

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

**katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Monika Novotná

**Pentózy jako zdroje energie *Mastigamoeba balamuthi***

Pentoses as energy sources of *Mastigamoeba balamuthi*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Zdeněk Verner, 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

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych především poděkovat vedoucímu této práce Zdeňku Vernerovi za jeho ochotu, trpělivost, cenné rady, opravy textu a pomoc při zpracování práce, jak po stránce teoretické, tak i praktické v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Lence Backové za vytvoření protokolů a makra pro analýzu buněk ve FIJI, Petru Žáčkovi z laboratoře OMICS v Biocevu za zpracování vzorků na metabolomiku, Marii Olšinové z laboratoře IMCF v Biocevu za veškerou pomoc, která mi byla poskytnuta při mikroskopování a Míše Marcinčíkové za ochotu při autoklávování PYGC média, kterého za tu dobu nebylo málo. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu po celou dobu studia a svému příteli za trpělivost a pochopení.

## Abstrakt

*Mastigamoeba balamuthi* je volně žijící améba, sesterská skupina jednoho z nejrozšířenějších původců parazitárních onemocnění *Entamoeba histolytica*. Během svého života může *M. balamuthi* využívat k produkci ATP nejméně čtyři různé zdroje energie. Kromě glukózy, standardního kultivačního zdroje energie, může améba využívat pentózy xylózu a arabinózu a také aminokyselinu L-arginin. Tato práce posuzuje preferovaný zdroj energie améby na základě morfologických a fyziologických vlastností, jako je růst a velikost buněk, pohyblivost, počet jader a koncové metabolické produkty. Po vyhodnocení statisticky významných rozdílů se došlo k závěru, že glukóza se zdá být méně preferovaným zdrojem energie než pentózy. Proto bylo navrženo nahradit v kultivačním médiu *M. balamuthi* všeobecně používanou hexózu preferovanou xylózou.

## **Abstract**

*Mastigamoeba balamuthi* is a free-living amoeba, a sister group to one of the most widespread parasitic agent *Entamoeba histolytica*. During its lifetime, *M. balamuthi* can utilize at least four different energy sources to produce ATP. In addition to glucose, a standard cultivation energy source, the amoeba can utilize pentoses xylose and arabinose, as well as an amino acid L-arginine. In this work, energy source preference was assessed. Morphological and physiological characteristics including cell growth and size, motility, number of nuclei and metabolic end products were evaluated. It was concluded that glucose appears to be a less preferred energy source than pentose upon evaluating statistically significant differences. Therefore, it was proposed to replace the commonly used hexose with the preferred xylose in the culture medium of *M. balamuthi*.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>2</b>
2.1	<i>MASTIGAMOEBA BALAMUTHI</i> .....	2
2.2	METABOLISMUS <i>M. BALAMUTHI</i> .....	3
2.3	PENTÓZY .....	10
2.4	ENCYSTACE .....	12
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>15</b>
4.1	POUŽITÉ ROZTOKY .....	15
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	15
4.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	15
4.3.1	PYGC médium.....	15
4.3.2	Definované médium .....	16
4.4	POUŽITÉ ORGANISMY .....	17
4.5	ADAPTACE BUNĚK <i>M. BALAMUTHI</i> NA DEFINOVANÉ MÉDIUM .....	17
4.6	PŘÍPRAVA BUNĚK <i>M. BALAMUTHI</i> NA EXPERIMENTY .....	18
4.7	RŮSTOVÁ ANALÝZA <i>M. BALAMUTHI</i> .....	18
4.8	INKUBACE BUNĚK <i>M. BALAMUTHI</i> NA MIKROSKOPII.....	19
4.9	MIKROSKOPIE ŽIVÝCH BUNĚK.....	19
4.10	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE .....	19
4.11	ANALÝZA OBRAZU (SPOLUPRÁCE S MGR. BACKOVOU).....	20
4.11.1	Velikost a tvar .....	20
4.11.2	Motilita.....	21
4.11.3	Počet jader.....	21
4.12	ANALÝZA ZÍSKANÝCH DAT .....	22
4.13	ENCYSTACE.....	22
4.13.1	Barvení cyst kalkofluorem .....	22
4.14	ANALÝZA KONCOVÝCH METABOLICKÝCH PRODUKTŮ (SPOLUPRÁCE S DR. ŽÁČKEM)..	23
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>24</b>
5.1	VLIV ENERGETICKÝCH ZDROJŮ NA RŮST .....	24
5.1.1	Růstové analýzy <i>M. balamuthi</i> na různých zdrojích energie .....	24
5.1.2	Růstová analýza <i>M. balamuthi</i> s inhibítorem karbamát kinázy .....	28

5.2	ADAPTACE BUNĚK <i>M. BALAMUTHI</i> NA DEFINOVANÉ MÉDIUM.....	30
5.3	VLIV ENERGETICKÝCH ZDROJŮ NA BUNĚČNOU MORFOLOGII A FYZIOLOGII.....	31
5.3.1	Velikost buněk .....	31
5.3.2	Tvar buněk .....	32
5.3.3	Počet jader.....	34
5.3.4	Motilita.....	36
5.4	VLIV ENERGETICKÝCH ZDROJŮ NA ENCYSTACI .....	37
5.4.1	Barvení cyst kalkofluorem .....	38
5.5	VLIV ENERGETICKÝCH ZDROJŮ NA KONCOVÉ METABOLICKÉ PRODUKTY .....	43
5.6	SHRnutí ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ .....	47
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>58</b>

# 1 Úvod

*Mastigamoeba balamuthi* je anaerobní volně žijící améba. Je významným druhem rodu *Mastigamoeba*, který slouží jako vhodný modelový organismus pro studium a výzkum volně žijících amitochondriálních organismů. Pozůstatky mitochondrií u *M. balamuthi* jsou mezistupněm mezi typickou mitochondrií a mitosomy, které se vyskytují u jiných druhů Archamoebae, přesněji u nejbližšího příbuzného druhu lidského patogena *Entamoeba histolytica*. Mitochondrie *M. balamuthi* se nazývají hydrogenosomy a poskytují produkci ATP částečnou anaerobní oxidací pyruvátu.

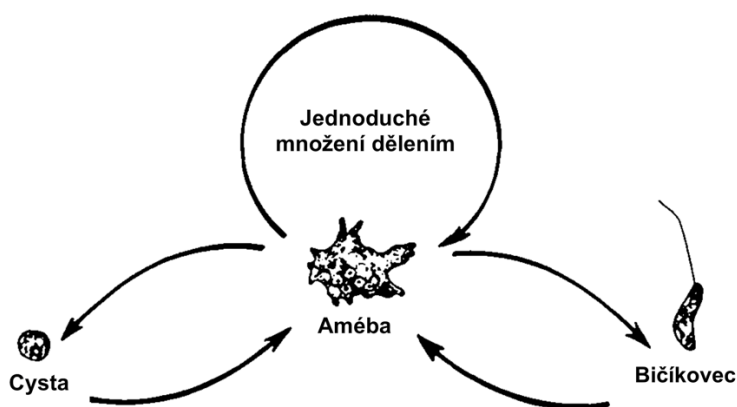
Genom *M. balamuthi* naznačuje schopnost buňky využívat pětiuhlíkaté sacharidy arabinózu a xylózu jako zdroje energie. Tyto sacharidy se vyskytují ve dřevě jako základní stavební kameny hemicelulózy. Hemicelulóza je polysacharid, který se skládá jak z hexózy (glukóza) tak z pentózy (arabinóza, xylóza). Kromě pentózy je *M. balamuthi* schopna získávat ATP i z aminokyselin pomocí arginin-dihydrolázové dráhy, kdy je zdrojem energie aminokyselina arginin. Buňky *M. balamuthi* jsou velmi polymorfní, jejich tvar je na první pohled asymetrický a nepravidelný. Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit a porovnat růst, velikost, tvar, motilitu a počet jader na různých zdrojích energie. Dále je tato práce zaměřena na encystaci a koncové metabolické produkty. Pro vyhodnocení výše zmíněných abilit byly buňky *M. balamuthi* kultivovány v PYGC médiu na různých zdrojích energie; byly použity sacharidy glukóza, arabinóza, xylóza a médium bez sacharidu, kde byly buňky nuceny využívat jako zdroj energie aminokyseliny.

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Mastigamoeba balamuthi*

Volně žijící anaerobní améba *Mastigamoeba balamuthi* je na základě fylogenetické analýzy blízké příbuzná významnému lidskému parazitu člověka *Entamoeba histolytica* (Baptiste et al., 2002). Obě améby se zařazují do skupiny Archamoebae, do eukaryotické nadskupiny Amoebozoa. *M. balamuthi* byla původně popsána a pojmenována jako *Phreatamoeba balamuthi* n. g., n. sp (Chavez et al., 1986). Z vodní studny v Gambii, v západní Africe, byla izolována a dále pěstována v laboratorních podmínkách axenicky v nedefinovaném organickém médiu (PYGC médium) nebo monoxenicky s *Escherichia coli* v médiu, které bylo chudší na organické živiny (PY médium) (Chavez et al., 1986).

V životním cyklu *M. balamuthi* byly pozorovány tři morfologické typy: améboidní forma (améba), améboflagelát (bičíkovec) a cysta (**obr. 1**).



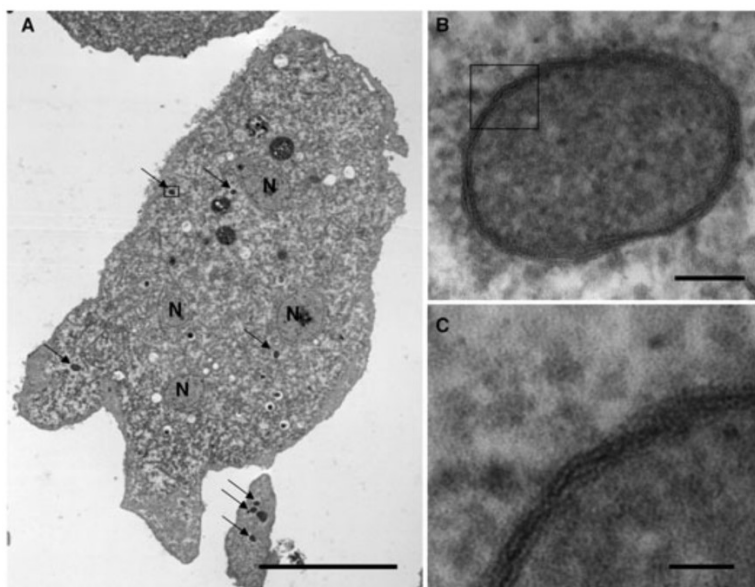
**Obr. 1** – Navrhované schéma životního cyklu *M. balamuthi* (Chavez et al., 1986).

Améboidní stádium se pohybuje pomocí panožek, dosahuje velikosti od 11 do 160  $\mu\text{m}$ , množí se dělením a je převážně vícejaderné. V laboratorních podmínkách lze améboidní stádium mastigaméby pěstovat axenicky v PYGC médiu, případně lze v PY médiu s *E. coli* vyvolat transformaci na bičíkovce přidáním rýžového prášku (1mg/ml) (Chavez et al., 1986). Pohyb bičíkovce, který má velikost v rozmezí od 6 do 50  $\mu\text{m}$ , je zajištěn jedním bičíkem. Bičíkovec se živí fagocytózou bakterií a nebyla u něj pozorována schopnost reprodukce (Chavez et al., 1986). Za nepříznivých podmínek je améba schopná vytvářet odolné cysty, které mají kulovitý až oválný tvar, jejich velikost se pohybuje v průměru od 9 do 18  $\mu\text{m}$  a postrádají póry ve stěně. Nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování (Chavez et al., 1986).

## 2.2 Metabolismus *M. balamuthi*

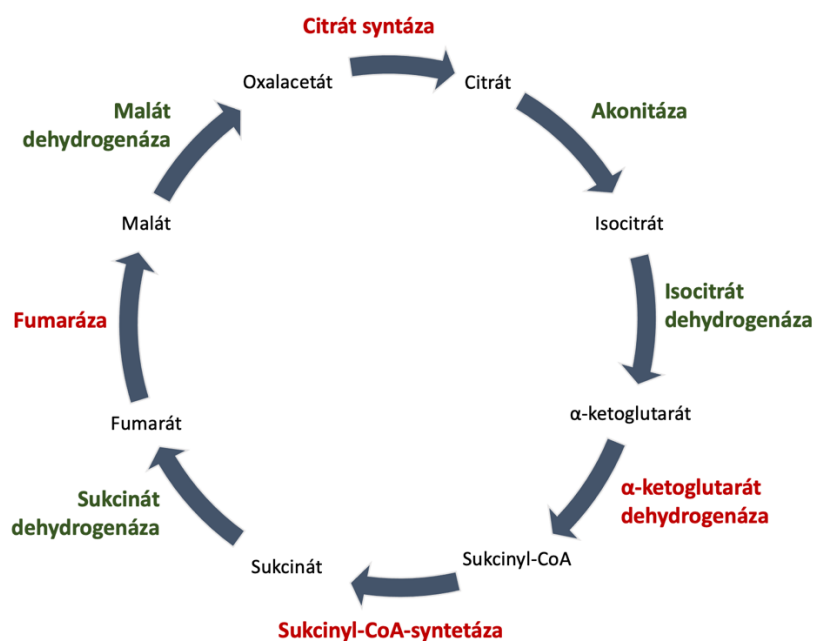
Předpokládá se, že společný předek Archamoebae a dalších linií Amoebozoa disponoval aerobními mitochondriemi, které se zachovaly u skupin, jako jsou blízké příbuzné Eumycetozoa (Ogawa et al., 2000; Arisue et al., 2002), zatímco *M. balamuthi* a *E. histolytica* ze skupiny Archamoebae přeměnily své aerobní mitochondrie na modifikované anaerobní formy, které postrádají většinu mitochondriálních drah, jakou jsou pyruvátdehydrogenázový komplex (PDH), Krebsův cyklus (TCA), dýchací řetězec závislý na cytochromu c a syntézu ATP oxidativní fosforylací (Gill et al., 2007; Müller et al., 2012). Tyto dráhy byly nahrazeny jednoduchým anaerobním energetickým metabolismem založeným na substrátové fosforylací (Gill et al., 2007; Nývltová et al., 2015). Ztráta genů u *M. balamuthi* byla kompenzována četnými laterálními přenosy genů z prokaryot, které jim propůjčily nové metabolické schopnosti. Velký zisk genů byl pozorován u anaerobního metabolismu, metabolismu aminokyselin a transportu a metabolismu sacharidů. Získané geny se mohou mimo jiné podílet na metabolismu sacharidů pocházejících z buněčné stěny rostlin (Žárský et al., 2021).

U *M. balamuthi* byly identifikovány hydrogenosomy (Nývltová et al., 2015), které mají modifikovaný energetický metabolismus a tvorba ATP je oproti klasickým mitochondriím dramaticky snížena (Müller et al., 2012). Hydrogenosom *M. balamuthi* byl objeven pomocí elektronové mikroskopie a původně byl považován za mitosom viz **obr. 2** (Gill et al., 2007).



**Obr. 2** – Transmisní elektronová mikroskopie *M. balamuthi* (Gill et al., 2007). A – Transmisní elektronová mikrofotografie celé buňky *M. balamuthi*. Šípky označují mitosomy, které byly později identifikovány jako hydrogenosomy. Buněčné jádro je označeno písmenem "N". Vložený rámeček označuje organely zobrazené v panelech B a C. Měřítko = 10  $\mu\text{m}$ . B – organela zobrazená při větším zvětšení, obklopená dvojitou membránou zobrazenou v obrázku C. Měřítko = 100 a 25 nm.

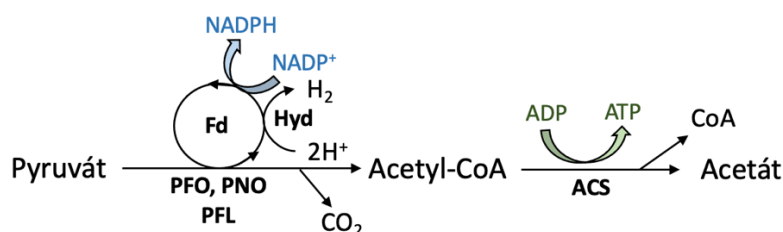
Oproti mitosomu *E. histolytica* byla u *M. balamuthi* na základě analýzy exprimovaných sekvenčních značek prokázána přítomnost několika proteinů TCA cyklu, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFO), hydrogenázy a acetyl-CoA syntetázy (ACS) (Gill et al., 2007); později bylo potvrzeno Nývltovou a kol. (2015), že mitochondrii příbuzná organela *M. balamuthi* odpovídá definici hydrogenosomů, což jsou organely 4. třídy mitochondriální rodiny (Müller et al., 2012). Nebyl identifikován ani gen, ani aktivita odpovídající citrát syntáze metabolizující oxalacetát na citrát. Enzymy TCA cyklu, které byly nalezeny u *M. balamuthi* nejsou po sobě jdoucí a nemohou vytvořit celý TCA cyklus (**obr. 3**). Metabolismus je tedy mnohem složitější než u nejbližší příbuzné parazitické améby *E. histolytica* (Gill et al., 2007) a zdá se, že je soustředěn kolem pyruvátu (Nývltová et al., 2015).



**Obr. 3** – Načrtnuté schéma Krebsova cyklu. Červeně označené enzymy nebyly nalezeny u *M. balamuthi*, zatímco zeleně označené enzymy byly u *M. balamuthi* nalezeny. Dostupné informace o enzimech *M. balamuthi* převzaty z Gill a kol. (2007) a Nývltová a kol. (2015).

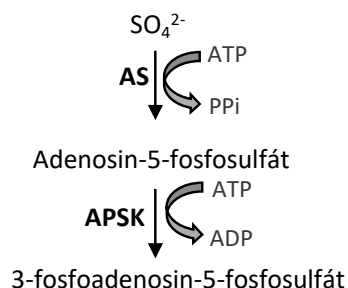
V hydrogenosomech jsou pyruvát a malát typickými substráty pro energetický metabolismus. Jablečný enzym, který přeměňuje malát na pyruvát, není u *M. balamuthi* přítomen; byla však potvrzena přítomnost bakteriální laktát dehydrogenázy, která by mohla poskytovat pyruvát z laktátu (Nývltová et al., 2015). Gill a kol. (2007) u *M. balamuthi* potvrdili existenci dvou ze čtyř enzymů, které tvoří dráhu degradace threoninu. Dráha degradace threoninu poskytuje pyruvát jako konečný produkt. Souhrnně tato data naznačují, že pyruvát slouží jako substrát pro tvorbu ATP v hydrogenosomech *M. balamuthi*.

Aerobní mitochondriální metabolismus pyruvátu napojený na TCA cyklu je u anaerobních protist nahrazen prodlouženou glykolýzou, kde je pyruvát zpracován až po vznik ATP prostřednictvím substrátové fosforylace (Müller et al., 2012). Pyruvát zde nepokračuje do PDH komplexu, ale přeměňuje se na acetyl-CoA a CO<sub>2</sub> pomocí PFO nebo pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktázy (PNO). Elektrony, které vznikají při těchto reakcích, jsou přenášeny na hydrogenázu prostřednictvím ferredoxinu za vzniku molekulárního vodíku nebo přímo na NADP<sup>+</sup> za vzniku NADPH. V dalším kroku je acetyl-CoA přeměněn na acetát, CoA a ATP enzymem ACS (**obr 4**). Alternativně je acetyl-CoA produkován pyruvátformátlyázou (PFL), která katalyzuje neoxidativní přeměnu pyruvátu (Stairs et al., 2011; Nývltová et al., 2015). *M. balamuthi* má duální dráhy pro prodlouženou glykolýzu a syntézu ATP závislou na ACS; tyto dráhy probíhají paralelně v hydrogenosomech a cytosolu, kde jsou specifické enzymatické aktivity PFO, hydrogenázy a ACS podstatně vyšší než aktivity enzymů v hydrogenosomech (Nývltová et al., 2015).



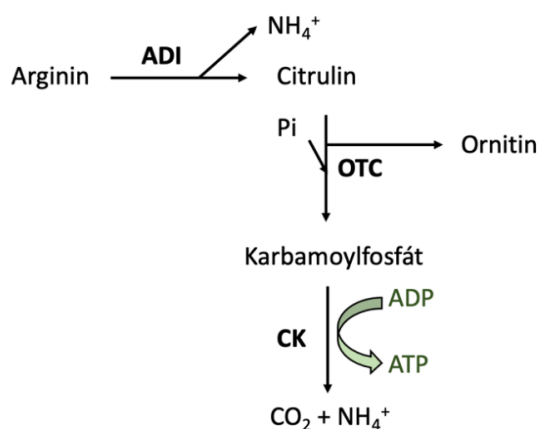
**Obr. 4** – Načrtnuté schéma zpracování pyruvátu prodlouženou glykolýzou u *M. balamuthi*. PFO: pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza, PNO: pyruvát NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza, PFL: pyruvátformátlyáza, ACS: acetyl-CoA syntetáza, Fd: ferredoxin, Hyd: hydrogenáza.

Další dráhy, které se nachází v hydrogenosomu *M. balamuthi*, jsou homolog podjednotek komplexu II (sukcinát dehydrogenáza), dráhy metabolismu pro štěpení glycinu (Gill et al., 2007), dráha aktivace sulfátu (**obr. 5**), která obsahuje dva enzymy sulfurylázu a adenosin-5-fosfosulfát kinázu (Nývltová et al., 2015). Tato dráha je také přítomna v mitosomech u *E. histolytica* (Mi-ichi et al., 2009).



**Obr. 5** – Načrtnuté schéma dráhy aktivace sulfátu. AS: sulfuryláza, APSK: adenosin-5-fosfosulfát kináza, PPi: pyrofosfát.

Arginin dihydrolázová dráha (ADH) známá také jako Arginin deiminázová dráha (**obr. 6**), katalyzuje přeměnu argininu na ornitin, amoniak a oxid uhličitý, přičemž generuje ATP z ADP a fosfátu (Abdelal, 1979). U *M. balamuthi* byly nalezeny enzymy ADH dráhy, které může mastigaméba využívat k produkci ATP z aminokyseliny arginin (Novák et al., 2016).



**Obr. 6** – Náčrt schématu arginin dihydrolázové dráhy (ADH). ADI: arginin deimináza, OTC: ornitinkarbamoyl transferáza, CK: karbamát kináza, Pi: anorganický fosfát.

Enzymy, které se účastní této dráhy, jsou arginin deimináza (ADI), ornitinkarbamoyl transferáza (OTC) a karbamát kináza (CK). V první reakci dochází k deaminaci argininu za vzniku citrulinu a  $\text{NH}_4^+$  pomocí enzymu ADI. V druhé reakci enzymem OTC dojde k přeměně citrulinu a anorganického fosfátu na karbamoylfosfát a ornitin. V poslední části ADH dráhy dochází k hydrolýze karbamoylfosfátu za vzniku  $\text{CO}_2$  a  $\text{NH}_4^+$  pomocí enzymu CK a tvorbě ATP z ADP a fosfátu.

Za specifický enzym ADH dráhy je považována ADI (Novák et al., 2016), jelikož CK má mimo jiné roli i v metabolismu purinů a dusíku a OTC může katalyzovat syntézu citrulinu u rostlin (Schubert, 2003) anebo být i součástí močového cyklu u živočichů, diatom a dinoflagelátů (Allen et al., 2011; Dagenais-Bellefeuille & Morse, 2013).

