzální léčba (Martinez, 1991; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Chronické kožní léze vyvolané po průniku akantaméby mohou předcházet vzniku GAE u imunodeficientních pacientů, zejména u lidí s diagnostikovaným AIDS (Gonzalez et al., 1986; Torno et al., 2000). AK je poslední a nejčastější onemocnění vyvolávané touto amébou. Jako jediné není spojené s imunitním stavem hostitele, ale nejčastěji se vyskytuje u nositelů kontaktních čoček. K této infekci může dojít poraněním oka nebo častěji nesprávnou hygienou kontaktních čoček. V oku dochází k bolestivému zánětu rohovky a tvorbě typického kruhového infiltrátu, což může vést až ke ztrátě zraku (Khan, 2003). Jak k těmto nemocem dochází a jaké mechanismy k tomu améba potřebuje, je v procesu objasňování. Tyto studie mohou napomoci k cílenější léčbě.



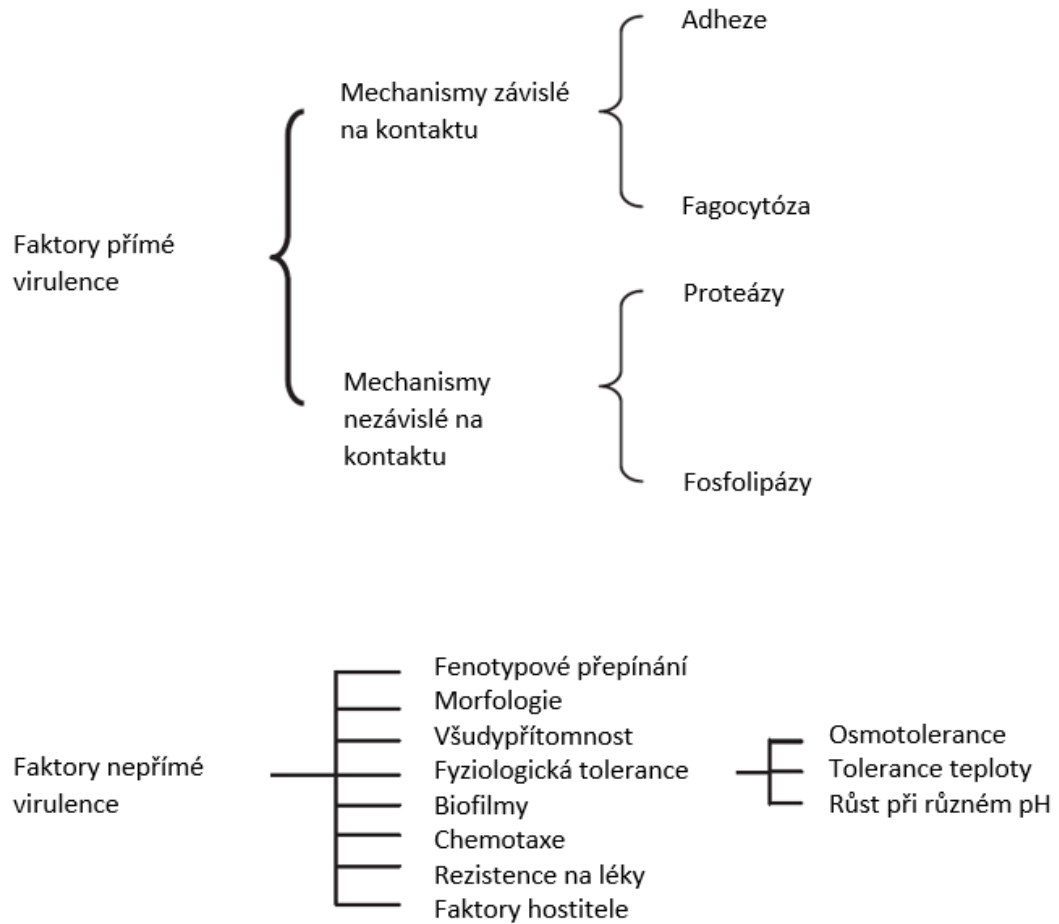
Obr. 3. Životní cyklus *Acanthamoeba* a cesty infekce člověka.

1. odolné cysty, 2. trofozoiti, 3. mitóza trofozoitů, 4. *Acanthamoeba* (cysty i trofozoiti) vstupuje do hostitele několika cestami: 5. infekce oka, 6. nosní dutinou do dýchacích cest a 7. přes poškozenou kůži. Obrázek byl převzat a upraven podle (<https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/pathogen.html>)

2.2.1 Faktory virulence

Virulence nejen u akantaméby, ale u všech parazitických protist, je působena souborem procesů, pomocí nichž jsou schopny se v hostiteli udržet, překonat jeho obranu, získat živiny a vyvolat onemocnění. Faktory virulence můžeme rozdělit na přímé a nepřímé a jsou shrnuty na **Obr. 4**. Pro akantamébu je velmi důležité vyvinout takové mechanismy, kterými dokáže invadovat do tkání a degradovat buňky hostitele. Tyto mechanismy se řadí mezi přímé a zahrnují na kontaktu závislou adhezi a fagocytózu a na kontaktu nezávislou produkci proteáz a fosfolipáz. Naopak faktory nepřímé virulence umožňují amébám přežít mimo hostitele. Jsou jimi například morfologie améb, schopnost termo a osmo tolerance a tvorba biofilmů (Khan, 2006).

Nejdůležitějšími procesy pro vyvolání apoptózy buněk hostitele se prokázaly adheze k hostitelským buňkám, která je následována fagocytózou a produkcí proteáz (Khan, 2003). Tyto procesy jsou blíže popsány v následujících kapitolách.



Obr. 4. Shrnutí přímých a nepřímých faktorů virulence akantaméby.
 Obrázek byl převzat a upraven podle (Khan, 2006).

2.2.1.1 Adheze

Klíčovým krokem pro to, aby mohla améba působit patologie u svého hostitele, je vazba na povrch jeho buněk (Yang et al., 1997). U akantaméby je tato vazba mezi adhezínem améby a receptorem na hostitelských buňkách. Na základě studií je prokázáno, že vazba na buňky epitelu rohovky je umožněna proteinem vázajícím manózu (MBP) (Morton et al., 1991). Tento protein může být u akantaméby využíván jako marker patogenity (Garate et al., 2004). Ukazuje se, že schopnost trofozoitů produkovat MBP souvisí s jejich schopností vyvolat patogenezi u hostitele (Garate et al., 2006). MBP můžeme tedy považovat za hlavní protein pro virulenci akantaméby, jelikož umožňuje interakci mezi parazitem a hostitelskou buňkou a vede k následné destrukci buněk hostitele (Kim et al., 2012). Protein MBP zprostředkovává adhezi i u kvasinky *Candida albicans*, která může také způsobovat oční keratitidy (Sandin et al., 1982; Naglik et al., 2011).

Pro navázání kontaktu s hostitelskou buňkou jsou dále důležité vzájemné interakce mezi amébou a extracelulární matrix (ECM) hostitele. ECM zprostředkovává u buněk tvořících rohovku mezibuněčnou komunikaci, a má také funkci v uchycení buněk. Vysoké zastoupení v ECM rohovky lidí má kolagen I a lamin-1, které oddělují rohovkový epitel od dalších částí oka (Michelacci, 2003; Yurchenco et al., 2004). Lamin-1 také zajišťuje hematogenní bariéru v mozku a jeho napadení amébou může být příčinou jejího hematogenního šíření (Rocha-Azevedo et al., 2009). Vazba na struktury ECM je závislá na manóze, jelikož při kultivaci améb s manózou byla jejich schopnost adheze jak ke kolagenním, tak i laminárním strukturám inhibována (Gordon et al., 1993). Schopnost améby vázat se na kolagen I a lamin-1 se jeví jako nezbytná při patogenezi akantaméby. Tato vlastnost vyplývá z porovnání patogenního druhu *A. culbertsoni*, který se účinně vázal jak na kolagenní, tak i na laminové struktury s volně žijící *A. astronyxis*, která se vázala na laminy jen minimálně a na kolagen se vázat nedokázala (Rocha-Azevedo et al., 2009). Proteiny vázající laminy byly prokázány u mnoha patogenních bakterií ale i protist, což podporuje tvrzení, že vazba na ně je nezbytným krokem k nákaze hostitele (Giordano et al., 1994; Ljungh et al., 1996; Ghosh et al., 1996; de O Ferreira et al., 2006). Tyto proteiny se podařilo identifikovat i u akantaméby (Kong et al., 2001; Hong et al., 2004). Do vztahu mezi amébou a ECM hostitele vstupuje ještě další atribut, kterým je vápník. V prostředí s nízkým obsahem vápníku se *A. polyphaga* dokázala účinněji vázat na struktury ECM (Wang et al., 1994).

Schopnost adheze na hostitelské buňky je narušena při přidání trypsinu. Při jeho účinku se améby téměř nedokázaly vázat na laminin a vazba na kolagen byla mírně snížena (Rocha-Azevedo et al., 2010). Rozdíl ve vazbě mezi těmito strukturami by mohl být v tom, že parazit navázaný na kolagen se stává rezistentním před účinkem trypsinu, stejně jako v případě bakterií (Beyers et al., 1994). I účinek latrunkulinem A na akantamébu, proveden na *A. culbertsoni*,

snížoval jejich adhezi. Výsledkem bylo zjištění, že améba potřebuje přestavět svůj cytoskelet, aby se byla schopna vázat na struktury ECM, jelikož latrunkulin zabraňuje polymeraci aktinu (Coué et al., 1987; Rocha-Azevedo et al., 2010).

2.2.1.2 Fagocytóza

Přilnavost améb k hostitelským buňkám vede k fagocytóze. Je to proces, kterým améby primárně pohlcují bakterie, ale při kultivaci s hostitelskými buňkami se ukazuje, že se účastní i v procesech vedoucích k patogenezi (Diaz et al., 1991). Fagocytóza je proces závislý na polymeraci aktinu z monomerního G-aktinu na dvoušroubovici F-aktinu. Při účinku cytochalasinu D byla schopnost améb usmrcovat hostitelské buňky snížena. Je to způsobeno tím, že cytochalasin D zamezuje polymeraci aktinu (Taylor et al., 1995; Niederkorn et al., 1999). Pomocí této látky byla také dokázána přímá účast polymerace aktinu v procesu fagocytózy, jelikož améby nebyly schopné bakterie pohlcovat (Alsam et al., 2005a).

Aby mohlo dojít k fagocytóze, je potřeba signál, jenž povede k polymeraci aktinu. Kultivace améb s genisteinem, což je inhibitor tyrosinkinázy, vyvolala snížení schopnosti pohlcovat bakterie. Opačná situace nastala při kultivaci s ortovanadátem sodným, který inhibuje tyrosin fosfatázy. V tomto případě docházelo ke stimulaci fagocytózy. Z této studie (Alsam et al., 2005a) vyplývá, že tyrosinkináza je důležitým signálem vedoucím k polymeraci aktinu a vychytávání bakterií. U améb kultivovaných s epitelovými buňkami byly pozorované tzv. amébestomy. To jsou specifické struktury související s fagocytózou, odvozené od pseudopodií, pomocí nichž je pohlcována potrava a mají funkci přísavky. Identifikace těchto struktur je dalším důkazem, že fagocytóza zaujímá důležitou roli ve virulenci (Khan, 2001). Objasnit další molekulární mechanismy vedoucí k fagocytóze u akantaméby může být důležité pro vývoj specifických léčiv.

2.2.1.3 Extracelulární proteázy

Důležitým faktorem virulence popisovaným nejen u protist, ale i u virů a bakterií jsou proteázy. Jedná se o enzymy, které rozkládají vazby mezi jednotlivými aminokyselinami v bílkovinách a tím je štěpí. Proteázy jsou popisovány jako hlavní aspekt patogenity, jelikož umožňují přímé poškození buněk a tkání. Jejich aktivita zaujímá důležitou úlohu během AK při napadání rohovky a při GAE, kde umožňují amébě invazi tkání (Clarke & Niederkorn, 2006; Khan, 2007). U patogenních druhů akantaméby byla popsána zvýšená sekrece extracelulárních proteáz oproti volně žijícím druhům (Mattana et al., 2002). Jedná se zejména o serinové, cysteinové

a metalo-proteázy. Jelikož proteázy byly nalezeny jak u volně žijících, tak i patogenních druhů, bude jejich hlavním účelem rozklad potravy pro získání živin (Khan, 2006).

Proteázy vylučované akantamébou dokáží účinně rozkládat komponenty ECM, jako je kolagen I, III, IV, elastin, fibronectin a laminin (He et al., 1990; Na et al., 2001; Sissons et al., 2006). Nejčastěji zastoupenými proteázami jsou serinové proteázy, které byly izolovány ve všech dosud testovaných izolátech akantaméby (Khan, 2006). Zásadní zastoupení ve virulenci při patogenezí vedoucí k AK má serinová proteáza MIP-133. Produkce této proteázy je indukována manózou (Alizadeh et al., 2008). MIP-133 vyvolá následnou produkci metalo-proteáz v rohovce a tím se amébě usnadní invaze (Hurt et al., 2003). MIP-133 dokáže degradovat buňky epitelu rohovky, keratocytů, ciliárních buněk duhovky a pigmentových epitelových buněk sítnice (Na et al., 2001; Na et al., 2002).

Serinové proteázy mají kromě funkce v invazi hostitelských buněk a rozkladu potravy i další využití. Améby je potřebují na to, aby byly schopny se z trofozoitů diferencovat na cysty. Tato funkce byla nalezena při použití fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF), což je inhibitor serinových proteáz, kdy se améby nebyly schopné při jeho působení encystovat. Tato vlastnost, jak navrhuje Dudley, Alsam a Khan (2008), by mohla usnadnit léčbu AK, jelikož by se zabránilo tvorbě vysoce rezistentních cyst v rohovce.

U akantaméby je popsáno i několik cysteinových proteáz ve velikosti 43, 75 a 130 kDa (Hadaš & Mazur, 1993; Alfieri et al., 2000). Je prokázáno, že tyto proteázy se kromě přímé patogenezí účastní i procesů encystace. Obě tyto vlastnosti byly pozorovány u cysteinových proteáz AcCP3 a AcCP6 (Wang et al., 2020).

Posledními popsány proteázami jsou metalo-proteázy mající v buňkách améby nejmenší zastoupení z extracelulárních proteáz. Jedna z nich (150 kDa) je schopna degradovat ECM, její aktivita je směřována proti kolagenu I a III, elastinu a plasminogenu (Alsam et al., 2005b). Jejich funkcí, kromě invaze buněk, je i schopnost odkrývat vazebná místa na hostitelských buňkách. Mohou tak zaujímat roli v adhezi na hostitelské buňky (Rocha-Azevedo et al., 2010). Předpokládá se účast těchto metalo-proteáz v infekci, jak při GAE, tak i při AK (Sissons et al., 2005).

2.2.2 Železo jako faktor virulence

Zdroj železa, ani mechanismy pro jeho získání, nejsou u akantaméby zcela objasněny. Růst améb je ovlivněn dostupností železa, což prokázali Hryniewiecka, Jenek, a Michejda (1980), když kultivovali buňky v podmínkách s nedostatkem železa. Akantaméba preferuje přijímat železo ve formě Fe^{2+} před Fe^{3+} (Grechnikova et al., 2022). V této studii se také podařilo popsat protein AcFeRed (ACA1_155690), který má pravděpodobně funkci reduktázy a redukuje Fe^{3+}

na Fe^{2+} v endozomu. Tyto ionty jsou přeneseny transportérem železnatých iontů do cytosolu buňky. Transportér přijímající Fe^{2+} ionty od AcFeRed je podle všeho protein AcNramp (ACA1_225890). Homology tohoto transportéru jsou známy i u bakterií a dalších eukaryot, kde plní také úlohu transportérů kovů (Nevo & Nelson, 2006). Při snížené dostupnosti železa dochází ke zvýšení produkce těchto dvou proteinů potřebných k jeho získání (AcFeRed a AcNramp) a zvýšená je i produkce proteáz. Naopak schopnost provádět pinocytózu se při nedostatku železa u améby snížila, jelikož je to mechanismus silně závislý na energii a ta je v podmínkách s nedostatkem železa omezená (Bowers, 1977). Pokud se však améba dostane do prostředí, kde je železa nadbytek, potřebuje z cytosolu přebytečné železo odstranit. K tomu dochází pomocí jiného transportéru, a to proteinu AcVit (ACA1_261050) (Grechnikova et al., 2022). Homologním proteinem je u kvasinek protein Ccc1, který transportuje nadbytečné železo z cytosolu do vakuoly (Li et al., 2001).

Experimenty s cysteinovými proteázami naznačují, že právě tyto proteiny by mohly mít důležitou funkci v získávání železa ze savčích hostitelů a mohly by být důležitým faktorem virulence v infekcích působených akantamébou (Ramírez-Rico et al., 2015). Cysteinové proteázy popsané u *E. histolytica* dokáží štěpit holo-laktoferin a feritin z koňské sleziny a předpokládá se, že by tuto funkci mohly mít i u akantaméby (Leon-Sicairos et al., 2005; López-Soto et al., 2009a).

3 Cíle práce

1. Příprava polyklonální protilátky proti nově popsanému proteinu AC_IDIP (Iron-Deprivation Induced Protein) a určení lokalizace tohoto proteinu v buňce.
2. Zjištění, jaký vliv má železo na virulenci *A. castellanii* při kokultivacích se savčími buňkami.
3. Provedení komparativní proteomické analýzy *A. castellanii* při různém zdroji živin.

4 Materiál a metody

4.1 Příprava polyklonální protilátky proti proteinu AC_IDIP

4.1.1 Použité plazmidy

Plazmid pGEM-T Easy Vector (Promega) byl použit k zaklonování PCR produktu genu AC_099250. Tento gen byl pojmenován jako AC_IDIP (Iron-Deprivation Induced Protein), jelikož jeho hladina byla zvýšená při kultivaci améby za nedostatku železa (Grechnikova et al., 2022). Plazmid pGEM-T Easy Vector má rezistenci k ampicilinu, čímž byla zajištěna jeho selekce. Pro následnou expresi v bakteriích *E. coli* byly využity tři plazmidy. Prvním byl pET42b (Novagen) s rezistencí na antibiotikum kanamycin. Tento plazmid se používá pro expresi proteinů s C-terminální histidinovou kotvou. Další dva plazmidy poskytnuté Morganem Colpem (laboratoř Johna Archibalda na Dalhousieově univerzitě v Kanadě), pTPBF-EGFP a pGAPDH-EGFP, jsme použili pro transfekci *A. castellanii*. Tyto plazmidy mají rezistenci na ampicilin.

Primery používané pro amplifikaci genů byly vytvořeny pomocí programu Geneious. Restrikční místa jsou uvedena v **tabulce 1** a **tabulce 2**.

Tabulka 1. Primery využívané při amplifikaci genu do plazmidu pET42b

Směr	Sekvence	Restrikční místo
Forward	5'-TATCATATGAGTTTCTTCTTCAGCAGTTC-3'	NdeI
Reverse	5'-CACCTCGAGTCTGGGGGCCTTGCGTAG-3'	XhoI

Tabulka 2. Primery využívané při amplifikaci genu do plazmidů pTPBF-EGFP a pGAPDH-EGFP

Směr	Sekvence	Restrikční místo
Forward	5'-CTCGCTAGCATGAGTTTCTTCTTCAGCAGTTC-3'	NheI
Reverse	5'-TATCATATGTCTGGGGGCCTTGCGTAG-3'	NdeI

4.1.2 Amplifikace genu

Amplifikace genu byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jako matrice pro amplifikaci genu pro AC_IDIP byla využita cDNA *A. castellanii*, která byla poskytnuta Mgr. Marii Grechnikovou. Složení reakční směsi a průběh PCR reakce je uveden v **tabulce 3** a **tabulce 4**. Pro amplifikaci byl použit SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara).

