Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie

Bc. Taťána Doležalová

Metabolismus mědi u *Acanthamoeba castellanii*

Copper metabolism in *Acanthamoeba castellanii*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Konzultant: Maria Grechnikova, Ph.D.

Praha, 2023

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 27. 4. 2023

Podpis ……

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Róbertu Šuťákovi, PhD za podporu, rady při psaní této práce a za možnost naučit se toho tolik nového v jeho laboratoři. Velký dík patří celému týmu laboratoře Příjmu a vnitřního metabolismu kovů za všechnu trpělivost, kterou měli s mými dotazy a nepovedenými pokusy. I have to thank especially my consultant Maria Grechnikova, PhD. for everything she taught me. She showed me how to hold a pipette properly and I have no plans to let go of it! Na závěr musím poděkovat své rodině, Honzovi a přátelům za neustálou podporu.

Abstrakt

Měď je esenciální prvek, který je díky svým redoxním vlastnostem zapojen jako kofaktor do mnoha enzymů, nejznámějším příkladem je cytochrom c oxidáza. Zároveň se tento prvek ve větší koncentraci projevuje toxickým působením na několika úrovních, dokáže narušovat železo-sirné klastry, poškozovat proteiny a vést k buněčné smrti. To je důvod, proč se tato práce zabývá metabolismem mědi u parazitické améby *Acanthamoeba castellanii*, která způsobuje vážná onemocnění jako je akantamébová keratitida či granulomatózní amébová encefalitida. Pochopení principu, kterým je udržována homeostáza mědi v tomto organismu, by mohlo vést k cílenému narušení této rovnováhy a využití toxických účinků mědi. V této práci byla na základě funkční komplementace popsána funkce ATPázy P-typu jako homologická k CCC2 ze *Saccharomyces cerevisiae*, která je zodpovědná za přenos iontů mědi z cytoplazmy do Golgiho aparátu. Dále byl popsán přenašeč z rodiny Ctr, který přenáší ionty mědi pravděpodobně přes cytoplazmatickou membránu. Byla sledována exprese těchto přenašečů v nadbytku a nedostatku mědi. Pro lepší představu, jak *A. castellanii* udržuje homeostázu mědi bylo pomocí metody ICP-MS popsáno, jaké množství mědi se v buňce akumuluje a jak je tato améba schopná vylučovat nadbytečné ionty mědí. Posledním tématem práce je užití měďnatých ionoforů jako možných nových terapeutik. Tyto látky přenáší ionty mědi do vnitřního prostředí buňky, nezávisle na jejích přenašečích, a buňka je tak vystavena vysoké koncentraci mědi. Měďnaté ionofory 8-hydroxychinolin a pyrithion sulfid se ukazují jako účinné proti *A. castellanii*.

Abstract

Copper is an essential element that, due to its redox properties, is involved as a cofactor in many enzymes, the most well-known example is the cytochrome c oxidase. At the same time, in higher concentrations, this element shows toxic effects on several levels, it can disrupt iron-sulfur clusters, damage proteins and lead to cell death. This is the reason why this thesis studies copper metabolism in the parasitic amoeba *Acanthamoeba castellanii*, which causes serious diseases such as acanthamoeba keratitis or granulomatous amoebic encephalitis. Understanding how copper homeostasis is maintained in this organism could lead to targeted disruption of this balance and the exploitation of the toxic effects of copper. In this work, the function of the P-type ATPase homologous to CCC2 from *Saccharomyces cerevisiae*, responsible for the transfer of copper ions from the cytoplasm to the Golgi apparatus, was characterized by functional complementation. Furthermore, a carrier from the Ctr family has been described that transfers copper ions presumably across the cytoplasmic membrane. The expression of these carriers was monitored in copper excess and deficiency. To get a better picture of how *A. castellanii* maintains copper homeostasis, the cellular accumulation of copper and the ability of this amoeba to deal with excess copper were described by ICP-MS. The last topic of the thesis is the use of copper ionophores as a possible new therapeutics. These substances carry copper ions into the inner cell environment, independently of their carriers, exposing the cell to high concentrations of copper. The copper ionophores 8-hydroxyquinoline and pyrithione sulphide have been shown to be effective against *A. castellanii*.

Obsah

1. Úvod 1
2. Literární přehled 2
2.1. *Acanthamoeba castellanii* 2
2.2. Měď 3
2.2.1. Obecné vlastnosti 3
2.2.2. Role mědi v imunitním systému 5
2.3. Metabolismus mědi 5
2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* 5
2.3.2. *Homo sapiens* 6
2.4. Metabolismus mědi parazitických organismů 7
2.4.1. Patogenní amfizoické améby 7
2.4.2. Apikomplexa 7
2.4.3. Kinetoplastida 8
2.4.4. Helminti 8
2.5. Ionophory 8
3. Cíle práce 11
4. Materiál a metody 12
4.1. Kultivace buněk 12
4.2. Růstová křivka 12
4.3. Klonování 12
4.3.1. Výběr proteinu 12
4.3.2. Primery 13
4.3.3. Syntéza cDNA 13
4.3.4. PCR (polymerázová řetězová reakce) 13
4.3.5. Elektroforéza 14
4.3.6. Extrakce DNA z gelu 15
4.3.7. Restrikční reakce 15
4.3.8. Ligační reakce 15
4.3.9. Transformace 16
4.4. Komplementace 17
4.4.1. Média 17