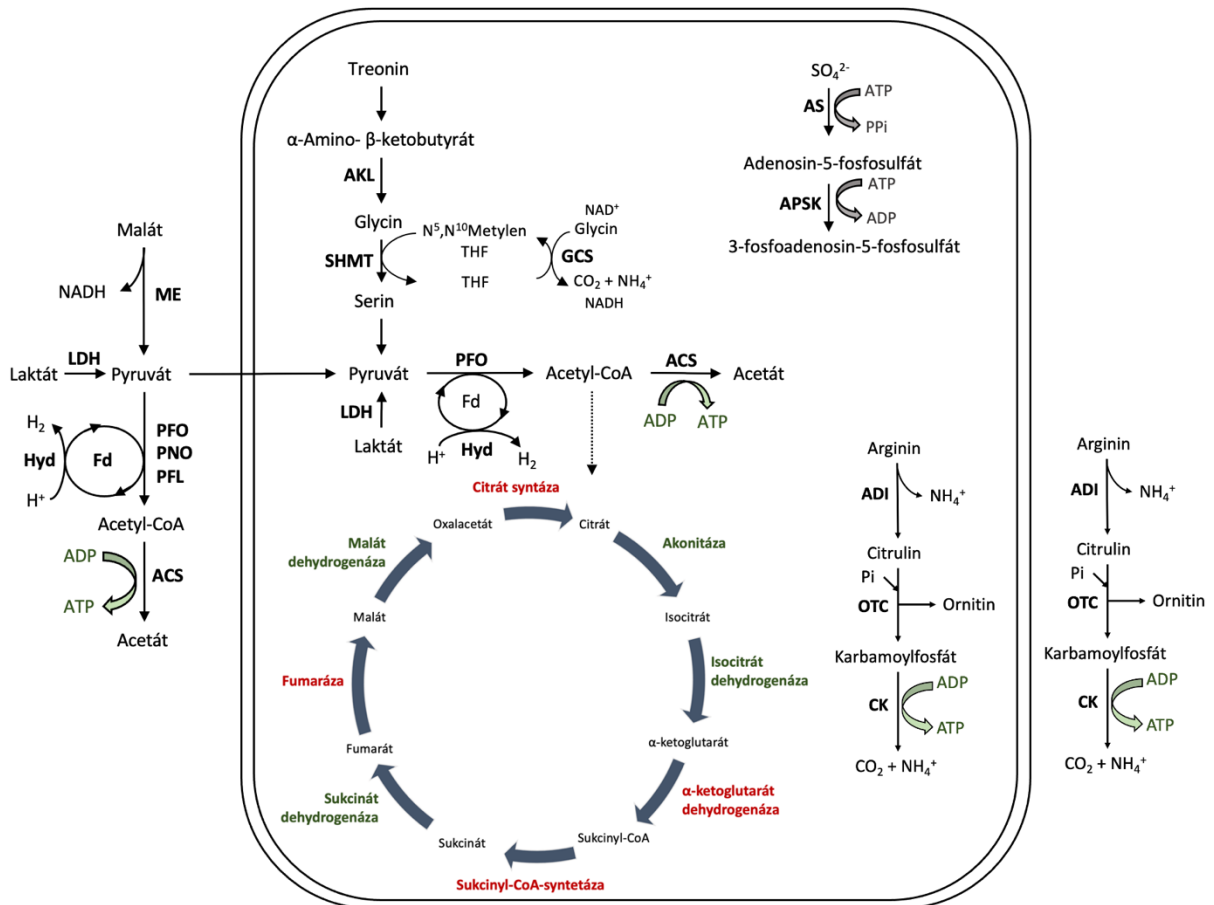
U prokaryotických organismů je ADH dráha nejrozšířenější anaerobní cestou degradace argininu (Abdelal, 1979; Cunin et al., 1986). Tato dráha byla popsána u Archaea (Ruepp & Soppa, 1996) a bakterií, kde je široce rozšířena a je často hlavním zdrojem produkce energie (Cunin et al., 1986). Kromě produkce energie degradací argininu přispívá ADH dráha i k přežití v kyselém prostředí díky produkci  $\text{NH}_4^+$  (Marquis et al., 1987; Casiano-Colon & Marquis, 1988). Původně bylo prokázáno, že pouze dvě blízké příbuzné linie eukaryot mají kompletní ADH dráhu: Parabasalia a Diplomonadida, obě patřící do Metamonada, podskupiny Excavata (Linstead & Cranshaw, 1983; Schofield et al., 1992; Yarlett et al., 1994; Biagini et al., 2003; Andersson et al., 2007). Novák a kol. (2016) však prokázali přítomnost všech tří enzymů u deseti dalších eukaryotických druhů včetně u Amoebozoa *M. balamuthi*.

ADI, OTC a CK jsou většinou u eukaryot lokalizovány v cytosolu. Tato lokalizace byla potvrzena u *Giardia intestinalis* (Schofield et al., 1992), naznačena je i u *Paratrimastix pyriformis* a *Monocercomonoides* sp (Novák et al., 2016). U *Trichomonas vaginalis* a *Tritrichomonas foetus* byla popsána membránová asociace (Yarlett et al., 1994). Později bylo prokázáno, že enzym ADI u *T. vaginalis* je lokalizován v hydrogenosomu, OTC a CK v cytosolu (Morada et al., 2011).

ADH dráhou jsou organismy schopny produkovat energii; u *T. vaginalis* generuje tato dráha až 10 % energie z celkového zisku energie metabolismem sacharidů (Yarlett et al., 1996) a u *G. intestinalis*, která má zcela cytosolickou ADH dráhu, produkuje ADH *in vitro* až 8x více ATP ve srovnání s metabolismem sacharidů (Schofield et al., 1992). Mimo produkci energie může ADH dráha mít i další uplatnění; bylo navrženo, že ADH dráha hraje důležitou roli v patogenezi buněk *G. intestinalis* a *T. vaginalis* (Ringqvist et al., 2008; Stadelmann et al., 2013).

Předpokládá se, že ADH dráha může být nápomocná k adaptaci metabolismu na prostředí s nízkým obsahem kyslíku, neboť dokáže významně produkovat množství ATP za anaerobních podmínek. Příkladem je volně žijící Diplomonadida *Hexamita inflata*, která se vyskytuje v prostředí s různým obsahem rozpuštěného kyslíku (Biagini et al., 2003).

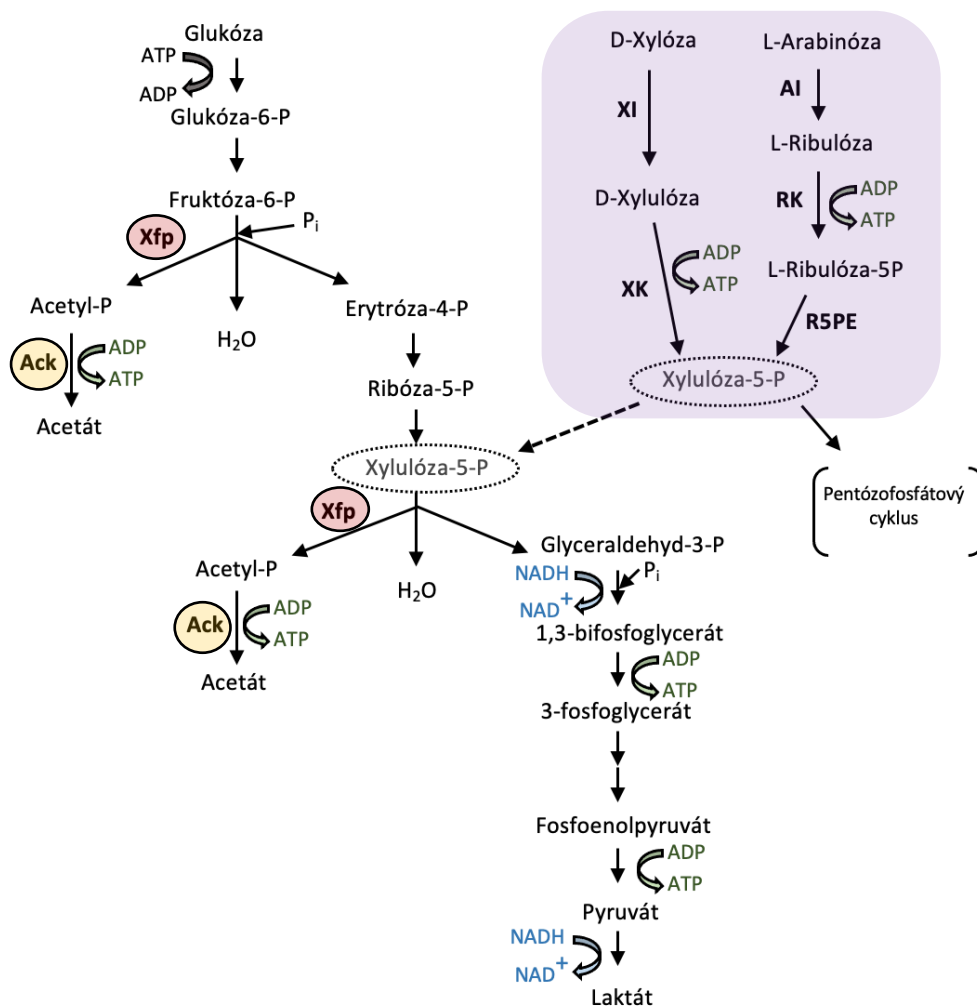
Souhrnné schéma metabolismu buněk *M. balamuthi*, které bylo vytvořeno z dosavadních informací sdělených v této práci je zobrazeno na **obr. 7**. Cílem energetického metabolismu je nadprodukce ATP, která dovoluje investici do růstu buněk a jejich množení, aktivního pohybu a případně encystaci. Zmíněné parametry jsou zkoumány v této práci.



**Obr. 7** – Načrtnuté schéma metabolismu buněk *M. balamuthi* z dosavadních informací, které jsou zmíněny v této práci. ME: jablečný enzym, LDH: laktát dehydrogenáza, PFO: pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza, PNO: pyruvát NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza, PFL: pyruvátformátlyáza, ACS: acetyl-CoA syntetáza, Fd: ferredoxin, Hyd: hydrogenáza, AKL: α-amino-β-ketobutyryát CoA ligáza, SHMT: serin hydroxymetyltransferáza, GCS: systém pro štěpení glycinu, AS: sulfuryláza, APSK: adenosin-5-fosfosulfát kináza, ADI: arginin deimináza, OTC: ornitinkarbamoyl transferáza, CK: karbamát kináza.

*M. balamuthi* získala geny kódující enzymy pro degradaci rostlinných buněčných stěn, včetně enzymů pro degradaci celulózy, pektinů a hemicelulóz na bázi pentóz (xylany a arabinany) (Žárský et al., 2021). Mezi celulolytické enzymy patří endoglukanáza, exoglukanáza a celobiáza, které přeměňují celulózu na glukózu. Další enzymy jako je xylan β-(1,4)-xylosidáza, α-amyláza a celulóza byly pravděpodobně také získány pomocí laterálního přenosu genů (Žárský et al., 2021). Přítomnost xylózové a arabinózové izomerázy naznačuje, že *M. balamuthi* je schopna katabolizovat pentózy prostřednictvím specifických izomerizačních drah typických pro bakterie (Fang et al., 2018). Izomerační dráhy jsou zobrazeny na **obr. 8**. na fialovém pozadí. Zajímavým enzymem degradace xylózy je bifunkční fosfoketoláza xylulóza-5-fosfát/fruktóza-6-fosfát (Xfp) viz **obr. 8**, která přeměňuje D-xylulóza-5-fosfát na D-glyceraldehyd a acetylfosfát (acetyl-P) a propojuje tak metabolismus xylózy s glykolýzou. Alternativně metabolizuje fruktózu-6-fosfát na D-erytrózu-4-fosfát a acetyl-P. Acetyl-P je pak substrátem pro acetátkinázu (Ack), která produkuje acetát a ATP.

Na základě analýzy genomu (Žárský et al., 2021) se předpokládá, že tato tzv. pentózová fosfoketolázová dráha, dříve popsána pouze u některých bakterií a hub (Glenn et al., 2014), funguje i u *M. balamuthi*. Tím se z *M. balamuthi* stává améba, která je přizpůsobena životu v anaerobióze a v prostředí bohatém na metabolizovatelné rostlinné polymery.



**Obr. 8.** – Načrtnuté schéma dráhy degradace glukózy a pentóz xylózy a arabinózy u *M. balamuthi*. V červeném kruhu je zobrazena bifunkční fosfoketoláza (Xfp) a ve žlutém kruhu acetátkináza (Ack). Jedna aktivita Xfp (EC 4.1.2.22) štěpí šestiuhlíkatý fosfosacharid (fruktóza-6-fosfát) na čtyřuhlíkový fosfát (erytróza-4-fosfát) a dvouuhlíkový fosfát (acetyl-P). Druhá aktivita Xfp (EC 4.1.2.29) štěpí pětiuhlíkatý fosfosacharid (xylulóza-5-fosfát) na tříuhlíkatý fosfát (glyceraldehyd-3-P) a dvouuhlíkatý fosfát (acetyl-P). Izomerační dráhy pro zpracování xylózy a arabinózy jsou zobrazeny na fialovém pozadí. XI: xylózová izomeráza, XK: xylulokináza, AI: arabinózová izomeráza, RK: ribulokináza, R5P4: ribulózováfosfát-5-epimeráza. Dráhy upraveny dle Wolfe (2015) a Bettiga a kol. (2008).

## 2.3 Pentózy

Pentózy jsou monosacharidy s pěti atomy uhlíku. Nejvíce rozšířenými pentózami v přírodě jsou D-xylóza, L-arabinóza a D-ribóza, která tvoří strukturní páteř genetického materiálu (ribonukleotidy). D-xylóza a L-arabinóza jsou důležité komponenty mnoha biopolymerů, jako je hemicelulóza, která je spolu s celulózou hlavní složkou buněčné stěny rostlin. Celulóza je nejvíce rozšířený rostlinný polysacharid tvořený z opakujících se podjednotek D-glukózy spojených  $\beta$ -1,4-vazbou, které utváří dlouhé lineární řetězce (Kolpak & Blackwell, 1976).

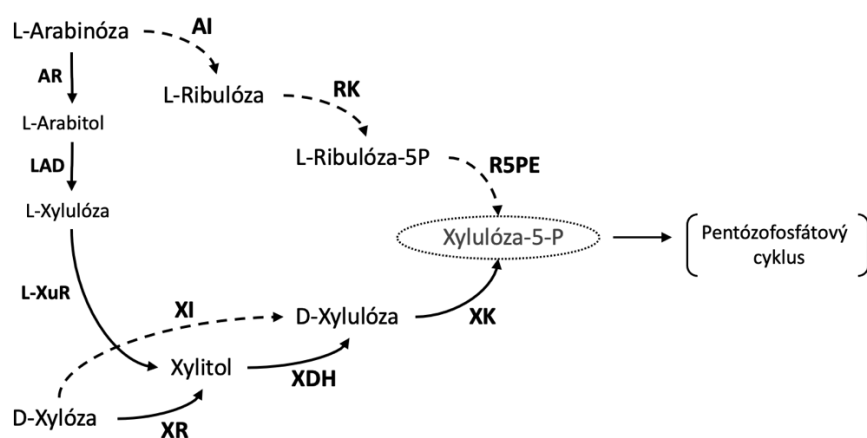
Hemicelulózy jsou heterogenní polysacharidy, které se vyznačují  $\beta$ -(1,4) vázanými páteřemi s ekvatoriální konfigurací (Scheller & Ulvskov, 2010). Po celulóze jsou druhými nejrozšířenějšími polysacharidy, které tvoří přibližně 30 % rostlinné sušiny (Pauly & Keegstra, 2008). Hemicelulózy se vyznačují vysokou strukturní a chemickou rozmanitostí. Jejich páteře jsou obvykle rozvětvené nebo substituované krátkými oligosacharidy, monosacharidy a organickými kyselinami. Stavebními kameny hemicelulózy jsou pentózy (xylóza, arabinóza), hexózy (glukóza, galaktóza, manóza), cukerné kyseliny (kyselina glukuronová), kyselina octová a fenolové kyseliny (kyselina ferulová, kyselina p-kumarová) (Saha, 2003; Álvarez et al., 2016). Podle převažujícího monosacharidu v hlavním polymerním řetězci se hemicelulózy dělí na čtyři typy polysacharidů: xylany, manany,  $\beta$ -(1,3;1,4)-glukany a xyloglukany. Další polysacharidy, jako jsou galaktany, arabinany a arabinogalaktany, jsou spíše součástí pektinu a nesdílejí ekvatoriální  $\beta$ -(1,4) vaznou páteřní strukturu (Scheller & Ulvskov, 2010). Mezi hemicelulózami jsou nejhojněji zastoupenými polysacharidy xylany; ty jsou hlavními hemicelulózami v tvrdém dřevě a travách (Westbye et al., 2006; Pauly & Keegstra, 2008). Xylan má hlavní řetězec z D-xylózových jednotek spojených  $\beta$ -(1,4) glykosidickými vazbami. Xylany se mohou dělit na homoxylany, které jsou složeny pouze z xylózy, glukuronoxylany obsahující kyselinu glukuronovou, arabinoxylany s arabinózou a glukoronoarabinoxylany obsahující jak kyselinu glukuronovou, tak arabinózu. Arabinoxylany jsou hlavní hemicelulózou ve stěnách trav (Pauly & Keegstra, 2008). Přesné složení hemicelulózy se odvíjí od druhu rostliny a tkáně (Scheller & Ulvskov, 2010). Například xylany z tvrdého dřeva mají na své páteři často navázanou kyselinu D-glukuronovou, zatímco L-arabinóza je nejčastějším větvícím zbytkem v xylanech obilovin (de Vries & Visser, 2001).

Zastoupení hemicelulózy je vyšší v listnatých stromech než v jehličnatých (Stokland et al., 2012). U jehličnatých stromů je hlavním typem hemicelulózy glukomanan, složený z podjednotek D-glukózy a D-manózy. V případě listnatých stromů je hlavním typem hemicelulózy xylan (Stokland et al., 2012).

Pektin je další složkou buněčné stěny rostlin. Zajišťuje spojení mezi celulózou a hemicelulózou (Caffall & Mohnen, 2009) a mimo jiné je tvořen postranními řetězci, které obsahují převážně arabinózu, galaktózu a xylózu (Alkorta et al., 1998; Ridley et al., 2001).

Vysoká variabilita ve složení hemicelulózy je příčinou existence řady enzymů potřebných k její degradaci. Většina organismů není schopna metabolizovat a získávat energii z xylózy a arabinózy; některé organismy jsou však schopny konvertovat tyto pentózy na metabolity pentózofosfátové nebo fosfoketolázové dráhy, případně je štěpit specifickou dráhou.

Degradace pentóz byla dobře prozkoumána u bakterií, hub a kvasinek (Bettiga et al., 2008; Hou et al., 2017; Ye et al., 2019; Sutter et al., 2020; Ruchala & Sibirny, 2021). U kvasinek a hub jsou pentózy běžně přeměňovány na D-xylulóza-5-fosfát pomocí reduktáz a dehydrogenáz (Bettiga et al., 2008), viz **obr. 9** plné značení. Podrobněji se jedná o enzymy arabinózová reduktáza, arabitol dehydrogenáza, L-xylulózová reduktáza, xylitol dehydrogenáza a xylulokináza. Dráhy končí na klíčovém produktu xylulóza-5-fosfát, který vstupuje do pentózofosfátové dráhy. U většiny bakterií se D-xylóza a L-arabinóza neoxidativně rozkládají na xylulóza-5-fosfát, na čemž se podílejí specifické kinázy, izomerázy a epimerázy (**obr. 9** – přerušované značení) (Sutter et al., 2020). Tyto izomerační dráhy pravděpodobně využívá i *M. balamuthi* (Žárský et al., 2021). Podrobněji se na degradaci D-xylózy izomerační dráhou podílí v prvním kroku xylózová izomeráza, která převede xylózu na xylulózu. Xylulóza je pak fosforylována xylulokinázou na xylulózu-5-fosfát. U izomerační dráhy arabinózy se v prvním kroku převede enzymem arabinózová izomeráza L-arabinóza na L-ribulózu, která je pak fosforylována na L-ribulózu-5-fosfát enzymem L-ribulokináza. L-ribulóza-5-fosfát se enzymem L-ribulózo-5-fosfát-4-epimeráza přemění také na D-xylulózu-5-fosfát, což je meziprodukt, přes nějž dojde ke vstupu do pentózofosfátové dráhy.

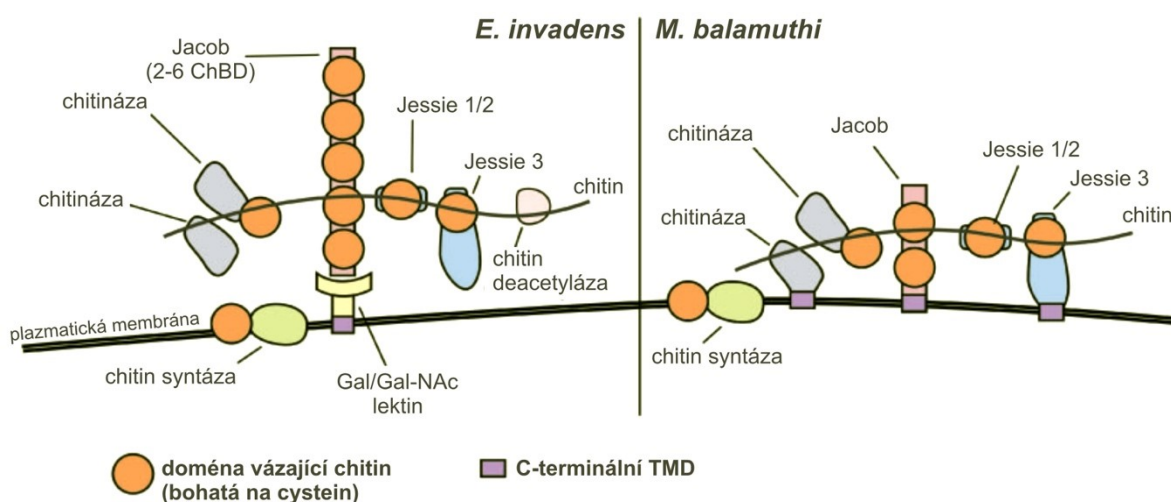


**Obr. 9.** – Dráhy zpracování xylózy a arabinózy. Plné značení: dráhy založené na oxidaci/redukci; přerušované značení: dráhy založené na izomerizaci (neoxidativní dráhy degradace). AR: arabinózová reduktáza; LAD: arabitol dehydrogenáza; L-XuR: L-xylulózová reduktáza; AI: arabinózová izomeráza; RK: ribulokináza; R5PE: ribulózová fosfát-5-epimeráza; XI: xylózová izomeráza; XR: xylózová reduktáza; XDH: xylitol dehydrogenáza; XK: xylulokináza. Upraveno dle Bettiga a kol. (2008).

## 2.4 Encystace

Vytvoření odolné cysty je nedílnou a významnou součástí životního cyklu mnoha organismů. Cysta bývá často označována jako klidové stádium, díky kterému je organismus schopný přežít nepříznivé životní podmínky, které mohou být způsobeny zásadními změnami v prostředí, např. nedostatkem živin, změnou okolní teploty či pH, nízkým nebo vysokým množstvím O<sub>2</sub>, příliš vysokou koncentrací odpadních produktů anebo velkým množstvím jedinců stejného druhu. Všechny tyto zmíněné změny prostředí mohou být podnětem pro tvorbu cyst procesem zvaným encystace; opačný proces je excystace, kdy se z klidového stádia cysty stává opět aktivní stádium schopné reprodukce (Hausmann, 2003).

U příbuzného rodu *Entamoebae* je nejvíce zkoumaným aspektem a měřitelnou složkou procesu encystace produkce chitinu (Campos-Góngora et al., 2004; Chatterjee et al., 2009). Chitin je polysacharidová složka buněčné stěny, která zajišťuje ochranu před nepříznivými podmínkami okolního prostředí. U parazitických prvoků je cysta po opuštění hostitele vystavena např. kyslíku, nedostatku živin a dalším chemickým, fyziologickým a mechanickým stresorům. U entameb se kromě chitinu skládá stěna cysty ze sady lektinů, včetně chitinázy a Jacobových a Jessieho lektinů s chitinovými vazebnými doménami bohatými na cystein (CBD) (van Dellen et al., 2002). U *M. balamuthi* byla nalezena kompletní dráha syntézy a degradace chitinu a Jessieho i Jacobovy lektiny viz **obr. 10**, o kterých se dříve předpokládalo, že jsou jedinečné pro *E. histolytica* (Žárský et al., 2021).



**Obr. 10** – Porovnání komponent stěny cyst u *Entamoeba invadens* a *M. balamuthi* a jejich předpokládaná struktura. Model pro *E. invadens* vychází ze studie Chatterjee a kol (2009) a model pro *M. balamuthi* vychází ze studie Žárský a kol. (2021). Obrázek byl převzat ze studie Žárský a kol. (2021).

Přestože *E. histolytica* a *M. balamuthi* mají podobnou sadu lektinů, může se struktura stěny cysty v detailech lišit. Předpokládá se, že v počáteční fázi encystace je Jacob vázán na povrch encystující entamoeba pomocí membránově ukotveného Gal/GalNAc lektinu, poté je syntetizován chitin, a nakonec je stěna zpevněna přidáním Jessie lektinů (Chatterjee et al., 2009). U *M. balamuthi* však Gal/GalNAc lektin chybí (**obr. 10**). Pozoruhodné je, že na rozdíl od proteinů Entamoeba Jessie a Jacob lektiny mají *M. balamuthi* Jessie-C a *M. balamuthi* Jacob-C-terminální transmembránovou doménu, které mohou fungovat jako přímé kotvy k plazmatické membráně místo Gal/GalNAc lektinu (Žárský et al., 2021).

Wesel a kol. (2021) vyvinuli první opakovatelnou metodu encystace *E. histolytica* v laboratorních podmínkách; cysty nesou čtyři znaky opravdové cysty, což jsou chitinová buněčná stěna, kulatý tvar a velikost menší než velikost trofozoitů, vícejadernost (většinou 4 nebo více jader) a odolnost vůči detergentům. Analýza encystujících populací *E. histolytica* pomocí průtokové cytometrie odhalila, že rozhodujícími faktory pro encystaci jsou vysoká hustota buněk a omezení glukózy jako zdroje energie (Wesel et al., 2021).