Tabulka 3. Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Množství
SapphireAmp Fast PCR Master Mix	12,5 μ l
Forward primer (10 μ M)	1,0 μ l
Reverse primer (10 μ M)	1,0 μ l
Templátová DNA	0,5 μ l
Deionizovaná voda	5,0 μ l

Tabulka 4. Průběh PCR reakce v cycleru

Počet cyklů	Teplota	Čas
1×	98 °C	1 min
30×	94 °C	10 sec
	55 °C	10 sec
	72 °C	30 sec
1×	72 °C	1 min
1×	4 °C	∞

4.1.3 Izolace a klonování DNA fragmentů

Výsledné fragmenty DNA byly naneseny na 1% agarózový gel s 0,1% interkalačním barvivem SYBR safe (Invitrogen) a rozděleny horizontální elektroforézou po dobu 30 min. Fragmenty na gelu byly zobrazeny pomocí UV záření. Band o příslušné velikosti byl z gelu vyříznut. Pro extrakci DNA z gelu byla použita komerčně dostupná sada Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid).

Po extrakci DNA následovalo její zaklonování do plazmidu pGEM-T Easy Vector pomocí sady CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Scientific). Tato sada obsahuje T4 DNA ligázu, která zajistila inkorporaci DNA pro protein AC_IDIP do plazmidu.

4.1.4 Transformace do bakterií

Po zaklonování DNA do plazmidu následovala transformace plazmidu do kompetentních bakterií *E. coli* kmene XLI-Blue, která byla provedena teplotním šokem. Bakterie byly nejdříve rozmrazeny na ledu a pak k nim byla přidána ligační směs, se kterou byly inkubovány 30 min na ledu. Následoval teplotní šok po dobu 30 sec při 42 °C ve vodní lázni a poté inkubace po dobu 2 min na ledu. K bakteriím bylo přidáno 250 μ l SOC (Super Optimal Broth) média, které bylo předehřáto na 37 °C. Jeho složení je uvedeno v **tabulce 5**. Bakterie byly v tomto médiu třepány po dobu 1 hod při 37 °C a 225 RPM. Na agarové plotny se selekčním antibiotikem 40 μ l

ampicilinu a 20 μ l X-Gal (Thermo Scientific) bylo nanášeno 50 μ l bakterií. Plotny byly do druhého dne inkubovány při 37 °C v termostatu.

Tabulka 5. Složení SOC média (100 ml)

Složka	Množství
Trypton (Oxoid)	2,000 g
Yeast extract (Oxoid)	0,500 g
NaCl (Sigma)	0,058 g
KCl (250 mM) (Sigma)	0,019 g
Upravit na pH 7, doplnit dH ₂ O do 100 ml a autoklávovat	
Glukóza (20%) (Sigma)	0,360 g
MgCl ₂ (2 M) (Sigma)	0,095 g

Následující den bylo na základě barevné selekce vybráno osm kolonií pro provedení kontrolního PCR, které mělo ověřit, zda proběhla transformace správně. Kolonie byly přeneseny a rozpuštěny v 50 μ l deionizované vody. PCR bylo provedeno na základě protokolu v komerčně dostupné sadě EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara) a zanalyzováno pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarózovém gelu.

Kolonie, u kterých byl při elektroforéze zaznamenán band v požadované velikosti, byly přeneseny do 5 ml LB média (**tabulka 6**) s přidáním selekčním antibiotikem 5 μ l ampicilinu. Bakterie byly inkubovány při 37 °C do druhého dne. Plazmidová DNA byla pomocí komerčně dostupné sady High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) izolována. Koncentrace plazmidové DNA byla měřena pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Izolovaná plazmidová DNA byla odeslána na sekvenaci (laboratoř sekvenace Biocev, RNDr. Štěpánka Hrdá, Ph.D.) pro ověření správné sekvence.

Tabulka 6. Složení LB média (500 ml)

Složka	Množství
LB (Sigma)	20 g
dH ₂ O	500 ml

Po izolaci plazmidové DNA byla provedena restrikce, při které byla DNA zanesena do expresních plazmidů (pET42b, pTPBF-EGFP a pGAPDH-EGFP) s využitím komerčně dostupné sady FastDigest restriction enzymes (Thermo Scientific). Restrikční enzymy uvedené v **tabulce 1** a **tabulce 2** byly použity ke štěpení genu pro AC_IDIP z plazmidové DNA. Restrikce probíhala 1 hod při 37 °C. V případě plazmidu pET42b, který byl štěpen restrikčními endonukleázami NdeI a XhoI, byla provedena horizontální elektroforéza na 1% agarózovém

gelu. Příslušný band byl vyříznut z gelu a plazmid byl extrahován. Následovala ligace všech plazmidů pomocí T4 DNA ligázy, se kterou byly vzorky inkubovány do druhého dne při 16 °C.

Plazmidy s vloženými inzerty pro protein AC_IDIP byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* kmene TOP10. Transformace proběhla teplotním šokem při 42 °C a následným ochlazením na ledu. Bakterie byly nanесeny na plotny ošetřené antibiotiky. Pro plazmid pET42b bylo na plotnu přidáno antibiotikum kanamycin a pro plazmidy pTPBF-EGFP a pGAPDH-EGFP antibiotikum ampicilin. Plotny byly do druhého dne inkubovány v termostatu při 37 °C. Vybrané kolonie od každého plazmidu byly ověřeny kontrolním PCR, zda obsahují insert a poslány na sekvenaci pro ověření správné sekvence. Kolonie, u kterých se prokázala správná sekvence byly přeneseny do LB média, kde při 37 °C narostly do následujícího rána a byly zamraženy v glycerolu a skladovány při –80 °C. Postup v dalších krocích byl proveden pouze s plazmidem pET42b. Plazmidy pTPBF-EGFP a pGAPDH-EGFP byly již připraveny pro provedení transfekce (kapitola 4.2).

Plazmid pET42b s inzertem byl transformován do buněk *E. coli* kmene BL21, které umožňují účinnou expresi proteinu. Transfekce byla provedena teplotním šokem za stejných podmínek jako u *E. coli* kmene XLI-Blue. Bakterie byly nanесeny na plotny ošetřené selekčním antibiotikem kanamycinem. Následně bylo provedeno kontrolní PCR a bakterie byly zamraženy v glycerolu při –80 °C s finální koncentrací 15 %.

4.1.5 Indukce proteinové exprese

Indukce exprese byla provedena nejprve v malém objemu, aby se určila míra exprese proteinu AC_IDIP v bakteriích. Do 20 ml LB média bylo přidáno 400 µl bakterií, dříve narostlých v LB médiu. Zjistili jsme, jaká je optická denzita (OD) (měřena ve všech experimentech při 600 nm) bakterií v médiu. Měření bylo provedeno pomocí přístroje WPA CO 8000 Biowave Cell Density Meter (Biochrom). Médium s bakteriemi bylo třepáno při 37 °C do doby, než bylo dosaženo hodnoty 0,6–0,8 OD, hodnota OD byla průběžně kontrolována. Po dosažení této hodnoty byl odebrán první vzorek v objemu 1 ml před přidáním IPTG (Sigma) v konečné koncentraci 0,5 mM. Bakterie byly následně třepány po dobu 3 hod při 37 °C. V čase 1 hod byl odebrán další vzorek, tentokrát v objemu 900 µl. Poslední vzorek byl odebrán v čase 3 hod v objemu 800 µl. Všechny vzorky byly centrifugovány při 3000 g po dobu 10 min a následně byl pelet buněk zavařen při 100 °C, 10 min v 50 µl vzorkového pufru (**tabulka 7**).

Míra proteinové exprese byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Vzorky zavařené ve vzorkovém pufru byly nanесeny v objemu 15 µl na jamku na 12% polyakrylamidový gel. Na gel bylo také nanесeno 8 µl PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), podle kterého jsme odečítali velikosti proteinu na gelu v rozmezí

10–250 kDa. Rozdělení proteinů na gelu podle velikosti probíhalo při 160 V po dobu 1,5 hod v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který dodal proteinům záporný náboj. Gel byl po rozdělení proteinů barven Coomassie Brilliant Blue (Sigma) po dobu 1 hod a následně odbarven odbarvovacím roztokem (250 ml denaturovaného ethanolu (Lach-ner), 100 ml kyseliny octové (Sigma), 650 ml dH₂O). Tento roztok byl u gelu přibližně po 10 min vyměňován za čistý až do doby, kdy byly na gelu viditelné jednotlivé rozdělené proteiny.

Abychom ověřili, zda jsme schopni protein AC_IDIP detekovat, byla provedena metoda western blot (viz kapitola 4.1.8). Při této metodě byla použita primární protilátka proti histidinové značce v koncentraci 1:1 000.

Po ověření proteinové exprese a přibližném určení její míry v čase byla provedena indukce exprese ve velkém objemu. Bakterie byly naředěny do 2 l LB média tak, aby počáteční hodnota OD byla pod 0,1 a třepány při 37 °C do doby, než OD dosáhla hodnoty v rozmezí 0,6–0,8. Po dosažení této hodnoty byl odebrán 1 ml v čase nula a přidáno IPTG. Stejně jako u indukce exprese v malém objemu byla provedena inkubace na třepačce po dobu 3 hod při 37 °C. Během této doby byly odebrány dva vzorky v čase 1 hod a 3 hod. Vzorky byly zpracovány stejným způsobem jako u indukce exprese v malém objemu. Po inkubaci byly narostlé bakterie centrifugovány při 3000 g, 4 °C po dobu 15 min. Pelet byl následně resuspendován v 15 ml fosfátového pufru a stočen za stejných podmínek jako v předchozím kroku.

Tabulka 7. Složení vzorkového pufru (5× koncentrovaný, skladování při –20 °C)

Složka	Množství
Roztok A: 3 g Trisma base (Sigma) v 50 ml dH ₂ O, pH 6,8	2,4 ml
SDS 10% (Sigma)	2,0 ml
Glycerol	2,5 ml
H ₂ O	1,6 ml
Roztok 10 mg bromfenolové modři v 1 ml roztoku A	1,0 ml
2-merkaptoetanol	0,5 ml

4.1.6 Izolace proteinu za denaturačních podmínek

Pro izolaci proteinu AC_IDIP byl použit pelet získaný v předchozím kroku. Izolace proteinu byla provedena z důvodu vytvoření protilátky v potkanovi. K této izolaci bylo potřeba 5 pufrů, jejichž složení je uvedeno v **tabulce 8**. Prvním použitým pufrům byl pufr B, v jehož 10 ml byl resuspendován pelet získaný při indukcii proteinové exprese. Pelet byl s tímto pufrům míchán 15 min. Dále byla provedena sonikace (QSonica Q125) 3×1 min s amplitudou 60 % a intervalem 10 sec/5 sec. Buněčný lyzát byl centrifugován na ultracentrifuze Optima XPN-90 Ultracentrifuge (Beckman coulter) při 200 000 g, 4 °C po dobu 20 min. Ze získaného

supernatantu byl odebrán vzorek v množství 30 μ l. Pro odebrání vzorku ve stejném objemu z peletu bylo potřeba nejprve pelet resuspendovat v 20 ml pufru B. Oba vzorky byly zavařeny v 6 μ l vzorkového pufru. Ke vzniklému supernatantu byl přidán 1 ml HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma), který zajistil izolaci proteinů obsahujícího histidinovou kotvu, jelikož se naváže na agarózové kuličky s niklem. Tento roztok byl inkubován 1 hod při pokojové teplotě za stálého mírného míchání a následně nanesen na kolonu Poly-Prep Chromatography Column (Bio-Rad). Kolonou protekla první frakce označená jako flow through (FT). Protein navázaný na agarózové matici byl dále uvolňován pufrů s postupně se snižujícím pH. Jednotlivé frakce byly po nanesení pufru odebírány a z nich odebrané vzorky zavařeny v 6 μ l vzorkového pufru. Kolona byla promývána pufrů v tomto pořadí:

1. Pufr C (promývací) 2 \times 4 ml
2. Pufr D 4 \times 1 ml
3. Pufr E 4 \times 1 ml
4. Pufr F 2 \times 1 ml

Na závěr byl odebrán vzorek přímo z agarózových kuliček, a také byl zavařen v 6 μ l vzorkového pufru. Všechny vzorky byly nanesený na 12% polyakrylamidový gel pro rozdělení proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy (popsáno v kapitole 4.1.5). Vizualizace proteinů na gelu byla provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue. Na základě tohoto barvení bylo stanoveno, ve které z elucí je zachyceno nejvíce proteinu. V našem případě to byla eluce E1 a E2. Tyto dvě frakce byly ředěny dvojkovou řadou, nanesený na gel a barvený. Band byl porovnán s bandem o známém množství proteinu, a takto byla determinována přibližná koncentrace proteinu.

Vybrané frakce byly spojeny a separovány na velké SDS-PAGE elektroforéze při 200 V po dobu 5 hod. Gel byl barven 1 hod pomocí Coomassie Brilliant Blue a následně odbarven přes noc. Požadovaný band byl vyříznut sterilním skalpelem a omýván 30 min sterilním fosfátovým pufrům. Band byl za využití Douncova homogenizátoru (Kimble-chase) homogenizován na co nejjemnější drť. Tento produkt byl rozdělen po 1 ml do 4 Eppendorf zkumavek, ty byly předány RNDr. Janu Machovi, Ph.D., který tento proteinový roztok injikoval do potkana pro vytvoření polyklonální protilátky.

Tabulka 8. Složení pufrů pro purifikaci proteinu za denaturačních podmínek

Pufr B – složky	Koncentrace
NaH ₂ PO ₄ (Lachner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8 M
pH 8	

Pufr C – složky	Koncentrace
NaH ₂ PO ₄ (Lachner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8 M
pH 6,3	

Pufr D – složky	Koncentrace
NaH ₂ PO ₄ (Lachner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8 M
pH 5,9	

Pufr E – složky	Koncentrace
NaH ₂ PO ₄ (Lachner)	100 mM
Tris (Sigma)	10 mM
Močovina (Sigma)	8 M
pH 4,5	

Pufr F – složky	Koncentrace
NaH ₂ PO ₄ (Lachner)	50 mM
NaCl (Sigma)	300 mM
Imidazol (Sigma)	400 mM
pH 8	

4.1.7 Imunizace potkana

Před injekcí homogenátů do potkana bylo potřeba zjistit, zda nemá vytvořené protilátky proti proteinům z *A. castellanii*. Potkan, u kterého se neukázal band vyvolaný navázáním lyzátu *A. castellanii*, byl vybrán pro tvorbu polyklonální protilátky.

4.1.8 Testování protilátky metodou western blot

Získaná polyklonální protilátka z potkana byla testována metodou western blot na buněčných lyzátech *A. castellanii*. Améby byly kultivovány za přítomnosti železa nebo chelátoru železa (příprava lyzátů v kapitole 4.1.8.1). Buněčné lyzáty zavařené ve vzorkovém pufru byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel v objemu 10 µl společně s markerem PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Proteiny byly rozděleny SDS-PAGE elektroforézou při 160 V po dobu 1,5 hod.

Gel byl pomocí polosuchého blotování přenesen na nitrocelulózovou membránu při působení 70 mA po dobu 1 hod a 15 min. Membrána byla obarvena roztokem Ponceaus S, abychom ověřili, že přenos proteinů z gelu na membránu proběhl rovnoměrně. Barevný roztok

byl následně vymýván destilovanou vodou. Membrána byla inkubována s roztokem sušeného mléka (složení v **tabulce 9**) po dobu minimálně 1 hod za stálého pozvolného míchání při pokojové teplotě nebo do druhého dne při 4 °C, za účelem blokování nespecifických interakcí s proteiny na membráně.

Primární protilátka proti proteinu AC_IDIP byla přidána na membránu do blokovacího roztoku v koncentraci 1:100, zalaminována do fólie a inkubována 1 hod na rotátoru. Membrána byla od primární protilátky promyta 3×15 min roztokem sušeného mléka. Sekundární anti-potkaní konjugovaná protilátka s křenovou peroxidázou byla v blokovacího roztoku v koncentraci 1:5000 s membránou inkubována 1 hod. Sekundární protilátka byla z membrány omyta 2×15 min blokovacím roztokem a následně 1× fosfátovým pufrům omyta od blokovacího roztoku. Proteiny na membráně byly vyvolány chemiluminiscenčně pomocí Chemiluminescent Peroxidase Substrate 1 (Sigma) v přístroji Amersham Imager 600 (GE Life Sciences, USA).

Tabulka 9. Složení blokovacího roztoku (500 ml)

Složka	Množství
Sušené odtučněné mléko	25 g
Fosfátový pufr	500 ml
Tween 20 (Sigma)	250 µl

4.1.8.1 Příprava lyzátů *A. castellanii*

Prvním krokem pro přípravu celkových buněčných lyzátů bylo nachystat kultury *A. castellanii* (viz kapitola 4.3.1.1) v objemu 5 ml PYG čistého média a média s přidavkem železa 25 µM nitrilotriacetátu železitého (Fe-NTA) nebo chelátoru železa 25 µM bathofenantrolindisulfonátu (BPS) v kultivačních nádobách o povrchu 25 cm². Buňky byly po třech dnech mechanicky uvolněny ode dna kultivační nádoby a celý obsah kultivačních nádob byl slit do 15 ml centrifugačních zkumavek. Kultury byly následně centrifugovány při rychlosti 1500 g po dobu 10 min. Supernatant byl slit a vyměněn za 500 µl sterilního fosfátového pufru. Obsah zkumavek byl po resuspendování peletu přenesen do 1,5 ml Eppendorf zkumavek a stočen při stejných podmínkách.

U takto připravených vzorků bylo stanoveno množství proteinů pomocí BCA sady (Thermo Scientific). Po zjištění koncentrace proteinů byly lyzáty naředěny na stejnou koncentraci pomocí fosfátového pufru a zavařeny (100 °C, 10 min) ve vzorkovém pufru.

4.1.9 Purifikace protilátky v nativních podmínkách

Protilátka byla purifikována s využitím soupravy SulfoLink® Immobilization Kit for Proteins (Thermo Scientific). Před zahájením práce s touto soupravou byl protein získaný z izolace za denaturujících podmínek zahuštěn a odsolen pomocí kolony Amicon Ultra-4, Merck Millipore. Kolona byla promyta a centrifugována 6×1 ml fosfátového pufru při 4000 g, 18 °C po dobu 10 min. Následně byl na kolonu přidán rozpouštěcí pufr (složení: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 4 M Guanidine-HCl; pH 7), abychom získali homogenní roztok bez proteinových sraženin.

Složení pufrů, používaných v tomto experimentu, je uvedeno v **tabulce 10**. Veškeré centrifugace během purifikace protilátky probíhaly při těchto podmínkách: 1000 g, 18 °C po dobu 1 min. K odsolenému a zahuštěnému proteinu v objemu 1 ml byl přidán 1 ml přípravného pufru (Sample preparation buffer). Tento roztok byl následně přidán k 6 mg 2-MEA (2-Mercaptoethylamine•HCl) do zkumavky nepropouštějící světlo a inkubován 1,5 hod při 37 °C na třepačce. Mezitím byla připravena 1. kolona Desalt spin column, byla upevněna do stojanu a nechal se z ní vykapat roztok, který obsahovala. Následně byly do kolony přidány 2 ml tzv. propojovacího pufru (Coupling buffer). Celá kolona byla umístěna do 15 ml zkumavky a centrifugována. Přidání propojovacího pufru a centrifugace bylo zopakováno.

Po ukončení inkubace proteinového roztoku byl roztok vychlazen na pokojovou teplotu a nanesen na připravenou promytou kolonu. Po vstřebání roztoku matricí v koloně bylo přidáno 100 µl propojovacího pufru a celá kolona umístěná ve zkumavce byla centrifugována. Získaný substrát zachycený ve zkumavce po centrifugaci obsahuje daný protein. Proteinový substrát byl smíchán s 2 ml propojovacího pufru.