4.4.2. Transformace kvasinek 19
4.4.3. Komplementace 19
4.5. Lokalizace proteinu 19
4.5.1. Transformace améb 19
4.5.2. Fluorescenční mikroskopie 20
4.6. IC_{50} 20
4.6.1. Příprava experimentu 20
4.6.2. Měření výsledků 21
4.7. ICP-MS 21
4.8. qPCR 22
4.8.1. Kultivace buněk 22
4.8.2. Extrakce mRNA 22
4.8.3. qPCR 22
5. Výsledky 24
5.1. Růstová křivka 24
5.2. Charakterizace přenašečů mědi 25
5.2.1. ATPáza P-typu (gen ACA1_111080) 25
5.2.1.1. Funkční analýza genu 25
5.2.1.2. Lokalizace proteinu 26
5.2.2. Ctr (geny ACA1_289610 a ACA1_399620) 29
5.2.2.1. Funkční analýza genu 29
5.2.2.2. Lokalizace proteinu 31
5.3. Stanovení IC_{50} pro jednotlivé ionofory 34
5.3.1. 8-HQ (8-hydroxychinolin) 34
5.3.2. PyS (pyrithion sulfid) 34
5.3.3. DSF (disulfiram) 35
5.4. Obsah mědi v *A. castellanii* v závislosti na kultivačních podmínkách 36
5.5. q-PCR 37
6. Diskuze 39
7. Závěr… 43
8. Seznam zkratek 44
9. Seznam použité literatury 45

1. Úvod

Měď je esenciální kov pro téměř všechny organismy, ale zároveň má díky svým redoxním vlastnostem schopnost působit velice toxicky. Každý organismus byl nucen vyvinout ve svém proteomu selektivní přenašeče tohoto kovu, které by zamezily nekontrolovatelnému hromadění iontů mědi ve vnitřním prostředí buňky. Díky tomu nacházíme poměrně dobře konzervované specifické přenašeče mědi napříč organismy. Ačkoliv u mnohých ještě nebyly identifikovány, je velmi pravděpodobné, že aspoň část proteinů bude konzervovaná i u nich.

Zkoumat jednotlivé přenašeče mědi u parazitických organismů je obzvlášť zajímavé, převážně kvůli již zmíněným toxickým vlastnostem tohoto prvku. Tato práce se zaměřuje na opomíjenou, ale patogenní *Acanthamoeba castellanii.* Tato amfizoická améba žije kosmopolitně ve vnějším prostředí, kde se živí fagocytózou bakterií a dalších mikroorganismů. Výjimečně dokáže přežívat a množit se i v lidském organismu. Následkem toho může vyvolat akantamébovou keratitidu, kožní léze či granulomatózní amébovou encefalitidu. Tato onemocnění nejsou příliš častá, ale mnohdy končí fatálně.

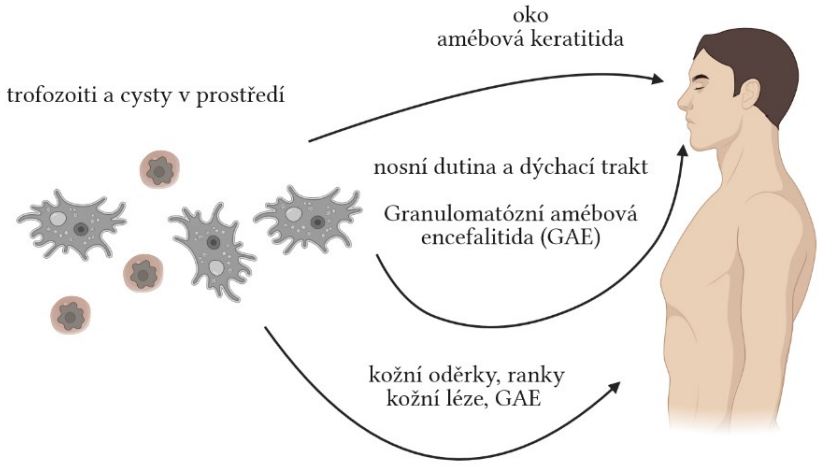
Porozumět, jak je tato améba tolerantní vůči mědi a jaké principy používá pro její transport, tak může být pomocnou cestou k tomu, jak tento prvek využít proti amébě samé. Tato práce se zabývá identifikací přenašečů mědi *A. castellanii*, evaluací účinku mědi na její růst a expresi těchto přenašečů a konečně také testováním potenciálních léčiv – měďnatých ionoforů. Tato skupina látek přenáší ionty mědi přes lipidickou cytoplazmatickou membránu a nekontrolovatelně navyšuje intracelulární množství mědi. To vede k toxickému působení mědi a většinou k buněčné smrti. Ukazuje se, že využití těchto látek je velice široké. Experimentálně se využívají proti rakovinným buňkám, houbovým onemocněním i parazitům.