Chitin je tvořen  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 vazbou spojenými polysacharidy, na které se mohou vázat sloučeniny známé jako fluorescenční nebo optické zjasňovače či "bělicí" činidla. Jednou takovou známou sloučeninou je kalkofluor. Při barvení se kalkofluor váže na  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykosidické vazby a po excitaci ultrafialovým nebo fialovým zářením fluoreskuje intenzivní modrobílou barvou (Harrington & Hageage, 2003). Kromě chitinu se může vázat na polysacharidy v celulóze v buněčných stěnách hub, rostlin a řas. Použití kalkofluoru v klinické mykologii poprvé popsali Hageage a Harrington (Hageage & Harrington, 1984) a našlo široké uplatnění v této oblasti a v parazitologii pro rychlou detekci mikroorganismů (Harrington & Hageage, 2003).

### 3 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo ověřit získané informace z genomu *Mastigamoeba balamuthi*, tj. její schopnost metabolizovat pentózy (xylózu a arabinózu) a zapojovat je do svého energetického metabolismu. Hypotéza byla ověřena prostřednictvím kultivace buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie.

Praktické cíle:

- Ověření metabolismu pentóz u *M. balamuthi* sérií pokusů zahrnujících růstové křivky na různých zdrojích energie.
- Růstová křivka s disulfiramem jakožto inhibitorem karbamát kinázy v arginin dihydrolázové dráze pro ověření argininu jako zdroje energie.
- Adaptace *M. balamuthi* na definované médium.
- Posouzení vlivu energetických zdrojů na buněčnou morfologii, motilitu a počet jader.
- Určení schopnosti encystace *M. balamuthi* na různých zdrojích energie a vizualizace fixovaného materiálu za použití fluorescenčního barviva kalkofluor.
- Porovnání koncových metabolických produktů *M. balamuthi* na různých zdrojích energie.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Použité roztoky

#### PBS

NaCl	8 g/l	137 mM
KCl	0,2 g/l	2,68 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O	1,53 g/l	4,27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l	1,47 mM

pH = 7,4

Všechny složky byly naváženy a rozpuštěny v destilované vodě. Objem destilované vody byl doplněn do 1000 ml. Připravený roztok PBS byl sterilizován pomocí autoklávu. Výše uvedené komponenty PBS byly zakoupeny od firmy Merck.

### 4.2 Použité chemikálie

**Arginin** (L-Arginine, Merck)

**Disulfiram** (Tetraethylthiuram disulfide, Merck) rozpuštěn v DMSO

**Formaldehyd** (Paraformaldehyde 32% solution, Electron Microscopy Sciences)

**Kalkofluor** (Calcofluor White Stain, Merck)

**Montovací médium** (VectaShield s DAPI, Vector Laboratories)

**Sarkosyl** (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck) rozpuštěn ve vodě

### 4.3 Kultivační média

#### 4.3.1 PYGC médium

##### Složení:

Proteose peptone	10 g/l	
Yeast extract	10 g/l	
L-cystein hydrochlorid monohydrát	0,95 g/l	5,40 mM
NaCl	5,03 g/l	86 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,89 g/l	5,11 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,67 g/l	4,92 mM

#### Postup přípravy:

Složky PYGC média byly naváženy a rozpuštěny v destilované vodě. Objem destilované vody byl doplněn do 1000 ml. Následovalo rozdělení média do 500 ml lahví z borosilikátového skla se šroubovacím uzávěrem a sterilizace pomocí autoklávu. Všechny komponenty PYGC média byly zakoupeny od firmy Merck.

#### Zdroje uhlíku:

Glukóza	10,09 g/l
Arabinóza	8,40 g/l
Xylóza	8,40 g/l

Výsledná molarita zdrojů uhlíku byla 56 mM. Složky byly zakoupeny od firmy Merck.

Po zchladnutí PYGC média z autoklávu na pokojovou teplotu bylo smícháno 450 ml sterilního PYGC média a 50 ml sterilního 10× koncentrovaného roztoku cukru (glukóza, arabinóza, xylóza); bez přídavku cukru rostly buňky na aminokyselinách, primárně argininu. Cukry byly sterilizovány pomocí filtrace (Syringe filters ROTILABO® PVDF, 0,22 µm, Roth). Na závěr bylo do média přidáno sterilní antibiotikum Penicilin (Penicillin G sodium salt, Merck) ve finální koncentraci 1000 U/ml a Amikacin (Medopharm s.r.o.) ve finální koncentraci 0,25 mg/ml. Médium bylo skladováno při teplotě -20 °C.

### **4.3.2 Definované médium**

#### Složení:

Glukóza	10,09 g/l	56 mM
L-cystein hydrochlorid monohydrát	0,95 g/l	5,40 mM
NaCl	5,03 g/l	86 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,89 g/l	5,11 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,67 g/l	4,92 mM
Glutation	1,00 g/l	3,25 mM
CaCl <sub>2</sub>	20 mg/l	0,18 mM
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	80 mg/l	0,32 mM
Citrát železito amonný	10 mg/l	

Výše zmíněné komponenty definovaného média byly zakoupeny od firmy Merck.

Diamond Vitamin Tween 80 Solution 40× (BioConcept)	25 ml/l
MEM Amino Acids Solution 50× (Gibco)	20 ml/l
MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100× (Gibco)	20 ml/l
Chemically Defined Lipid Concentrate (Gibco)	20 ml/l

pH = 6

#### Postup přípravy:

Všechny složky byly naváženy a rozpuštěny v destilované vodě. Objem destilované vody byl doplněn do 1000 ml a pH bylo upraveno pomocí koncentrovaného roztoku hydroxidu draselného (KOH). Na závěr bylo médium sterilizováno prostřednictvím filtrace (Vacuum Filtration, TPP) a skladováno při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4.4 Použité organismy

### *Mastigamoeba balamuthi*

Axenická kultura *Mastigamoeba balamuthi*, kmen ATCC 30984 (poskytl M. Müller, The Rockefeller University, USA), byla pěstována v PYGC médiu při  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  v plastových kultivačních lahvích o povrchu  $25\text{ cm}^2$  (Cell Culture Flask,  $25\text{ cm}^2$ , SPL Life Sciences) ve vertikální poloze s povoleným uzávěrem pro výměnu plynů. Buňky *M. balamuthi* byly přeočkovávány jednou až dvakrát během týdne vždy po dosažení 80–100% konfluency do nových kultivačních lahví s čerstvým médiem. Pro přenesení inokula do čerstvého média bylo potřeba mechanicky uvolnit améby přisedlé k povrchu kultivační lahve pomocí sterilní plastové pasturovy pipety a přenést 1–2 ml suspenze do nové kultivační lahve s čerstvým médiem. Prvních 15–30 min byly kultivační lahve s buňkami ponechány v horizontální poloze pro přichycení améb ke stěně lahve. Při manipulaci s amébami byly používány wide bore špičky (Optifit Tips, Wide bore, Sartorius) nebo plastové pipety.

## 4.5 Adaptace buněk *M. balamuthi* na definované médium

Pro manipulaci se složkami média bylo vyvinuto nové definované médium (DFM). Přejít z PYGC média na DFM byl uskutečněn postupným ředěním PYGC média. Postupná adaptace začínala s PYGC médiem naředěným v poměru 3:1 (PYGC: DFM). Po dosažení 80–100% konfluency buněk došlo k dalšímu kroku ředění, opět v poměru 3:1 (PYGC mix: DFM). Pokud nebylo dosaženo konfluency, médium bylo vyměněno za čerstvé.

## 4.6 Příprava buněk *M. balamuthi* na experimenty

### Nasazení buněk

Pro nasazení buněk na pokusy byly potřeba tři dny staré narostlé kultury buněk od každého zdroje energie. Kultivační lahve se propláchly od sedimentu čerstvým médiem. Poté bylo přidáno přibližně 10 ml čerstvého média a pomocí sterilní plastové pasturovy pipety byly améby uvolněny ze stěny kultivační lahve.

### Počítání buněk

500  $\mu$ l buněk bylo naředěno do 10 ml izotonického pufru (Beckman Coulter, USA) a spočítáno pomocí přístroje Z2 Coulter (Beckman Coulter Z2, USA) při nastavení rozsahu velikosti buněk 7–27  $\mu$ m s ředícím faktorem 20 $\times$ .

## 4.7 Růstová analýza *M. balamuthi*

Měření růstové analýzy probíhalo v biologických triplikátech a pro počítání buněk byly předem připraveny tři zkumavky na každý den. První den bylo nasazeno inokulum 100 000 buněk do 15 ml zkumavek (Centrifuge Tube, VWR) a doplněno PYGC médiem s příslušným zdrojem energie. Růstová analýza byla sledována po dobu 168 h a koncentrace buněk byla zjišťována po 24 h. Zahrnuty byly jak buňky uvolněné do média, tak buňky přisedlé. Zkumavky, ze kterých byl slit obsah pro počítání buněk volně v médiu, byly znovu naplněny PYGC médiem a pro kvantitativní uvolnění přisedlých buněk byla použita sonikační vodní lázeň (Elmasonic, P-LAB a.s.) po dobu 10 s. Poté byly vzorky s uvolněnými amébami stočeny na 1000 g po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Pelet byl rozsuspendován v 1 ml PYGC média a spočítán za využití přístroje Z2 Coulter (**kapitola 4.6**). Před každým měřením koncentrace buněk byly vzorky promíchány a uchovány na ledu, aby se zabránilo opětovné adhezenci améb na stěnu zkumavky.

Pro růstovou analýzu s inhibitorem byly otestovány koncentrace disulfiramu 1 mM, 750  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 1  $\mu$ M v PYGC médiu s glukózou a bez přidaného sacharidu. První den bylo nasazeno inokulum 100 000 buněk do 15 ml zkumavek a třetí den byly spočítány koncentrace buněk pomocí Z2 Coulter (**kapitola 4.6**). Pro sedmidenní růstové křivky s inhibitorem byla použita koncentrace disulfiramu 250  $\mu$ M.

## 4.8 Inkubace buněk *M. balamuthi* na mikroskopii

Pro mikroskopická pozorování byly buňky kultivovány na petriho miskách 24 h v termostatu při 27 °C za anaerobních podmínek v uzavřeném kompaktním plastovém pouzdru (ThermoFisher Scientific) za využití systému AnaeroGen™ Compact (ThermoFisher Scientific) kontrolovaného pomocí indikátoru anaerobního prostředí (ThermoFisher Scientific).

## 4.9 Mikroskopie živých buněk

Pro snímání živých buněk, jejich velikosti, tvaru a pohybu byly použity plastové petriho misky o průměru 35 mm se skleněným dnem 20 mm (Glass Bottom Dish, Cellvis). Inokulum bylo zvoleno tak, aby po 24 h bylo možné snímat jednotlivé buňky, tj. 5 000–10 000 buněk. Buňky byly převrstveny PYGC médiem s určeným zdrojem energie a inkubovány 24 h (**kapitola 4.8**). Samotné snímání buněk probíhalo na invertovaném mikroskopu Leica SP8 v průchozím světle s objektivem 10×. Při sledování buněk byly petriho misky se skleněným dnem umístěné v inkubační komůrce (OKOlabs incubation system) za podmínek 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> při 27 °C. Pro velikost a tvar bylo snímáno minimálně 200 buněk a pro motilitu 20 buněk na různých zdrojích energie v reálném čase.

Vzorky pro snímání pohybu byly pozorovány po dobu 20 min. Měření probíhalo na více místech za využití funkce Stage Diaey, v různých rovinách pomocí z-stack a snímání každých 30 s pomocí časové řady v programu LasX (Leica Microsystems).

## 4.10 Fluorescenční mikroskopie

Pro přípravu trvalých preparátů byla sterilní krycí sklíčka vložena pinzetou do petriho misek o průměru 60 mm (Nunc™ EasYDish™ Dishes, Thermo Scientific). Na krycí sklíčka bylo nanášeno 50 000 buněk, převrstveno PYGC médiem s příslušným zdrojem energie a inkubováno 24 h (**kapitola 4.8**). Petriho misky byly propláchnuty 2 ml sterilního PBS. Poté bylo přidáno 2 ml 3% formaldehydu na 30 min. V dalším kroku bylo na krycí sklíčko kápnuto montovací médium VectaShield s DAPI (Vector Laboratories) a přiklopeno na podložní sklíčko. Krycí sklíčka byla zafixována lakem na nehty a skladována ve tmě.

Připravené preparáty byly snímány průchozím světlem a fluorescenční mikroskopií na mikroskopu Leica SP8 v laboratoři Imaging Methods Core Facility v Biocevu. Nastavený objektiv byl 20× a filtr s DAPI. Bylo nasnímáno minimálně 170 buněk a snímky byly pořizovány v různých rovinách pomocí funkce z-stack v programu LasX.

## 4.11 Analýza obrazu (spolupráce s Mgr. Backovou)

Získané snímky byly zpracovány v programech LasX a FIJI (Schindelin et al., 2012). Při globálním nastavení ve FIJI: Image/properties – micron 0,32. Pro analýzu buněk bylo nutné, aby se buňky vzájemně nedotýkaly. Pokud tomu tak nebylo, rozdělily se pomocí příkazu Draw (free hand liner/Edit).

### 4.11.1 Velikost a tvar

#### Příprava černobílé masky

Pro analýzu velikostí buněk v programu FIJI byl využit plugin MorphoLibJ (Legland et al., 2016). Prvním krokem bylo vytvořit černobílý snímek příkazem Morphological segmentation (Plugins/MorpholibJ/Segmentation) s následujícími parametry:

object image

gradient type: Morphological

gradient radius: 1

Tolerance (10–100); podle velikosti buněk bylo nutno vyzkoušet různé rozsahy, aby nedocházelo k zahrnutí či vynechání malých či velkých objektů

Display: Waterslide lines

vytvoření černobílé masky

Následně bylo potřeba ve vytvořeném černobílém snímku vybarvit vzniklé obrazce (obrysy buněk) černou barvou za pomoci příkazu Fill Holes (Process/Binary/Options/Do). Poté byly nastaveny analyzované parametry (Area, Shape) příkazem Set Measurements (Analyze).

#### Výběr objektů pro analýzu

Pro označení buněk a vyloučení jiných objektů ze snímku bylo příkazem Analyze Particles (Analyze); a následnou manipulací s parametry size pixels a circularity upravena velikost a cirkularita tak, aby artefakty nebyly zahrnuty do měření. Samotné měření a sumarizace výsledků tvarů daných objektů byla prováděna označením Display results, po kterém následuje Clear results, Summarize, Add to manager a Exclude on edges.

### 4.11.2 Motilita

Ze vzniklých videí pohybu buněk byla vybrána z-rovina s optimální ostrostí ohraničení jednotlivých buněk a kontrastem vůči pozadí v programu FIJI příkazem Duplicate (Image). Následovala změna barvy pozadí na bílé a buňky byly ponechány v tmavé barvě pomocí příkazu Substrakt background (Process), vybrat Light background s nastavením rozsahu kontrastu světlého pozadí a tmavých objektu v rozmezí 10–20. V dalším kroku byla vytvořena černobílá maska pomocí pluginu MorphoLibJ podle postupu, který je uveden v **podkapitole 4.11.1 Příprava černobílé masky**. Pro přesnější snímání buněk při měření pohybu, byl tvar améb mírně zakulacen pomocí příkazu Close (Process/Binary/Options/Iterations: +-5/Count: +-2/Do). Následně byly na vytvořené masce označeny objekty k měření rychlosti příkazem Analyze particles, a to stejným způsobem jako v **podkapitole 4.11.1 Výběr objektů pro analýzu**. Vzniklý snímek byl uložen ve formátu s příponou tiff. Takto připravený soubor byl zpracován pluginem TrackMate (Ershov et al., 2021; Tinevez et al., 2017), příkazem TrackMate (Plugins/Tracking) s následujícími parametry:

Do you want to swap Z to Y? Yes

Select detector: Mask detector

Detections

Select a Tracker: Overlap tracker

Náhled na výsledné trajektorie pohybu jednotlivých buněk byl uskutečněn přes Tracks (Display options).

### 4.11.3 Počet jader

Pro snímání jader byly snímky pořizovány z více rovin. Z trvalých preparátů vznikaly vždy dva snímky z jednoho místa, jeden při průchozím světle a druhý DAPI. Tyto dva snímky byly spojeny pro měření počtu jader na danou buňku.

#### Průchozí světlo

Z pořízeného snímku byla nejdříve vybrána z-rovina, ve které měly buňky zaostřené ohraničení a kontrastní obrysy vůči pozadí, v programu FIJI příkazem Duplicate (Image). V dalším kroku byla vytvořena černobílá maska, stejným způsobem jako je uvedeno v **podkapitole 4.11.1**.

#### DAPI

Pro zajištění viditelnosti jader z několika rovin se spojily nasnímané roviny do jedné pomocí příkazu Zproject (Image/Stacks), max intensity. V případě slabé viditelnosti jader byl upraven jas/kontrast a zvýrazněno tmavé pozadí příkazem Substrakt background (Process) v rozmezí 10–30. V dalším

kroku byla označena jednotlivá jádra pomocí pluginu Startdist (Schmidt et al., 2018) příkazem StarDist2-Model versable (Plugins/StarDist).

Finálním krokem bylo sloučení snímku černobílé masky s obrysem buněk a snímku, kde jsou zvýrazněná pouze jádra (DAPI) na černém pozadí. Makro (**příloha 1**) vytvořené Mgr. Backovou pro FIJI automaticky přiřadilo a spočetlo jádra v jednotlivých buňkách.

## 4.12 Analýza získaných dat

Statistická analýza velikosti buněk, tvaru buněk, motility a počtu jader byla provedena pomocí programu Excel (Microsoft) a GraphPad Prism verze 8.0.1 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA).

## 4.13 Encystace

V pilotním experimentu byly nasazeny inokula s určitým množstvím buněk (100 000, 500 000 a 1000 000) do 15 ml zkumavek a doplněny PYGC médiem s příslušným zdrojem energie. Třetí a pátý den proběhla kontrola vzniklého sedimentu na přítomnost cyst.

V dalším kroku byl testován případný vliv metabolitů na úspěšnost encystace. První den bylo přeneseno inokulum 1 000 000 buněk do 15 ml zkumavek a doplněno kondiciovaným PYGC médiem s příslušným zdrojem energie. Kondiciovaná média byla přefiltrována (Syringe filters ROTILABO® PVDF, 0,22 µm, Roth) a takto připravené vzorky byly ponechány v termostatu při 27 °C po dobu 7 dní.

Sedmý den byl odebrán sediment (1,5 ml). Ten byl přenesen do mikrozkušavky a stočen na 10 000 g po dobu 10 min při 4 °C. Pelet byl promyt 1 ml milliQ H<sub>2</sub>O a stočen za stejných podmínek. Poté byl pelet rozsuspendován a ponechán 15 min v 1 ml 0,1% sarkosylu (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck). Následně byly vzorky znovu stočeny a pelet byl promyt vodou (1 ml). Takto připravené vzorky byly počítány v Bürkerově komůrce.

### 4.13.1 Barvení cyst kalkofluorem

Po spočítání cyst v Bürkerově komůrce, byla z jednotlivých vzorků odebrána kapka na podložní sklíčko, k tomu byla přidána kapka kalkofluoru (Calcofluor White Stain, Merck), přiklopeno krycí sklíčko, 1 min inkubováno a následně pozorováno pod mikroskopem.

V dalším pokusu byl odebrán sediment s cystami ze 21 dní starých kultur buněk a přenesen do mikrozku mávek. Bylo smícháno 150  $\mu$ l cyst s 64  $\mu$ l kalkofluoru a inkubováno 1 min. Z takto připraveného vzorku byla kápnuta kapka na podložní sklíčko, přikryta krycím sklíčkem a preparát byl ihned pozorován.

Další barvení kalkofluorem bylo zaměřeno na fixované buňky. Dle protokolu výrobce byly barveny tři kultury buněk. První kultura buněk byla fixována 3% formaldehydem po dobu 30 min. Poté byl vyměněn formaldehyd za PBS s 50% kalkofluorem. Druhá kultura buněk byla fixována 3% formaldehydem s přidávkem 50% kalkofluoru. Třetí kultura buněk byla ponechána bez fixace, pouze s přidáním PYGC média s 50% kalkofluorem. Kultivační lahve byly během barvení v horizontální poloze tak, aby vrstva buněk na stěně kultivační lahve byla souvisle pokryta přídanou směsí, čímž bylo zamezeno vysychání.

Do nově přeočkovaných kultur buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou a v médiu s arabinózou byl přidán kalkofluor ve finální koncentraci 0,001% dle Harrington & Hageage (2003). Třetí den byly kultury buněk zkontrolovány pod mikroskopem a bylo přidáno stejné množství kalkofluoru. Kultivace probíhala celkem 7 dní.

Prohlížení fixovaného materiálu i živých kultur buněk s kalkofluorem bylo uskutečněno na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Nikon Ti-E s objektivem 10 $\times$ , filtr s DAPI a UV světlem.

#### **4.14 Analýza koncových metabolických produktů (spolupráce s Dr. Žáčkem)**

V pilotním experimentu bylo v kultivačních lahvích s 3 dny starými kulturami buněk, které dosahovaly 80% konfluence, vyměněno médium za PBS a PBS se zdrojem energie. Každých 30 min byl kontrolován stav (životaschopnost) buněk a inkubace probíhala 2 h.

Pro měření byly mastigaméby kultivovány 72 h v kultivačních lahvích. Z lahví bylo opatrně slito médium a 3 $\times$  opláchnuto 5 ml PBS. Po opláchnutí bylo do lahví přidáno 10 ml PBS s odpovídajícím zdrojem energie. Takto připravené vzorky byly inkubovány v horizontální poloze s uzavřeným závitkem po dobu 30 min při pokojové teplotě. Měření probíhalo v biologických pentaplikátech. Po uplynutí inkubační doby byl obsah lahví přefiltrován (Syringe filters ROTILABO<sup>®</sup> PVDF, 0,22  $\mu$ m, Roth) a použit pro stanovení koncových metabolických produktů. Buňky byly sonikovány ve vodní lázni a spočítány viz **kapitola 4.6**.

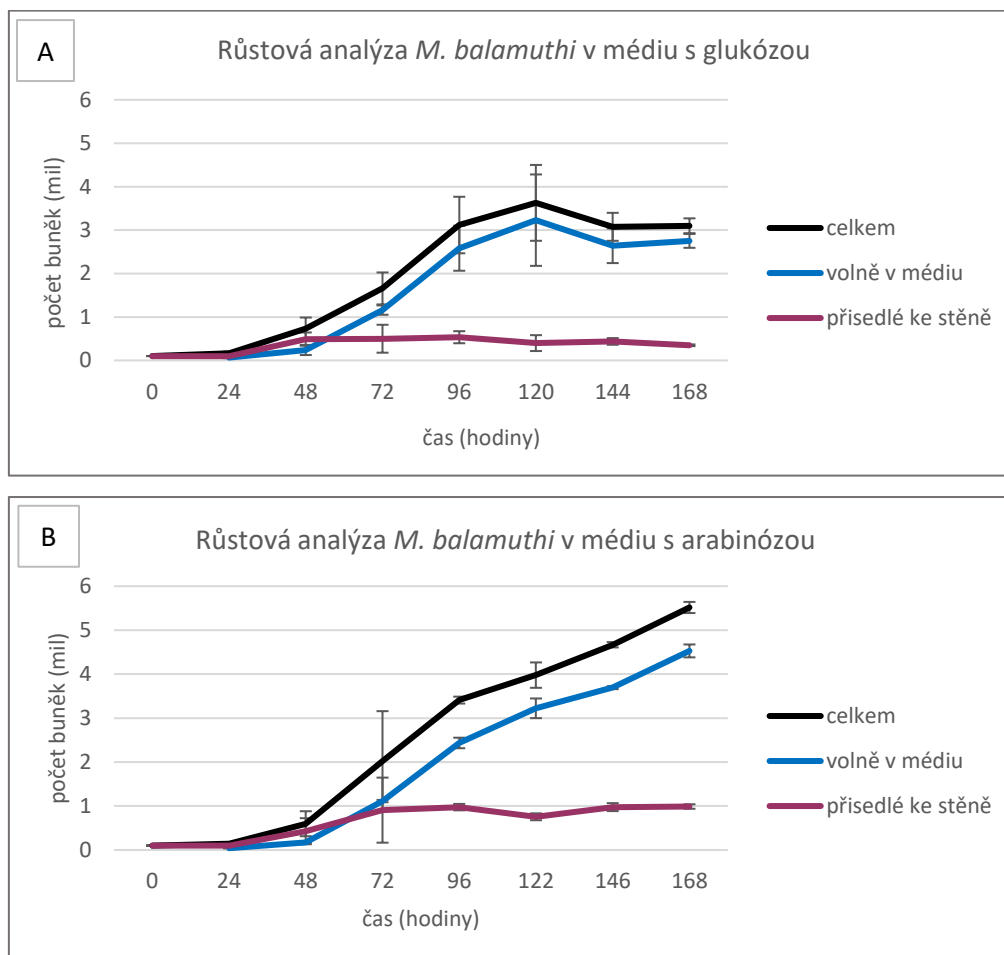
Metabolické produkty *M. balamuthi* na různých zdrojích energie byly stanoveny dle Smutné a kol. (2022). Jedná se o komprehensivní dvourozměrnou plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí (GCxGC-TOF/MS). Byl použit přístroj Pegasus 4D od firmy Leco Corporation vybavený kryomodulátorem na kapalný dusík a robotickým autosamplerem MPS (Gerstel, Německo).