Další kolona používaná v purifikaci protilátky byla SulfoLink Resin, jejíž obsah byl mechanicky promíchán. Kolona byla centrifugována, aby došlo k odstranění roztoku, který obsahovala. Následně byla kolona promyta 2×2 ml propojovacího pufru a centrifugována. Na kolonu byl nanesen získaný proteinový substrát a s ním byla kolona inkubována za stálého míchání 15 min. Kolona byla umístěna do stojanu, kde se po dobu 30 min usazoval její obsah. Dále byla centrifugována a substrát zachycený ve zkumavce po centrifugaci obsahoval proteiny, které se na matrici nenavázaly. Kolona byla promyta 4×2 ml promývacího roztoku (Wash Solution), následně 2×2 ml propojovacího pufru. Po každém nanesení roztoku byla kolona centrifugována. V propojovacím pufru o objemu 2 ml bylo rozpuštěno 15,8 mg L-cysteinu•HCl, tento roztok byl přidán na kolonu, se kterým byla inkubována za stálého mírného míchání při pokojové teplotě 15 min. Kolona byla umístěna do stojanu a po dobu 30 min se usazoval její obsah. Po usazení se z ní nechal obsah samovolně vykat.

Na takto připravenou kolonu byly nanесeny 2 ml protilátky proti proteinu AC_IDIP a 200 µl promývacího roztoku. Kolona byla míchána při pokojové teplotě 30 min a poté

centrifugována. Eluce získaná po centrifugaci byla označena písmenem A. Následovalo další promývání kolony a centrifugace:

1. Eluce B získána po nanesení 1 ml promývacího roztoku.
2. Eluce C1–C4 získané po nanesení 4×2 ml promývacího roztoku.
3. Eluce E1–E4 získané po nanesení 4×2 ml elučního pufru (obsahuje 100 µl neutralizačního pufru (Thermo Scientific IgG Elution Buffer)).

Vzorky po promytí elučním pufrem obsahují pročištěnou protilátku. Všechny získané eluce byly skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aby bylo možné uchovat i používanou kolonu, byla promyta 4 ml promývacího pufru a naplněna 4 ml tohoto pufru s přidavkem 0,05% azidu.

Tabulka 10. Složení pufrů pro purifikaci protilátky v nativních podmínkách

Přípravný pufr – složky	Koncentrace
Fosforečnan sodný	0,1 M
EDTA-Na	5 mM
pH 6	

Propojovací pufr – složky	Koncentrace
Tris	50 mM
EDTA-Na	5 mM
pH 8,5	

Promývací roztok – složky	Koncentrace
NaCl	1 M
NaN ₃	0,05%

4.2 Transfekce proteinu AC_IDIP

Cílem transfekce bylo zanést DNA proteinu AC_IDIP do buněk *A. castellanii* pomocí plazmidů pGAPDH-EGFP a pTPBF-EGFP. Na základě fluorescenčních proteinů, které měl na sobě AC_IDIP navázané, jsme následně určovali jeho lokalizaci v buňce. Transfekce byla provedena podle protokolu Morgana Colpa (Colp, 2018). Buňky *A. castellanii* byly kultivovány po dobu 3 dnů v 75 cm² kultivačních nádobách v médiu PYG s přidavkem 10 mM železa ve formě citrátu. Améby byly centrifugovány při 1000 g, 4 °C po dobu 10 min a resuspendovány v 500 µl encystačního média (složení v **tabulce 11**). Do jednotlivých jamek 6 jamkové destičky bylo nanášeno 50 000 buněk améb v 500 µl encystačního média.

Plazmidová DNA (pGAPDH nebo pTPBF s vloženou DNA pro AC_IDIP) v množství 4 µg byla naředěna ve 100 µl encystačního média. K takto připravené plazmidové DNA bylo přidáno 20 µl transfekčního činidla SuperFect (Qiagen) a inkubováno po dobu 10 min při

pokožové teplotě. Po uplynutí dané doby bylo doplněno 600 µl encystačního média a celý tento roztok byl přidán k amébám na destičku. Buňky *A. castellanii* byly inkubovány s tímto roztokem obsahujícím činidlo SuperFect po dobu 3 hod při pokojové teplotě. Stejný roztok bez obsahu plazmidové DNA byl použit jako negativní kontrola. Po inkubaci byl tento roztok odebrán a vyměněn za médium PYG s přidaným železem (10 mM FeCitrát), ve kterém byly buňky kultivovány po dobu 24 hod při 27 °C. Po této době bylo na destičku přidáno 10 µg/ml geneticínu (G418 disulfátová sůl, Sigma), který má zajistit, aby se zanesená DNA v buňkách udržela. Výměna média PYG s železem a geneticinem byla u buněk prováděna přibližně jedenkrát za 7 dní. Po 2–3 týdnech, kdy se buňky adaptovaly na přidávané médium a jejich růst se zrychlil, byly přeneseny do 25 cm² kultivačních nádob s médiem PYG a 50 µg/ml geneticínu. V tomto médiu byly buňky nadále kultivovány a přeočkovávány jednou týdně.

Tabulka 11. Složení encystačního média

Složka	Množství
KCl (1 M)	5 ml
Tris-HCl (1 M)	1 ml
MgSO ₄ (8 mM)	400 µl
NaHCO ₃ (1 M)	50 µl
CaCl ₂ (1 M)	20 µl

4.3 Komparativní proteomická analýza

4.3.1 Kultivace buněk

4.3.1.1 *Acanthamoeba castellanii*

V laboratoři byly *A. castellanii* kultivované v nádobách s filtrem o povrchu 25 cm² pro zajištění aerobního prostředí. Buňky byly uchovávány při 27 °C v kultivačních nádobách v horizontální poloze. Používali jsme 5 ml média PYG na jednu kultivační nádobu, složení v **tabulce 12**. Sterilizace média bylo dosaženo přefiltrováním. Přeočkovávání améb probíhalo nepravidelně, jelikož nejsou citlivé na přerůstání. Améby byly při přeočkování manuálně uvolněny třepáním, protože narůstají přichycené na stěně nádoby. Veškerá manipulace s kulturou byla prováděna sterilně v laminárním boxu, abychom předešli případným kontaminacím.

Tabulka 12. Složení 1 l kultivačního média pro *A. castellanii*

Složka	Množství
Glukóza (1,5%)	15 g
Yeast extract (0,75%)	7,5 g
Pepton (0,75%)	7,5 g
KH ₂ PO ₄ (0,002 M)	0,272 g
MgSO ₄ (0,001 M)	0,247 g
CaCl ₂ (0,05 mM)	0,0055 g
Thiamin (1 µg/ml)	1 ml
Biotin (0,2 µg/ml)	800 µl
B12 (1 ng/ml)	10 µl
dH ₂ O	do 1 l

4.3.1.2 Fibroblasty BJ a Fibrosarkomy HT-1080

Savčí buňky byly v laboratoři kultivovány v kultivačních nádobách (25 cm²) při teplotě 37 °C v horizontální poloze. Pro jejich kultivaci bylo používané médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose, Sigma) s přidaným tepelně inaktivovaným fetálním hovězím sérem (56 °C, 30 min ve vodní lázni). Do média jsme také přidávali antibiotikum Penicilin-Streptomycin (Sigma) (složení kultivačního média pro savčí buňky: 500 ml DMEM (Sigma); 55 ml fetálního hovězího séra inaktivovaného (Sigma); 5,55 ml Penicilin-Streptomycin (Sigma)). Při přeočkovávání bylo nejprve z narostlé kultury slito médium. K opláchnutí buněk od starého média, a k uvolnění buněk ode dna nádoby, byl vždy používán 1 ml roztoku 1×Trypsin-EDTA (1 ml Trypsin-EDTA (Sigma), 9 ml sterilního fosfátového pufru; skladování při –21 °C). S roztokem Trypsinu-EDTA bylo potřeba buňky uchovat přibližně po dobu 5 min při 37 °C, aby došlo k uvolnění buněk ode dna nádoby. Následně jsme do nádoby přidali 3 ml média. Z této jedné kultury jsme získali tři nové. Do připravených kultivačních nádob s 6 ml média jsme přidávali 1 ml z připravené kultury. Takto byly savčí buňky přeočkovávány každé 3-4 dny.

4.3.2 Inaktivace bakterií

Bakterie *Enterobacter aerogenes* byly centrifugovány při 2000 g po dobu 10 min. Následně byl slit supernatant, bakterie jsme promyli sterilní vodou a opět centrifugovali, ale již při 1000 g po dobu 10 min. Supernatant byl znovu slit a přidali jsme sterilní vodu. Bakterie jsme nechali v připravené vodní lázni inaktivovat při 56 °C po dobu 40 min. Během této doby bylo třeba bakterie pravidelně protřepávat.

4.3.3 Růstová analýza *A. castellanii* s bakteriemi

Pro vytvoření růstové křivky bylo potřeba připravit kontrolní kulturu *A. castellanii* bez *E. aerogenes* a améby se třemi hodnotami OD bakterií. Na růstovou analýzu byly připraveny tři narostlé kultury *A. castellanii*. Améby byly spočítány pomocí počítadla buněk Cell Counter (Beckman Coulter). Do všech testovaných vzorků bylo v čase 0 přidáno 10 000 buněk/ml *A. castellanii*. U bakterií jsme změřili OD a na základě naměřené hodnoty jsme přidali určené množství bakterií, abychom dosáhli požadované hodnoty OD 0,2; 0,4 a 0,6. Kultivace améb s bakteriemi byly prováděny v médiu PYG, kdy celkový objem kultivační nádoby činil 5 ml. Růst buněk byl měřen pomocí průtokového cytometru (Guava easyCyte 11HT Flow Cytometer) ve čtyřech časových bodech, a to po 24, 48, 72 a 96 hod od začátku kultivace.

4.3.4 Kokultivace *A. castellanii* s fibrosarkomy

Než jsme mohli zahájit kokultivace, potřebovali jsme zvolit médium, které podpoří růst *A. castellanii* i fibrosarkomů HT 1080. V kultuře fibrosarkomů jsme vyměnili médium DMEM za médium PYG. Další den byly fibrosarkomy kontrolovány pod světelným mikroskopem. Na základě tohoto pozorování jsme zjistili, že fibrosarkomy v tomto médiu nejsou schopné přežít. Začali jsme tedy testovat tři poměry médií DMEM a PYG. Na 8 jamkové destičce jsme nechali narůst fibrosarkomy v médiu DMEM. Po 24 hod jsme médium vyměnili, do 2 jamek jsme přidali média DMEM a PYG v poměru 1:1, do dalších dvou v poměru 1:2 a do dalších v poměru 1:5. V posledních 2 jamkách jsme nechali původní médium. Na základě sledování ve světelném mikroskopu se ukázalo, že ve všech poměrech jsou buňky schopné přežít. Mohli jsme tak přejít k testování médií s amébami, kde jsme zkoušeli stejné poměry.

Pro růstovou křivku *A. castellanii* v různých médiích jsme si připravili tři kultury améb v médiu PYG v kultivačních nádobách o povrchu 25 cm². Populace buněk v těchto kulturách byla spočítána pomocí počítadla buněk. Z těchto třech kultur byly připraveny nové kultury pro růstovou analýzu. Pro každou měřenou podmínku jsme měli vzorky v biologických triplikátech. Připravili jsme kulturu *A. castellanii* v PYG médiu a v médiích PYG a DMEM v již zmiňovaných třech poměrech (1:1, 1:2 a 1:5) Jednotlivé vzorky obsahovaly na začátku měření 10 000 buněk/ml.

Růstová křivka byla měřena pomocí počítadla buněk po dobu 72 hod. První měření proběhlo po 24 hod, kdy z každého vzorku bylo odebráno 200 µl pro měření na počítadle buněk. Výsledky byly zaznamenávány do programu Excel, kde byl následně vytvořen graf růstové křivky se směřodatnými odchylkami. Toto měření bylo zopakováno po 48 a 72 hod od počátku kultivace.

Po nalezení vhodného média pro buňky *A. castellanii* a zároveň pro fibrosarkomy jsme mohli zahájit kokultivace těchto dvou populací buněk. V médiu DMEM jsme nechali narůst buňky fibrosarkomů po dobu přibližně 48 hod při 37 °C. Buňky *A. castellanii* rostly v médiu PYG při 27 °C. Po uplynutí dané doby jsme u kultury fibrosarkomů vyměnili médium za kombinaci médií DMEM a PYG. Přidali jsme buňky *A. castellanii*. Podle množství přidávaných améb jsme museli dávat pozor, aby byl stále zachován poměr médií 1:1. Tuto kokultivaci jsme poté uchovávali při 27 °C, jelikož améby v laboratorních podmínkách nejsou schopné přežít vyšší teplotu.

4.3.5 Příprava vzorků na proteomickou analýzu

Na komparativní proteomickou analýzu byly připraveny vzorky v biologických triplicátech kultivovaných v médiích DMEM a PYG v poměru 1:1. Připravovali jsme buňky *A. castellanii* v médiu bez přidaných živin, *A. castellanii* s bakteriemi *E. aerogenes* s hodnotou OD 0,4 a *A. castellanii* s fibrosarkomy HT 1080. Tyto kultivace byly krátkodobé po stanovenou dobu 6 hod.

Na proteomickou analýzu byly také připraveny buňky *A. castellanii* dlouhodobě kultivované s fibrosarkomy. K narostlé kultuře fibrosarkomů, kde jsme vyměnili médium za již zmiňovanou kombinaci médií DMEM a PYG v poměru 1:1, byly přidány améby v koncentraci 50 000 buněk/ml. Přibližně po dvou dnech, kdy améby požraly veškeré savčí buňky, byly tyto améby přidány k další narostlé kultuře fibrosarkomů opět v koncentraci 50 000 buněk/ml. Tento postup byl zopakován ještě potřetí. Na proteomickou analýzu jsme tedy použili třetí pasáž buněk *A. castellanii* kultivovaných dlouhodobě s fibrosarkomy.

Ze všech připravených vzorků bylo následně slito médium a vyměněno za fosfátový pufr. Buňky byly mechanicky vyklepávány, aby došlo k jejich uvolnění ze dna kultivační nádoby. Obsah kultivačních nádob byl slit do 50 ml zkumavek a centrifugován při 1 200 g, 4 °C po dobu 10 min. Pelet byl promyt fosfátovým pufrem. Výsledný pelet byl předán do servisní proteomické laboratoře centra Biocev pro provedení proteomické analýzy.

Pelet buněk byl lyzován (95 °C, 5 min) s přidaným 1% SDS a štěpen trypsinem. Následně byly vzorky nanoseny na kolonu nano-HPLC EASY-Spray Pep Map C18 (50 cm × 75 cm, s velikostí částic 2 μm a pórů 100 Å (Thermo Scientific)) a analyzovány na hmotnostním spektrometru Orbitrap Fusion™ Q-OT-qIT (Thermo Scientific). Zpracování bylo provedeno pomocí softwaru MaxQuant (verze 1.5.3.8) a kvantifikace algoritmem „label free“ (Cox et al., 2014).

Data obdržená od proteomické laboratoře byla porovnána s databází AmoebaDB. Další zpracování bylo provedeno v programu Excel. Přiřazení pravděpodobné funkce proteinům bylo provedeno RNDr. Janem Machem Ph.D., který funkci přiřadil na základě databáze KEGG. Proteiny obsahující železo, nebo se na jeho metabolismu podílející, byly identifikovány manuálně pomocí serveru HHpred s využitím těchto databází: PDB, Pfam, KOG, NCBI.

4.4 Testování vlivu železa na kokultivaci *A. castellanii* se savčími buňkami

4.4.1 Růstová analýza fibroblastů

Růstová křivka fibroblastů (Human BJ fibroblasts) byla měřena pomocí přístroje Lumascope S720 (Etaluma, Inc.), který byl umístěn v inkubátoru se 37 °C. Tento přístroj provedl časosběr, kdy každé 3 hodiny pořídil fotografii jamek na vícejamkové destičce. Celkový čas zaznamenávání růstové křivky byl 96 hod. Tato analýza byla provedena na biologických triplicátech. Pro každou podmínku byly naneseny vzorky do tří jamek na 96 jamkové destičce. Testovali jsme podmínky v médiu DMEM bez aditiv, s přidaným železem ve formě citrátu v koncentraci 25 μM nebo s přidaným chelátorem železa ve formě BPS s koncentrací 25 μM. Na destičku byly přidány savčí buňky v koncentraci 2 000 buněk na jamku a inkubovány do druhého dne při 37 °C. Druhý den byly k buňkám doplněny aditiva (železo nebo chelátor železa). Do všech měřených jamek byl přidán SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain (5 mM roztok v DMSO) (Invitrogen) ve finální koncentraci 0,5 μM na jamku, který se používá k obarvení nukleových kyselin v buňkách, ale barvivo je schopno proniknout pouze plazmatickou membránou poškozených buněk. Barvivo bylo tedy použito pro detekci poškozených umírajících buněk.

Přístroj po 96 hod poskytl fotografie jamek jak v průchozím světle, tak i ve fluorescenci. Data z těchto fotografií byla vyhodnocována v programu Lumaquant 8.8, ve kterém jsme označili buňky a podle pokrytí plochy jamky program vyhodnocoval růst fibroblastů. Na snímcích z fluorescenčního kanálu nebyly patrné téměř žádné buňky. Hodnoty byly zaneseny do grafu v programu Excel a vynesena růstová křivka.

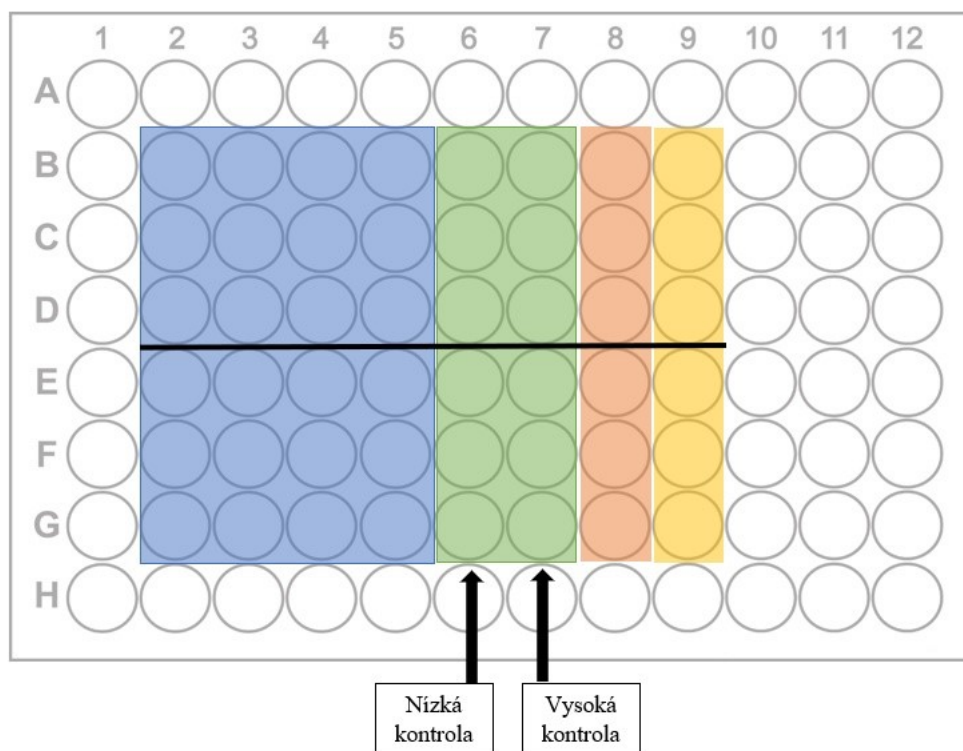
4.4.2 Měření cytotoxicity

Na 96 jamkové destičce byly po dobu 2 dnů kultivovány fibroblasty BJ v médiu DMEM s přidaným fetálním hovězím sérem a antibiotiky v 36 jamkách. Následně bylo médium odebráno a vyměněno za nové (150 μ l DMEM na jamku). Na takto připravenou destičku jsme začali nanášet améby. Buňky *A. castellanii* byly kultivovány s přidavkem železa (Fe-NTA v koncentraci 25 μ M) nebo s chelátorem železa (BPS v koncentraci 25 μ M) po dobu 2 dnů. Améby byly centrifugovány při 1500 g po dobu 10 min. Supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány v médiu DMEM.