2. Literární přehled

2.1. *Acanthamoeba castellanii*

A. castellanii je amfizoická améba ze skupiny Discosea, Amoebozoa, která byla popsána v roce 1930 v kultuře *Cryptococcus pararoseus* (Castellani, 1930). Vyskytuje se kosmopolitně ve vnějším prostředí, v půdě, vodě i ve vzduchu, nejvíce ji najdeme na rozhraní těchto prostředí (například voda-půda). V příznivých podmínkách se vyskytuje ve stádiu trofozoita, které je schopné se dále množit a fagocytovat bakterie, houby, kvasinky i další prvoky (De Moraes & Alfieri, 2008). *A. castellanii* tak mají důležitou úlohu v udržování ekosystému, převážně v regulaci bakterií (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Při zhoršení vnějších podmínek se z trofozoitů stávají odolná stádia – cysty, ve kterých améby dokáží přečkat nepříznivé období až několik let a stále si zachovat svou virulenci (Mazur et al., 1995). Cysty mají charakteristický svraštělý až hvězdicovitý tvar a jsou velmi odolné nejen vůči vnějším podmínkám, ale také k dezinfekcím a antibiotikům (Khunkitti et al., 1998).

Lékařsky významná se *A. castellanii* stává v okamžiku, kdy vstoupí do lidského organismu. Jelikož je kosmopolitně přítomná v prostředí, setkává se s ní člověk opakovaně, ale pouze v některých případech dojde k namnožení améb v lidském organismu a následným patogenním projevům (Obr.1).



Obrázek č. 1. – Místa vstupu *A. castellanii* do lidského organismu a následná onemocnění
Vytvořeno v BioRender.com

Nejen u uživatelů kontaktních čoček se může rozvinout akantamébová keratitida (Lorenzo-Morales et al., 2015). Při tomto onemocnění se jednotliví trofozoiti *A. castellanii* (ale i dalších druhů, např. *A. culbertsoni*) přichytí nejdříve ke kontaktní čočce, později na epitel rohovky díky schopnosti adheze, která je pro celou infekci klíčová. Nejprve se přítomnost améby projevuje lehkým diskomfortem, ale později se přidá bolest a zhoršení zraku. Největší komplikací této nemoci je pozdní diagnostika, která nahrává rozvinutí infekce, čímž může dojít až k úplné

ztrátě zraku. Dříve probíhala diagnostika pomocí kultivace materiálu získaného biopsií rohovky, dnes je to převážně za použití metody PCR a konfokální mikroskopie (Mathers et al., 2000). Incidence amébové keratitidy v populaci se postupně zvyšuje (pravděpodobně i díky snazší diagnostice) a ročně postihne přibližně 30 000 uživatelů očních čoček (Randag et al., 2019; Seal, 2003).

Při vstupu trofozoitů skrze dýchací cesty nebo kožní ranky se může při následném rozsevu do CNS (centrální nervové soustavy) rozvinout granulomatózní amébová encefalitida (GAE). *A. castellanii* je schopná překonat hematoencefalickou bariéru a svou přítomností vyvolat zánět mozkové tkáně. Takto silně rozvinutá infekce se vyskytuje převážně u již nemocných pacientů a má rychlý průběh. Většinou se jedná o imunodeficientní jedince po transplantacích, případně pacienty se závažnými chronickými záněty (Feingold et al., 1998). Někdy může GAE doplňovat i kutánní forma, kdy po průniku *A. castellanii* kůží dochází ke vzniku velkých kožních lézí (Torno et al., 2000). GAE je velmi vzácná, její léčba je složitá a spolu s pozdní diagnostikou vede k vysoké úmrtnosti kolem 90 % (Zhang & Cheng, 2021).

A. castellanii funguje pro určité druhy mikroorganismů jako vektor, rezervoár a v podstatě takový „trojský kůň“. Některé patogenní prokaryotické organismy dokáží uniknout fagocytóze ve vnitřním prostředí améby a využít ji jako přenašeče. Nejznámějším příkladem je *Legionella pneumophila* (původce legionelózy), která dokáže cíleně vyvolat lýzi buňky, aby z *Acanthamoeba* spp. unikla (Gao & Kwaik, 2000). Mezi další patří také *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* a *Vibrio cholerae* (Greub & Raoult, 2004; Kunze et al., 2021). Díky tomu se z *A. castellanii* stává podceňovaný, ale světově významný parazit, který téměř nejde zastavit.