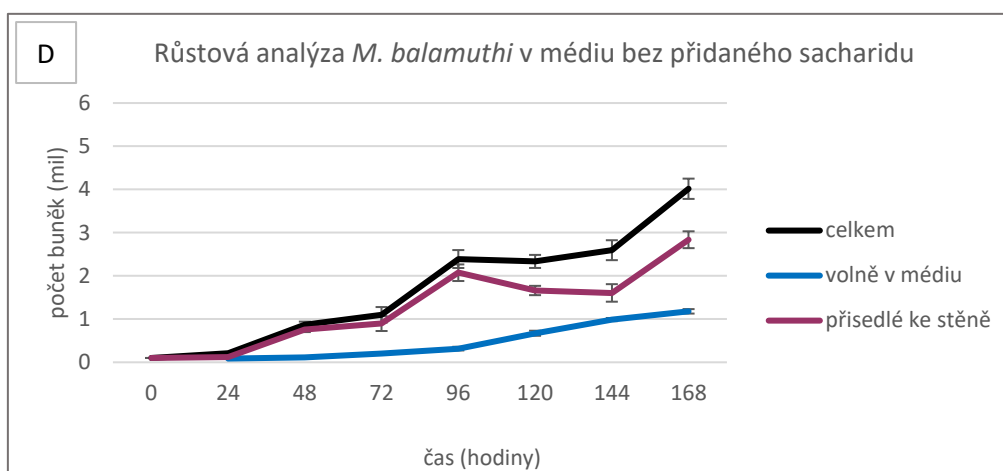
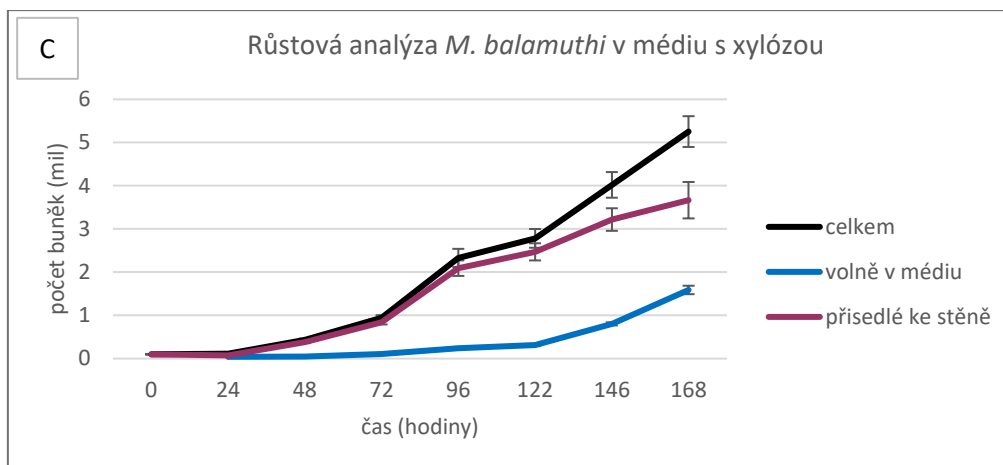
## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv energetických zdrojů na růst

#### 5.1.1 Růstové analýzy *M. balamuthi* na různých zdrojích energie

Vliv energetických zdrojů na růst buněk *M. balamuthi* byl pozorován v médiu s glukózou, arabinózou, xylózou a v médiu bez přidaného sacharidu. Sledování růstu *M. balamuthi* probíhalo v biologických triplikátech po 7 dní. Počáteční inokulum ve všech vzorcích bylo 100 000 buněk. Kultivované mastigaméby primárně rostou a rozmnožují se přisedlé ke stěně, po zaplnění prostoru stěny lahve byly améby pozorovány i volně v médiu. Z tohoto důvodu byla měřena zvlášť koncentrace buněk přisedlých ke stěně (fialová křivka) a zvlášť koncentrace buněk volně v médiu (modrá křivka). Černá křivka vyznačuje celkový počet buněk. Každý bod grafu znázorňuje průměr triplikátů a jejich směrodatné odchylky (**Obr. 1**).





**Obr. 1** – Grafy růstové analýzy *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Označení písmenem A – růstové křivky na glukóze, B – růstové křivky na arabinóze, C – růstové křivky na xylóze, D – růstové křivky bez přidaného sacharidu.

Celkový nejvyšší počet buněk byl pozorován u buněk v médiu s arabinózou ( $5,517 \times 10^6 \pm 0,126 \times 10^6$ ), následováno médiem s xylózou ( $5,253 \times 10^6 \pm 0,356 \times 10^6$ ), médiem bez přidaného sacharidu ( $4,016 \times 10^6 \pm 0,234 \times 10^6$ ) a na závěr médium s glukózou, dosahující celkově nejnižšího počtu buněk ( $3,630 \times 10^6 \pm 0,873 \times 10^6$ ). Průběh růstových křivek pro jednotlivé zdroje byl hodnocen pomocí ANOVY pro opakovaná měření (**tab. 1**).

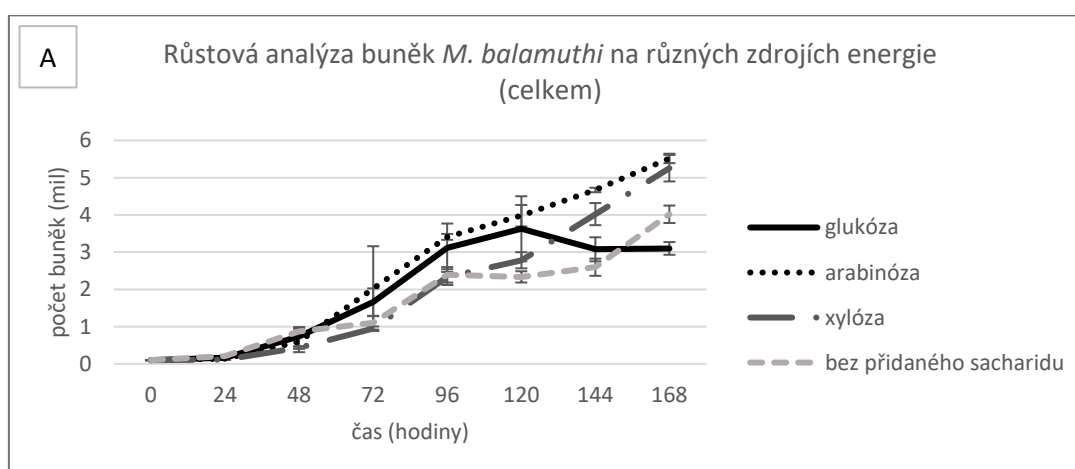
**Tab. 1** – Tabulky s hodnotami dosažené hladiny významnosti (P-value) u celkového počtu buněk (A), buněk volně v médiu (B) a buněk přisedlých ke stěně zkumavky (C) na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

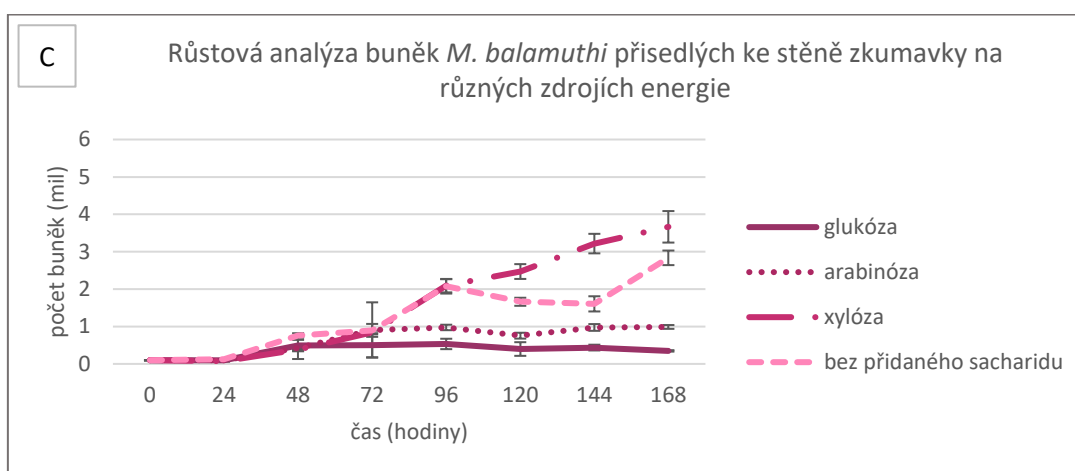
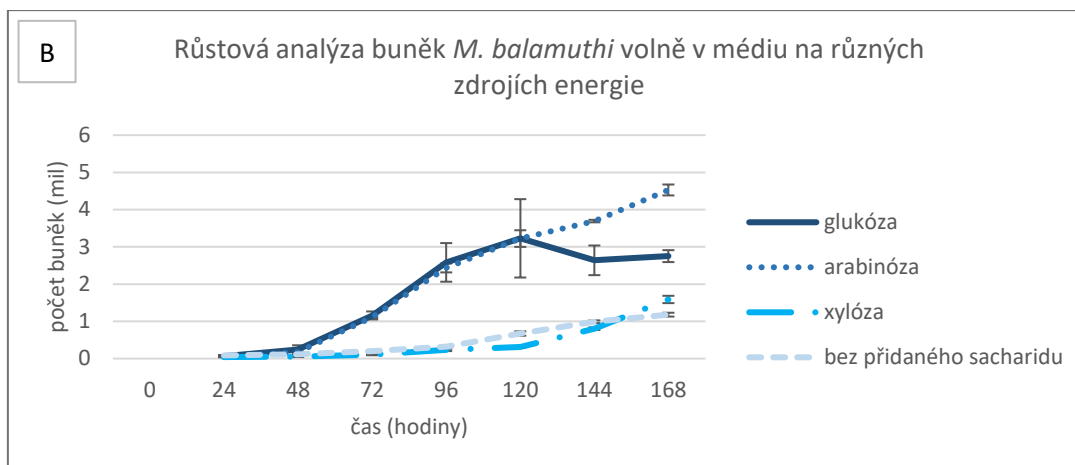
<b>A – Celkový počet buněk</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,2904	0,9980	0,8283
arabinóza	0,2904	–	0,3753	0,0626
xylóza	0,9980	0,3753	–	0,7338
bez sacharidu	0,8283	0,0626	0,7338	–

<b>B – Buňky volně v médiu</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,8889	<b>0,0225</b>	<b>0,0306</b>
arabinóza	0,8889	–	<b>0,0044</b>	<b>0,0062</b>
xylóza	<b>0,0225</b>	<b>0,0044</b>	–	0,9990
bez sacharidu	<b>0,0306</b>	<b>0,0062</b>	0,9990	–

<b>C – Buňky přisedlé ke stěně</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,8007	<b>0,0044</b>	<b>0,0494</b>
arabinóza	0,8007	–	<b>0,0338</b>	0,2641
xylóza	<b>0,0044</b>	<b>0,0338</b>	–	0,7001
bez sacharidu	<b>0,0494</b>	0,2641	0,7001	–

Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl u celkového počtu buněk napříč médii s různým zdrojem energie. Signifikantní rozdíly byly zjištěny u volných buněk v médiu a u přisedlých buněk ke stěně zkumavky. V médiu s glukózou a arabinózou bylo větší množství buněk vyskytujících se volně v médiu než u média s xylózou a bez přidaného sacharidu. Naopak vyšší počet buněk přisedlých ke stěně zkumavky byl pozorován u média s xylózou a bez přidaného sacharidu ve srovnání s médiem s obsahem glukózy a arabinózy (**obr. 2**).

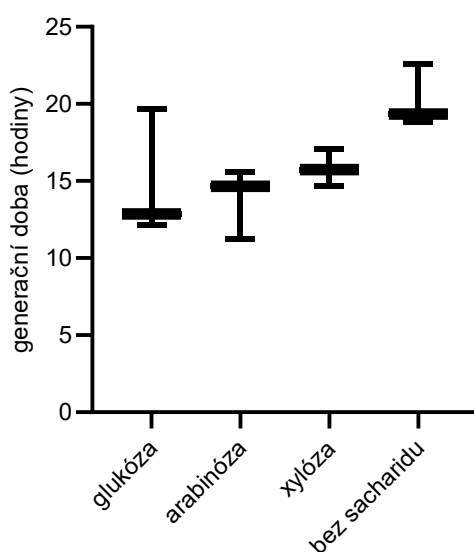




**Obr. 2** – Grafy znázorňující růstové křivky buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Označení A – růstové křivky celkového počtu buněk, B – růstové křivky buněk volně v médiu, C – růstové křivky přisedlých buněk ke stěně zkumavky. Hodnoty byly převzaty a přeskupeny z **obr 1**.

Z exponenciální fáze růstu byla z růstových křivek vypočítána generační doba (**Obr. 3**). Nejkratší průměrnou generační dobu měly buňky v médiu s arabinózou (13 h 50 min), následováno médiem s glukózou (14 h 53 min), médiem s xylózou (15 h 50 min) a médiem bez přidaného sacharidu (20 h 15 min). Statistické zhodnocení za využití jednocestné neparametrické ANOVY (Kruskal-Wallisův test) ukázalo, že generační doba se statisticky neliší napříč různými zdroji energie (**Tab. 2**).

Průměrná generační doba u buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie



**Obr. 3** – Graf průměrné generační doby u buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Ohraničená příčka znázorňuje rozmezí od minimální do maximální hodnoty, vyplněný proužek vyznačuje vypočítaný průměr.

**Tab. 2** – Tabulka s hodnotami dosažené hladiny významnosti (P-value) u porovnávání průměrné generační doby na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

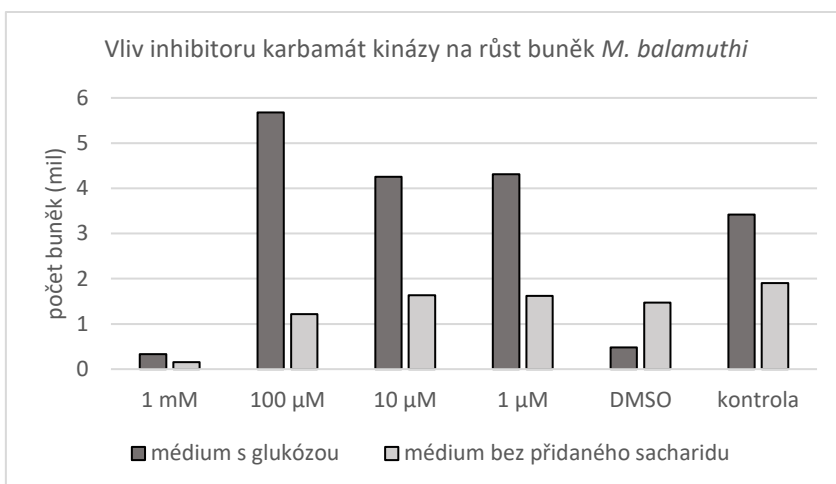
Generační doba	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	>0,9999	>0,9999	0,5523
arabinóza	>0,9999	–	>0,9999	0,2248
xylóza	>0,9999	>0,9999	–	>0,9999
bez sacharidu	0,5523	0,2248	>0,9999	–

### 5.1.2 Růstová analýza *M. balamuthi* s inhibítorem karbamát kinázy

*M. balamuthi* má arginin-dihydrolázovou dráhu, jejímž klíčovým enzymem je karbamát kináza v reakci přeměny karbamoylfosfátu na amoniak, ATP a oxid uhličitý. U *Giardia intestinalis* je tento enzym citlivý na disulfiram (Galkin et al., 2014), proto bylo rozhodnuto testovat tento inhibitor i u *M. balamuthi*; zatímco buňky bez přídavku sacharidu by měly být závislé na aktivitě karbamát kinázy, buňky pěstované na glukóze by většinu ATP měly získat z glykolýzy.

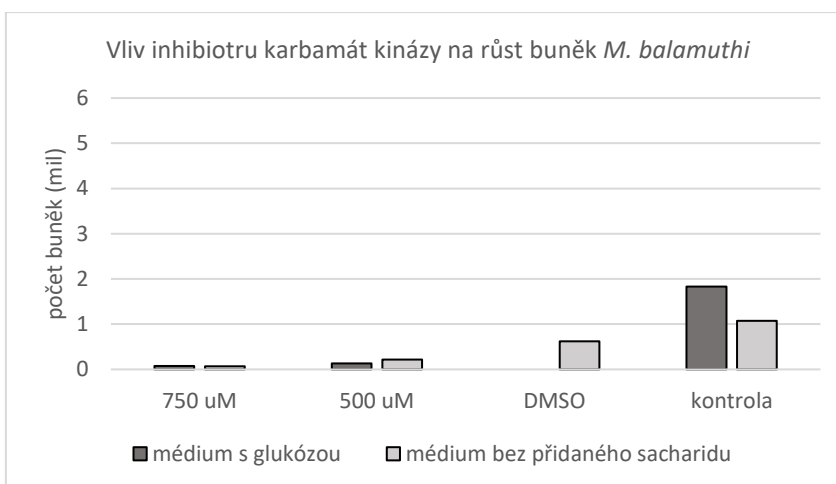
Pro zjištění optimální koncentrace disulfiramu byl sledován vliv jeho různých koncentrací na růst buněk *M. balamuthi* pěstovaných bez sacharidů v porovnání s růstem na glukóze. První den bylo nasazeno inokulum 100 000 buněk. Třetí den byly vzorky spočítány. Na úvod byly testovány koncentrace 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 1  $\mu$ M, po dobu tří dnů viz **obr. 4**. K experimentům byla vždy přidána kontrola, která neobsahovala přidaný inhibitor a kontrola bez inhibitoru s DMSO. Z grafu je patrné, že při koncentraci disulfiramu 1 mM byl inhibován růst buněk jak v médiu bez

přidaného sacharidu, tak v médiu s glukózou. Rovněž vidíme, že disulfiram má na buňky pěstované na glukóze stimulační efekt.



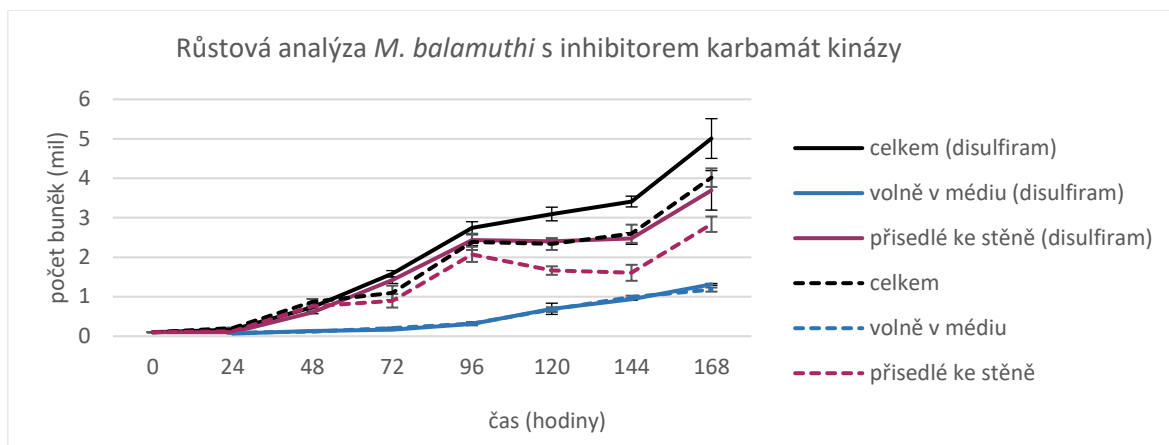
**Obr. 4** – Graf vlivu inhibitoru karbamát kinázy (disulfiramu) na růst buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou a v médiu bez přidaného sacharidu.

V dalším kroku byly testovány koncentrace disulfiramu 500 μM a 750 μM (**Obr. 5**). Je patrné, že obě koncentrace byly stále vysoké.



**Obr. 5** – Graf vlivu inhibitoru karbamát kinázy (disulfiramu) na růst buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou a v médiu bez přidaného sacharidu.

Pro sedmidenní růstovou analýzu byla zvolena poloviční koncentrace inhibitoru karbamát kinázy, tj. 250 μM. Výsledné růstové křivky biologických triplikátů jsou vyhotoveny v **obr. 6**.



**Obr. 6** – Graf růstové analýzy *M. balamuthi* v médiu bez přidaného sacharidu (přerušované značení křivek) a v médiu bez přidaného sacharidu s inhibítorem karbamát kinázy (plné značení křivek). Hodnoty růstových křivek bez přidaného disulfiramu jsou převzaty z grafu na **obr. 1–D**.

Statistické zhodnocení růstových křivek bez přidaného inhibitoru a s přidaným inhibítorem pomocí neparametrického T-testu ukázalo signifikantní rozdíly v celkovém počtu buněk ( $P\text{-value} = 0,0330$ ) a u přisedlých buněk ke stěně ( $P\text{-value} = 0,0307$ ). U buněk volně v médiu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P\text{-value} = 0,7109$ ). Vzhledem k tomu, že koncentrace  $250 \mu\text{M}$  disulfiramu neměla vliv na inhibici růstu buněk bez přidaného sacharidu, bylo rozhodnuto dále nepokračovat s touto chemikálií v dalších experimentech a namísto toho bylo vyvinuto definované médium, ve kterém by bylo možné manipulovat s koncentrací argininu.

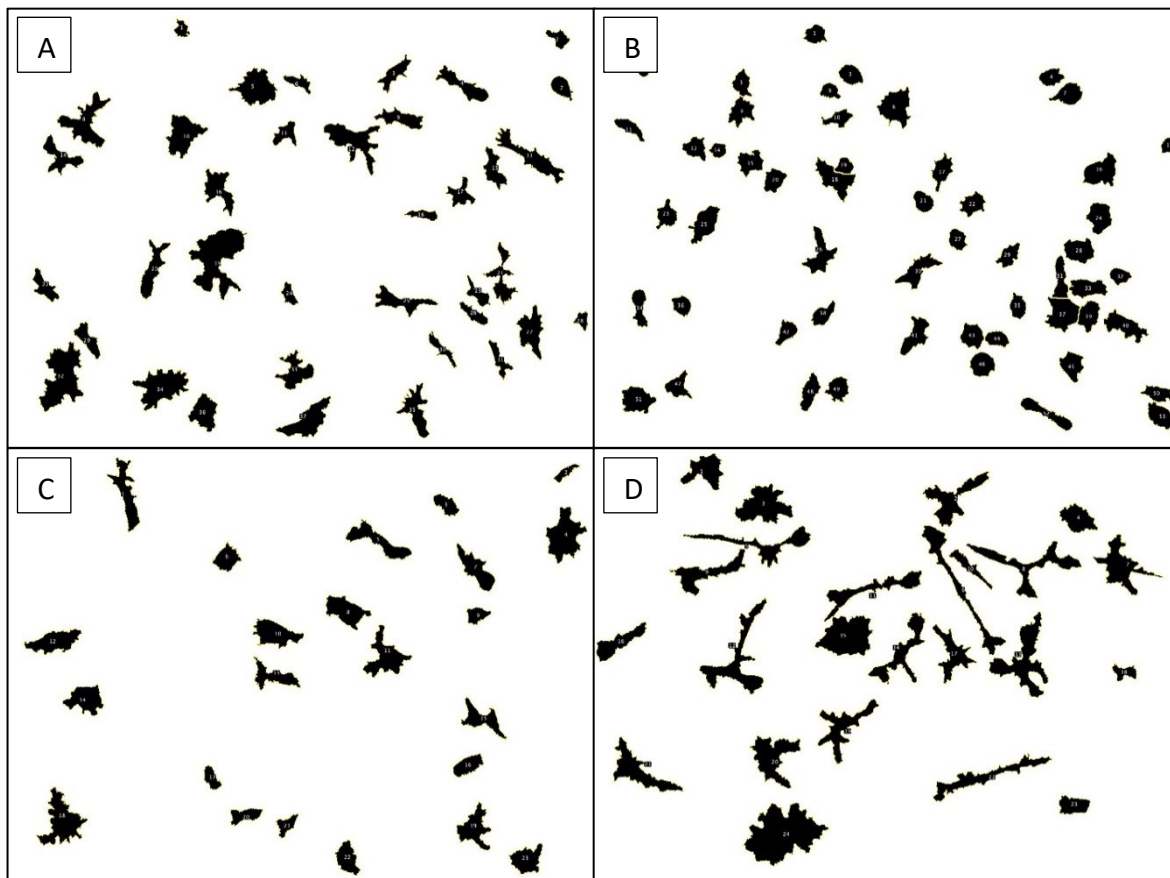
## 5.2 Adaptace buněk *M. balamuthi* na definované médium

L-arginin je aminokyselina, která je nedílnou součástí komponent PYGC média. Proto bylo vyvinuto definované médium, u něhož lze manipulovat jednotlivé složky, včetně argininu. Přechod buněk *M. balamuthi* z PYGC média na definované médium (DFM + aminokyseliny) byl uskutečněn postupným ředěním PYGC média DFM. Tímto postupem byly buňky převedeny do čistého DFM, ovšem jejich růstová rychlost byla velmi malá. Z toho důvodu bylo v dalším kroku upraveno množství esenciálních a neesenciálních aminokyselin a byly přidány mastné kyseliny a vitamínový mix. Za těchto podmínek se rychlost růstu postupně zvyšovala a stabilizovala. V současné době, tj. 11 měsíců po prvotním převedení buněk do DFM, buňky stabilně rostou navzdory vyšší inokulaci používané k přeočkování, tj. 4–6 ml. Buňky dosahují konfluency přibližně po 8–12 dnech. Z důvodu dlouhé adaptace buněk na DFM nebyly uskutečněny experimenty s argininem.