Do třech jamek byly k fibroblastům přidány améby kultivované s přidavkem železa a do dalších třech améby s přidavkem chelátoru železa, a to v objemu 150 μ l. Následně byly améby z těchto prvních jamek 3 \times ředěny dvojkovou řadou přenášením 150 μ l roztoku. Do nových tří jamek byly přidány samostatné améby kultivované s přidavkem železa a do dalších tří améby kultivované s chelátorem železa. Do odpovídajících, takto připravených jamek bylo přidáno železo (Fe-NTA v koncentraci 25 μ M) nebo chelátor železa (BPS v koncentraci 25 μ M). Takto připravená destička s fibroblasty a amébami byla umístěna na 24 hod do 27 °C (**Obr. 5**).

Pro testování cytotoxicity byla použita sada Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche). Tento kolorimetrický test zaznamenává hladinu laktátdehydrogenázy (LDH), která je uvolňována z cytoplazmy poškozených buněk, v našem případě ze savčích buněk. Pro správné vyhodnocení dat cytotoxického testu bylo potřeba vytvořit kontroly. Všechny kontroly byly připravovány v triplicátu. První kontrolou bylo 100 μ l média DMEM s aditivou (Fe-NTA v koncentraci 25 μ M nebo BPS v koncentraci 25 μ M), abychom byli schopni zaznamenat jeho případnou LDH aktivitu. Nízká kontrola obsahovala 50 μ l fibrosarkomů a 50 μ l média DMEM. Zde bylo potřeba zjistit, jaké množství LDH se z buněk uvolňuje samovolně bez zásahu patogenu. Poslední byla vysoká kontrola se složením 50 μ l fibrosarkomů, 50 μ l média DMEM a 5 μ l lyzačního pufru. V této kontrole se dosáhlo maximálního množství LDH, které se z buněk může uvolnit. Po přidání lyzačního pufru byla destička inkubována při 37 °C po dobu 10 min.

Obsah všech jamek odebraný bez buněk (buňky zůstaly přichyceny na dně jamek) byl přenesen na novou 96 jamkovou destičku. Reakční mix (katalyzátor a barvicí roztok v poměru 1:45) v objemu 100 μ l byl přidán do všech jamek. Destička s přidaným reakčním mixem byla 5 min inkubována ve tmě. Na destičku byl nanesen „stop“ roztok (50 μ l/jamku). Absorbance roztoků v jednotlivých jamkách byla zjišťována pomocí spektrofotometru SPECORD S 600 – UV-vis diode array (Analytik Jena) a výsledná data byla zanesena do grafu v programu Excel. Tento pokus byl opakován stejným postupem s médiem DMEM bez přidavku hovězího bovinního séra.



Obr. 5. Schéma 96 jamkové destičky při měření cytotoxicity pomocí Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche).

Modré jamky: *A. castellanii* se savčími buňkami, **zelené jamky:** savčí buňky, **oranžové jamky:** *A. castellanii* a **žluté jamky:** médium DMEM. **Nizká kontrola** obsahovala savčí buňky v DMEM médiu, **vysoká kontrola** savčí buňky v DMEM médiu s přidáním lyzačním pufrem.

4.4.3 Zjišťování virulence pomocí průtokové cytometrie

Prvním krokem pro zahájení testování virulence bylo nechat narůst fibrosarkomy na 24 jamkové destičce. Z narostlé kultury fibrosarkomů bylo do každé jamky přidáno 80 μ l buněk a jamky byly doplněny médiem DMEM do objemu 2 ml. Toto množství fibrosarkomů vycházelo z výpočtu buněk na plochu, které bylo stejné jako při přeočkovávání kultury. Po 48 hod od nasazení buněk bylo na destičce vyměněno médium za médium pro kokultivace DMEM a PGY v poměru 1:1. Ještě předtím, než na destičku byly přidány améby, byl spočítán počet fibrosarkomů v čase 0 hod pomocí průtokového cytometru. Následně pomocí počítadla buněk byly spočítány buňky *A. castellanii*. Na základě tohoto počtu se přidalo do jamek k fibrosarkomům 50 000 buněk/ml *A. castellanii*. Do 8 jamek bylo ke kultivaci přidáno železo ve formě Fe-NTA v koncentraci 25 μ M a do dalších 8 jamek byl přidán chelátor železa ve formě BPS ve stejné koncentraci. Tato kokultivace proběhla při 27 °C.

Po 10 hod bylo zahájeno první měření na průtokovém cytometru. Na 96 jamkovou destičku jsme odebrali vzorky ze 3 jamek od každé podmínky. Abychom byly schopni odebrat buňky fibrosarkomů, které jsou přichyceny na dně jamky, a na uvolnění nestačí pouhé

resuspendování, museli jsme nejprve odebrat médium a poté přidat 400 μ l roztoku 1 \times Trypsin-EDTA. Destičku jsme umístili do 27 °C přibližně na 5 min, než se buňky uvolnily ze dna. Průtokový cytometr rozpoznával 2 populace buněk na základě odlišné fluorescence (*A. castellanii* – GFP, HT 1080 – dTomato). Průtokový cytometr excitoval oba fluorescenční proteiny modrým laserem (488 nm). Protein GFP byl následně zachycován zeleným detektorem (525/30 nm) a protein dTomato červeným detektorem (695/50 nm). Na přístroji byl nastaven i tzv. forward a side scatter, který udává velikost a granularitu buněk. Tento parament však pro nás nebyl klíčový, jelikož buňky *A. castellanii* a fibrosarkomů jsou přibližně stejně velké. Tento postup měření na průtokovém cytometru byl zopakován ještě 3 \times po 24, 34 a 48 hod. Naměřené hodnoty byly zaneseny do grafu v programu Excel a sestrojeny růstové křivky.

5 Výsledky

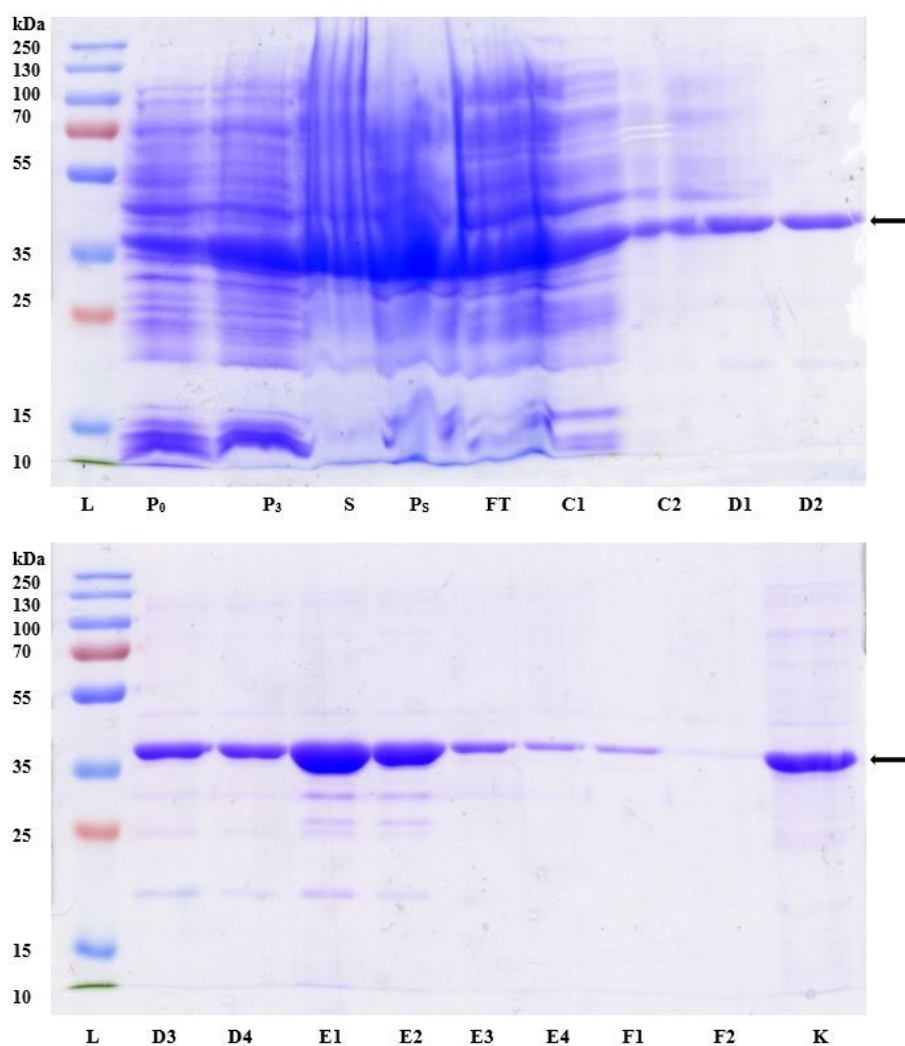
5.1 Charakterizace nově identifikovaného proteinu AC_IDIP

5.1.1 Purifikace proteinu AC_IDIP

Protein AC_IDIP byl identifikován jako protein potencionálně se podílející na homeostáze železa *A. castellanii* v předešlých studiích v naší laboratoři. Proteomická analýza ukázala, že množství tohoto proteinu v buňce *A. castellanii* je závislé na dostupnosti železa (Grechnikova et al., 2022), a proto bychom ho chtěli využívat jako marker železného statusu buňky. Rozhodli jsme se tento protein purifikovat, následně proti němu vytvořit protilátku a ověřit, zda se skutečně jedná o protein, který je regulován železem.

Gen pro AC_IDIP se podařilo úspěšně zaklonovat do plazmidu pET42b a následně byla provedena transformace do bakterií *E. coli* BL21. V dalším kroku byla provedena indukce exprese pomocí IPTG a izolace proteinu za denaturujících podmínek s použitím niklové kolony přes HIS-tag.

Výsledky purifikace (**Obr. 6**) ukazují, že se protein podařilo z velké části z kolony promýt, i když část proteinu zůstala navázaná na koloně. Jako materiál pro tvorbu protilátky v laboratorním potkanovi byla vybrána eluce E1.

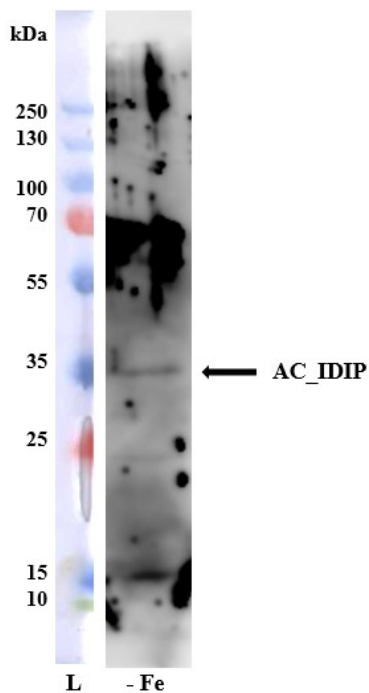


Obr. 6. Výsledek purifikace proteinu AC_IDIP na SDS-PAGE gelu.

Šipkou je označena velikost sledovaného proteinu. **L:** proteinový standart, **P₀:** buněčný lyzát odebraný v čase 0 hod (vzorek odebraný před inkubací buněk s IPTG při 37 °C), **P₃:** buněčný lyzát odebraný v čase 3 hod (vzorek odebraný po 3 hod inkubaci buněk s IPTG při 37 °C), **S:** supernatant po sonikaci, **P_s:** pelet po sonikaci, **FT:** vzorek nezachycený na koloně, **C₁** a **C₂:** vzorky promyté pufrém WASH, **D₁–D₄:** vzorky promyté pufrém D, **E₁–E₄:** vzorky promyté pufrém E, **F₁** a **F₂:** vzorky promyté pufrém F, **K:** vzorek proteinu, který zůstal navázaný na niklových kuličkách v koloně po promývání pufrými.

5.1.2 Testování protilátky

Protilátka z krevního séra potkana proti AC_IDIP byla testována metodou western blot. Protilátku jsme testovali na lyzátu buněk *A. castellanii*, které byly kultivované s přidavkem chelátoru železa (25 μ M BPS). Na membráně vyvolané peroxidázou bylo velké pozadí, které prakticky přehlušilo relevantní signál (**Obr. 7**).



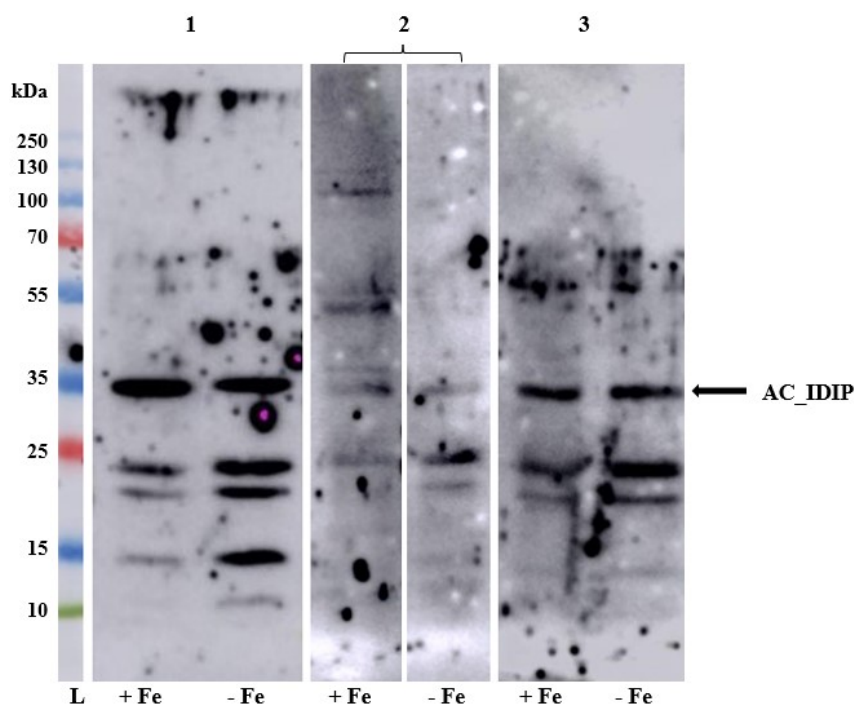
Obr. 7. Testování protilátky proti AC_IDIP na lyzátu buněk *A. castellanii* kultivovaných s přidáním chelátorem železa (BPS).

L: proteinový standart, - Fe: lyzát buněk *A. castellanii* kultivovaných s přidavkem chelátoru železa (25 μ M BPS). Šipka označuje velikost sledovaného proteinu.

5.1.3 Purifikace protilátky

Vzhledem k neuspokojivému výsledku testování protilátky jsme se ji rozhodli purifikovat. Tento krok obvykle vede ke zvýšení specifity, jelikož jsou ze séra odstraněny nežádoucí proteiny.

Purifikace protilátky byla provedena pomocí kolony s agarovými kuličkami. Agaróza je aktivovaná jodacetylovými skupinami a vlivem cysteinových zbytků se antigen kovalentně váže na tuto kolonu. Z testování metodou western blot můžeme vidět, že se protilátku povedlo částečně pročistit (**Obr. 8**). Protein AC_IDIP se podařilo uspokojivě detekovat, avšak signál se na membráně rozpadá do několika bandů. To je zapříčiněno nejspíše degradací proteinu v lyzátech. Testování protilátky pomocí metody western blot bylo provedeno v triplikátu na třech různých lyzátech. S ohledem na tyto výsledky se domníváme, že signál v podmínce s chelátorem železa (BPS) je silnější a hladina proteinu v buňce je tedy nejspíše zvýšená při nedostatku železa.



Obr. 8. Testování purifikované protilátky proti AC_IDIP na lyzátech buněk *A. castellanii* kultivovaných s přidavkem železa (Fe) nebo chelátoru železa (BPS).

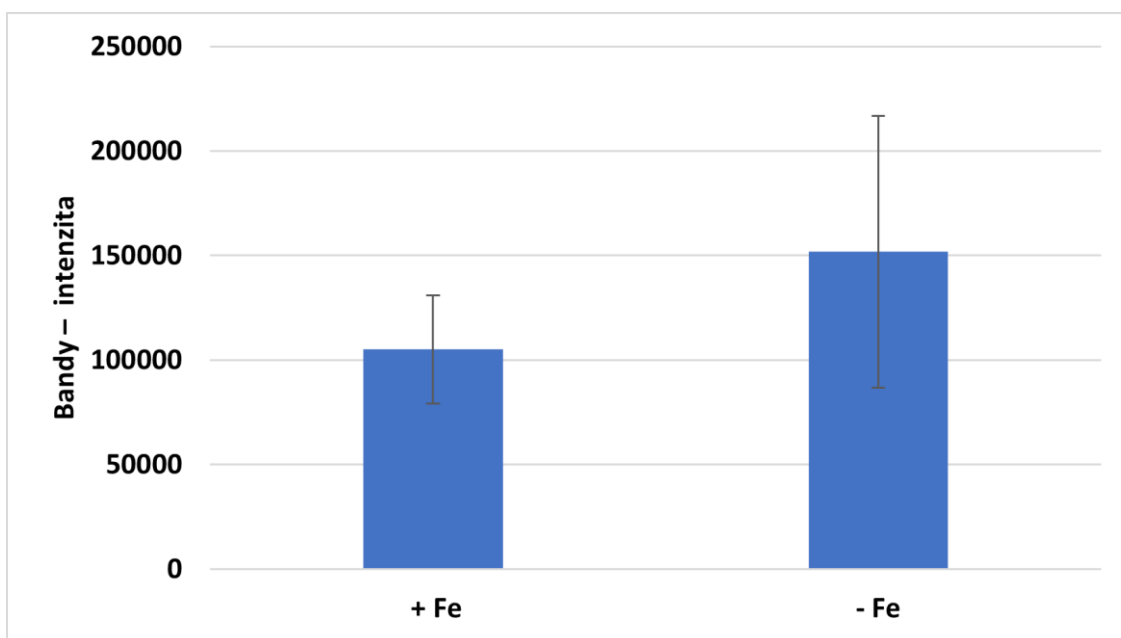
1–3: vzorky testované protilátky na třech různých lyzátech, L: proteinový standart, + Fe: lyzát buněk *A. castellanii* kultivovaných s přidavkem železa (25 μ M Fe), – Fe: lyzát buněk *A. castellanii* kultivovaných s přidavkem chelátoru železa (25 μ M BPS). Šipka označuje velikost sledovaného proteinu.

5.1.4 Denzitometrie

Výsledný signál z testování protilátky na western blotu jsme chtěli kvantifikovat, abychom ověřili, zda je hladina proteinu opravdu zvýšená v přítomnosti chelátoru železa (BPS). Intenzitu signálu na membráně (viz **Obr. 8**) jsme vyhodnocovali v programu Fiji (ImageJ). Do analýzy byl zahrnut následující počet bandů pro jednotlivé vzorky:

1. 5 bandů pro + Fe, 5 bandů pro - Fe
2. 2 bandy pro + Fe, 2 bandy pro - Fe
3. 3 bandy pro + Fe, 3 bandy pro - Fe

Z výsledného grafu se ukazuje intenzita signálu zvýšená při nedostatku železa (**Obr. 9**). Avšak tento výsledek není statisticky signifikantní.