2.2. Měď

2.2.1. Obecné vlastnosti

Měď je se svými vlastnostmi jedním z esenciálních prvků, který potřebuje téměř každý organismus. Díky schopnosti přecházet mezi oxidovaným (Cu^{2+}) a redukovaným (Cu^{+}) stavem a redoxnímu potenciálu je měď často inkorporována jako kofaktor enzymů (Tabulka č. 1), nebo pevná součást proteinových komplexů, jakými jsou například hemocyanin a plastocyanin (Olivares & Uauy, 1996; Tsang et al., 2021).

Tabulka č. 1 – Přehled důležitých enzymů obsahujících měď jako kofaktor

enzym	funkce
cytochrom c oxidáza	poslední komplex dýchacího řetězce
superoxid dismutáza	katalýza dismutace, přeměna superoxidu na peroxid vodíku
amino oxidázy	katalýza oxidace různých biogenních aminů
lyzyloxidáza	přeměna lysinu na aldehydy, tvorba spojů v extracelulárních matrix
„multi-copper" ferrooxidázy	katalýza oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+}
tyrozináza	syntéza melaninu
dopamin-ß-oxidáza	syntéza katecholaminů

Ačkoliv je měď esenciální, musí být její množství ve vnitřním prostředí buňky velmi malé a velmi přesně regulované. Je odhadováno, že se ve vnitřním prostředí *S. cerevisiae* vyskytuje méně než jeden atom volného iontu mědi (Rae et al., 1999). Nadbytek tohoto prvku je totiž pro organismus toxický na několika úrovních. Dlouhou dobu převažovalo přesvědčení, že důvodem toxicity mědi je Fentonova reakce, tedy produkce hydroxylových radikálů a následný oxidativní stres. Fentonova reakce je známá především jako reakce Fe^{2+} s peroxidem vodíku (H_2O_2), během které vznikají hydroxylové radikály (OH•). Bylo ukázáno, že obdobně reagují ionty Cu^{+} *in vitro* a dochází ke vzniku ROS (reaktivní formy kyslíku), viz rovnice níže v textu. Předpokládalo se, že tento děj probíhá i *in vivo* (Ozawa & Hanaki, 1991). Buňky vystavené vyšším koncentracím mědi vykazovaly poškození DNA, proteinů a lipidů, což bylo bráno jako důsledek oxidativního stresu v buňce.

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH\bullet$$

Nové poznatky ale přináší jiné pohledy na tuto problematiku. Nyní už je známé, že v případě *E. coli* není měď za oxidativní stres přímo zodpovědná (Macomber et al., 2007). Zároveň se ukazuje, že Cu^{2+} při reakci s H_2O_2 spíše přechází na formu Cu^{3+}, než aby došlo k významnému generování ROS (Pham et al., 2013).

Zajímavým novým poznatkem je, že se ionty mědi váží na lipoylované proteiny, zvlášť na enzymy důležité pro Krebsův cyklus, a vedou k jejich dysfunkci, agregaci v mitochondriích a ke specifickému typu buněčné smrti, který někdy bývá označován jako „cuproptóza" (Tsvetkov et al., 2022; Wang et al., 2022). Převážně v anaerobních podmínkách vnitřního prostředí buňky a v nadbytku iontů mědi dochází k metalaci proteinů v nesprávných místech, a to vede k jejich dysfunkci a agregaci (Zuily et al., 2022). Zároveň je ale měď s produkcí ROS v aerobních podmínkách stále spojená, v její přítomnosti dochází k oxidaci membránových lipidů, což narušuje plazmatickou membránu (Poyton et al., 2016).

Navíc je potvrzeno, že v *E. coli* ionty mědi narušují železo-sirné klastry v dehydratázách zapojených do syntézy větvených aminokyselin (Macomber & Imlay, 2009). Ionty Cu^{+} se navíc přímo naváží na aktivovanou síru a tím zabrání správné koordinaci Fe-S klastrů, případně narušují

již vytvořené klastry umístěné v enzymech. Enzymy s Fe-S klastry jsou díky svým redoxním vlastnostem esenciální pro organismus a ten s jejich dysfunkcí nedokáže dlouho přežívat (Garcia-Santamarina et al., 2017).

2.2.2. Role mědi v imunitním systému

Měď má také svou nezastupitelnou roli v imunitním systému. Při deficienci tohoto prvku v lidském organismu dochází k výraznému oslabení imunitního systému (Stabel & Spears, 1989). Naopak během infekcí je množství mědi v séru vyšší než u zdravých jedinců (Lahey et al., 1953). Tyto vysoké hladiny mědi jsou většinou lokální a pravděpodobně způsobené vyšší expresí ceruloplasminu (Culbertson et al., 2020). Ceruloplasmin je „multicopper" oxidáza, která je schopna navázat až 6 iontů mědi a funguje jako nejdůležitější nosič mědi v lidském organismu. Zároveň má ale velmi důležitou roli v metabolismu železa (Hellman & Gitlin, 2002).