## 5.3 Vliv energetických zdrojů na buněčnou morfologii a fyziologii

### 5.3.1 Velikost buněk

Při pozorování mastigaméb pomocí světelného mikroskopu je jasně vidět, že buňky na různých zdrojích energie mají různou velikost a tvar (viz **obr. 7**).



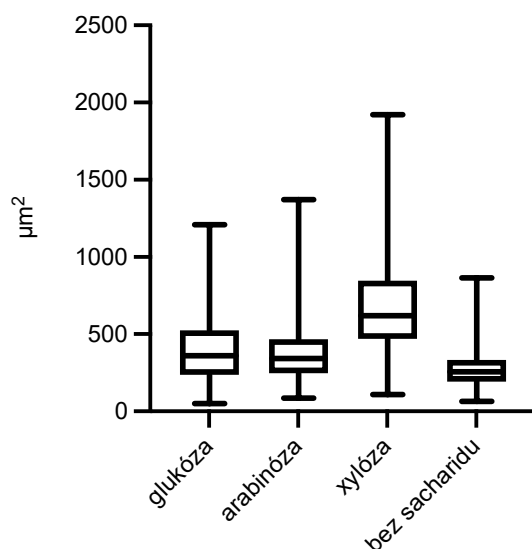
**Obr. 7** – Reprezentativní maska buněk pěstovaných na různých zdrojích energie. A – glukóza; B – bez sacharidu; C – arabinóza; D – xylóza.

Pro statistické zhodnocení bylo nasnímáno 207–539 živých buněk po 24 h kultivace na petriho miskách. Výsledné snímky byly zpracovány ve FIJI a statistická analýza byla provedena v programu Graphpad Prism za využití jednocestné ANOVY a vícenásobného porovnávacího Tukeyova testu při nastavení  $\alpha = 0,05$ . Buňky *M. balamuthi* na různých zdrojích energie měly rozdílné velikosti, což bylo potvrzeno statistickou analýzou a dosažené hladiny významnosti (P-value) jsou vypsány níže viz **tab. 3**. Ze získaných dat (**obr. 8**) je patrné, že největší buňky byly v médiu s xylózou a nejmenší v médiu bez přidaného sacharidu. Mastigaméby v médiu s glukózou a arabinózou mezi sebou nejevily statisticky významný rozdíl velikostí, byly však menší než buňky v médiu s xylózou a větší než v médiu bez přidaného sacharidu.

**Tab. 3** – Tabulka s dosaženými hladinami významnosti (P-value) u porovnávání velikostí buněk *M. bamaluthi* na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

Velikost buněk	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,5658	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
arabinóza	0,5658	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
xylóza	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	–	<b>&lt;0,0001</b>
bez sacharidu	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	–

Velikost buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie



**Obr. 8** – Graf znázorňující velikost buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Ohraničená přímka znázorňuje rozmezí od minimální do maximální hodnoty, čtverec vyznačuje konfidenční interval a příčná čára uvnitř čtverce označuje vypočítaný průměr.

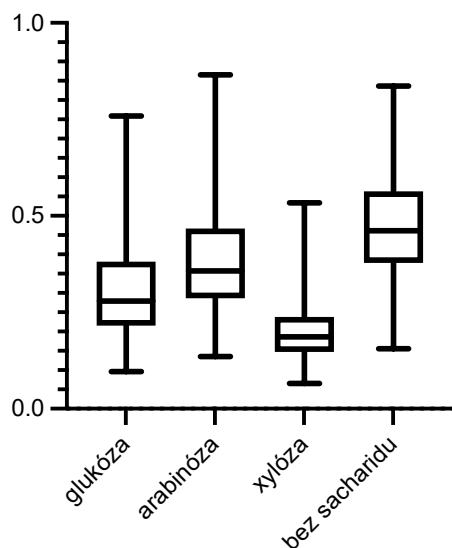
Na základě statistické analýzy je zřejmé, že různé zdroje energie statisticky významně ovlivňují velikost buněk.

### 5.3.2 Tvar buněk

Z **obrázku 7** je zřejmé, že buňky na různých zdrojích energie mají různou morfologii. Pro její hodnocení se dají použít různé parametry či segmentace. V rámci projektu bylo testováno, zda se buňky v některých parametrech neliší. Kromě možnosti měření povrchu buněk, a tedy jejich velikosti, bylo možné analyzovat i cirkularitu a kulatost díky rozšířené verzi příkazu Measure programu FIJI, který vypočítává cirkularitu objektu pomocí vzorce  $4 \times \pi \frac{S}{o^2}$ , kde S je plocha objektu a o jeho obvod, a kulatost  $\frac{4 \times S}{\pi \times MA^2}$ , kde S je plocha objektu a MA je délka jeho hlavní osy. Hodnota cirkularity 1,0 znamená dokonalou kružnici. Jak se hodnota přibližuje k 0,0, označuje stále protáhlejší mnohoúhelník. Výsledný graf pro cirkularitu je ukázán na **obr. 9** a pro kulatost na **obr. 10**. Statistická analýza byla provedena pomocí jednocestné ANOVY a vícenásobného porovnávání

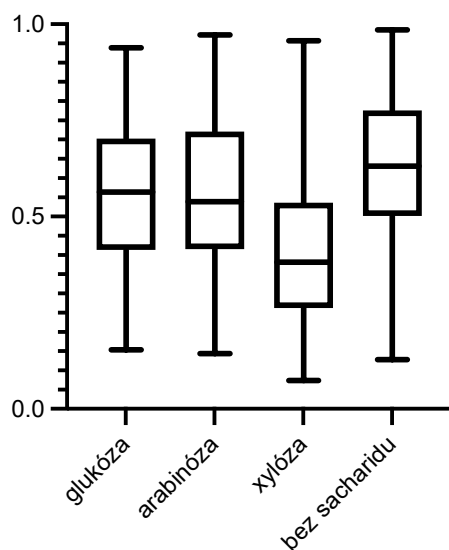
Tukeyova testu při nastavení  $\alpha = 0,05$ . Dosažené hladiny významnosti (P-value) jsou vypsány níže v **tab. 4** a **5**.

Cirkularita buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie



**Obr. 9** – Graf znázornující cirkularitu buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Ohraničená přímka znázorňuje rozmezí od minimální do maximální hodnoty, čtverec vyznačuje konfidenční interval a příčná čára uvnitř čtverce označuje vypočítaný průměr.

Kulatost buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie



**Obr. 10** – Graf znázornující kulatost buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Ohraničená přímka znázorňuje rozmezí od minimální do maximální hodnoty, čtverec vyznačuje konfidenční interval a příčná čára uvnitř čtverce označuje vypočítaný průměr.

**Tab. 4** – Tabulka s dosaženými hladinami významnosti (P-value) u porovnávání tvaru (cirkularity) buněk *M. bamaluthi* na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

<b>Cirkularita</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
arabinóza	<b>&lt;0,0001</b>	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
xylóza	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	–	<b>&lt;0,0001</b>
bez sacharidu	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	–

**Tab. 5** – Tabulka s dosaženými hladinami významnosti (P-value) u porovnávání tvaru (kulatost) buněk *M. bamaluthi* na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

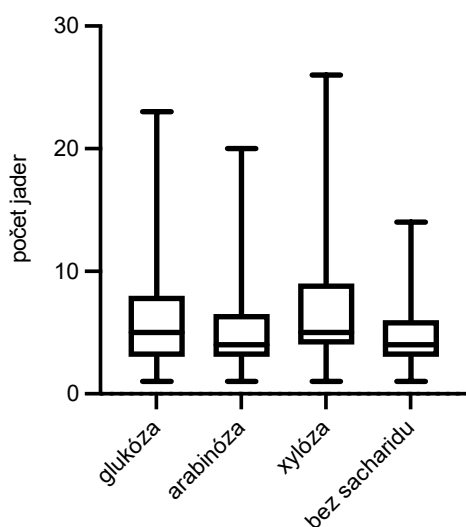
<b>Kulatost</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,9843	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
arabinóza	0,9843	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>
xylóza	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	–	<b>&lt;0,0001</b>
bez sacharidu	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	–

Při porovnání sledovaných parametrů, tj. cirkularitě a kulatosti, vyšla cirkularita jako parametr vhodný pro rozlišení buněk pěstovaných na různých zdrojích energie.

### 5.3.3 Počet jader

Ukázalo se, že velikost buněk je závislá na použitém zdroji energie. Další otázka, na kterou byla hledána odpověď je, zdali se různá velikost buněk odrazí ve změně v počtu jader. Buňky *M. bamaluthi* byly inkubovány přes noc v petriho miskách na krycím sklíčku a druhý den byly připraveny trvalé preparáty. Po nabarvení a nasnímání buněk i jader byla provedena statistická analýza. Jelikož data nevykazovala Gausovskou distribuci, byla zhodnocena za použití jednocestné neparametrické ANOVY (Kruskal-Wallisův test) a vícenásobného porovnávacího testu (Dunn's test) při nastavení  $\alpha = 0,05$  (**Obr. 11**). Průměrný počet jader na buňku a maximální počet jader v závislosti na různé zdroje energie je uveden v **tab. 6** a dosažené hladiny významnosti jsou zobrazeny v **tab. 7**.

Počet jader u buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie



**Obr. 11** – Graf znázorňující celkový počet jader buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Ohraničená příčka znázorňuje rozmezí od minimální do maximální hodnoty, čtverec vyznačuje konfidenční interval a příčná čára uvnitř čtverce označuje vypočítaný průměr.

**Tab. 6** – Tabulka s průměrným a maximálním počtem jader u buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie.

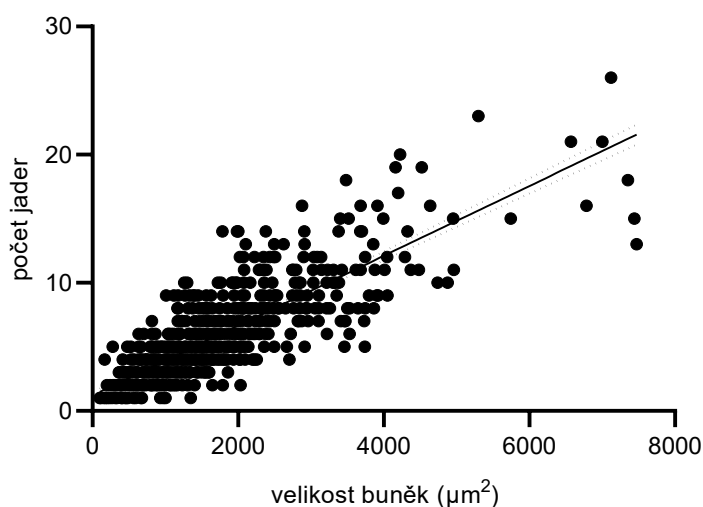
	průměrný počet jader	maximální počet jader
<b>médium s glukózou</b>	5,83	23
<b>médium s arabinózou</b>	5,00	20
<b>médium s xylózou</b>	6,50	26
<b>médium bez sacharidu</b>	4,85	14

**Tab. 7** – Tabulka s dosaženými hladinami významnosti (P-value) u porovnávání počtu jader buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

Počet jader	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,0724	>0,9999	0,1342
arabinóza	0,0724	–	<b>0,0021</b>	>0,9999
xylóza	>0,9999	<b>0,0021</b>	–	<b>0,0063</b>
bez sacharidu	0,1342	>0,9999	<b>0,0063</b>	–

Spojení výsledných dat ohledně velikosti buněk a počtu jader je zobrazeno na **obr. 12**. Je patrná signifikantní korelace mezi rostoucí velikostí buněk a zvyšujícím počtem jader. Pearsonův korelační koeficient ( $r = 0,8233$ ) naznačuje silnou a významnou korelaci mezi těmito měřenými parametry.

Korelace mezi počtem jader a velikostí buněk *M. balamuthi*



**Obr. 12** – Graf lineární závislosti mezi počtem jader a velikostí buněk *M. balamuthi* pěstovaných na různých zdrojích energie.

### 5.3.4 Motilita

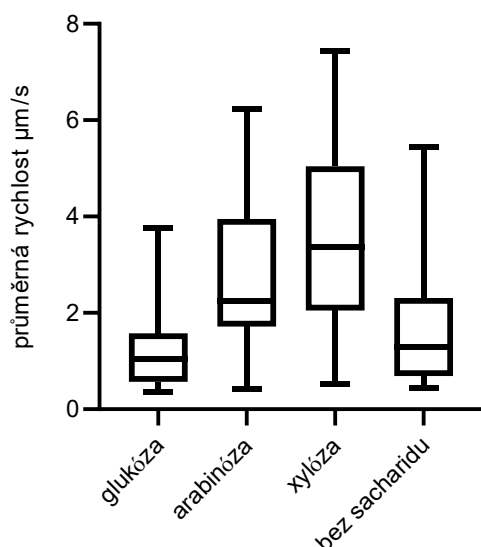
Další parametr, který byl pozorován, byl vliv různých energetických zdrojů na motilitu buněk *M. balamuthi*. Z nasnímaných záběrů byly získány jednotlivé trajektorie pohybu buněk a vypočítány průměrné rychlosti (**Obr. 13**). Získané hodnoty neprošly testem normality, ale byly lognormální, proto byla použita logaritmická transformace a v dalším kroku byla provedena statistická analýza pomocí jednocestné ANOVY a vícenásobného porovnávacího Tukeyova testu při nastavení  $\alpha = 0,05$  (**Tab. 8**). Buňky v médiu s xylózou dosahovaly nejvyšší průměrné rychlosti, následovaly buňky v médiu s arabinózou, bez přidaného sacharidu a na závěr buňky v médiu s glukózou, které vykazovaly nejnižší průměrnou rychlost pohybu.

**Tab. 8** – Tabulka s dosaženými hladinami významnosti (P-value) u porovnávání průměrné rychlosti pohybu buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

<b>Motilita</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,2962
arabinóza	<b>&lt;0,0001</b>	–	0,6766	<b>0,0009</b>
xylóza	<b>&lt;0,0001</b>	0,6766	–	<b>0,0001</b>
bez sacharidu	0,2962	<b>0,0009</b>	<b>0,0001</b>	–

Dle statistické analýzy se mastigaméby na pentózách pohybují rychleji než v médiu s glukózou či bez přidaného sacharidu.

Průměrná rychlost pohybu buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie



**Obr. 13** – Graf zobrazující průměrnou rychlost pohybu buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Ohraničená přímka znázorňuje rozmezí od minimální do maximální hodnoty, čtverec vyznačuje konfidenční interval a příčná čára uvnitř čtverce označuje vypočítaný průměr.

#### 5.4 Vliv energetických zdrojů na encystaci

Vytvoření cysty jako součásti životního cyklu u některých organismů je zcela běžné. Cysty všeobecně umožňují překonat nepříznivé životní podmínky. V této kapitole byla zkoumána schopnost encystace buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. V pilotním experimentu byla zjišťována tvorba sedimentu s možnými cystami za určitý počet dní. Od každého zdroje energie bylo první den nasazeno inokulum o koncentraci buněk 100 000, 500 000 a 1 000 000. Třetí den byl pozorován sediment na dně zkumavek u arabinózy a glukózy. V obou případech se jednalo o vzorky s 500 000 a 1 000 000 nasazených buněk. U argininu a xylózy sediment pozorován nebyl. Pátý den od počátku experimentu byl sediment viditelný u všech vzorků s arabinózou a glukózou. Sediment u xylózy byl pouze u 500 000 a 1 000 000 nasazených buněk, kdežto u argininu nebyl ani v jednom případě viditelný sediment na dně použitých zkumavek. Na základě získaných dat bylo pro další experimenty použito nejvyšší inokulum.

V dalším experimentu byl testován případný vliv exkretovaných metabolitů na úspěšnost tvorby sedimentu s případnými cystami. Do 15 ml zkumavek bylo přeneseno inokulum 1 000 000 buněk a doplněno kondiciovaným PYGC médiem s příslušným zdrojem energie. Byla testována dvě kondiciovaná média a čerstvé médium; první kondiciované PYGC médium bylo odebráno ze 3 dny starých kultur buněk a druhé ze 7 dní starých kultur buněk. Vzorky byly inkubovány v termostatu při 27 °C po 7 dní. Získaný sediment byl dále zpracován a inkubován 15 min v 0,1% sarkosylu (Wesel

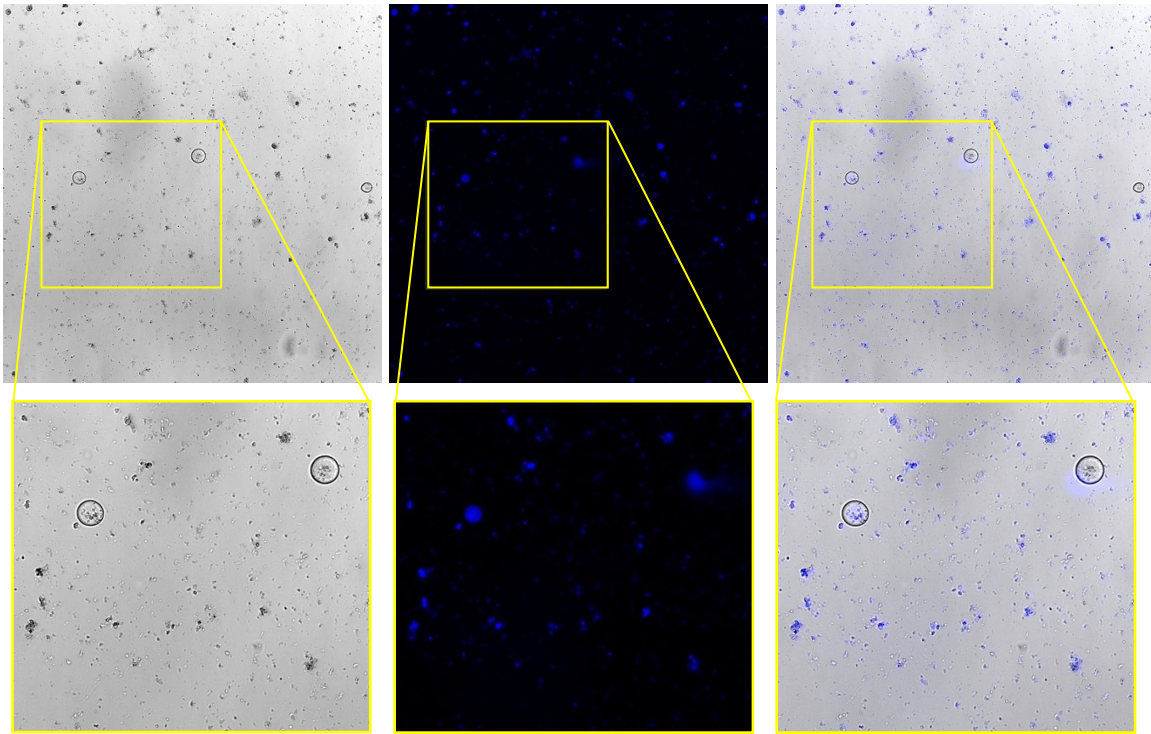
et al., 2021). Po promytí vodou byly vzorky cyst počítány v Bürkerově komůrce. Útvary připomínající cysty byly nalezeny pouze v médiu s arabinózou, a to ze vzorků s čerstvým médiem (440 000 cyst/ml) a 3 dny kondiciovaným médiem (51 000 cyst/ml). U ostatních nebyly pozorovány žádné kulovité objekty. Z uvedeného vyplývá, že metabolity *M. balamuthi* nemají pozitivní vliv na tvorbu případných cyst. Dále bylo tedy použito čerstvé PYGC médium.

#### 5.4.1 Barvení cyst kalkofluorem

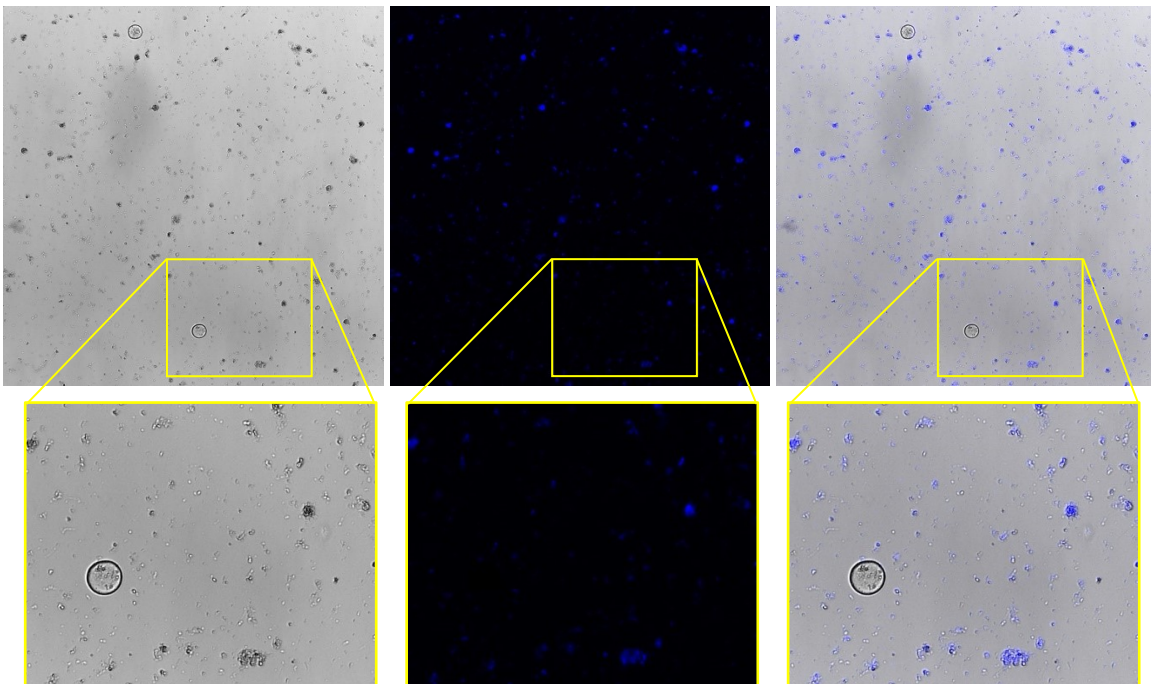
Kalkofluor je nespecifický fluorochrom, který se váže na  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 polysacharidy, které se nacházejí v celulóze a chitinu v buněčných stěnách a po excitaci ultrafialovým nebo fialovým zářením fluoreskují intenzivní modrobílou barvou. Běžně se využívá v mikrobiologii a parazitologii pro barvení spor mikrosporidií, cyst *Giardia intestinalis*, cyst *Entamoeba histolytica* a dalších (shrnuto v Harrington & Hageage, 2003). Proto bylo rozhodnuto vyzkoušet toto barvení i u *M. balamuthi*.

Při pokusu o barvení cyst ze vzorků po sarkosylu (arabinóza) nebyly kulaté objekty barveny. V řádu několika minut byly obarveny všechny struktury na preparátu – jak kulaté objekty, tak artefakty.

V dalším experimentu byl odebrán sediment ze 21 dní starých kultur buněk v médiu s arabinózou a v médiu s glukózou, ve kterých byly ve světelném mikroskopu pozorovány kulaté objekty připomínající cysty. Získaný sediment byl smíchán s kalkofluorem (150  $\mu$ l: 64  $\mu$ l) inkubován 1 min, připraven preparát a ihned pozorován na fluorescenčním mikroskopu. Výsledné snímky jsou zobrazeny v **obr. 14** a **15**.