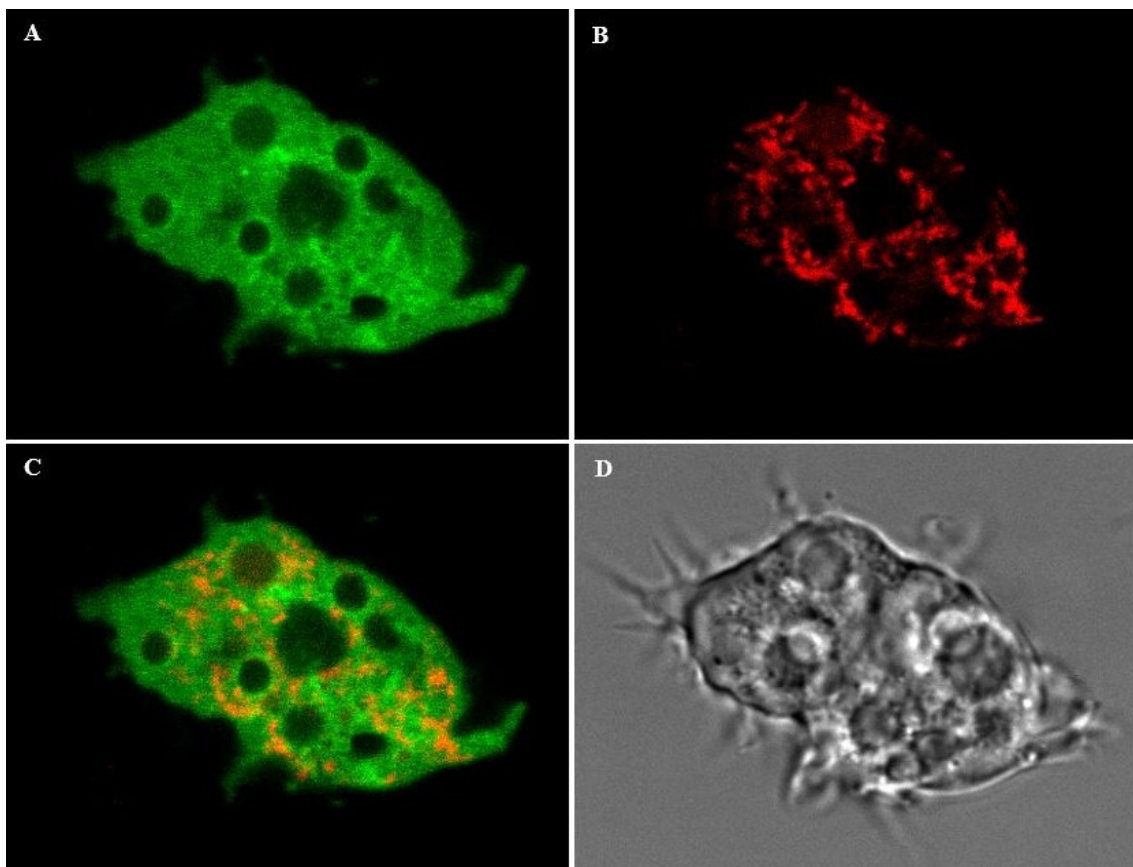
Obr. 9. Intenzita signálu protilátky proti AC_IDIP na membráně s lyzáty buněk *A. castellanii* kultivovanými s přidavkem železa nebo chelátoru železa.

+ Fe: lyzát *A. castellanii* kultivovaných s přidavkem železa, - Fe: lyzát *A. castellanii* kultivovaných s přidavkem chelátoru železa (BPS).

5.2 Lokalizace proteinu AC_IDIP

Protein AC_IDIP nevykazuje homologii k žádné známé skupině proteinů, avšak bioinformatická analýza naznačila jadernou lokalizaci (Grechnikova et al., 2022). Pro zjištění lokalizace proteinu v buňce *A. castellanii* byla použita metoda exprese fluorescenčně značeného proteinu. Byly testovány dva plazmidy, pGAPDH a pTPBF, které umožňují do buňky zanést gen pro studovaný protein značený pomocí GFP. Tyto dva plazmidy se liší mírou exprese, která je u pGAPDH vyšší (Bateman, 2010). Na základě fluorescence je pak možné určit lokalizaci proteinu v buňce pomocí konfokální skenovací mikroskopie.

U obou použitých plazmidů se podařilo zanést gen do buňky a exprimovat ho. Z výsledků z konfokální skenovací mikroskopie (**Obr. 10**) bylo zjištěno, že lokalizace proteinu AC_IDIP je cytosolická.



Obr. 10. Lokalizace proteinu AC_IDIP v buňce *A. castellanii*.

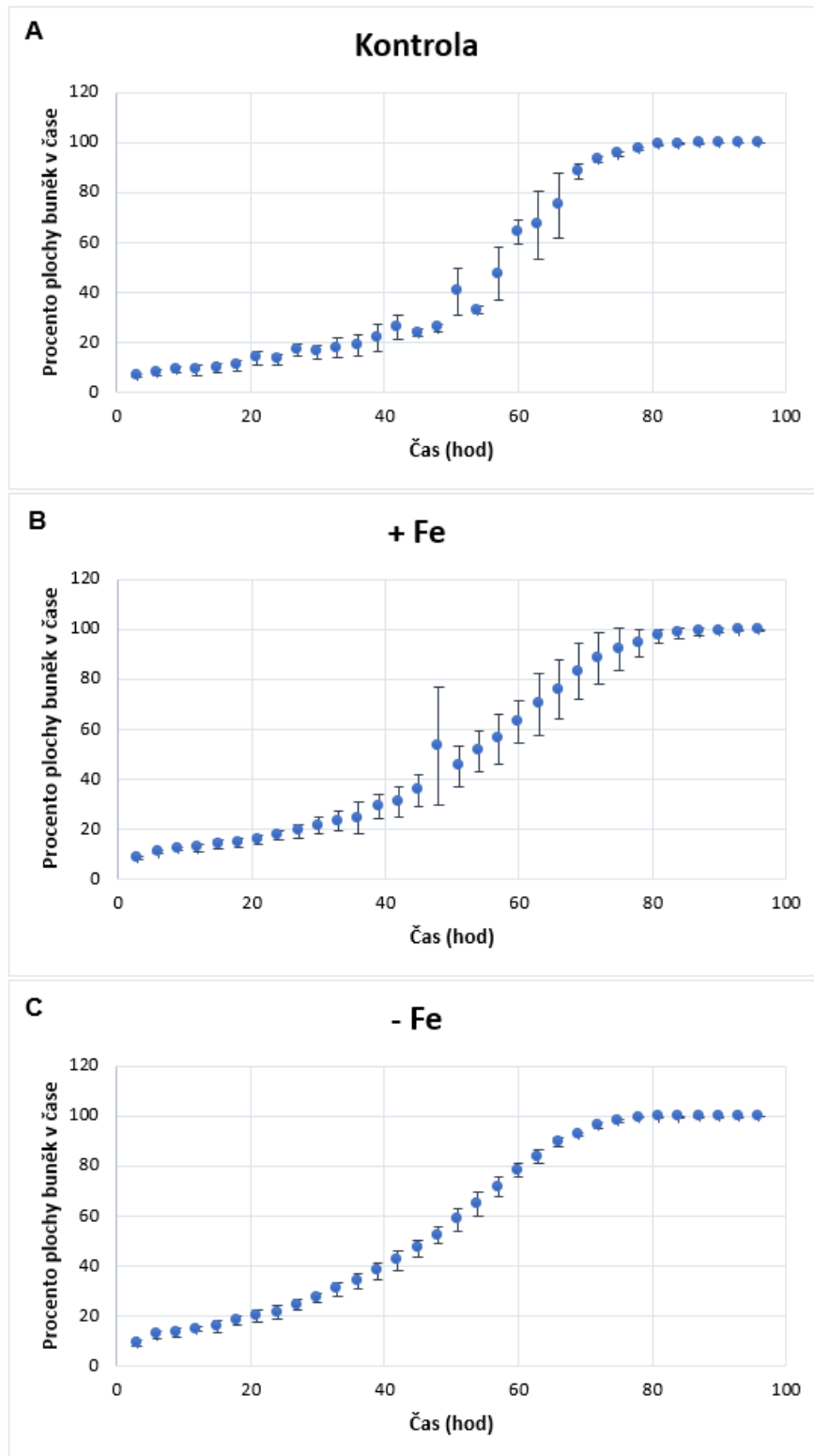
Fotografie jsou pořízené ze skenovacího konfokálního mikroskopu (Leica TCS SP8 WLL SMD-FLIM). Gen pro protein AC_IDIP byl do buňky zanesen pomocí plazmidu pTPBF s expresí proteinu GFP. **A:** protein AC_IDIP, **B:** MitoTracker Red CMXRos značící mitochondrie, **C:** průnik kanálů A a B, **D:** buňka v průchozím světle.

5.3 Vliv železa na virulenci *A. castellanii* při kokultivaci se savčími buňkami

5.3.1 Měření cytotoxicity

Jedním z hlavních cílů této práce bylo ověřit, zda v prostředí s dostatkem železa bude *A. castellanii* rychleji požírat savčí buňky, a vzroste tak její virulence v porovnání s kultivací s přidaným chelátorem železa. Za tímto účelem jsme nejdříve testovali, zda budeme schopni kvantifikovat virulenci *A. castellanii* při využití komerčně dostupné soupravy Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH). Jedná se o kolorimetrický test založený na měření aktivity laktátdehydrogenázy, který je proveden na vícejamkové destičce. Tento enzym se uvolňuje do média z cytosolu poškozených buněk a jeho kvantifikace slouží pro stanovení virulence. Pro tento test jsme používali lidské fibroblasty BJ.

Než jsme mohli zahájit testování cytotoxicity, potřebovali jsme ověřit, zda růst fibroblastů významně neovlivňuje přídavek železa ve formě citrátu nebo chelátoru železa BPS. Růstová křivka byla zaznamenávána pomocí přístroje Lumascope S720, který každé 3 hod po dobu 96 hod pořídil fotografii jamky. Na základě procenta pokrytí dna jamky byl vyhodnocen růst buněk v programu Lumaquant 8.8. Ukázalo se, že v testované koncentraci 25 μM citrátu železitého nebo 25 μM chelátoru železa BPS jsou fibroblasty schopné srovnatelně dobře růst a můžeme tak tyto koncentrace použít pro další experimenty (**Obr. 11**).



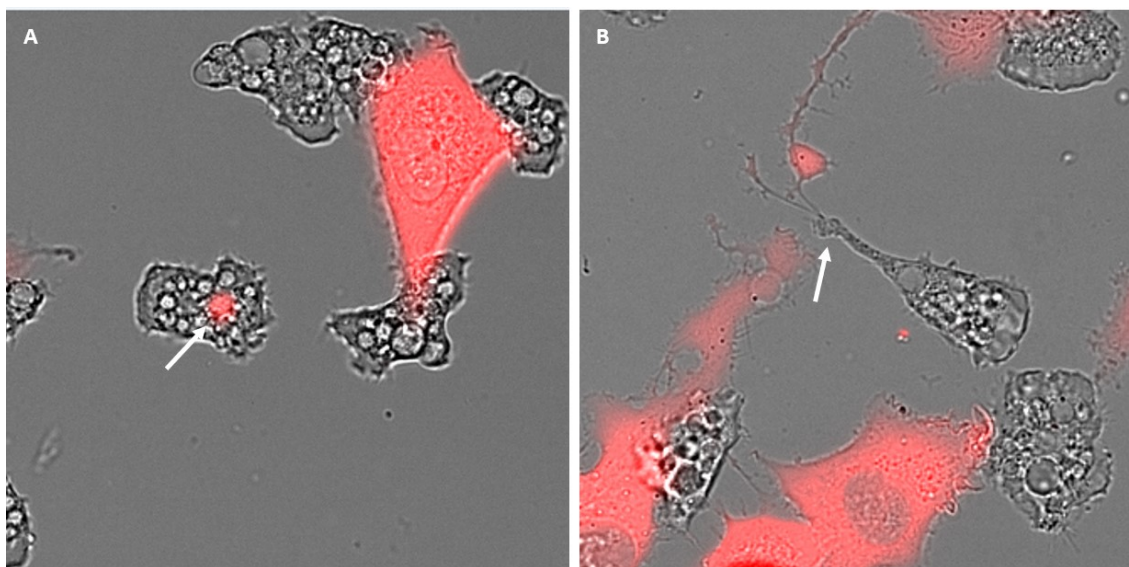
Obr. 11. Růstové křivky fibroblastů (Human BJ fibroblasts) při různé dostupnosti železa.

A: fibroblasty kultivované bez přídavku železa nebo chelátoru železa (kontrola), B: fibroblasty kultivované s přídavkem železa (+ Fe), C: fibroblasty kultivované s přídavkem chelátoru železa (- Fe).

Testování cytotoxicity pomocí sady však nebylo úspěšné. Při prvním měření byla absorbance vzorků příliš vysoká a neměřitelná. Zkoušeli jsme tento test provádět opakovaně a použít médium DMEM bez fetálního hovězího séra. Domnívali jsme se, že právě toto sérum negativně ovlivňuje průběh testu. Ale ani tímto způsobem se nám nepodařilo získat očekávané výsledky, jelikož absorbance měla s klesáním koncentrace buněk také klesat, ale v podmínce s chelátorem železa tomu bylo právě naopak. Museli jsme tedy najít jiný způsob, jakým virulenci stanovit.

5.3.2 Fluorescenčně značené fibrosarkomy

Vzhledem k nevhodnosti techniky kvantifikace laktátdehydrogenázy jsme se rozhodli zjišťovat virulenci pomocí počítání buněk *A. castellanii* a savčích buněk na průtokovém cytometru. Pro ověření, zda se v našich experimentálních podmínkách *A. castellanii* skutečně živí savčími buňkami a jakým způsobem je požívá, bylo natočeno video na fluorescenčním skenovacím mikroskopu (Nikon H-TIRF 2). Pro natočení videa byly použity fibrosarkomy HT 1080 značené červeným fluorescenčním proteinem dTomato a neznačené buňky *A. castellanii*. Video bylo natáčeno po dobu 5 hod zároveň ve fluorescenci a průchozím světle. Z videa je patrné (**Obr. 12**), že *A. castellanii* utrhuje kousky z fibrosarkomů, které následně pohlcuje (**příloha 1**). U některých améb je ve vakuole vidět svítící část pohlcené savčí buňky (**příloha 2**).



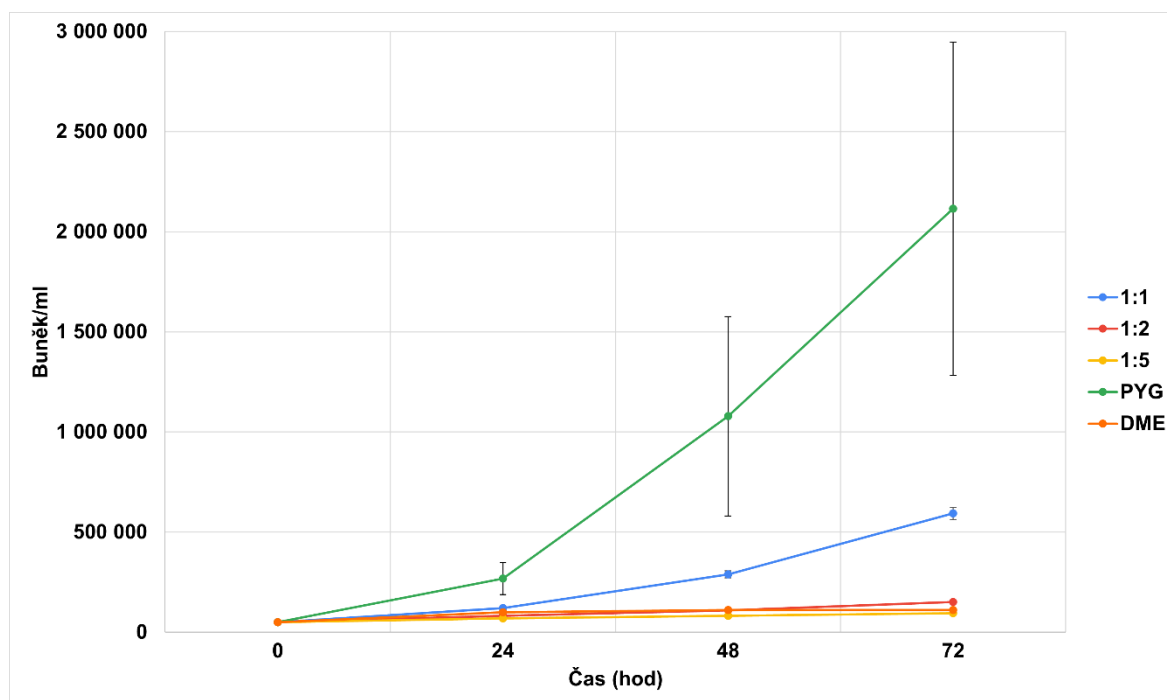
Obr. 12. Fotografie z konfokálního skenovacího mikroskopu zachycující pohlcování částí fibrosarkomů parazitem *A. castellanii*.

A: na fotografii šipka označuje část pohlcené buňky amébou *A. castellanii*, **B:** na fotografii šipka označuje část savčí buňky, který améba utrhuje a táhne pomocí panožky za sebou.

5.3.3 Testování média pro kokultivace

Prvním krokem pro zahájení kokultivací bylo zjistit, jaké médium bude podporovat růst *A. castellanii* a zároveň fibrosarkomů HT 1080. Nejprve jsme zkusili fibrosarkomy udržovat v čistém médiu PYG, ve kterém standardně kultivujeme *A. castellanii*. Stav buněk v médiu byl u fibrosarkomů vyhodnocován pozorováním pod světelným mikroskopem. Fibrosarkomy však nebyly schopny v tomto médiu přežít, neboť již po 12 hod nebyly přisedlé na dně jamky. Přistoupili jsme tedy k testování různých poměrů média PYG a média DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose) standardně používaného pro savčí buňky. Testovali jsme tři poměry médií PYG a DMEM, a to 1:1, 1:2 a 1:5. Přežívání fibrosarkomů bylo vyhodnocováno na základě sledování ve světelném mikroskopu. Ve všech těchto médiích byly fibrosarkomy schopny setrvat přichycené na dně jamky, a tak rozhodující bylo, při kterém poměru médií bude nejlépe růst *A. castellanii*.

Pro růst *A. castellanii* v daných médiích byla měřena růstová křivka na počítadle buněk po dobu 72 hod (**Obr. 13**). Kultivace v médiu PYG sloužila jako kontrola růstu buněk. Zkoušeli jsme také, zda budou schopné růst v čistém médiu DMEM, které používáme pro savčí buňky. V tomto médiu byl však jejich růst zanedbatelný, stejně jako v médiích o poměru 1:2 a 1:5. Na základě těchto výsledků jsme jako vhodné médium pro kokultivace *A. castellanii* s fibrosarkomy vybrali médium v poměru 1:1. V tomto médiu se růst *A. castellanii* nejvíce blížil růstu v médiu PYG.



Obr. 13. Růstová křivka *A. castellanii* v různých médiích měřena po dobu 72 hod.