Klíčovou složkou buněčné imunity jsou fagocyty a především makrofágy. Po fagocytóze patogen uzavřou do fagolyzozomu, ve kterém panují velice nehostinné podmínky. Kromě kyslíkových radikálů, nízkého pH a nedostatku železa je uvnitř i nadbytek mědi. Aktivované makrofágy zvýší příjem mědi pomocí vyšší exprese přenašečů Ctr (membránové přenašeče pro transport iontů mědi do cytoplazmy) a její množství ve fagolyzozomu se zvětší až 10x. Také dochází k vyšší expresi ATP7A (ATPáza P-typu), která transportuje ionty mědi z cytosolu do kompartmentů sekretorické dráhy a fagolyzozomu (White et al., 2009). Tyto dva přenašeče mědi se dohromady podílí na zvýšení koncentraci mědi ve fagolyzozomu.

Kvůli tomu jsou hlavně bakterie, paraziti a další patogeny adaptačně nuceni vytvořit detoxifikační dráhu pro vylučování nadbytečných iontů mědi, ale zároveň i pro její zabudování do esenciálních enzymů.

2.3. Metabolismus mědi

Pro užší zaměření této práce není nutné se zabývat všemi konkrétními přenašeči, metalochaperony a metalothioneiny, které hrají v metabolismu mědi zásadní roli. Proto v následujících kapitolách (2.3.1. a 2.3.2.) bude vysvětleno pouze fungování několika zásadních proteinů zapojených do homeostázy mědi, které jsou pro tuto práci klíčové, a to u modelového organismu *S. cerevisiae* a u *Homo sapiens*.

2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Jako jeden z nejlépe popsaných modelových organismů můžeme brát *S. cerevisiae,* ve kterém jsou všechny přenašeče, podílející se na metabolismu mědi, jasně popsány a lokalizovány. Z poznatků ze *S. cerevisiae* vycházela i tato práce, převážně celá studie funkční komplementace, která byla založena na práci s mutanty *S. cerevisiae* s deficiencí vybraných přenašečů mědi.

Prvními z nich jsou membránové vysokoafinní přenašeče mědi Ctr1 a Ctr3, které jsou lokalizovány na cytoplazmatické membráně a přenáší ionty Cu^{+} do vnitřního prostředí buňky. V aerobním prostředí najdeme měď spíše v oxidované formě (Cu^{2+}), která ve vnějším prostředí tvoří stabilní komplexy. Proto se na plazmatické membráně kvasinek nachází metaloreduktázy Fre1 a Fre2, které redukují ionty mědi a železa a jejich exprese je podmíněna množstvím mědi v buňce (Georgatsou et al., 1997). Dalším přenašečem mědi je Ctr2, který je lokalizován v membráně vakuol a mobilizuje zde uložené ionty mědi (Rees et al., 2004). Ctr mají tři transmembránové domény a mají charakteristické vazebné místo pro ionty mědi (Ren et al., 2019).

Dalším důležitým proteinem je CCC2 (Ca^{2+} sensitive cross complementer 2). Tato ATPáza P-typu patří do rodiny P_{IB-1} a je lokalizovaná v membráně trans-Golgiho aparátu (TGN). Přijímá ionty mědi (Cu^{+}) od cytosolického metalochaperonu Atx1 a přenáší je do Golgiho aparátu, odkud jsou pak distribuovány do cílových enzymů (Banci et al., 2007). Předání iontu mědi mezi Atx1 a CCC2 probíhá za vzniku komplexu těchto proteinů pomocí protein-protein interakce (Banci et al., 2006). CCC2 je heterodimer, jehož jednotky se od sebe liší a obsahují dvě vazebná místa pro kovy (MDB, metal binding domain). Navázání iontů mědi umožňují specifické struktury (ßαßßαß ferredoxin fold) a konzervovaný aminokyselinový motiv CxxC, který sdílí všechny enzymy vážící měď napříč celou říší eukaryot a prokaryot (Badarau & Dennison, 2011; Zhou et al., 2008).

2.3.2. *Homo sapiens*

Lidský metabolismus je mnohem komplikovanější než u výše zmíněné kvasinky. Měď je přijímaná v potravě a její redistribuce probíhá v játrech, kam je transportována portální žílou. Před vstupem do hepatocytů musí být přijaté ionty mědi zredukované na formu Cu^{+} (Van den Berg & McArdle, 1994). V redukované formě je možné přenést ionty mědi pomocí přenašeče z rodiny Ctr, u lidí pojmenované jako hCtr1 (Maryon et al., 2013). Většina mědi v lidském séru je vázaná na ceruloplasmin a zbytek na albumin a transcuprein.