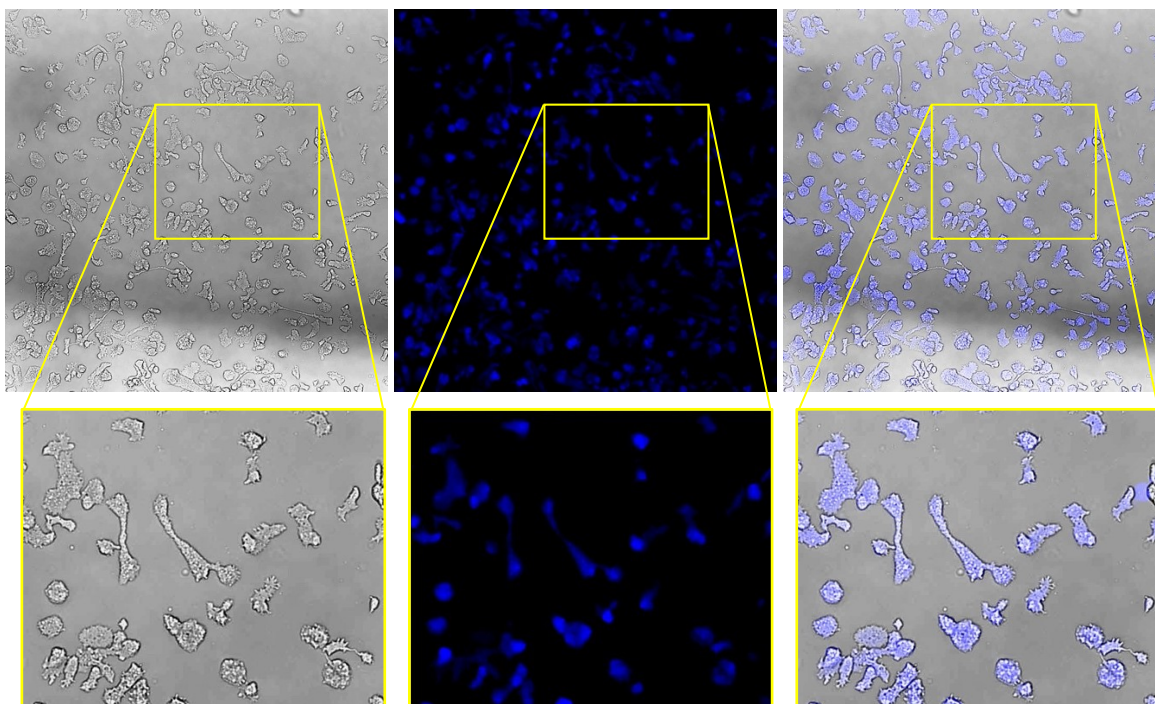
**Obr. 14** – Snímky z preparátu ze sedimentu 21 dní starých kultur buněk *M. balamuthi* v médiu s arabinózou. Na prvním snímku jsou buňky *M. balamuthi* v průchodím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.



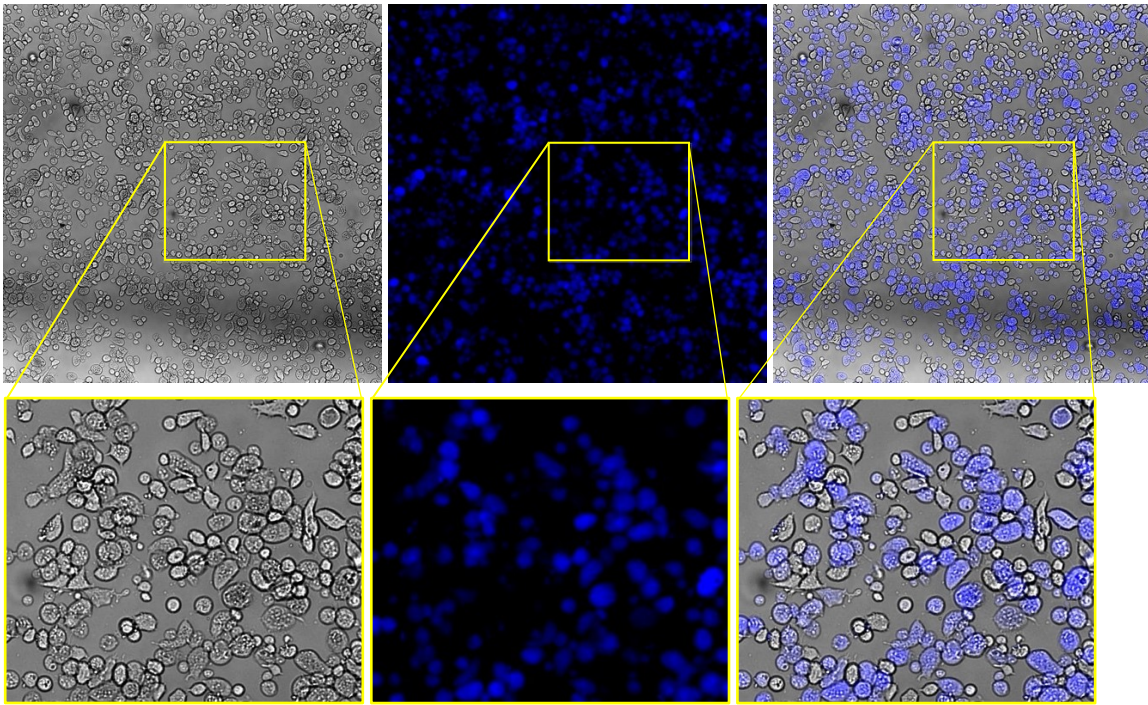
**Obr. 15** – Připravený preparát ze sedimentu 21 dní starých kultur buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou. Na prvním snímku jsou buňky *M. balamuthi* v průchodím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.

Kulaté objekty připomínající cysty nebyly přidáním kalkofluorem obarveny ani v jednom případě viz kompozice **obr. 14** a **15**. Barven byl případný buněčný detrit.

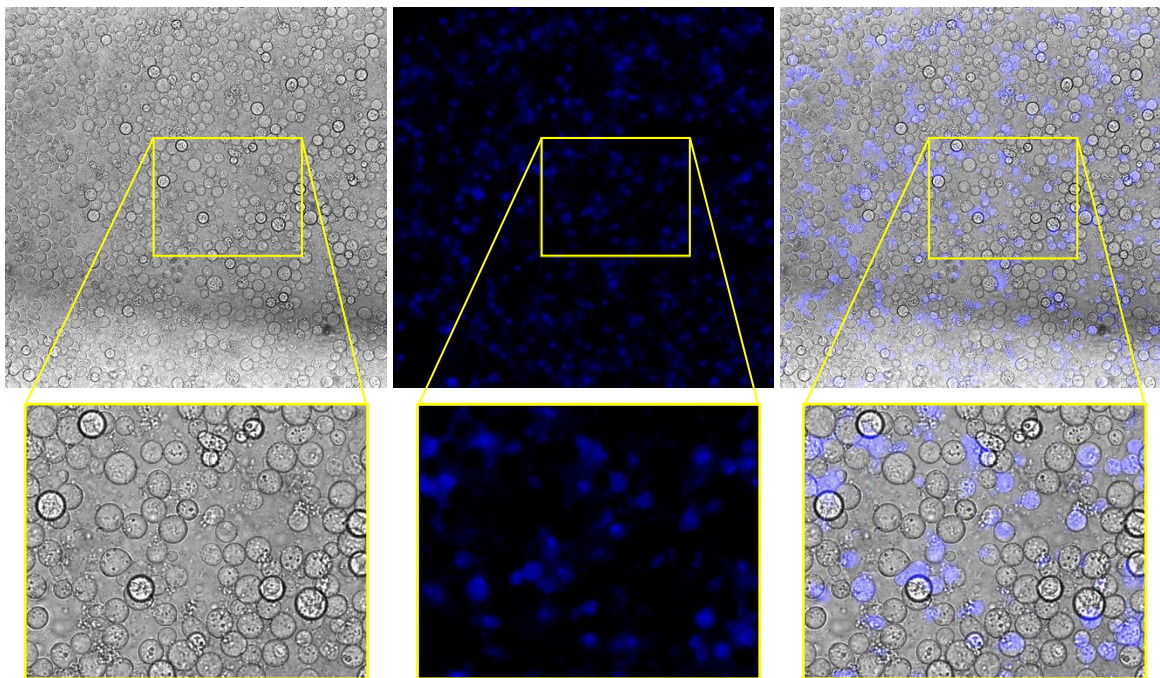
Následně bylo testováno, zda se kalkofluorem obarví fixované buňky. Dle protokolu výrobce byly barveny tři kultury buněk. První kultura buněk v médiu s xylózou byla fixována 3% formaldehydem po dobu 30 min. Poté byl vyměněn formaldehyd za PBS s 50% kalkofluorem (**obr. 16**). Druhá kultura buněk v médiu bez přidaného sacharidu byla fixována 3% formaldehydem s přídavkem 50% kalkofluoru (**obr. 17**) a třetí kultura buněk v médiu s glukózou byla ponechána bez fixace, kdy bylo smícháno PYGC médium s 50% kalkofluorem (**obr. 18**).



**Obr. 16** – První kultura buněk *M. balamuthi* v médiu s xylózou, která byla fixována 3% formaldehydem po dobu 30 min a poté byl vyměněn formaldehyd za PBS s 50% kalkofluorem. Na prvním snímku můžeme vidět buňky *M. balamuthi* v průchozím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.



**Obr. 17** – Druhá kultura buněk *M. balamuthi* v médiu bez přidaného sacharidu, která byla fixována 3% formaldehydem s přidávkem 50% kalkofluoru po dobu 30 min. Na prvním snímku můžeme vidět buňky *M. balamuthi* v průchodím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.

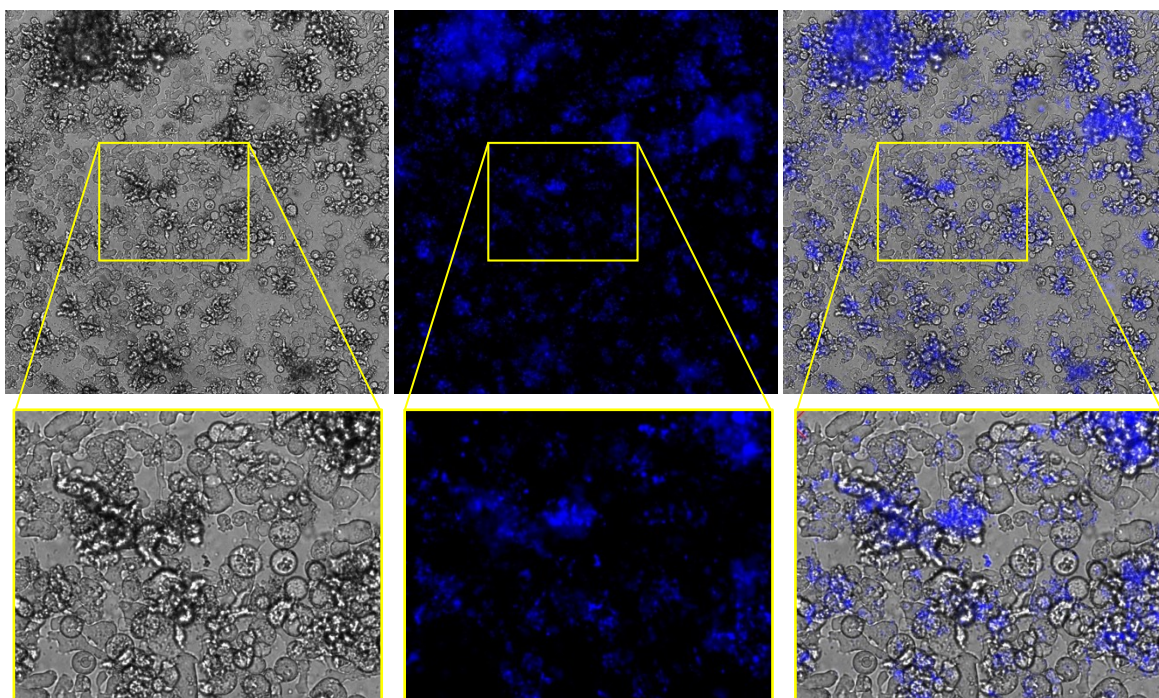


**Obr. 18** – Třetí kultura buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou nebyla fixována. Bylo smícháno PYGC médium s 50% kalkofluorem a pozorováno pod mikroskopem. Na prvním snímku můžeme vidět buňky *M. balamuthi* v průchodím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.

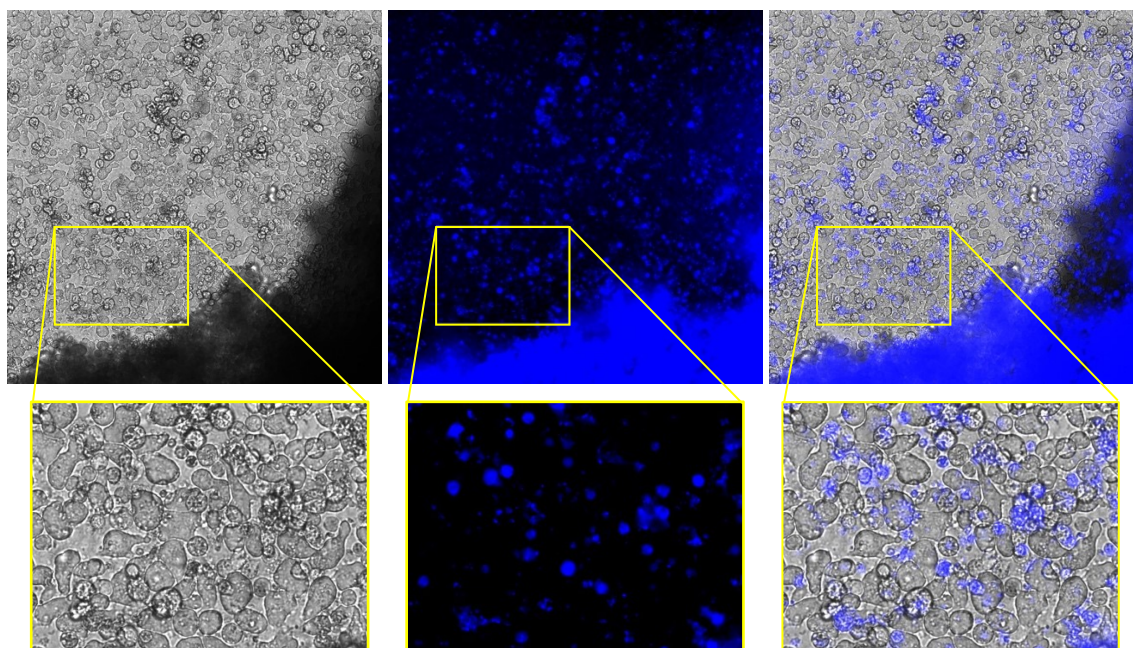
U prvních dvou kultur mastigaméb v médiu s xylózou a v médiu bez sacharidu, které byly fixovány 3% formaldehydem, došlo k nabarvení fixovaných buněk kalkofluorem. U třetí kultury buněk, která nebyla fixována, ale pouze barvena přidaným kalkofluorem do média, byla pozorována

změna vzhledu buněk. Buňky byly zakulaceny a postupně začaly odumírat. Umírající buňky se posléze začaly barvit modře.

Do nově přeočkovaných kultur buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou a v médiu s arabinózou byl přidán kalkofluor ve finální koncentraci 0,001% dle protokolu z výše uvedeného článku (Harrington & Hageage, 2003). Třetí den byly kultury buněk zkontrolovány pod mikroskopem, barvení potencionálních kulatých objektů (cyst) nebylo pozorováno, a proto bylo přidáno opět stejné množství kalkofluoru. Kultivace probíhala celkem 7 dní. Výsledné snímky jsou zobrazeny v **obr. 19** a **20**.



**Obr. 19** – Snímky buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou barvené po 7 dní kalkofluorem. Na prvním snímku můžeme vidět buňky *M. balamuthi* v průchozím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.



**Obr. 20** – Snímky buněk *M. balamuthi* v médiu s arabinózou barvené po 7 dní kalkofluorem. Na prvním snímku můžeme vidět buňky *M. balamuthi* v průchozím světle, na druhém snímku filtr DAPI a třetí snímek je kompozice dvou předešlých.

V obou případech byly obarveny pravděpodobně buněčné pozůstatky nebo umírající buňky. Nebylo pozorováno barvení cyst kalkofluorem, pokud ano, nacházely se ve shluku vpravo dole u **obr. 20**. Chitinová buněčná stěna nebyla barvena kalkofluorem za použitých podmínek v této práci.

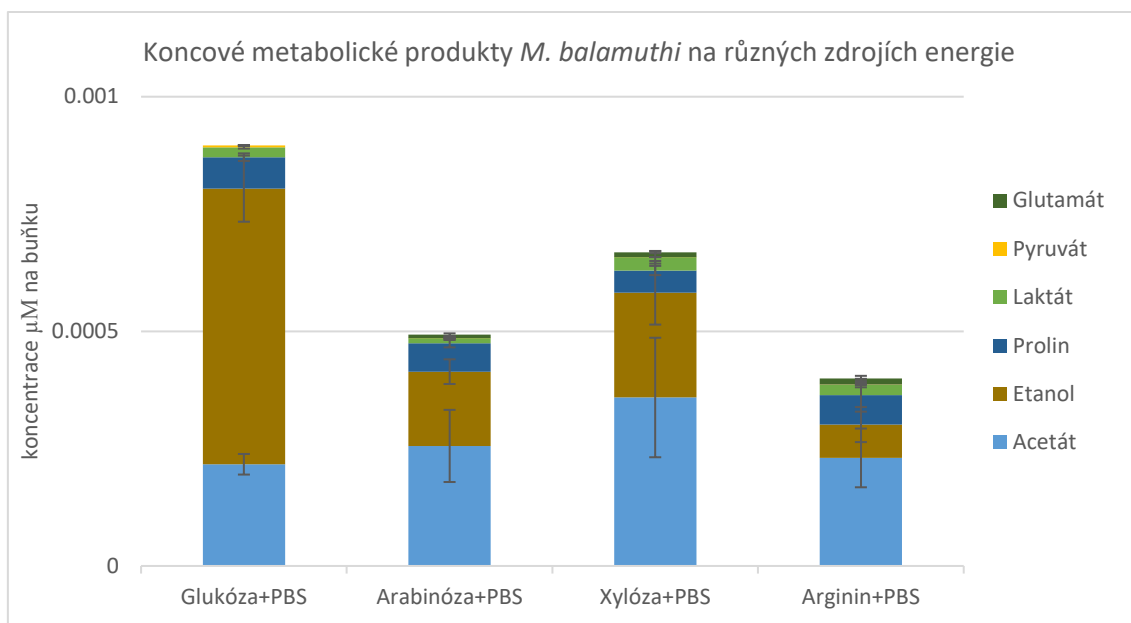
## 5.5 Vliv energetických zdrojů na koncové metabolické produkty

Z genomu víme, že *M. balamuthi* má arginin-dihydrolázovou dráhu a je schopna katabolizovat pentózy arabinózu a xylózu. Měřením koncových metabolických produktů můžeme nahlédnout a více porozumět metabolismu *M. balamuthi* na různých zdrojích energie.

Pilotní experiment byl zaměřen na životaschopnost buněk v PBS a v PBS obohaceném o zdroj energie (glukóza, arabinóza, xylóza a arginin). Životaschopnost byla kontrolována pod mikroskopem v pravidelném časovém intervalu. Z tohoto pilotního experimentu vyšla najevo vhodnější varianta PBS se zdrojem energie než varianta čistého PBS, kde po krátkém časovém úseku (cca 45 min) docházelo k úmrtí buněk. Optimální doba inkubace byla 30 min. Pokud probíhala inkubace buněk s PBS se zdrojem energie déle než 60 min, docházelo k úmrtí buněk.

Tři dny staré kultury buněk *M. balamuthi*, které dosahovaly 80–100% konfluency, byly kultivovány v 10 ml PBS s odpovídajícím zdrojem energie po dobu 30 min při pokojové teplotě. Ve vzorcích byly sledovány následující metabolity: pyruvát, laktát, citrát, sukcinát, acetát, etanol, glutamin, glutamát a prolin. Sukcinát, citrát a glutamin nebylo možno naměřit, jejich množství se

pohybovalo pod detekční hladinou. Na **obr. 21** jsou zobrazeny naměřené hodnoty detekovatelných koncových metabolických produktů *M. balamuthi*.



**Obr. 21** – Graf shrnující detekovatelné testované koncové metabolické produkty metabolismu *M. balamuthi* při kultivaci na různých zdrojích energie. Na grafu jsou vidět směrodatné odchylky vytvořené z biologických pentaplikátů v programu Excel.

Naměřené hodnoty byly porovnány a zhodnoceny pomocí jednocestné ANOVY a vícenásobného porovnávacího Tukeyova testu při nastavení  $\alpha = 0,05$  v programu GraphPad Prism. Signifikantní rozdíly byly pozorovány u laktátu, pyruvátu, glutamátu a etanolu (**tab. 9** a **obr. 22**). U zbylých měření detekovatelných koncových metabolických produktů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

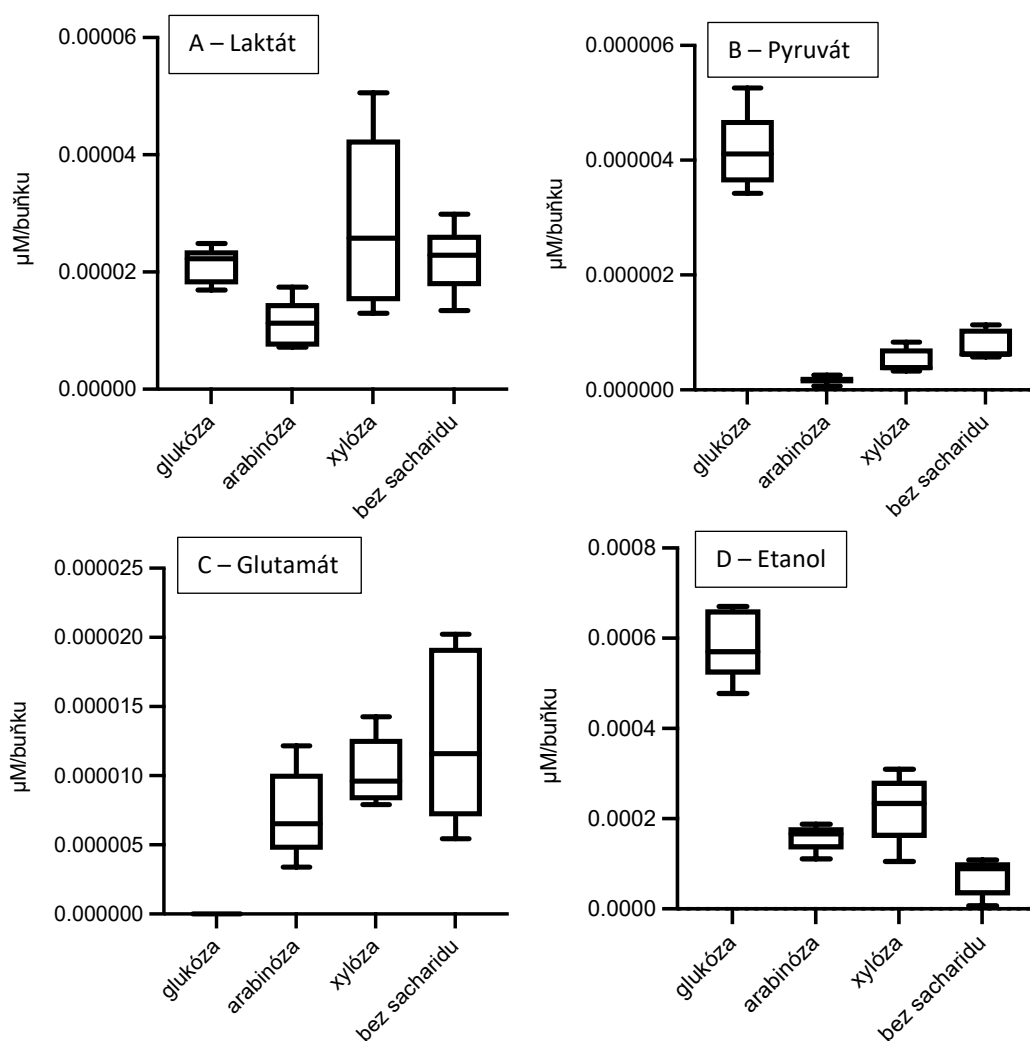
**Tab. 9** – Tabulky s dosaženými hladinami významnosti (P-value) u porovnávání produkce koncových metabolických produktů buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Zhodnocené metabolity; A – laktát, B – pyruvát, C – glutamát a D – etanol. Signifikantní hladiny významnosti jsou tučně zvýrazněné.