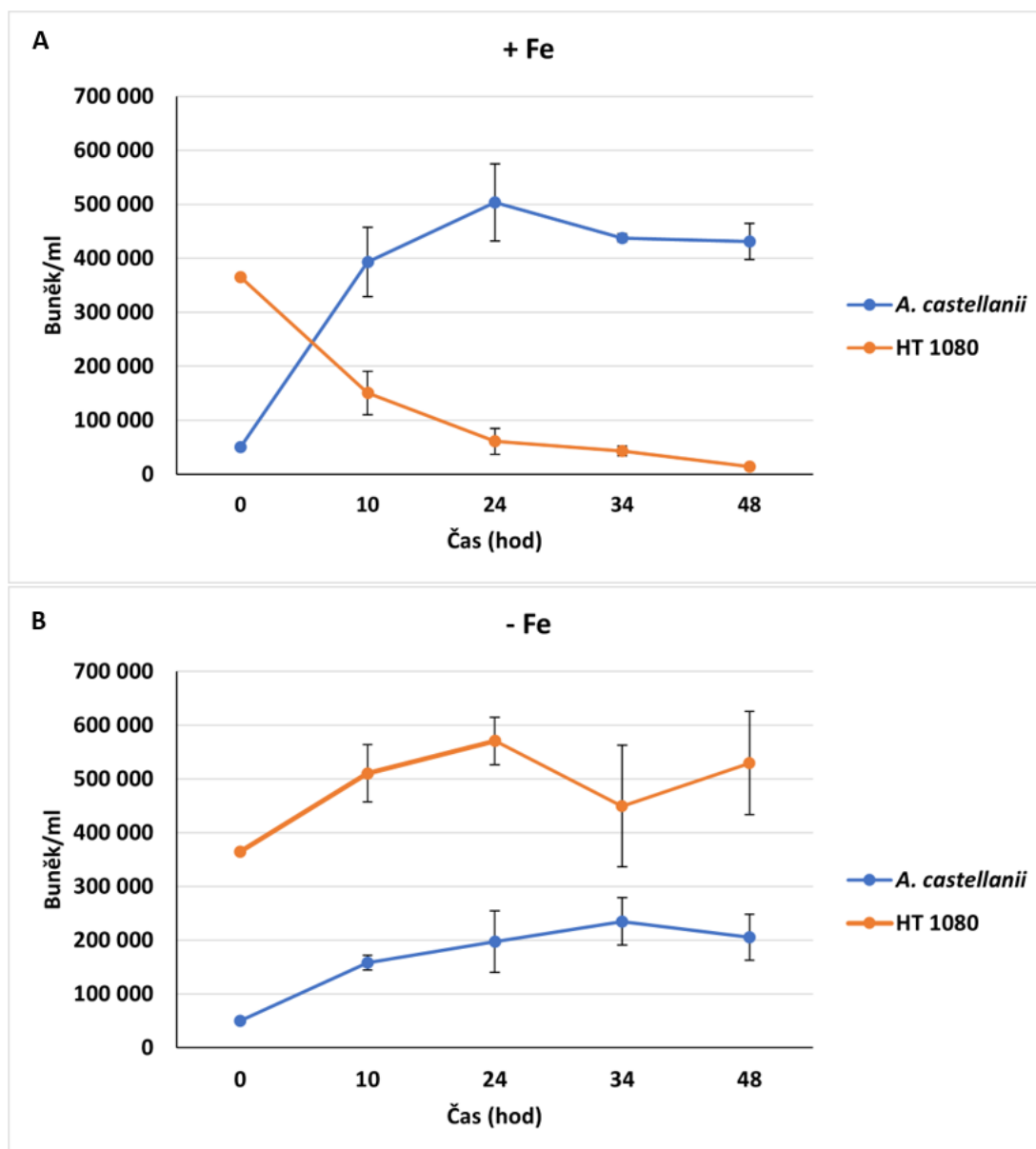
PYG: médium používané pro kultivaci *A. castellanii*, **DMEM:** médium používané pro kultivaci savčích buněk, **1:1, 1:2, 1:5:** médium PYG ku médiu DMEM ve třech poměrech.

5.3.4 Stanovení virulence pomocí průtokové cytometrie

Pro zahájení testování virulence pomocí průtokové cytometrie bylo důležité zajistit, aby přístroj dokázal účinně oddělit populace buněk parazita a fibrosarkomů. Počáteční problém byl v tom, že buňky *A. castellanii* a testované savčí buňky jsou přibližně stejně velké, a tak se nám je nedařilo na cytometru od sebe dobře odlišit. Začali jsme tedy používat fluorescenčně značené fibrosarkomy HT 1080 a také fluorescenčně značené *A. castellanii*. Na základě rozdílné fluorescenční barvy (fibrosarkomy značené červeným fluorescenčním proteinem dTomato a améby značené zeleným fluorescenčním proteinem GFP) jsme pak byli schopni tyto dvě populace buněk od sebe rozlišit a spočítat kolik buněk v dané populaci je.

Kokultivace *A. castellanii* s fibrosarkomy byla testována v již zmiňovaném médiu 1:1 (PYG:DMEM) s přidaným 25 μM železem ve formě Fe-NTA nebo s přidaným 25 μM chelátorem železa BPS. Počet buněk v populacích byl měřen ve třech časových bodech. Vstupní počet buněk *A. castellanii* byl ve všech podmínkách 50 000 buněk/ml. Buněk fibrosarkomů bylo v čase 0 hod (v čase přidání améb k savčím buňkám) 365 000 buněk/ml.

Z výsledných růstových křivek pro jednotlivé podmínky je patrné, že železo má vliv na virulenci *A. castellanii* (**Obr. 14**). U kokultivace s přidaným zdrojem železa strmě klesá počet fibrosarkomů a počet buněk *A. castellanii* naopak rychle roste. Při kokultivaci s chelátorem železa (BPS) nastala jiná situace. Populace *A. castellanii* i populace fibrosarkomů vykazovala pozvolný růst.



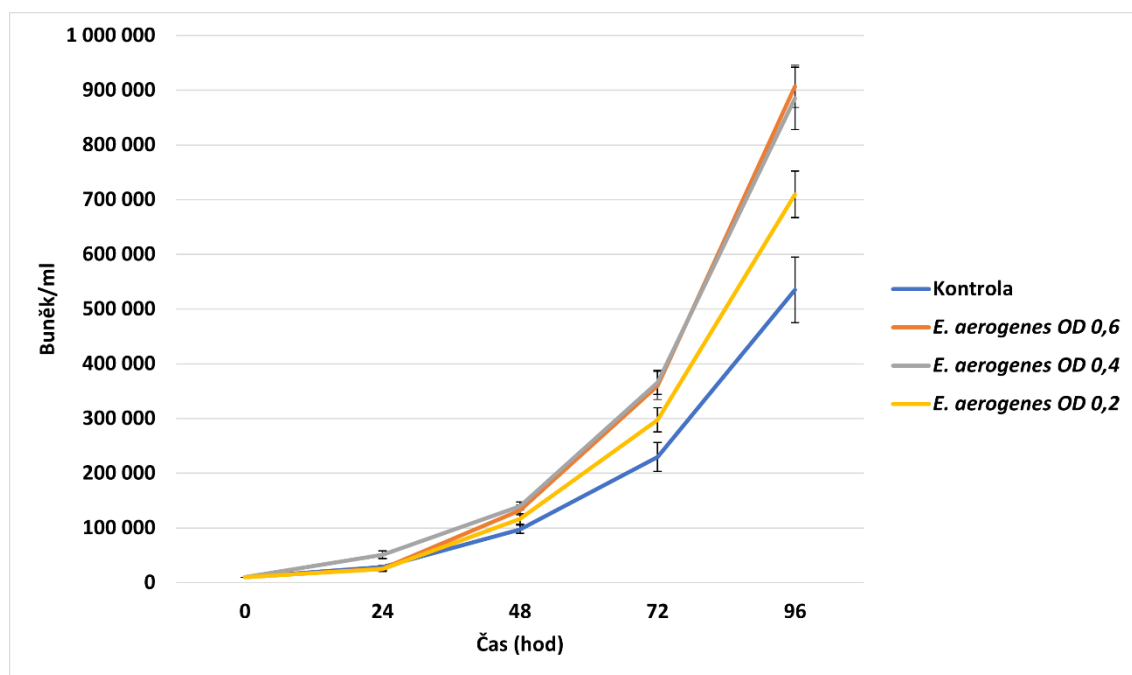
Obr. 14. Růstové křivky kokultivací *A. castellanii* s fibrosarkomy HT 1080.

A: kokultivace v médiu s přísávkem železa (+ Fe), B: kokultivace v médiu s přísávkem chelátoru (- Fe).

5.4 Komparativní proteomická analýza *A. castellanii* při různém zdroji živin

5.4.1 Bakterie jako zdroj živin

Cílem komparativní proteomické analýzy bylo sledovat rozdíly v zastoupení proteinů u *A. castellanii* při kultivaci s různými zdroji živin, což by mohlo vést k identifikaci faktorů virulence. Zajímali nás zejména změny proteinů obsahujících železo nebo podílející se na příjmu/metabolismu tohoto kovu. Jedním z testovaných zdrojů živin pro *A. castellanii* byly bakterie *Enterobacter aerogenes*. Před přípravou vzorků na proteomickou analýzu bylo potřeba zjistit vhodnou koncentraci těchto bakterií, při které dochází k podpoře růstu *A. castellanii*. Pro stanovení této koncentrace byla měřena růstová křivka po dobu 96 hod (Obr. 15). Počáteční množství *A. castellanii* bylo ve všech vzorcích 10 000 buněk/ml. Jako kontrolu jsme použili kulturu *A. castellanii* bez přidaných bakterií. Testovali jsme růst *A. castellanii* se třemi různými hodnotami OD bakterií: 0,2; 0,4 a 0,6. Na základě růstové křivky jsme jako nejvhodnější zvolili kulturu *A. castellanii* s bakteriemi o hodnotě OD 0,4, jelikož další zvýšení koncentrace bakterií již nevedlo ke zlepšení růstu améb.

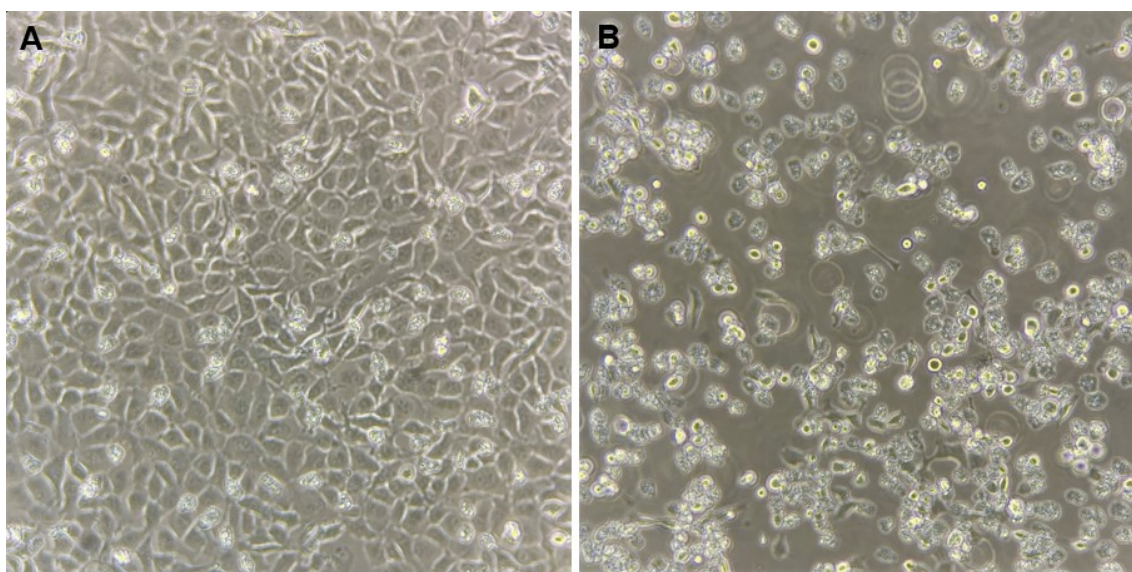


Obr. 15. Růstová křivka *A. castellanii* s bakteriemi *Enterobacter aerogenes* měřena po dobu 96 hod. **Kontrola:** *A. castellanii* pěstovaná v médiu bez přidaných bakterií, ***E. aerogenes* 0,2 OD:** *A. castellanii* s bakteriemi s hodnotou OD 0,2, ***E. aerogenes* 0,4 OD:** *A. castellanii* s bakteriemi s hodnotou OD 0,4, ***E. aerogenes* 0,6 OD:** *A. castellanii* s bakteriemi s hodnotou OD 0,6.

5.4.2 Fibrosarkomy jako zdroj živin

Zatímco pro proteomickou analýzu vlivu bakterií jako zdroje živin pro *A. castellanii* jsme zvolili dobu kultivace 6 hod, fibrosarkomy jsme kultivovali s *A. castellanii* krátkodobě (po dobu 6 hod), ale i dlouhodobě, kdy jsme na analýzu připravili vzorky třetí pasáže améb. Pro krátkodobou kultivaci jsme potřebovali určit kolik buněk *A. castellanii* budeme přidávat k narostlé kultuře fibrosarkomů. Kvůli možné interferenci s analýzou proteomu améb jsme chtěli docílit toho, aby po uplynutí 6 hod bylo ve vzorku co nejméně fibrosarkomů. Zároveň jsme se ale chtěli vyhnout jejich úplné eliminaci, aby nedošlo k potlačení očekávaných změn závislých na přítomnosti savčích buněk. Testování bylo prováděno na základě sledování kokultivace pod světelným mikroskopem. Fibrosarkomy jsme nechali narůst po dobu 48 hod a poté jsme k nim přidávali améby. Začínali jsme na koncentraci 12 500 buněk/ml, což bylo velmi málo. Po 6 hod nebyla pozorována téměř žádná změna v množství savčích buněk (**Obr. 16**). Nakonec jsme určili vhodnou koncentraci 200 000 buněk/ml, jelikož při tomto množství zbyl po uplynutí 6 hod kultivace v kultivační nádobě minimální počet fibrosarkomů. Při vyšších množstvích améb by již došlo k úplnému požrání fibrosarkomů.

Dlouhodobá kokultivace byla prováděna tak, že jsme k narostlým fibrosarkomům přidali 50 000 buněk/ml *A. castellanii*. Přibližně po 48 hod, kdy ve vzorku zbyly jen améby, jsme tyto améby v koncentraci 50 000 buněk/ml znovu přidali k dalším narostlým fibrosarkomům. Tento postup jsme zopakovali ještě jedenkrát. Po uplynutí 6 dnů od začátku kokultivace, jsme získali třetí pasáž *A. castellanii*, kterou jsme předali na vyhodnocení proteomické analýzy.



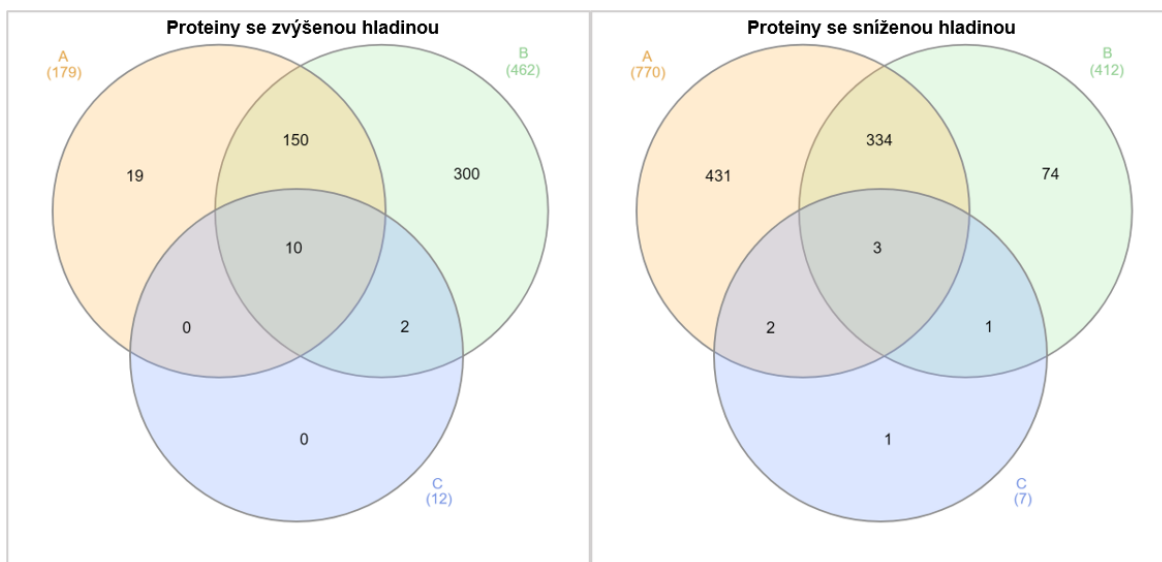
Obr. 16. Fotografie ze světelného mikroskopu znázorňující stav kokultivace *A. castellanii* s fibrosarkomy HT 1080 po 6 hod.

A: *A. castellanii* v koncentraci 12 500 buněk/ml, **B:** *A. castellanii* v koncentraci 200 000 buněk/ml.

5.4.3 Vyhodnocení proteomické analýzy

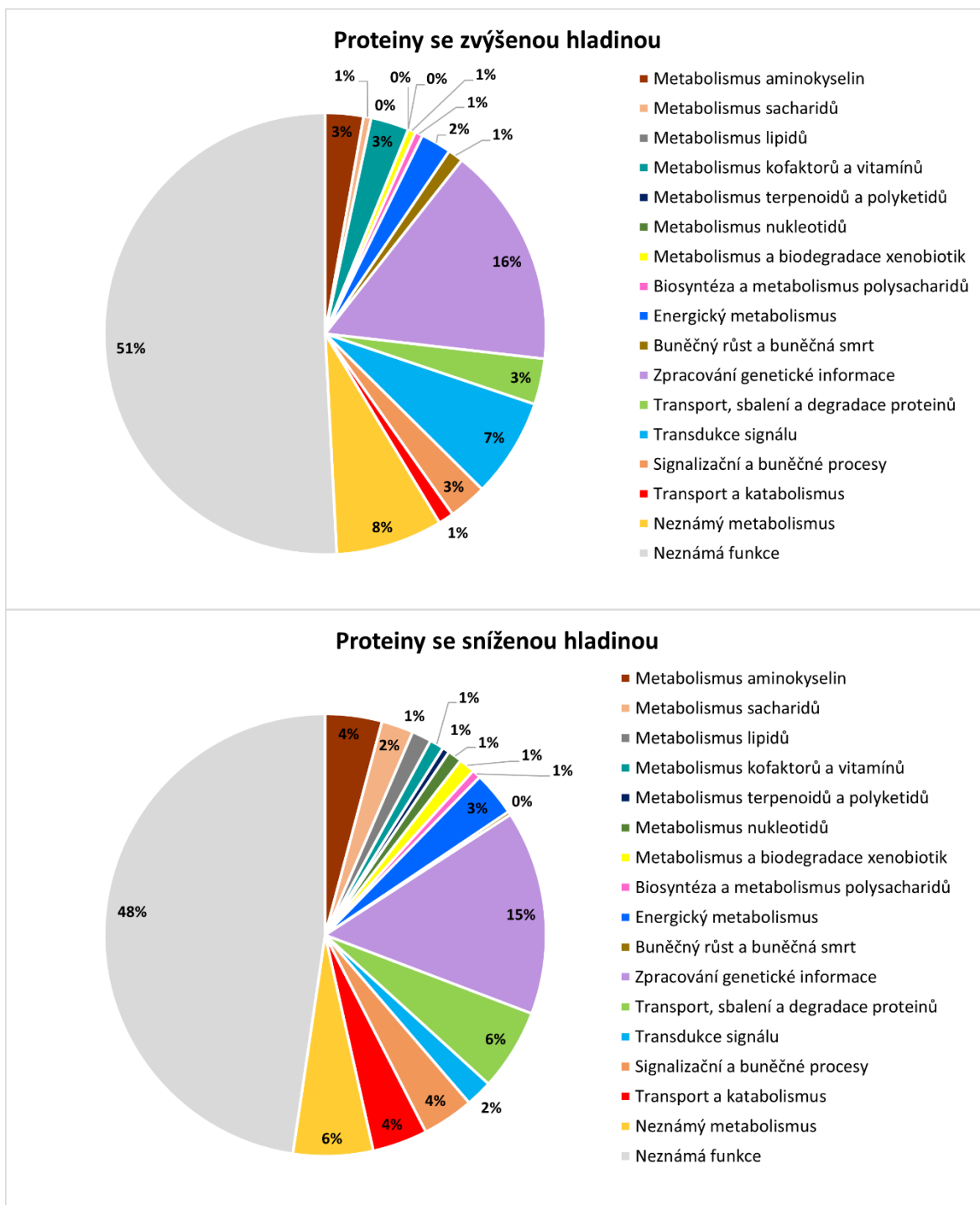
Komparativní proteomická analýza byla provedena v servisní proteomické laboratoři centra Biocev. Vzorky byly připraveny v biologických triplikátech. Pro analýzu byly vybrány buňky *A. castellanii* kultivované po dobu 6 hod, a to axenické kultury, buňky *A. castellanii* kultivované s *E. aerogenes* a améby kokultivované s fibrosarkomy HT 1080. Také jsme pro analýzu připravili vzorky třetí pasáže buněk *A. castellanii* kultivovaných s fibrosarkomy HT 1080.