Obdobou zmíněné ATPázy P-typu kvasinek jsou lidské ATP7A (Menkeho protein, MNKP) a ATP7B (Wilsonův protein, WNDP). Tyto ATPázy dostaly jméno dle nemocí spojených s jejich mutacemi, které vyvolají systémové poruchy metabolismu mědi. Funkčně jsou velmi podobné CCC2, jejich funkce je závislá na hydrolýze ATP a lokalizované jsou v TGN. Rozdílem je, že v nadbytku mědi lokalizuje ATP7A i do plazmatické membrány a hraje tak klíčovou roli pro vylučování iontů mědi z buňky (Petris et al., 1996). Obě tyto ATPázy sdílí již zmiňovaný CxxC motiv, který je v tomto případě šestkrát tandemově opakovaný (Chelly et al., 1993). Měď je do TGN transportována pomocí metalochaperonu Hah1 a předána ATPáze P-typu pomocí stejného mechanismu, jako je tomu u *S. cerevisiae*.

2.4. Metabolismus mědi parazitických organismů

Paraziti jsou velmi obsáhlá skupina mnohobuněčných i jednobuněčných organismů. Metabolismu mědi, respektive jednotlivým komponentům udržujícím její homeostázu překvapivě nebylo ve výzkumu věnováno mnoho prostoru. Proto je dosavadních poznatků velmi málo, nicméně vědecká pozornost parazitologů se tímto směrem začíná pomalu ubírat.

2.4.1. Patogenní amfizoické améby

Skupina amfizoických améb, které sdílí obdobné životní nároky a schopnost vyvolat lidské patogenní projevy, sdružuje améby, jako je *Naegleria fowleri, Balamuthia* spp. *a Sappinia* spp. Jejich metabolismus mědi téměř není popsán. Nejvíce poznatků je známo u *N. fowleri*, kde byla popsána ATPáza P-typu (Nf-CuATPase), která obsahuje transmembránové domény a charakteristický motiv CxxC pro vazbu iontů mědi. V nadbytku mědi byla exprese této ATPázy zvýšená a umožnila mutantnímu kmeni *S. cerevisiae* Δcup2 růst ve vysokých koncentracích mědi. Tento mutantní kmen *S. cerevisiae* Δcup2 postrádá aktivátor exprese metalothioneinů, které jsou důležité pro detoxifikaci mědi, a tak v nadbytku mědi nedokáže růst. Výsledky funkční komplementace v tomto mutantním kmeni naznačují, že Nf-CuATPáza se podílí právě na detoxifikaci mědi a bude pravděpodobně lokalizovaná v cytoplazmatické membráně, nebo membráně vakuol, což ještě nebylo možné potvrdit (Grechnikova et al., 2020). Zároveň byly u *N. fowleri* i její nepatogenní příbuzné *N. gruberi* popsány pomocí funkční komplementace v *S. cerevisiae* přenašeče mědi obdobné Ctr. Ty dokázaly v mutantním kmeni Δ Ctr1/3 obnovit příjem mědi a byly lokalizovány v *S. cerevisiae* v plazmatické membráně. Jejich exprese nebyla ovlivněna nadbytkem mědi, takže je jejich regulace pravděpodobně posttranslační (Ženíšková et al., 2022).

2.4.2. Apikomplexa

Medicínsky nevýznamnějším parazitickým prvokem je původce malárie *Plasmodium falciparum*. U něj byla popsána ATPáza P-typu (PfCuP-ATPase, CuTP), která obsahuje charakteristický motiv CxxC a transmembránové domény. CuTP je lokalizována v membráně erytrocytu i v membráně parazita (Rasoloson et al., 2004). Předpokládá se, že slouží k distribuci iontů mědi, ale pravděpodobně hraje roli i v exportu iontů mědi z buňky. Zároveň bylo ukázáno, že funkce této ATPázy je klíčová pro pohlavní rozmnožování *P. falciparum*. Při deficienci této CuTP dochází pravděpodobně k dysfunkci neznámého proteinu se zabudovanou mědí, což pak ovlivňuje schopnost oplození gamet (Kenthirapalan et al., 2014). Navíc byl identifikován přenašeč mědi Ctr, lokalizovaný v membráně erytrocytu, který slouží jako importér mědi do vnitřního prostředí parazita (Choveaux et al., 2012). Jako jediné metalochaperony u *P. falciparum* byly popsány Pf-Cox17, který se podílí na předávání iontů mědi pro cytochrom c oxidázu (CCO), a Pf-Cox11, který má úlohu v zabudování iontu mědi do Cu_B části CCO (Choveaux et al., 2015; Salman & Goldring, 2022).

ATPáza CuTP je přítomna i u dalších zástupců ze skupiny apikomplexa, jako je *Cryptosporidium parvum* nebo *Toxoplasma gondii*. Díky sdílenému motivu MxxCxxC jsou tyto ATPázy snadněji vyhledatelné v genomu (Kenthirapalan et al., 2014; LaGier et al., 2001).

2.4.3. Kinetoplastida

Ze zástupců skupiny kinetoplastida byla popsána ATPáza P-typu u *Leishmania major*. LmATP7 je lokalizována u promastigotů v plazmatické membráně i endosomech a hraje klíčovou roli pro přežívání *L. major* uvnitř makrofágu a pravděpodobně i ve vylučování nadbytečných iontů mědi (Paul et al., 2022).