<b>A – laktát</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	0,2765	0,5652	0,9973
arabinóza	0,2765	–	<b>0,0261</b>	0,2048
xylóza	0,5652	<b>0,0261</b>	–	0,6802
bez sacharidu	0,9973	0,2048	0,6802	–

<b>B – pyruvát</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
arabinóza	<b>&lt;0,0001</b>	–	0,5290	0,0934
xylóza	<b>&lt;0,0001</b>	0,5290	–	0,6669
bez sacharidu	<b>&lt;0,0001</b>	0,0934	0,6669	–

<b>C – glutamát</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	<b>0,0354</b>	<b>0,0026</b>	<b>0,0003</b>
arabinóza	<b>0,0354</b>	–	0,5842	0,1246
xylóza	<b>0,0026</b>	0,5842	–	0,7068
bez sacharidu	<b>0,0003</b>	0,1246	0,7068	–

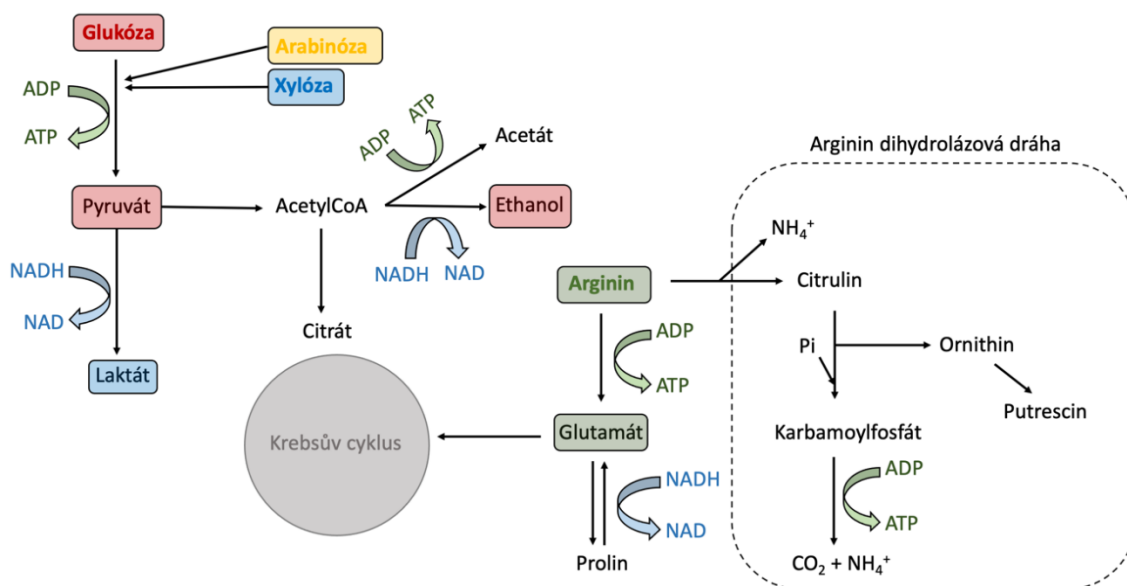
<b>D – etanol</b>	glukóza	arabinóza	xylóza	bez sacharidu
glukóza	–	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
arabinóza	<b>&lt;0,0001</b>	–	0,3559	0,1436
xylóza	<b>&lt;0,0001</b>	0,3559	–	<b>0,0053</b>
bez sacharidu	<b>&lt;0,0001</b>	0,1436	<b>0,0053</b>	–



**Obr. 22** – Grafy výsledných koncových metabolických hladin detekovatelných metabolitů u buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Pozorované metabolity; A – laktát, B – pyruvát, C – glutamát a D – etanol.

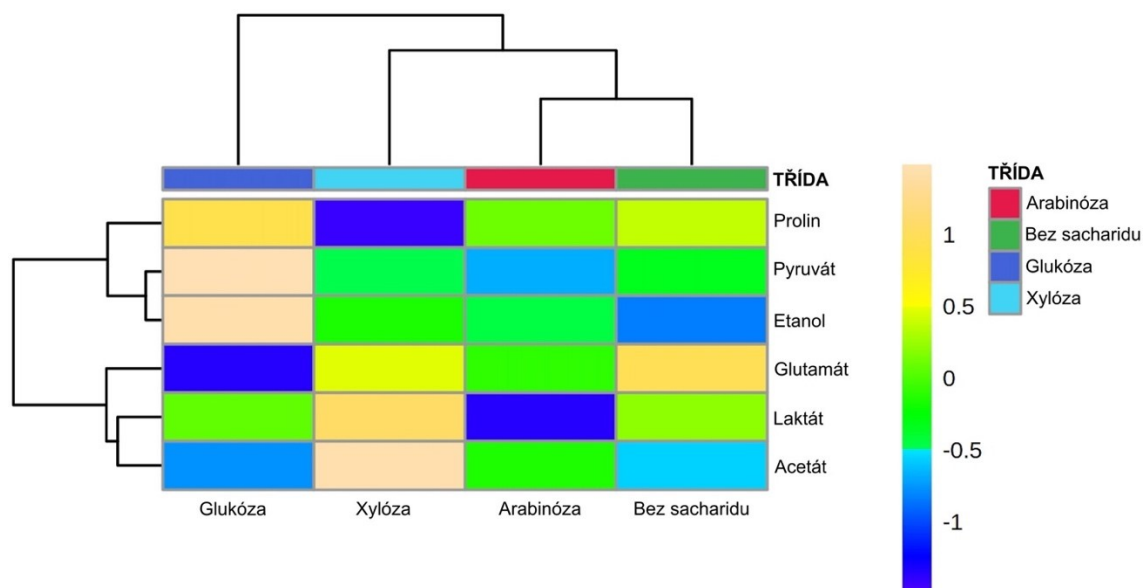
Mastigaméby pěstované v médiu s glukózou měly nejvyšší naměřené hladiny metabolitů pyruvátu a etanolu, u média s xylózou to byl laktát a u média bez přidaného sacharidu, kdy buňky využívají arginin jako zdroj energie měl nejvyšší hladinu metabolit glutamát. Načrtnuté schéma

metabolismu s testovanými zdroji energie a detekovatelné metabolity s významným odlišením jsou zobrazeny na **obr. 23**.



**Obr. 23** – Načrtnuté schéma metabolismu buněk *M. balamuthi* s výslednými koncovými metabolity, které byly detekovatelné a významně se statisticky odlišovaly (pyruvát, laktát, ethanol, glutamát).

Arabinóza neměla v detekovatelných a statisticky významně odlišných metabolitech koncový produkt, který by převyšoval hladinu ostatních. Po detailní klastrové analýze v MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) z průměrných hodnot pentaplikátů vyšlo najevo, že je arabinóza nejvíce podobná argininu, tj. médiu bez přidaného sacharidu (**obr. 24**).



**Obr. 24** – Detailní klastrová metabolická analýza (MetaboAnalyst 5.0).

## 5.6 Shrnutí získaných výsledků

Získané výsledky v této práci byly seskupeny a porovnány do **tab. 10** a **tab. 11**. Všechny měřené parametry či vlastnosti buněk *M. balamuthi* byly mezi sebou hodnoceny napříč různými zdroji energie; glukóza, arabinóza, xylóza a bez přidaného sacharidu, kde améby *M. balamuthi* využívaly jako zdroj energie aminokyselinu arginin. Hodnocení probíhalo podle následujícího konsensu: čtyři hvězdičky znamenaly největší nárůst buněk a jedna hvězdička nejmenší růst buněk. Stejným systémem bylo provedeno hodnocení generační doby, velikosti buněk, cirkularity, kulatosti, motility a počtu jader. Nejlepšího hodnocení (čtyři hvězdičky) generační doby dosahovaly buňky v médiu, které měly nejkratší generační dobu.

**Tab. 10** – Shrnující tabulka se všemi získanými výsledky ohledně buněk *M. balamuthi*. Do bodového hodnocení byly zahrnuty pouze parametry týkající se fyziologie buňky, které jsou tučně zvýrazněné a podtržené.

	<b>glukóza</b>	<b>arabinóza</b>	<b>xylóza</b>	<b>bez sacharidu</b>
<b><u>Růst</u></b>	*	****	***	**
Generační doba	***	****	**	*
<b><u>Velikost buněk</u></b>	***	**	****	*
Cirkularita	**	***	*	****
Kulatost	***	**	*	****
<b><u>Motilita</u></b>	*	***	****	**
Počet jader	***	**	****	*
Encystace	–	ano	–	–
Metabolomika	etanol	acetát	acetát	acetát
<b>BODOVÉ SHRNUTÍ</b>	<b>5/12</b>	<b>9/12</b>	<b>11/12</b>	<b>5/12</b>

**Tab. 11** – Shrnující tabulka s průměrnými hodnotami měřených parametrů se směrodatnými odchylkami.

	<b>glukóza</b>	<b>arabinóza</b>	<b>xylóza</b>	<b>bez sacharidu</b>
<b>Růst (nejvyšší dosažený počet buněk na stěně a celkem)</b>	4,0E5 ± 1,8E5 3,6E ± 8,7E5	9,9E5 ± 5,1E4 5,5E6 ± 1,3E5	3,7E6 ± 4,2E5 5,3E6 ± 3,6E5	2,8E6 ± 1,9E5 4,0E6 ± 2,3E5
<b>Velikost buněk (µm<sup>2</sup>)</b>	403 ± 221	383 ± 206	662 ± 279	272 ± 114
<b>Tvar buněk</b>	0,31 ± 0,13	0,38 ± 0,14	0,21 ± 0,09	0,47 ± 0,14
<b>Motilita (µm/s)</b>	1,21 ± 0,74	2,75 ± 1,46	3,41 ± 1,76	1,71 ± 1,29
<b>Počet jader</b>	6 ± 4	5 ± 3	7 ± 4	5 ± 3

Po vyhodnocení statisticky významných rozdílů lze soudit, že glukóza je méně preferovaným zdrojem energie než pentózy.

## 6 Diskuse

O celkovém metabolismu *Mastigamoeba balamuthi* se doposud ví pouze málo. Mnoho poznatků je založených na nedávné sekvenaci genomu (Žárský et al., 2021) a z dřívější studie, v níž autoři charakterizovali evoluční rozmanitost redukováných mitochondriálních organel pomocí průzkumu exprimovaných sekvenčních značek u *M. balamuthi* a jejího příbuzného lidského parazita *Entamoeba histolytica* (Gill et al., 2007). V této práci byla ověřována data získaná z genomu, tedy zda je *M. balamuthi* schopna metabolizovat pentózy xylózu a arabinózu. Kromě glukózy a zmíněných pentóz je *M. balamuthi* zřejmě přizpůsobena využívat při nedostatku sacharidů i další zdroj energie, a to aminokyseliny; arginin prostřednictvím arginin-dihydrolázové dráhy a případně i threonin při jeho degradaci na konečný produkt pyruvát. V tomto případě se může pyruvát dále zapojovat do metabolismu a produkovat ATP. K posouzení, který zdroj energie je preferovaným, byly hodnoceny morfologické a fyziologické vlastnosti včetně růstu a velikosti buněk, pohyblivost a počtu jader.

Jedním z prvních experimentů této práce byla sedmidenní růstová analýza *M. balamuthi* na různých zdrojích energie: glukóza, arabinóza, xylóza a bez přídavku sacharidu, kdy buňky rostly na aminokyselinách. Růstová analýza probíhala v biologických triplikátech a byl měřen počet buněk přisedlých ke stěně zkumavky i plovoucích volně v médiu. Z výsledků na obr. 1, na straně 24 a 25 vyplývá, že největší nárůst buněk byl v médiu s arabinózou, následován médiem s xylózou, médiem bez přídavku sacharidu a na závěr médiem s glukózou. Zde buňky dosáhly nejvyššího počtu pátý den od počátku růstové analýzy, zatímco buňky na ostatních zdrojích energie měly nejvyšší dosažený počet buněk poslední, tj. sedmý den sledované růstové analýzy. Otázkou je, zdali by buňky dosahovaly vyššího počtu buněk při delší růstové analýze nebo by se jejich růst zastavil. K zastavení růstu by pravděpodobně došlo po vyčerpání živin, životního prostoru či při vysokých hladinách odpadních produktů metabolismu.

Statistické zhodnocení překvapivě ukázalo, že u celkového počtu buněk napříč médii nebyl statisticky významný rozdíl. Signifikantní rozdíly byly u volně plovoucích buněk v médiu a u buněk přisedlých ke stěně zkumavky. V médiu s glukózou a arabinózou bylo větší množství buněk plovoucích volně v médiu než u média s xylózou a bez přídavku sacharidu; a naopak vyšší počet buněk přisedlých ke stěně zkumavky byl pozorován u média s xylózou a bez přídavku sacharidu ve srovnání s médiem s glukózou a arabinózou.

Z exponenciální fáze růstu z triplikátů růstové analýzy byla vypočítána průměrná generační doba na různých zdrojích energie. Stejně jako u celkového počtu buněk, nebyly ani zde zjištěny statisticky významné rozdíly. Nejkratší průměrnou generační dobu měly buňky v médiu s arabinózou 13 h 50 min, následovalo médium s glukózou 14 h 53 min, s xylózou 15 h 50 min a bez přídavku

sacharidu 20 h 15 min. Rozdíl mezi nejkratší a nejdelší zjištěnou průměrnou generační dobou byl 6 h 25 min.

První hlavní zjištění této práce se týkalo rozdílného vzhledu buněk pozorovaných světelným mikroskopem (obr. 7, strana 31). Hned na první pohled je zřejmé, že se mastigaméby v médiích s různým zdrojem energie velikostně i tvarově odlišují. Proto bylo dalším cílem této práce, zhodnotit vliv různých zdrojů energie na velikost buněk *M. balamuthi*. Velikost byla hodnocena u buněk, které byly pěstovány 24 h na petriho miskách. Aby nedošlo k zaplnění prostoru pro růst a získaná data bylo snazší analyzovat, nasazený počet buněk byl minimální. Statistické vyhodnocení ukázalo, že buňky v médiu s xylózou byly největší a v médiu bez přidané sacharidu nejmenší. Buňky pěstované v médiu s arabinózou a glukózou nejevily statisticky významný rozdíl ve velikosti buněk, byly však menší než buňky v médiu s xylózou a větší než buňky v médiu bez přidaného sacharidu. Tyto buňky se mohou označit jako buňky středně velké a mají více plovoucích buněk volně v médiu než buňky pěstované na xylóze a bez přidaného sacharidu. Z toho lze usuzovat, že pouhá velikost buněk nemusí být znakem životaschopnosti. Na základě získaných statistických dat, kdy hladina významnosti byla menší než 0,0001 mimo zmíněné zdroje glukózu a arabinózu, je zřejmé, že různé zdroje energie statisticky významně ovlivňují velikost buněk.

Jako další parametr v morfologii buněk byl hodnocen tvar buněk *M. balamuthi*, cirkularita a kulatost. Cirkularita se ukázala jako vhodný parametr pro rozlišování buněk pěstovaných na různých zdrojích energie, statisticky se významně lišily všechny zdroje energie. V případě parametru kulatosti (roundness) nedosahovaly statisticky významného rozdílu buňky pěstované v médiu s arabinózou a glukózou.

Buňky pěstované v médiu bez sacharidu měly největší cirkularitu (0,47) s minimálním větvením panožek do stran; jejich velikost je v porovnání s ostatními buňkami pěstovaných na jiných zdrojích energie nejmenší a při růstové analýze měly vyšší počet buněk přisedlých ke stěně zkumavky než buňky v médiu s glukózou a arabinózou. Následovaly buňky pěstované na glukóze (0,31) a arabinóze (0,38), které měly více větvené panožky do stran než buňky pěstované v médiu bez sacharidu. Jejich velikost byla střední; byly větší než buňky bez sacharidu a menší než buňky na xylóze. Při růstové analýze měly vysoký počet buněk volně v médiu a nízký počet buněk přisedlých ke stěně zkumavky. Nejméně cirkulární buňky s nejvíce rozvětvenými panožkami byly buňky pěstované v médiu s xylózou (0,21), které měly největší velikost a v růstové analýze měly nejvíce přisedlých buněk ke stěně zkumavky ve srovnání s ostatními zdroji energie.

Další otázka, na kterou byla hledána odpověď je, zdali se různá velikost buněk odrazí ve změně v počtu jader. Buňky *M. balamuthi* byly inkubovány 24 h v petriho miskách na krycích sklíčkách, ze kterých byly připraveny trvalé preparáty. Z výsledných dat byl zjištěn maximální a průměrný počet jader na buňku. Při porovnání dat z této práce (tab. 6, strana 35) s daty ze studie Chavez a kol. (1986), kde je uveden průměrný počet jader na buňku 15 a počet jader se pohyboval od 1 do 46 (bylo zkoumáno 113 buněk *M. balamuthi*), jsou získaná data z této práce nižší

(PYGC médium s glukózou průměrný počet jader je 5,83). Chavez a kol. (1986) sdělují, že dvoujaderné formy se vyskytují zřídka a že jednojadernost je v axenické kultuře spíše přechodným než stabilním stavem. Ve studii však nebylo zmíněno, jak staré kultury buněk byly měřeny na počet jader, což může být důvod, proč v této práci bylo dosaženo nižšího průměrného počtu jader, neboť buňky byly kultivovány na petriho miskách 24 h. Je možné, že po delší kultivaci by dosahovaly vyššího počtu jader. Statistické zhodnocení dat z této práce ohledně počtu jader u buněk na různých zdrojích energie ukázalo významné rozdíly v médiu s xylózou vs. arabinózou ( $P = 0,0021$ ) a xylózou vs. bez sacharidu ( $P = 0,0063$ ). Spojením naměřených dat ohledně velikosti buněk a počtu jader byl získán graf (obr. 12, strana 36) znázorňující korelaci mezi těmito parametry. Pearsonův korelační koeficient ( $r = 0,8233$ ) naznačuje silnou a významnou korelaci mezi měřenými parametry velikosti buněk a počtu jader, a proto byl pouze jeden z těchto parametrů zahrnut do shrnujícího celkového zhodnocení morfologie a fyziologie buněk *M. balamuthi*, viz níže.

Do hodnocení fyziologie buněk byla zahrnuta motilita buněk na různých zdrojích energie. Z trajektorií buněk, které byly zachyceny na petriho miskách po 24 h kultivaci, byly vypočítány průměrné rychlosti. Po statistickém zhodnocení vyšly najevo pentózy xylóza a arabinóza jako zdroje energie, na kterých se buňky pohybují rychleji než na glukóze či bez sacharidu, kde využívají aminokyseliny jako zdroj energie. Pentózy zde mohou být preferovaným zdrojem energie za předpokladu, že vyšší rychlost pohybu buněk znamená dostatek energie pro rychlou expanzi a zaplnění okolního prostoru. Ve studii Witkowski a kol. (2012) uvádí, že nedostatek dusíku a fosfátu snižuje motilitu u *Navicula* sp. Oproti tomu ve studii Daglio a kol. (2016) došli k závěru, že diatoma *Halamphora luciae* reaguje na nedostatek fosfátu zvýšenou motilitou i vyšším počtem pohybujících se buněk a ke snížení motility došlo až při omezení dusíku. V předkládané práci byla vyšší rychlost pohybu améb považována za lepší kondici. Jak bylo zmíněno výše, vyšší rychlost pohybu odpovídá vyšší produkci energie, která je k aktivnímu pohybu potřebná; současně vlivem krátké kultivace (24 h) na petriho miskách by buňky měly mít stále dostatek živin z relativně čerstvého média.

V celkovém zhodnocení morfologie a fyziologie buněk *M. balamuthi* dle tab. 10 na straně 47 vychází jako preferovaný zdroj energie xylóza, která dosáhla nejvyšší bodového hodnocení. Hodnocené parametry byly: růst, velikost a motilita buněk *M. balamuthi*. Tvar a velikost buněk může mimo jiné souviset s růstovými analýzami, kdy tyto parametry morfologie buněk mohou ovlivňovat, zdali mají buňky dost prostoru pro přisednutí na stěnu zkumavky či nikoli. U buněk pěstovaných v médiu bez sacharidu byly buňky nejmenší a nejvíce zakulacené, díky čemuž mohly zaplnit vyšším počtem buněk stejně velkou plochu oproti glukóze a arabinóze, kde převládaly buňky plovoucí volně v médiu. Buňky pěstované v médiu s xylózou měly nejvíce buněk přisedlých ke stěně, ale zároveň měly největší velikost. Důvodem může být fakt, že jejich tvar byl nejméně zakulacen, byly více protáhlé a rozvětvené do všech stran, čímž se buňky mohly různě přizpůsobovat a zaplňovat povrch stěny. Druhým možným vysvětlením je, že buňky měřené v růstových analýzách plovoucí volně v médiu nemusely být životaschopné améby, ale případně cysty, nebo buňky, které již umíraly.

Tím by se ještě více potvrdilo, že je xylóza preferovaným zdrojem energie, jelikož měla největší počet naměřených buněk přisedlých ke stěně zkumavky viz obr. 2 na straně 26 a 27. Proto bylo navrženo nahradit v kultivačním médiu *M. balamuthi* všeobecně používanou hexózu xylózou.

Další vliv mohla mít na pohyb a velikost buněk doba kultivace; v této práci bylo pro hodnocení morfologie a fyziologie buněk prováděno měření po 24 h kultivace v petriho miskách. Otázkou zůstává, jakou by měly buňky velikost a rychlost pohybu po dvojnásobně dlouhé příp. ještě delší kultivaci.

V této práci byla také zkoumána schopnost encystace buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie. Z výsledných dat vyšlo najevo, že exkretované metabolity do média neměly vliv na tvorbu sedimentu s případnými cystami. Sediment odebraný ze 7 dní starých kultur buněk byl dle Wesela a kol. (2021) ošetřen 15 min v 0,1% sarkosylu a následně barven kalkofluorem. Kulaté objekty byly po ošetření sarkosylem pozorovány pouze u média s arabinózou, které však nebyly barveny kalkofluorem. Po delším pozorování pod mikroskopem bylo na preparátu obarveno vše včetně artefaktů.

Dále bylo vyzkoušeno barvení sedimentu kalkofluorem ze 21 dní starých kultur buněk *M. balamuthi* v médiu s glukózou a arabinózou. Ani v jednom případě nedošlo k nabarvení kulatých objektů, byly obarveny pouze artefakty. Následně byly barveny kalkofluorem dvě kultury buněk fixovaných formaldehydem; ty se barvily modře. Další kultura buněk nebyla fixována, ale pouze barvena kalkofluorem přidaným do média. U této kultury byla pozorována změna vzhledu buněk. Buňky byly zakulaceny a zřejmě začaly postupně odumírat. Tyto buňky se posléze začaly barvit modře. V buňkách *M. balamuthi* se pravděpodobně vyskytují zásobní polysacharidy či další sloučeniny obsahující  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 vazby, na které je kalkofluor schopen se navázat a barvit je.

V dalším kroku bylo testováno, zdali se kalkofluorem budou barvit živé buňky, případně cysty v kultuře. Do nově přeočkovaných kultur buněk *M. balamuthi* byl přidán kalkofluor ve finální koncentraci 0,001% dle Harringtona a Hageage (2003). Třetí den byly kultury buněk zkontrolovány pod mikroskopem, barvení potenciálních cyst nebylo pozorováno, a proto bylo přidáno znova stejné množství kalkofluoru. Kultivace probíhala celkem 7 dní. V obou případech byly obarveny pravděpodobně buněčné pozůstatky nebo umírající buňky. Nebylo pozorováno barvení cyst kalkofluorem, a pokud ano, nacházely se ve shluku na obr. 20 strana 43. Za podmínek použitých v této práci nebyla případná chitinová buněčná stěna barvena.

Chavez a kol. (1986) pozorovali tvorbu cyst ve starých kulturách buněk *M. balamuthi* pěstovaných v PY médiu, které je oproti PYGC médiu chudší na organické sloučeniny. Tyto cysty byly rezistentní vůči přípravku Vagisec a tvorba cyst se zvyšovala s úbytkem živin. Excystaci bylo možné vyvolat přenesením cyst do čerstvého média (Chavez et al., 1986). V této práci bylo celou dobu používáno PYGC médium, které je bohatší na organické sloučeniny a glukóza byla nahrazována jiným sacharidem nebo nebyla přidána. Kromě organicky chudšího PY média byly ve studii Chavez a kol. (1986) přidávány do média bakterie *E. coli*. Tyto dva aspekty mohou mít

významný vliv na tvorbu cyst. V médiu, které bylo používáno v této práci nebyly zahrnuty. Stáří buněčných kultur, bohatší médium a axenická kultivace by mohly být důvody, proč nebyly v našem případě barvením kalkofluorem potvrzeny cysty.

Kromě barvení kalkofluorem byly sledovány některé ze znaků cyst u *E. histolytica* (Wesel et al., 2021). Kulatý tvar a menší velikost jsou viditelné na některých útvarech z mikroskopických snímků; odolnost vůči detergentu byla prokázána pouze u cyst z média s arabinózou, nedošlo však k nabarvení chitinové stěny kalkofluorem; poslední uvedený znak, vícejadernost cyst, nebyla v této práci sledována.