Při interpretaci proteomické analýzy jsme porovnávali proteomy buněk *A. castellanii* kultivovaných s bakteriemi nebo fibrosarkomy vždy s axenickou kulturou *A. castellanii* (**příloha 3–6**). Počet proteinů se sníženou nebo zvýšenou hladinou, při studovaných podmínkách, je znázorněn pomocí Vennova diagramu (**Obr. 17**). Při vystavení améb fibrosarkomům byla velká část proteinů se zvýšenou i sníženou hladinou shodná při krátkodobé a dlouhodobé kokultivaci. U vzorku améb s bakteriemi jsme neidentifikovali žádné proteiny se zvýšenou hladinou exkluzivně v této podmínce. Pouze jeden protein vykazoval sníženou hladinu výhradně při kokultivaci s bakteriemi. Největší skupina proteinů, která měla zvýšenou hladinu ve všech podmínkách, byla skupina proteinů s tzv. CBS doménou. Hlubší analýzu jsme provedli u vlivu krátkodobé kokultivace s fibrosarkomy. V této podmínce bylo zaznamenáno nejvíce proteinů se změněnou hladinou. Zde bylo identifikováno 179 proteinů se zvýšenou hladinou a 770 proteinů se sníženou hladinou. U těchto proteinů byla bioinformatickou analýzou predikovaná funkce, byly rozděleny do funkčních skupin a byly vytvořeny výšečové grafy, ve kterých je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých skupin (**Obr. 18**). Přiřazení funkce jednotlivým proteinům bylo provedeno za využití databáze KEGG (The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Také bylo určeno procentuální zastoupení proteinů, u kterých jsme na základě anotace proteinů a serveru HHpred predikovali železo jako kofaktor na 1,58 %.



Obr. 17. Vennovy diagramy znázorňující proteiny jejichž hladina byla ovlivněna podmínkami kultivace.

A: *A. castellanii* kultivované s fibrosarkomy krátkodobě, **B:** *A. castellanii* kultivované s fibrosarkomy dlouhodobě, **C:** *A. castellanii* kultivované s bakteriemi. Všechny vzorky jsou porovnávány s axenickou kulturou *A. castellanii*.



Obr. 18. Výšečové grafy znázorňující zastoupení funkčních skupin proteinů, u kterých byla hladina ovlivněna krátkodobou kokultivací *A. castellanii* s fibrosarkomy.

6 Diskuze

Železo má nezastupitelnou úlohu ve všech živých organismech, jelikož se účastní mnoha biochemických procesů. Podílí se zejména na oxidačně-redukčních dějích, přenosu elektronů, syntéze DNA a je kofaktorem různých enzymů. Naopak volné atomy železa jsou pro buňky toxické. Důležitou úlohu má také ve vztahu hostitele a parazita. Dostupnost železa v hostiteli ovlivňuje virulenci parazita, jelikož je pro ně nezbytnou mikroživinou. Parazitické organismy využívají různé mechanismy, kterými získávají železo z hostitele, a hostitel se naopak tomuto procesu brání a snaží se udržet volné železo v co nejnižším množství. O metabolismu železa a jeho vlivu na virulenci víme u *A. castellanii* jen velmi málo. Proto jsme se v této práci zaměřili právě na to, jak dostupnost železa ovlivňuje virulenci této améby.

Jedním z proteinů, který by v metabolismu železa *A. castellanii* mohl hrát důležitou roli, je nově popsany protein AC_IDIP. Tento protein byl definován v předešlých proteomických studiích u nás v laboratoři, kde byla hladina AC_IDIP výrazně zvýšená v podmínce s nedostatkem železa. Od toho je odvozeno jeho pojmenování **Iron-Deprivation Induced Protein** (Grechnikova et al., 2022). Proti tomuto proteinu byla vytvořena protilátka, kterou jsme testovali na buněčných lyzátech *A. castellanii* kultivovaných v nedostatku železa nebo v jeho nadbytku. Purifikace protilátky zvýšila její specifitu, nicméně jsme zaznamenali, že se signál na membráně rozpadá do několika bandů a tyto signály jsou viditelné v obou podmínkách. K tomuto došlo nejspíše z důvodu nestability proteinů v buněčných lyzátech a jejich degradaci. Podle předpokladů a předešlých analýz, měl být tento signál silnější na lyzátech buněk kultivovaných s chelátorem železa. Provedení denzitometrie naznačilo, že hladina proteinu AC_IDIP je skutečně vyšší v podmínce bez železa, ale tento výsledek není statisticky signifikantní. Tento protein by se tedy mohl využívat jako marker železného statusu buňky, ale připravená protilátka není dostatečně účinná na to, aby se k tomuto účelu dala efektivně používat.

Lokalizace proteinu AC_IDIP byla pomocí transfekce a následné fluorescenční mikroskopie určena jako cytosolická. Před provedením experimentu jsme na základě bioinformatické analýzy předpokládali jadernou lokalizaci, přičemž pro tento protein nebyla objevena žádná funkční homologie. Domnívali jsme se tedy, že by se mohlo jednat o transkripční faktor. Protein AC_IDIP by mohl být i navzdory své cytosolické lokalizaci transkripčním faktorem. Ještě předtím, než se některé transkripční faktory mohou dostat do jádra, musí vázat příslušný ligand v cytosolu, který jim umožní tento vstup. Další možnost je ta, že protein potřebuje pro vstup do jádra nějaké posttranslační modifikace například fosforylaci pomocí specifických kináz a do té doby zůstává v cytoplasmě (Whiteside & Goodbourn, 1993). Je známé, že vazba případného ligandu ovlivňuje lokalizaci transkripčních faktorů, jejich aktivaci a schopnost vázat se na DNA (Latchman, 1997).

Abychom ověřili úlohu železa ve virulenci *A. castellanii*, testovali jsme, zda jeho dostupnost ovlivní kokultivaci *A. castellanii* s fibrosarkomy. Stanovování virulence jsme chtěli provádět pomocí komerčně dostupné sady Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH). Tento kolorimetrický test zaznamenává hladinu laktátdehydrogenázy, která se uvolňuje z cytosolu poškozených buněk, v našem případě savčích buněk poškozených amébou. Nedokázali jsme však získat relevantní výsledek, tento test na určování virulence nefungoval. Právě chelátor železa mohl nejspíše negativně reagovat s nějakými přidávanými složkami. Proto jsme přešli na stanovování virulence pomocí průtokové cytometrie.

Pro určování virulence pomocí průtokové cytometrie jsme začali používat fluorescenčně značené fibrosarkomy HT 1080 TOMATO a *A. castellanii* značené fluorescenčním proteinem GFP. V obou případech byl těmito proteiny značen cytosol buněk. Jako virulentní faktor bylo v tomto případě určující, jak rychle améby požírají savčí buňky.

Byl proveden pokus, ve kterém jsme po dobu 48 hod sledovali růst *A. castellanii* a fibrosarkomů při kokultivaci v médiu s nadbytkem nebo nedostatkem železa. Z pokusu je patrné, že železo má vliv na virulenci *A. castellanii*. V přítomnosti zvýšeného množství železa populace *A. castellanii* rychle rostla, a naopak fibrosarkomů v této kokultivaci rychle ubývalo. Kokultivace v přítomnosti chelátoru železa vypadala rozdílně, v tomto případě byly schopné růst i fibrosarkomy. Z toho vyplývá, že améby pravděpodobně potřebují železo, aby mohly využívat některé faktory virulence, respektive přímo mechanismy požíráání buněk jsou závislé na železe. Ze studie (Grechnikova et al., 2022) víme, že buňky *A. castellanii* kultivované při nedostatku železa, neměly dostatek energie na pohlcování bakterií pinocytózou a dávaly přednost zisku živin obsažených v médiu. Již v předešlých studiích byla dokázána silná závislost mechanismů, kterými je pohlcována potrava, na energii, ať už se jedná o pinocytózu nebo na receptorech závislou fagocytózu (Bowers, 1977).

Buňky *A. castellanii* obsahují proteázy, které dokáží štěpit molekuly vážící železo jako je laktoferin, transferin, ale i hemoglobin (Ramírez-Rico et al., 2015). V dalších měřeních by bylo proto zajímavé zjistit, zda záleží na tom, v jaké formě železo amébám dodáme a otestovat vliv různých zdrojů železa na virulenci *A. castellanii*, a zda bychom dosáhli podobných výsledků jako v tomto experimentu.

Dalším cílem, na který jsme se zaměřili, bylo provést komparativní proteomickou analýzu a zjistit, zda budeme schopni sledovat rozdíly v proteomu *A. castellanii* při kultivaci s různými zdroji potravy. Za tímto účelem jsme kultivovali *A. castellanii* v čistém médiu, v přítomnosti bakterií *E. aerogenes*, nebo při kokultivaci se savčími buňkami (fibrosarkomy HT 1080). Kultivaci se savčími buňkami jsme prováděli jak krátkodobě po dobu 6 hod, tak i dlouhodobě, kdy jsme připravili třetí pasáž *A. castellanii* kultivovanou s fibrosarkomy.

Nejmenší změny oproti amébám kultivovaných v čistém médiu, byly zaznamenány v podmínce, kde jako zdroj potravy byly přidávány bakterie. V tomto případě jsme zaznamenali

pouze 12 proteinů se zvýšenou a 7 proteinů se sníženou hladinou. Zpracování bakteriální potravy je u *A. castellanii* součástí bazálního metabolismu/fyziologie. Améba dává přednost zejména gram negativním bakteriím, kterými *E. aerogenes* jsou (Bottone et al., 1994). Přídavek bakterií proto pravděpodobně nezpůsobuje markantní změny v proteomu.

Kokultivace se savčími buňkami způsobila výrazné změny v zastoupení proteinů. U améb dlouhodobě kultivovaných s fibrosarkomy bylo identifikováno 462 proteinů se zvýšenou hladinou a 412 se sníženou hladinou. Velký počet ovlivněných proteinů byl zaznamenán i u krátkodobé kokultivace se savčími buňkami; 179 proteinů vykazovalo zvýšenou a 770 proteinů sníženou hladinou. Vzhledem k velkému množství zaznamenaných proteinů jsme se dále zaměřili na améby kultivované krátkodobě se savčími buňkami. Cílem bylo mimo jiné identifikovat proteiny, které se podílejí na mechanismu požití savčích buněk. U dlouhodobé kultivace se savčími buňkami by již tyto proteiny nemusely mít tak výrazně zvýšenou hladinu, jelikož bychom více sledovali adaptaci na jiný zdroj živin.

Nejvíce proteinů se zvýšenou hladinou při krátkodobé kokultivaci s fibrosarkomy se uplatňuje ve strukturách cytoskeletu. Trofozoiti *A. castellanii* tyto proteiny využívají k cytolýze buněk hostitele. Tato funkce byla identifikována pomocí cytoskeletálních inhibitorů (cytochalasin D), po jejichž aplikaci došlo k inhibici apoptózy hostitelských buněk (Taylor et al., 1995). Aktin byl identifikován jako protein s nejvyšší změnou hladiny v celé proteomické analýze. Tento protein se uplatňuje především ve schopnosti buněk přilnout k povrchům, při navázání kontaktu s buňkami hostitele, účastní se při pohybu buněk, ale i ve fagocytóze (Bretscher, 1991; Swanson & Baer, 1995). Aktin umožňuje rychlé změny morfologie buňky, a to tvorbou lobopodií a akantopodií, ve kterých byly objeveny aktinová vlákna, v experimentu byla značená specifickými protilátkami a vizualizována fluorescenční a elektronovou mikroskopií (González-Robles et al., 2008). Výskyt tohoto proteinu ve filopodiích byl také popsán u *E. histolytica*, kde se aktin hojně vyskytoval zejména při kultivaci s glykoproteinem fibronectinem (Talamas-Rohana & Rios, 2000). Dalším cytoskeletálním proteinem identifikovaným v analýze byl tubulin, který je součástí mikrotubulů. Identifikovány byly také cytoskeletální domény podílející se na polymeraci aktinu, jako například doména formin, domény vázající se přímo na aktin, jako je doména kalponinu a také SH₃ doména (SRC homology 3 doména), která se uplatňuje v proteinech signálních drah regulujících cytoskelet. Zaznamenán byl i protein ankyrin, jehož funkce je v organizaci aktinového cytoskeletu.

Mezi proteiny se zvýšenou hladinou byly ve větším počtu také zaznamenány proteiny pomáhající buňkám ubránit se oxidativnímu stresu. Buňky *A. castellanii* jsou schopné účinně se bránit reaktivním formám kyslíku jejich detoxifikací právě díky těmto proteinům (Hadaš, 1991). Identifikovány byly univerzální stresové domény, ale také peroxiredoxiny. Ukázalo se, že námi studovaný protein AC_IDIP má také zvýšenou hladinu a bude zaujímat, zatím blíže

nespecifikovanou, úlohu vyvolanou změnami živin. Při dlouhodobé kultivaci se savčími buňkami již tato zvýšená hladina nebyla zaznamenána.

Zvýšenou hladinu jsme očekávali také u proteáz, které jsou známými faktory virulence nejenom u parazitických protist, ale i u bakterií a virů. Tyto látky dokážou narušit hostitelské buňky a následně umožňují zpracovat fagocytovanou potravu a mohly by zaujímat důležitou funkci při infekcích působených *A. castellanii* (Kim et al., 2006). U *A. castellanii* bylo popsáno velké množství těchto proteinů, které umožňují amébě rozkládat potravu na menší části, aby ji byla schopna pohltnout. Nejvíce zastoupenými proteázami u *A. castellanii* bývají serinové proteázy, což se potvrdilo i v naší proteomické analýze (Hadaš & Mazur, 1993; Mitro et al., 1994). Dalšími byly cysteinové proteázy a byly zaznamenány i metalo-proteázy. Cysteinové proteázy se pravděpodobně podílejí na rozkladu molekul vázajících železo v hostiteli a umožňují takto vázané železo získat (Ramírez-Rico et al., 2015). Avšak převážná většina zaznamenaných proteáz měla v kokultivacích sníženou hladinu oproti axenické kultuře améb. Domníváme se, že to může být způsobeno tím, že se proteázy uplatňovaly na počátku invaze při narušení hostitelských buněk, aby mohly být buňky následně pohlceny pomocí fagocytózy nebo pinocytózy, avšak tato závislost není zcela objasněna (Alizadeh et al., 1994; Clarke & Niederkorn, 2006). Tyto proteázy mohou být také extracelulární (Hadaš & Mazur, 1993), a proto je v proteomické analýze nedokážeme zachytit. Při budoucích experimentech by v tomto případě bylo užitečné provést proteomickou analýzu po velmi krátké kultivaci se savčími buňkami, například 1–2 hod po přidání améb k savčím buňkám, nebo také zanalyzovat proteiny, které budou obsaženy v médiu po kokultivaci.

V této komparativní proteomické analýze jsme se dále zaměřili na to, jakou roli budou zaujímat proteiny, které obsahují železo nebo se na jeho metabolismu podílejí, jelikož jsme pomocí kokultivace *A. castellanii* se savčími buňkami dokázali, že železo hraje úlohu při její virulenci. U jiné patogenní améby, *Naegleria fowleri*, pravděpodobně zaujímá důležitou úlohu ve virulenci protein hemerythrin, který je jedním z nejvíce ovlivněných proteinů dostupností železa (Jung et al., 2009; Arbon et al., 2020). Dokonce se ukazuje, že při snížení jeho exprese docházelo k poklesu virulence u parazita (Jung et al., 2009). Prokázalo se, že se hemerythrin nachází v pseudopodiích a podílí se na fagocytóze a patogenitě buněk (Kang et al., 2005). Chtěli jsme tedy zjistit, zda homolog proteinu hemerythrin u *A. castellanii* plní podobnou úlohu a bude se uplatňovat při interakci se savčími buňkami. Víme, že tento protein se u *A. castellanii* nachází (Alvarez-Carreño et al., 2016) a podařilo se nám ho i v jejím proteomu detekovat. Proteomická analýza však nezaznamenala výrazně změněnou hladinu tohoto proteinu vlivem živin. Zastoupení proteinů obsahujících železo, nebo se na jeho metabolismu podílejících, bylo mezi ovlivněnými proteiny identifikováno při kokultivaci améb se savčími buňkami velmi malé množství (1,58 %). Je zřejmé, že virulence u *A. castellanii* je podmíněna různorodými proteiny, které spolu kooperují, ale také motilitou buňky a schopností vytvářet lobopodie a akantopodie. Zatím jsme neidentifikovali konkrétní proteiny metabolismu železa klíčové pro patogenezí savčích buněk.

7 Závěr

Diplomová práce si kladla za cíl objasnit problematiku vlivu železa na virulenci *A. castellanii*. Nejprve jsme se zaměřili na protein AC_IDIP, u kterého se nám na základě exprese fluorescenčně značeného proteinu podařilo určit lokalizaci jako cytosolickou. Vytvořili jsme poměrně specifickou protilátku proti tomuto proteinu. S jejím využitím jsme provedli imunoblotovou analýzu, která naznačila, že se dle předpokladu jedná o protein indukovaný při nedostatku železa.

Zaměřili jsme se také na to, jaký vliv má železo na kokultivaci *A. castellanii* se savčími buňkami. V tomto případě se nám podařilo zřetelně prokázat vliv železa na virulenci, kdy améby kultivované při nedostatku železa nebyly schopné buňky efektivně požírat.

V neposlední řadě se na základě komparativní proteomické analýzy ukázalo, že jsme schopni sledovat změny proteomu *A. castellanii*, které jsou vyvolány dostupností různých zdrojů živin. Detekovali jsme velké množství proteinů, jejichž hladina se mění při interakcích se savčími buňkami. Zejména cytoskeletální proteiny vykazovaly zvýšenou hladinu, překvapením byla snížená hladina proteáz. Proteinů, které obsahují železo nebo se na jeho metabolismu podílejí, bylo mezi ovlivněnými proteiny identifikováno velmi malé procento a jejich vliv na virulenci *A. castellanii* bude minimální.

8 Seznam použitých zkratek

AC_IDIP	<i>Acanthamoeba castellanii</i> Iron-Deprivation Induced Protein
AK	Amébová keratitida
BCA sada	Bicinchoninic acid sada pro určení koncentrace proteinů
BPS	Bathofenanthrolindisulfonát
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	Centrální nervová soustava
DMEM	Médium pro kultivaci savčích buněk (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
Fe-NTA	Nitilotriacetát železitý
GAE	Granulomatózní amébová encefalitida
IPTG	Izopropyl β -D-1-thiogalactopyranozid
LDH	Laktátdehydrogenáza
MBP	Protein vázající manózu (mannose binding protein)
MFT	Major facilitator transporters
OD	Optická denzita
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PYG	Médium pro kultivaci améb (pepton, extrakt kvasinek a glukóza)
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SOC médium	Médium pro kultivaci bakterií <i>E. coli</i> (Super Optimal Broth)
X-Gal	Bromchlorindoxyl galaktosid

9 Seznam použité literatury

- Aisen, P., & Leibman, A. (1972). Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 257(2), 314–323.
- Alfieri, S. C., Correia, C. E., Motegi, S. A., & Pral, E. M. (2000). Proteinase activities in total extracts and in medium conditioned by *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Journal of Parasitology*, 86(2), 220–227.
- Alizadeh, H., Li, H., Neelam, S., & Niederkorn, J. Y. (2008). Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by the mannose-induced *Acanthamoeba* cytolytic protein. *Experimental eye research*, 87(3), 286–291.
- Alizadeh, H., Pidherney, M. S., McCulley, J. P., & Niederkorn, J. Y. (1994). Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. *Infection and immunity*, 62(4), 1298–1303.
- Allen, P. G., & Dawidowicz, E. A. (1990). Phagocytosis in *Acanthamoeba*: I. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *Journal of cellular physiology*, 145(3), 508–513.
- Alsam, S., Sissons, J., Dudley, R., & Khan, N. A. (2005a). Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitology research*, 96(6), 402–409.
- Alsam, S., Sissons, J., Jayasekera, S., & Khan, N. A. (2005b). Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Journal of Infection*, 51(2), 150–156.
- Alvarez-Carreño, C., Becerra, A., & Lazcano, A. (2016). Molecular evolution of the oxygen-binding hemerythrin domain. *PLoS One*, 11(6), 1–21.
- Arbon, D., Ženíšková, K., Mach, J., Grechnikova, M., Malych, R., Talacko, P., & Šut'ák, R. (2020). Adaptive iron utilization compensates for the lack of an inducible uptake system in *Naegleria fowleri* and represents a potential target for therapeutic intervention. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(6), 1–25.
- Bagg, A., & Neilands, J. B. (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiological reviews*, 51(4), 509–518.