V genomu *Trypanosoma* spp. byly identifikovány komponenty metabolismu mědi, převážně ATPázy P-typu schopné vázat měď. Byla potvrzena přítomnost, exprese a schopnost vázat měď u ATPázy P-typu NTbbCuATPase u *T. b. brucei* a NTcoCuATPase u *T. congolense* (Isah et al., 2020).

2.4.4. Helminti

Poznatky ohledně přenašečů mědi mezi zástupci parazitických helmintů není mnoho. Pro skupinu Nematoda se dá vycházet z poznatků z modelového organismu *Caenorhabditis elegans*, ve kterém byl popsán přenašeč mědi z rodiny Ctr s názvem CHCA-1 (Yuan et al., 2018). Dále byla identifikována pouze jedna ATPáza P-typu CUA-1 v intestinálních buňkách, podílející se na metabolismu mědi. Její lokalizace se mění vlivem vnějších podmínek a při nadbytku mědi hraje roli v exportu iontů (Chun et al., 2017).

U ostatních skupin jako jsou Cestoda, Trematoda a Acantocephala nebyly žádné přenašeče mědi identifikovány. Jelikož u mnohých byla popsána Cu/ZnSOD1, například u *Clonorchis sinensis, Taenia solium* a *Paragonimus westermanii,* dá se předpokládat, že v jejich genomu budou komponenty udržující homeostázu mědi a metalochaperony přinášející ionty mědi pro tento, ale i další enzymy (Castellanos-González et al., 2002; A. H. Li, Kong, et al., 2005; A. H. Li, Na, et al., 2005).

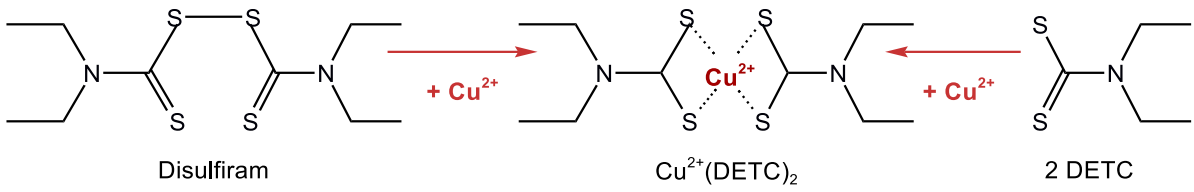
2.5. Ionophory

Ionofory představují skupinu látek, která nesdílí jednotné strukturní podobnosti, ale spojuje ji schopnost přenášet ionty přes plazmatickou membránu, případně se do ní inkorporovat. Tím je často způsoben iontový rozvrat ve vnitřním prostředí buňky a následně buněčná smrt. Díky tomu jsou ionofory slibným nástrojem pro cílenou likvidaci patogenů (Alfonso & Quesada, 2013).

Prvním možným využitím ionoforů je cílení na změnu pH v buňce, které je přísně regulováno. Salimycin funguje jako ionofor K^+ iontů a jejich vnesením dovnitř buňky dochází k dysfunkci Na^+/K^+ pump a následnému rozvratu v buňce. Díky tomu se z něj stává slibný nástroj pro boj s patogeny i rakovinnými buňkami (Antoszczak, 2019).

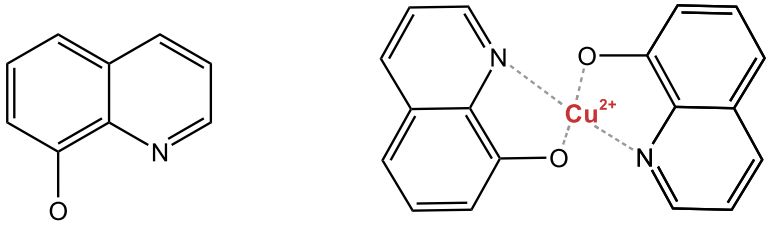
Druhou možností je využití ionoforů, které váží různé kationty kovů, jako jsou například měď, zinek, železo nebo kobalt. Pro téma této práce jsou nejdůležitější ionofory přenášející ionty mědi ve formě Cu^{2+}. Ionofory s mědí vytváří neutrální lipofilní komplex, který je schopný projít membránou. Buňka se pak musí vypořádat s extrémním nárůstem vnitřní koncentrace mědi, a pokud nemá dostatečně výkonný detoxifikační systém, dochází k buněčné smrti. Měďnaté ionofory můžeme rozdělit do čtyř skupin: dithiokarbamáty, thiosemikarbazony, hydroxychinoliny a hydroxyflavony (Oliveri, 2020). Mezi dithiokarbamáty patří disulfiram (DSF), známý také pod názvem Antabus. DSF je využívaný pro léčbu alkoholismu, jelikož inhibuje aldehyd dehydrogenázu a tím celkové zpracovávání alkoholu za doprovodu nepříjemných účinků. Výhodou je, že se jedná o již známý a užívaný lék, který díky svým vlastnostem nabízí nové možnosti užití. Velmi účinný se ukázal v kombinaci s mědí proti *Mycobacterium tuberculosis* (Dalecki et al., 2015) a *Candida albicans* (Shanholtzer et al., 2022). Zároveň bylo prokázáno, že působí cytotoxicky i na rakovinné buňky (Y. Li et al., 2020). DSF se v kyselém a na měď bohatém prostředí rozpadá na DETC (diethyldithiokarbamát), kdy dvě molekuly DETC váží jeden iont mědi (Obr. 2).