Další část této práce byla zaměřena na inhibici karbamát kinázy, klíčový enzym v posledním kroku ADH dráhy. Jak bylo zjištěno ve studii Novák a kol. (2016), jedná se o relativně rozšířenou metabolickou dráhu mezi eukaryoty, včetně *M. balamuthi*. Galkin a kol. (2014) ukázali, že enzym CK z *G. intestinalis* je nezbytný pro přežití trofozoitů a jeho aktivita může být z 50 % inhibována disulfiramem při koncentraci 0,64  $\mu\text{M}$  a růst buněk je ovlivněn při koncentracích 0,75–3,1  $\mu\text{M}$ .

V této práci byl vyzkoušen účinek inhibitoru disulfiramu na mastigaméby v médiu bez sacharidu, v němž by mohly být závislé na aktivitě karbamát kinázy v porovnání s mastigamébami pěstovaných na glukóze, které by měly získat většinu ATP z glykolýzy. Byla zjištěna nejpříhodnější koncentrace disulfiramu a vliv jeho různých koncentrací na růst buněk *M. balamuthi* pěstovaných ve výše zmíněných médiích. Disulfiram měl ve většině případů vliv jak na buňky v médiu bez sacharidu, tak i na buňky pěstované na glukóze, kde byl pozorován stimulační efekt. Pro sedmidenní růstovou analýzu v biologických triplicátech v médiu bez přídavku sacharidu byla vybrána koncentrace 250  $\mu\text{M}$ . Tato koncentrace však neinhibovala růst buněk, proto bylo dále rozhodnuto nepokračovat s touto chemikálií do dalších experimentů. Jeden z důvodů, proč inhibice růstu buněk disulfiramem nebyla úspěšná, by mohl spočívat v přítomnosti dráhy degradace threoninu. Gill a kol. (2007) prokázali, že *M. balamuthi* má minimálně 2 ze 4 enzymů této dráhy. Konečným produktem této dráhy je pyruvát, který se pak může účastnit dalšího metabolismu a buňky tak mohou produkovat ATP přes prodlouženou glykolýzu, aniž by využívaly ADH dráhu. Disulfiram je však schopen inhibovat desítky dalších drah (viz [https://www.brenda-enzymes.org/ligand.php?brenda\\_ligand\\_id=986](https://www.brenda-enzymes.org/ligand.php?brenda_ligand_id=986)). Jeho účinek v této práci byl zcela odlišný od výsledků Galkin a kol (2014), kde úspěšně inhiboval růst trofozoitů *G. intestinalis*. Namísto hledání vhodného inhibitoru bylo vyvinuto definované médium, ve kterém by bylo možné manipulovat s jeho jednotlivými složkami včetně množství argininu a threoninu.

Z důvodu přítomnosti L-argininu jako nedílné součásti PYGC média a ve světle dat z experimentu s inhibitorem karbamát kinázy, bylo v této práci vyvinuto definované médium, ve kterém by bylo možné manipulovat s jednotlivými složkami a studovat biologickou odpověď *M. balamuthi* na různé zdroje energie. Přejít buněk *M. balamuthi* z PYGC média na DFM byl uskutečněn postupným ředěním PYGC média DFM. Rychlost růstu byla zpočátku velmi malá, a proto bylo upraveno množství esenciálních a neesenciálních aminokyselin a byly přidány mastné

kyseliny a vitamínový mix. Za těchto podmínek se rychlost růstu postupně zvyšovala a stabilizovala. Buňky *M. balamuthi* se dlouho adaptovaly (11 měsíců), a z tohoto důvodu nebyly uskutečněny experimenty s tímto médiem. Experimenty, které mohly být provedeny s DFM médiem jsou růstové analýzy na různých zdrojích energie jako je glukóza, arabinóza, xylóza, bez přidaného sacharidu, bez přidaného sacharidu s odebraným argininem, bez přidaného sacharidu s odebraným threoninem a bez přidaného sacharidu s odebraným argininem i threoninem, kde by mohl být předpokládán zánik kultury buněk *M. balamuthi*. Pokud by buňky *M. balamuthi* rostly v DFM bez přidaného sacharidu a bez threoninu, mohla by se opět vyzkoušet optimální koncentrace disulfiramu pro inhibici buněk závislých na aktivitě karbamát kinázy v ADH dráze. Tím by případně bylo ověřeno, zdali a jak moc buňky *M. balamuthi* využívají ADH dráhu k zisku ATP. Další pokusy by mohly být zaměřeny na porovnání velikosti a tvaru buněk, počtu jader a rychlost pohybu buněk na různých zdrojích energie, kde by bylo více kontrolované, jaký zdroj energie je využíván. Opět by bylo možné provést analýzu koncových metabolických produktů metabolismu buněk *M. balamuthi*, případně i ověření tvorby cyst přidáním rýžového prášku a bakterií *E. coli* do organicky chudšího PY média v porovnání s DFM médiem.

Další metodou, kterou byl zkoumán vliv různých zdrojů energie na buňky *M. balamuthi*, byla analýza koncových metabolických produktů metabolismu buněk *M. balamuthi* v závislosti na různých zdrojích energie. Měření probíhalo v pentaplikátech a byla testována přítomnost následujících metabolitů: pyruvátu, laktátu, citrátu, sukcinátu, acetátu, etanolu, glutaminu, glutamátu a prolinu. Sukcinát, citrát a glutamin nebylo možno naměřit, neboť se jejich množství pohybovalo pod hladinou detekce. U detekovatelných koncových metabolitů pyruvátu, laktátu, glutamátu, etanolu, acetátu a prolinu měly statisticky významné rozdíly pyruvát, laktát, glutamát a etanol. Acetát a prolin se napříč různými zdroji energie statisticky významně nelišily. Sukcinát a citrát jsou produkty v Krebsově cyklu. Absence jejich hladin při měření by mohla napovídat tvrzení ze studie Gill a kol. (2007), že *M. balamuthi* pravděpodobně nemá funkční Krebsův cyklus, pouze jsou přítomny některé enzymy, které však pro svou nedostatečnou provázanost nemohou tvořit celý Krebsův cyklus. Další roli mohl hrát enzym nalezený v genomu *M. balamuthi* – citrát lyáza, jenž zpracovává citrát na oxalacetát a CoA.

Z výsledků metabolické analýzy (obr 21. strana 44) je patrné, že na různých zdrojích energie dosahovaly buňky *M. balamuthi* rozdílné koncentrace koncových metabolických produktů a lišila se i jejich celková dosažená hladina. Rozdíl v celkové dosažené hladině koncových metabolických produktů by mohl být odůvodněn rychlejším zpracováváním glukózy oproti ostatním zdrojům energie, nebo i nižší sekrecí metabolitů do okolního prostředí. Další možné vysvětlení by mohlo zahrnovat fakt, že *M. balamuthi* má další koncové metabolické produkty, které nebyly měřeny v této práci a které produkuje v nepřítomnosti glukózy.

Buňky *M. balamuthi* pěstované v médiu s glukózou měly nejvyšší naměřené hladiny metabolitů pyruvátu a etanolu, u média s xylózou to byl laktát a u média bez přidaného sacharidu, kdy buňky využívají aminokyseliny jako zdroj energie, měl nejvyšší hladinu metabolit glutamát (obr. 22 a 23 strana 45,46). Arabinóza neměla statisticky významný detekovaný metabolit, který by významně převyšoval hladinu ostatních. Po detailní klastrové analýze (obr. 24 strana 46) z průměrných hodnot pentaplikátů vyšlo najevo, že je arabinóza nejvíce podobná médiu bez přidaného sacharidu. Překvapivě si zde pentózy nejsou podobné, i když se zapojují do stejné dráhy. Dochází tedy pravděpodobně k jiné signalizaci, případně jsou enzymy, které vedou na společný metabolit, jinak aktivní. To nasvědčuje tomu, že arabinóza pravděpodobně není preferovaným zdrojem energie před xylózou či glukózou, které zauímají vyšší podíl v hemicelulóze, ze které je *M. balamuthi* schopna čerpat energii díky získaným genům pro degradaci rostlinné buněčné stěny.

V genomu *M. balamuthi* byl nalezen široký soubor enzymů a transportérů metabolitů potřebných pro rozklad a využití polymerů rostlinné buněčné stěny (Žárský et al., 2021). Jedná se pravděpodobně o adaptaci, která umožňuje žít se rostlinnými zbytky v anoxických sedimentech, ve kterých by se *M. balamuthi* mohla vyskytovat. Příbuzné volně žijící Archamoebae můžeme nalézt ve sladkovodních i mořských sedimentech, stojatých vodách anebo v bahnitém substrátu na okrajích rybníků a řek (Page, 1970; Jacob & Patterson, 1990; Bernard et al., 2000; Frolov et al., 2004). *M. balamuthi* byla nalezena ve volné přírodě pouze jednou, a to ve studni v západní Africe. Přítomnost enzymů pro degradaci buněčné stěny rostlin by mohla naznačovat, že preferovaným biotopem je vodní zdroj obklopený flórou, v jehož anaerobní vrstvě využívá *M. balamuthi* pentózy jako zdroj energie. Xylany jsou nejrozšířenější hemicelulózou ve dřevě listnatých stromů. Jejich podíl představuje 17,4% suché váhy dřeva, ve srovnání s glukózou, nejčastějším sacharidem, který tvoří 50% (Jeffries, 1983). Tvrzení, že je xylóza preferovaným zdrojem energie koreluje s množstvím xylózy ve dřevě, kde je arabinóza ve srovnání s xylózou mnohem méně zastoupena. Celulóza má však největší celkové zastoupení v buněčné stěně rostlin, která je složena z glukózových podjednotek spojených glykosidickou vazbou  $\beta$ -1,4. Po vyhodnocení statisticky významných rozdílů z této práce vychází najevo, že glukóza se zdá být méně preferovaným zdrojem energie, a to i přes nejhojnější výskyt v porovnání s pentózou xylózou. Do budoucna by se mělo zvážit nahrazení glukózy v kultivačním médiu preferovanou xylózou.

## 7 Závěr

V této diplomové práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o životním cyklu, metabolismu a zdrojích energie, které je schopna *M. balamuthi* využívat k produkci ATP.

Praktická část této práce si kladla za úkol ověřit získané informace z genomu *M. balamuthi*, a to konkrétně její schopnost metabolizovat pentózy a případně zjistit, který zdroj energie je preferovaný. Pomocí kultivace buněk *M. balamuthi* na různých zdrojích energie a sérií experimentů zahrnujících hodnocení buněčné morfologie a fyziologie, byla zjištěna preference pentózy xylózy, jako zdroje energie pro *M. balamuthi*.

## 8 Seznam použitých zkratek

Acetyl-P	Acetylfosfát
Ack	Acetát kináza
ACS	Acetyl-CoA syntetáza
ADH	Arginin dihydrolázová dráha
ADI	Arginin deimináza
ADP	Adenosindifosfát
AKL	$\alpha$ -amino- $\beta$ -ketobutyrate CoA ligáza
APSK	Adenosin-5-fosfosulfát kináza
AS	Sulfuryláza
ATP	Adenosintrifosfát
CBD	Chitinové vazebné domény bohaté na cystein (chitin-binding domain)
CK	Karbamát kináza
CoA	Koenzym A
DAPI	4,6-diamidin-2-fenylindol
DFM	Definované médium pro kultivaci buněk <i>M. balamuthi</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fd	Ferredoxin
Gal/GalNAc	Galaktóza/N-acetylgalaktosamin
GCS	Metabolismus pro štěpení glycinu (glycine cleavage system)
Hyd	Hydrogenáza
LDH	Laktát dehydrogenáza
ME	Jablečný enzym (malic enzyme)
NAD <sup>+</sup>	Oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
NADH	Redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu
NADP <sup>+</sup>	Oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NADPH	Redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
OTC	Ornitinkarbamoyl transferáza
PDH	Pyruvátdehydrogenázový komplex
PFL	Pyruvátformát lyáza
PFO	Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza
Pi	Anorganický fosfát
PNO	Pyruvát:NADP <sup>+</sup> oxidoreduktáza
PPi	Pyrofosfát

PY médium	Organicky chudší médium pro kultivaci buněk <i>M. balamuthi</i> (proteose peptone-yeast extract)
PYGC médium	Médium pro kultivaci buněk <i>M. balamuthi</i> (proteose peptone-yeast extract-glucose-cysteine)
SHMT	Serin hydroxymetyltransferáza
TCA	Krebsův cyklus (tricarboxylic acid cycle)
TMD	Transmembránová doména (transmembrane domain)
XfP	Bifunkční fosfoketoláza xylulóza-5-fosfát/fruktóza-6-fosfát

## 9 Literatura

- Abdelal, A. T.** (1979). Arginine catabolism by microorganisms. *Annual Review of Microbiology*. **33**, 139–168.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L.** (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*. **33**, 21–28.
- Allen, A. E., Dupont, C. L., Oborník, M., Horák, A., Nunes-Nesi, A., McCrow, J. P., Zheng, H., Johnson, D. A., Hu, H., Fernie, A. R., & Bowler, C.** (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*. **473**, 203–207.
- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F. M., & Díez, B.** (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology*. **9**, 149–156.
- Andersson, J. O., Sjögren, Å. M., Horner, D. S., Murphy, C. A., Dyal, P. L., Svärd, S. G., Logsdon, J. M., Ragan, M. A., Hirt, R. P., & Roger, A. J.** (2007). A genomic survey of the fish parasite *Spironucleus salmonicida* indicates genomic plasticity among diplomonads and significant lateral gene transfer in eukaryote genome evolution. *BMC Genomics*. **8**, 51.
- Arisue, N., Hashimoto, T., Lee, J. A., Moore, D. v., Gordon, P., Sensen, C. W., Gaasterland, T., Hasegawa, M., & Müller, M.** (2002). The phylogenetic position of the pelobiont *Mastigamoeba balamuthi* based on sequences of rDNA and translation elongation factors EF-1alpha and EF-2. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **49**, 1–10.
- Bapteste, E., Brinkmann, H., Lee, J. A., Moore, D. v., Sensen, C. W., Gordon, P., Duruflé, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Müller, M., & Philippe, H.** (2002). The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 1414–1419.
- Bernard, C., Simpson, A. G. B., & Patterson, D. J.** (2000). Some free-living flagellates (protista) from anoxic habitats. *Ophelia*. **52**, 113–142.
- Bettiga, M., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M. F.** (2008). Comparing the xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology for Biofuels*. **1**.
- Biagini, G. A., Yarlett, N., Ball, G. E., Billetz, A. C., Lindmark, D. G., Martinez, M. P., Lloyd, D., & Edwards, M. R.** (2003). Bacterial-like energy metabolism in the amitochondriate protozoon *Hexamita inflata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **128**, 11–19.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. **344**, 1879–1900.
- Campos-Góngora, E., Ebert, F., Willhoeft, U., Said-Fernández, S., & Tannich, E.** (2004). Characterization of chitin synthases from Entamoeba. *Protist*. **155**, 323–330.

- Casiano-Colon, A., & Marquis, R. E.** (1988). Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, 1318–1324.
- Chatterjee, A., Ghosh, S. K., Jang, K., Bullitt, E., Moore, L., Robbins, P. W., & Samuelson, J.** (2009). Evidence for a “wattle and daub” model of the cyst wall of *Entamoeba*. *PLOS Pathogens*. **5**, e1000498.
- Chavez, L. A., Balamuth, W., & Gong, T.** (1986). A light and electron microscopical study of a new, polymorphic free-living amoeba, *Phreatamoeba balamuthi* n. g., n. sp. *The Journal of Protozoology*. **33**, 397–404.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., & Stalon, V.** (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological Reviews*. **50**, 314–352.
- Dagenais-Bellefeuille, S., & Morse, D.** (2013). Putting the N in dinoflagellates. *Frontiers in Microbiology*. **4**.
- Daglio, Y., Maidana, N. I., Matulewicz, M. C., & Rodríguez, M. C.** (2016). Changes in motility and induction of enzymatic activity by nitrogen and phosphate deficiency in benthic *Halamphora luciae* (Bacillariophyceae) from Argentina. *Phycologia*. **55**, 493–505.
- de Vries, R. P., & Visser, J.** (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **65**, 497–522.
- Ershov, D., Phan, M.-S., Pylvänäinen, J. W., Rigaud, S. U., Blanc, L. le, Charles-Orszag, A., Conway, J. R. W., Laine, R. F., Roy, N. H., Bonazzi, D., Duménil, G., Jacquemet, G., & Tinevez, J.-Y.** (2021). Bringing TrackMate in the era of machine-learning and deep-learning. *BioRxiv*.
- Fang, Z., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W.** (2018). Isomerases and epimerases for biotransformation of pentoses. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **102**, 7283–7292.
- Frolov, A. O., Chystjakova, L. v, & Goodkov, A. v.** (2004). A new pelobiont protist *Pelomyxa corona* sp. n. (Peloflagellata, Pelobiontida). *Protistology*. **3**, 233–241.
- Galkin, A., Kulakova, L., Lim, K., Chen, C. Z., Zheng, W., Turko, I. v., & Herzberg, O.** (2014). Structural basis for inactivation of *Giardia lamblia* carbamate kinase by disulfiram. *Journal of Biological Chemistry*. **289**, 10502–10509.
- Gill, E. E., Diaz-Triviño, S., Barberà, M. J., Silberman, J. D., Stechmann, A., Gaston, D., Tamas, I., & Roger, A. J.** (2007). Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Molecular Microbiology*. **66**, 1306–1320.
- Glenn, K., Ingram-Smith, C., & Smith, K. S.** (2014). Biochemical and kinetic characterization of xylulose 5-phosphate/fructose 6-phosphate phosphoketolase 2 (Xfp2) from *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. **13**, 657.

- Hageage, G. J., & Harrington, B. J.** (1984). Use of Calcofluor white in clinical mycology. *Laboratory Medicine*. **15**, 109–112.
- Harrington, B. J., & Hageage, G. J.** (2003). Calcofluor white: a review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology. *Laboratory Medicine*. **34**, 361–367.
- Hausmann, K., Hülsmann, N.** (2003). Protozoologie. *Vol. Academia*.
- Hou, S., Feng, H., Gao, J., Li, Y., Yuan, W., & Bai, F.** (2017). [Fermentations of xylose and arabinose by *Kluyveromyces marxianus*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*. **33**, 923–935.
- Jacob, L., & Patterson, D. J.** (1990). Some flagellates (Protista) from tropical marine sediments. *Journal of Natural History*. **24**, 801–937.
- Jeffries, T. W.** (1983). Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **27**, 1–32.
- Kolpak, F. J., & Blackwell, J.** (1976). Determination of the structure of cellulose II. *Macromolecules*. **9**, 273–278.
- Legland, D., Arganda-Carreras, I., & Andrey, P.** (2016). MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics (Oxford, England)*. **32**, 3532–3534.
- Linstead, D., & Cranshaw, M. A.** (1983). The pathway of arginine catabolism in the parasitic flagellate *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **8**, 241–252.
- Marquis, R. E., Bender, G. R., Murray, D. R., & Wong, A.** (1987). Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**, 198–200.
- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T.** (2009). Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 21731–21736.
- Morada, M., Smid, O., Hampl, V., Sutak, R., Lam, B., Rappelli, P., Dessi, D., Fiori, P. L., Tachezy, J., & Yarlett, N.** (2011). Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **176**, 51–54.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F.** (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **76**, 444–495.

- Novák, L., Zubáčová, Z., Karnkowska, A., Kolisko, M., Hroudová, M., Stairs, C. W., Simpson, A. G. B., Keeling, P. J., Roger, A. J., Čepička, I., & Hampl, V. (2016). Arginine deiminase pathway enzymes: evolutionary history in metamonads and other eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*. **16**, 1–14.
- Nývtlová, E., Stairs, C. W., Hrdý, I., Rídl, J., Mach, J., Paques, J., Roger, A. J., & Tachezy, J. (2015). Lateral gene transfer and gene duplication played a key role in the evolution of *Mastigamoeba balamuthi* hydrogenosomes. *Molecular Biology and Evolution*. **32**, 1039–1055.
- Ogawa, S., Yoshino, R., Angata, K., Iwamoto, M., Pi, M., Kuroe, K., Matsuo, K., Morio, T., Urushihara, H., Yanagisawa, K., & Tanaka, Y. (2000). The mitochondrial DNA of *Dictyostelium discoideum*: complete sequence, gene content and genome organization. *Molecular & General Genetics*. **263**, 514–519.
- Page, F. C. (1970). *Mastigamoeba aspera* from Estuarine Tidal Pools in Maine. *Transactions of the American Microscopical Society*. **89**, 197.
- Pauly, M., & Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **54**, 559–568.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. **57**, 929–967.
- Ringqvist, E., Palm, J. E. D., Skarin, H., Hehl, A. B., Weiland, M., Davids, B. J., Reiner, D. S., Griffiths, W. J., Eckmann, L., Gillin, F. D., & Svärd, S. G. (2008). Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **159**, 85–91.
- Ruchala, J., & Sibirny, A. A. (2021). Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*. **45**.
- Ruepp, A., & Soppa, J. (1996). Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. *Journal of Bacteriology*. **178**, 4942–4947.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **30**, 279–291.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. **61**, 263–289.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. **9**, 676–682.
- Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C., & Myers, G. (2018). Cell detection with star-convex polygons. *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention*. **11071**, 265–273.

- Schofield, P. J., Edwards, M. R., Matthews, J., & Wilson, J. R.** (1992). The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **51**, 29–36.
- Schubert, K. R.** (2003). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Biology*. **37**, 539–574.
- Smutná, T., Dohnáľková, A., Sutak, R., Narayanasamy, R. K., Tachezy, J., & Hrdý, I.** (2022). A cytosolic ferredoxin-independent hydrogenase possibly mediates hydrogen uptake in *Trichomonas vaginalis*. *Current Biology*. **32**, 124–135.
- Stadelmann, B., Hanevik, K., Andersson, M. K., Bruserud, O., & Svärd, S. G.** (2013). The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions in vitro. *BMC Microbiology*. **13**, 1–11.
- Stairs, C. W., Roger, A. J., & Hampl, V.** (2011). Eukaryotic pyruvate formate lyase and its activating enzyme were acquired laterally from a Firmicute. *Molecular Biology and Evolution*. **28**, 2087–2099.
- Stokland, J. N., Siitonen, J., & Jonsson, B. G.** (2012). Biodiversity in dead wood. *Cambridge, UK: Cambridge University Press*.
- Sutter, J. M., Johnsen, U., Reinhardt, A., & Schönheit, P.** (2020). Pentose degradation in archaea: Halorhabdus species degrade D-xylose, L-arabinose and D-ribose via bacterial-type pathways. *Extremophiles*. **24**, 759–772.
- Tinevez, J. Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., & Eliceiri, K. W.** (2017). TrackMate: an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*. **115**, 80–90.
- van Dellen, K., Ghosh, S. K., Robbins, P. W., Loftus, B., & Samuelson, J.** (2002). *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-cys or 8-cys chitin-binding domains. *Infection and Immunity*. **70**, 3259.
- Wesel, J., Shuman, J., Bastuzel, I., Dickerson, J., & Ingram-Smith, C.** (2021). Encystation of *Entamoeba histolytica* in axenic culture. *Microorganisms*. **9**.
- Westbye, P., Svanberg, C., & Gatenholm, P.** (2006). The effect of molecular composition of xylan extracted from birch on its assembly onto bleached soft wood kraft pulp. *Holzforschung*. **60**, 143–148.
- Witkowski, A., Brehm, U., Palińska, K. A., & Rhiel, E.** (2012). Swarm-like migratory behaviour in the laboratory of a pennate diatom isolated from North Sea sediments. *Diatom Research*. **27**, 95–100.
- Wolfe, A. J.** (2015). Glycolysis for microbiome generation. *Microbiology Spectrum*. **3**.

- Yarlett, N., Lindmark, D. G., Golderg, B., Ali Moharrami, M., & Bacchi, C. J.** (1994). Subcellular localization of the enzymes of the arginine dihydrolase pathway in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **41**, 554–559.
- Yarlett, N., Martinez, M. P., Moharrami, M. A., & Tachezy, J.** (1996). The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **78**, 117–125.
- Ye, S., Kim, J. W., & Kim, S. R.** (2019). Metabolic engineering for improved fermentation of L-arabinose. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **29**, 339–346.
- Žárský, V., Klimeš, V., Pačes, J., Vlček, Č., Hradilová, M., Beneš, V., Nývtová, E., Hrdý, I., Pyrih, J., Mach, J., Barlow, L., Stairs, C. W., Eme, L., Hall, N., Eliáš, M., Dacks, J. B., Roger, A., & Tachezy, J.** (2021). The *Mastigamoeba balamuthi* genome and the nature of the free-living ancestor of Entamoeba. *Molecular Biology and Evolution*. **38**, 2240–2259.