- Balado, M., Souto, A., Vences, A., Careaga, V. P., Valderrama, K., Segade, Y., Rodríguez, J., Osorio, C. R., Jiménez, C., & Lemos, M. L. (2015).** Two catechol siderophores, acinetobactin and amonabactin, are simultaneously produced by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* sharing part of the biosynthetic pathway. *ACS chemical biology*, *10*(12), 2850–2860.
- Band, R. N., & Mohrlök, S. (1973).** The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. *The Journal of Protozoology*, *20*(5), 654–657.
- Bateman, E. (2010).** Expression plasmids and production of EGFP in stably transfected *Acanthamoeba*. *Protein expression and purification*, *70*(1), 95–100.
- Beyers, T. M., Lai, W. C., Read, R. W., & Pakes, S. P. (1994).** *Mycoplasma pulmonis* 46-kDa trypsin-resistant protein adheres to rat tracheal epithelial cells. *Laboratory animal science*, *44*(6), 573–578.
- Bottone, E. J., Pere, A. A., Gordon, R. E., & Qureshi, M. N. (1994).** Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *Journal of medical microbiology*, *40*(2), 148–154.
- Bowers, B. (1977).** Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Experimental cell research*, *110*(2), 409–417.
- Bowers, B., & Olszewski, T. E. (1972).** Pinocytosis in *Acanthamoeba castellanii*: Kinetics and morphology. *The Journal of cell biology*, *53*(3), 681–694.
- Bretscher, A. (1991).** Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annual review of cell biology*, *7*(1), 337–374.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Griffiths, E. (1978).** Role of iron in bacterial infection. *Current topics in microbiology and immunology*, 1–35.
- CDC (Centers for Disease control and Prevention).** *Acanthamoeba castellanii* life cycle. Získáno z <https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/pathogen.html>
- Chang, C. S., & Chang, K. P. (1985).** Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and biochemical parasitology*, *16*(3), 267–276.
- Chappell, C. L., Wright, J. A., Coletta, M., & Newsome, A. L. (2001).** Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, *8*(4), 724–730.

- Clark, M., Fisher, N. C., Kasthuri, R., & Cerami Hand, C. (2013).** Parasite maturation and host serum iron influence the labile iron pool of erythrocyte stage *Plasmodium falciparum*. *British journal of haematology*, 161(2), 262–269.
- Clarke, D. W., & Niederkorn, J. Y. (2006).** The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in parasitology*, 22(4), 175–180.
- Colp, M. (2018).** Transformation of *Acanthamoeba castellanii* with Qiagen SuperFect reagent. *protocols.io*. Získáno z <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.s4regv6>
- Cornelissen, C. N. (2003).** Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Frontiers Bioscience*, 8, d836–d847.
- Coué, M., Brenner, S. L., Spector, I., & Korn, E. D. (1987).** Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS letters*, 213(2), 316–318.
- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014).** Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics*, 13(9), 2513–2526.
- Crosa, J. H., & Walsh, C. T. (2002).** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(2), 223–249.
- Cruz-Castañeda, A., López-Casamichana, M., & Olivares-Trejo, J. J. (2011).** *Entamoeba histolytica* secretes two haem-binding proteins to scavenge haem. *Biochemical Journal*, 434(1), 105–111.
- de Jonckheere, J. F. (1991).** Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of infectious diseases*, 13, S385–S387.
- de Lorenzo, V., & Martinez, J. L. (1988).** Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(5), 621–629.
- de O Ferreira, E., Araújo Lobo, L., Barreiros Petrópolis, D., dos S Avelar, K. E., Ferreira, M. C., e Silva Filho, F. C., & Domingues, R. M. C. P. (2006).** A *Bacteroides fragilis* surface glycoprotein mediates the interaction between the bacterium and the extracellular matrix component laminin-1. *Research in microbiology*, 157(10), 960–966.
- Diaz, J., Osuna, A., Rosales, M. J., Cifuentes, J., & Mascaro, C. (1991).** Sucker-like structures in two strains of *Acanthamoeba*: scanning electron microscopy study. *International journal for parasitology*, 21(3), 365–367.

- Dudley, R., Alsam, S., & Khan, N. A. (2008).** The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS microbiology letters*, 286(1), 9–15.
- Ellermann, M., & Arthur, J. C. (2017).** Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 105, 68–78.
- Flannery, A. R., Huynh, C., Mitra, B., Mortara, R. A., & Andrews, N. W. (2011).** LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 23266–23279.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S., & Aderem, A. (2004).** Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432(7019), 917–921.
- Ganz, T. (2009).** Iron in innate immunity: starve the invaders. *Current opinion in immunology*, 21(1), 63–67.
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2006).** Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 690–699.
- Garate, M., Cao, Z., Bateman, E., & Panjwani, N. (2004).** Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29849–29856.
- Garate, M., Marchant, J., Cubillos, I., Cao, Z., Khan, N. A., & Panjwani, N. (2006).** In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(3), 1056–1062.
- Ghosh, A., Kole, L., Bandyopadhyay, K., Sarkar, K., & Das, P. K. (1996).** Evidence of a laminin binding protein on the surface of *Leishmania donovani*. *Biochemical and biophysical research communications*, 226(1), 101–106.
- Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S. S., & Colli, W. (1994).** An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Molecular and biochemical parasitology*, 65(1), 85–94.
- González-Robles, A., Castañón, G., Hernández-Ramírez, V. I., Salazar-Villatoro, L., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., Talamás-Rohana, P., & Martínez-Palomo, A. (2008).** *Acanthamoeba castellanii*: Identification and distribution of actin cytoskeleton. *Experimental Parasitology*, 119(3), 411–417.

- Gonzalez, M. M., Gould, E., Dickinson, G., Martinez, A. J., Visvesvara, G., Cleary, T. J., & Hensley, G. T. (1986).** Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 110(8), 749–751.
- Gordon, V. R., Asem, E. K., Vodkin, M. H., & McLaughlin, G. L. (1993).** *Acanthamoeba* binds to extracellular matrix proteins in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34(3), 658–662.
- Grechnikova, M., Arbon, D., Ženíšková, K., Malych, R., Mach, J., Krejbichová, L., Šimáčková, A., & Šuťák, R. (2022).** Elucidation of iron homeostasis in *Acanthamoeba castellanii*. *International Journal for Parasitology*, v tisku.
- Hadaš, E. (1991).** Anti-oxidant enzymes of *Acanthamoeba castellanii* strains. *Acta protozoologica*, 30(2), 103–106.
- Hadaš, E., & Mazur, T. (1993).** Biochemical markers of pathogenicity and virulence of *Acanthamoeba* sp. strains. *Parasitology research*, 79(8), 696–698.
- Hart, R. C., Kadis, S., & Chapman, W. L., Jr. (1982).** Nutritional iron status and susceptibility to *Proteus mirabilis* pyelonephritis in the rat. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(6), 713–717.
- He, Y. G., Niederkorn, J. Y., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Silvano, R., & Dougherty, J. (1990).** In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 31(11), 2235–2240.
- Hernández-Cuevas, N. A., Weber, C., Hon, C. C., & Guillen, N. (2014).** Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *PLoS One*, 9(9), e107102.
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010).** Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27(5), 637–657.
- Hong, Y. C., Lee, W. M., Kong, H. H., Jeong, H. J., & Chung, D. I. (2004).** Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a laminin-binding protein (AhLBP) from *Acanthamoeba healyi*. *Experimental Parasitology*, 106(3–4), 95–102.
- Hryniewiecka, L., Jenek, J., & Michejda, J. W. (1980).** Necessity of iron for the alternative respiratory pathway in *Acanthamoeba castellanii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93(1), 141–148.

- Hurt, M., Neelam, S., Niederkorn, J., & Alizadeh, H. (2003).** Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infection and immunity*, 71(11), 6243–6255.
- Huynh, C., Sacks, D. L., & Andrews, N. W. (2006).** A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *The Journal of experimental medicine*, 203(10), 2363–2375.
- Jung, S. Y., Kim, J. H., Song, K. J., Lee, Y. J., Kwon, M. H., Kim, K., Park, S., Im, K., & Shin, H. J. (2009).** Gene silencing of nfa1 affects the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* in murine macrophages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165(1), 87–93.
- Kang, S. Y., Song, K. J., Jeong, S. R., Kim, J. H., Park, J. S., Kim, K., Kwon, M. H., & Shin, H. J. (2005).** Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(7), 873–876.
- Khan, N. A. (2001).** Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 43(6), 391–395.
- Khan, N. A. (2003).** Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial pathogenesis*, 34(6), 277–285.
- Khan, N. A. (2006).** *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 564–595.
- Khan, N. A. (2007).** *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *International journal for parasitology*, 37(2), 131–138.
- Kim, J. H., Matin, A., Shin, H. J., Park, H., Yoo, K. T., Yuan, X. Z., Kim, K. S., & Jung, S. Y. (2012).** Functional roles of mannose-binding protein in the adhesion, cytotoxicity and phagocytosis of *Acanthamoeba castellanii*. *Experimental parasitology*, 132(2), 287–292.
- Kim, W. T., Kong, H. H., Ha, Y. R., Hong, Y. C., Jeong, H. J., Yu, H. S., & Chung, D. I. (2006).** Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *The Korean Journal of Parasitology*, 44(4), 321–330.
- Kong, H. H., Hwang, M. Y., Kim, H. K., & Chung, D. I. (2001).** Expressed sequence tags (ESTs) analysis of *Acanthamoeba healyi*. *The Korean Journal of Parasitology*, 39(2), 151.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020).** Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152–163.

- Latchman, D. S. (1997).** Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(12), 1305–1312.
- Leon-Sicaïros, N., Reyes-Lopez, M., Canizalez-Roman, A., Bermúdez-Cruz, R. M., Serrano-Luna, J., Arroyo, R., & De la Garza, M. (2005).** Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*, 151(12), 3859–3871.
- Li, L., Chen, O. S., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2001).** CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29515–29519.
- Ljungh, Å., Moran, A. P., & Wadström, T. (1996).** Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. *FEMS immunology and medical microbiology*, 16(2), 117–126.
- López-Soto, F., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., León-Sicaïros, N., Piña-Vázquez, C., Salazar, E. P., & De la Garza, M. (2009a).** *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *International journal for parasitology*, 39(4), 417–426.
- López-Soto, F., León-Sicaïros, N., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Ordaz-Pichardo, C., Piña-Vázquez, C., Salazar, E. P., & De la Garza, M. (2009b).** Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1038–1050.
- Mach, J., & Štuřák, R. (2020).** Iron in parasitic protists—from uptake to storage and where we can interfere. *Metallomics*, 12(9), 1335–1347.
- Mach, J., Tachezy, J., & Štuřák, R. (2013).** Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of parasitology*, 99(2), 363–364.
- Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003).** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 273–307.
- Martinez, A. J. (1991).** Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(3), S399–S402.
- Mattana, A., Cappai, V., Alberti, L., Serra, C., Fiori, P. L., & Cappuccinelli, P. (2002).** ADP and other metabolites released from *Acanthamoeba castellanii* lead to human monocytic cell death through apoptosis and stimulate the secretion of proinflammatory cytokines. *Infection and Immunity*, 70(8), 4424–4432.

- Mazur, T., Hadaś, E., & Iwanicka, I. (1995).** The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical medicine and parasitology*, 46(2), 106–108.
- Michelacci, Y. M. (2003).** Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(8), 1037–1046.
- Mitro, K., Bhagavathiammai, A., Zhou, O. M., Bobbett, G., McKerrow, J. H., Chokshi, R., Chokshi, B., & James, E. R. (1994).** Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Experimental parasitology*, 78(4), 377–385.
- Morton, L. D., McLaughlin, G. L., & Whiteley, H. E. (1991).** Effects of temperature, amebic strain, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium in vitro. *Infection and Immunity*, 59(10), 3819–3822.
- Na, B. K., Cho, J. H., Song, C. Y., & Kim, T. S. (2002).** Degradation of immunoglobulins, protease inhibitors, and interleukin-1 by a secretory proteinase of *Acanthamoeba castellanii*. *The Korean journal of parasitology*, 40(2), 93.
- Na, B. K., Kim, J. C., & Song, C. Y. (2001).** Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *Microbial pathogenesis*, 30(1), 39–48.
- Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. (2011).** *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection*, 13(12–13), 963–976.
- Neilands, J. B. (1981).** Microbial iron compounds. *Annual review of biochemistry*, 50(1), 715–731.
- Neilands, J. B. (1982).** Microbial envelope proteins related to iron. *Annual Reviews in Microbiology*, 36(1), 285–309.
- Nevo, Y., & Nelson, N. (2006).** The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 609–620.
- Nieder Korn, J. Y., Alizadeh, H., Leher, H., & McCulley, J. P. (1999).** The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection*, 1(6), 437–443.
- Page, F. C. (1988).** A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK*, 122 pp.
- Puschmann, M., & Ganzoni, A. M. (1977).** Increased resistance of iron-deficient mice to *Salmonella* infection. *Infection and Immunity*, 17(3), 663–664.

- Ramírez-Rico, G., Martínez-Castillo, M., De La Garza, M., Shibayama, M., & Serrano-Luna, J. (2015).** *Acanthamoeba castellanii* proteases are capable of degrading iron-binding proteins as a possible mechanism of pathogenicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 614–622.
- Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual reviews in microbiology*, 54(1), 881–941.
- Rocha-Azevedo, B. D. A., Jamerson, M., Cabral, G. A., & Marciano-Cabral, F. (2010).** *Acanthamoeba culbertsoni*: Analysis of amoebic adhesion and invasion on extracellular matrix components collagen I and laminin-1. *Experimental parasitology*, 126(1), 79–84.
- Rocha-Azevedo, B. D. A., Jamerson, M., Cabral, G. A., Silva-Filho, F. C., & Marciano-Cabral, F. (2009).** *Acanthamoeba* interaction with extracellular matrix glycoproteins: biological and biochemical characterization and role in cytotoxicity and invasiveness. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(3), 270–278.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994).** Ecology of free-living amoebae. *Critical reviews in microbiology*, 20(3), 225–241.
- Sahu, T., Boisson, B., Lacroix, C., Bischoff, E., Richier, Q., Formaglio, P., Thiberge, S., Dobrescu, I., Ménard, R., & Baldacci, P. (2014).** ZIPCO, a putative metal ion transporter, is crucial for *Plasmodium* liver-stage development. *EMBO molecular medicine*, 6(11), 1387–1397.
- Sandin, R. L., Rogers, A. L., Patterson, R. J., & Beneke, E. S. (1982).** Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells in vitro. *Infection and Immunity*, 35(1), 79–85.
- Sawyer, T. K., & Griffin, J. L. (1975).** A proposed new family, Acanthamoebidae (order Amoebida), for certain cyst-forming filose amoebae. *Transactions of the American Microscopical Society*, 93–98.
- Sengupta, S., Tripathi, J., Tandon, R., Raje, M., Roy, R. P., Basu, S. K., & Mukhopadhyay, A. (1999).** Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2758–2765.
- Sissons, J., Alsam, S., Goldsworthy, G., Lightfoot, M., Jarroll, E. L., & Khan, N. A. (2006).** Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC microbiology*, 6(1), 1–8.

- Sissons, J., Kim, K. S., Stins, M., Jayasekera, S., Alsam, S., & Khan, N. A. (2005).** *Acanthamoeba castellanii* induces host cell death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Infection and immunity*, 73(5), 2704–2708.
- Skaar, E. P. (2010).** The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS pathogens*, 6(8), e1000949.
- Stojilkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O’Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F., & So, M. (1995).** The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Molecular microbiology*, 15(3), 531–541.
- Sullivan Jr, D. J., Gluzman, I. Y., & Goldberg, D. E. (1996).** *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*, 271(5246), 219–222.
- Swanson, J. A., & Baer, S. C. (1995).** Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cell Biology*, 5(3), 89–93.
- Talamas-Rohana, P., & Rios, A. (2000).** Actin stress fibers in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin. *Archives of Medical Research*, 31, S131–S133.
- Taylor, W. M., Pidherney, M. S., Alizadeh, H., & Niederkorn, J. Y. (1995).** In vitro characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. *The Journal of Parasitology*, 81(4), 603–609.
- Thompson, J. M., Jones, H. A., & Perry, R. D. (1999).** Molecular characterization of the hemin uptake locus (hmu) from *Yersinia pestis* and analysis of hmu mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infection and immunity*, 67(8), 3879–3892.
- Torno Jr, M. S., Babapour, R., Gurevitch, A., & Witt, M. D. (2000).** Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(2), 351–354.
- Wandersman, C., & Stojilkovic, I. (2000).** Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current opinion in microbiology*, 3(2), 215–220.
- Wang, L., Asem, E. K., & McLaughlin, G. L. (1994).** Calcium enhances *Acanthamoeba polyphaga* binding to extracellular matrix proteins. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(5), 2421–2426.
- Wang, Z., Wu, D., Tachibana, H., Feng, M., & Cheng, X. (2020).** Identification and biochemical characterisation of *Acanthamoeba castellanii* cysteine protease 3. *Parasites & vectors*, 13(1), 1–11.

- Whiteside, S. T., & Goodbourn, S. (1993).** Signal transduction and nuclear targeting: Regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *Journal of Cell Science*, 104(4), 949–955.
- Wilson, M. E., Vorhies, R. W., Andersen, K. A., & Britigan, B. E. (1994).** Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infection and immunity*, 62(8), 3262–3269.
- Yang, Z., Cao, Z., & Panjwani, N. (1997).** Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infection and immunity*, 65(2), 439–445.
- Yurchenco, P. D., Amenta, P. S., & Patton, B. L. (2004).** Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biology*, 22(7), 521–538.

10 Seznam příloh

Příloha 1: Video pohlcování částí fibrosarkomů parazitem *A. castellanii*.

Na videu je zaznamenáno jak *A. castellanii* utrhuje část fibrosarkomu HT 1080. Video bylo pořízeno na fluorescenčním skenovacím mikroskopu (Nikon H-TIRF 2).

Příloha 2: Video pohlcování částí fibrosarkomů parazitem *A. castellanii*.

Na videu ve vakuole je vidět svítící část pohlcené savčí buňky. Video bylo pořízeno na fluorescenčním skenovacím mikroskopu (Nikon H-TIRF 2).

Příloha 3: Tabulka proteinů *A. castellanii*, u kterých se změnila hladina při kultivaci s fibrosarkomy HT 1080 krátkodobě (6 hod) v porovnání s axenickou kulturou *A. castellanii*.

Oranžově jsou zvýrazněny proteiny obsahující železo nebo se na jeho metabolismu podílejí. Modře je označen protein AC_IDIP (Iron-Deprivation Induced Protein).

Příloha 4: Tabulka proteinů *A. castellanii*, u kterých se změnila hladina při kultivaci s fibrosarkomy HT 1080 dlouhodobě (3. pasáž buněk *A. castellanii*) v porovnání s axenickou kulturou *A. castellanii*.

Příloha 5: Tabulka proteinů *A. castellanii*, u kterých se změnila hladina při kultivaci s bakteriemi (*E. aerogenes*) v porovnání s axenickou kulturou *A. castellanii*.

Příloha 6: Tabulka proteomických dat z analýzy vlivu živin na proteom *A. castellanii*.