Měďnaté ionofory dokáží působit více toxicky na nádorové buňky, protože je pro jejich proliferaci měď velice důležitá, a to převážně pro angiogenezi. Zároveň mají rakovinné buňky pozměněný metabolismus, který se projevuje charakteristickou vyšší hladinou ROS a větším množstvím redukovaného glutathionu (GSH). Kvůli tomu jsou náchylnější k navýšení ROS více než buňky zdravých tkání (Oliveri, 2022; Trachootham et al., 2009). Ionofory mohou být dodávány do organismu ve formě proionoforu, kdy jsou aktivované až v konkrétní rakovinné buňce. Díky vyšší hladině GSH, než jaké jsou v normálních buňkách, dojde pouze v rakovinné buňce k aktivaci ionoforu, který pak přenáší ionty mědi do vnitřního prostředí buňky. V nádorové buňce dochází k akumulaci mědi, vyčerpání GSH a tvorbě ROS, čímž dojde k úplnému narušení redoxní rovnováhy buňky (Bao et al., 2018). Další možností cíleného transportu ionoforu do rakovinných buněk je vytvoření různých glukokonjugátů, například s deriváty 8-hydroxychinolinu. Nádorové buňky více exprimují glukózové přenašeče než normální buňky, více ji přijímají a glukóza je odštěpena až v nádorových buňkách, čímž pak dojde k aktivaci ionoforu (Oliveri et al., 2012).



Obrázek č. 2 - Struktura disulfiramu a diethylthiolkarbamátu a vazba iontu mědi.
Upraveno v programu KingDraw, převzato z (Dalecki et al., 2015).

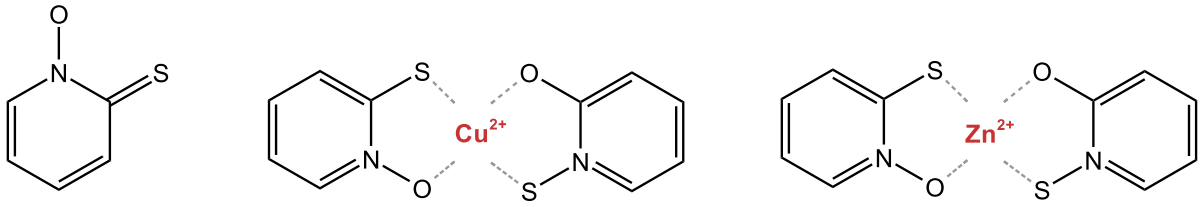
Dalším ionoforem, který má velmi variabilní využití, je 8-hydroxychinolin (8HQ, Obr. 3) (Song et al., 2015). Jeho účinnost je vysoká převážně díky schopnosti vázat kovy, ale s mědí tvoří nejstabilnější komplex. S navázanými ionty mědi se ukazuje jako účinný proti *Mycobacterium tuberculosis* (Shah et al., 2016).



Obrázek č. 3 – Struktura 8-hydroxychinolinu a navázání iontu mědi

Vytvořeno v programu KingDraw, převzato z PubChem.

Posledním význačným měďnatým ionoforem je pyrithion sulfid (PyS), který je běžně využívaný ve formě se zinkem ve vlasových šampónech proti lupům (Obr. 4). Kromě zinku ale pyrithion dokáže vázat ionty mědi a ukazuje se jako účinný ionofor, který má antimikrobiální účinky (Mishra et al., 2023; Reeder et al., 2011).



Obrázek č. 4 – Struktura pyrithion sulfidu s navázanými ionty mědi a zinku

Vytvořeno v programu KingDraw, převzato z PubChem.

3. Cíle práce

1. Identifikovat funkční homology kvasinkové ATPázy P-typu CCC2 a přenašeče mědi Ctr1/3 v *Acanthamoeba castellanii,* popsat a ověřit funkci těchto homologů a pokusit se je lokalizovat.
2. Experimentálně vyzkoušet působení ionoforů s přídavkem mědi na růst *Acanthamoeba castellanii.*
3. Popsat obsah mědi v buňce v závislosti na její dostupnosti v kultivačním médiu pomocí metody ICP-MS a popsat vliv těchto podmínek na expresi vybraných proteinů s využitím metody qPCR.

4. Materiál a metody

4.1. Kultivace buněk

Acanthamoeba castellanii kmen Neff je udržována v kultivační nádobě s povrchem 25 cm^2 v teplotě 27 °C. Do kultivační nádoby je přidáno 5 ml kultivačního média PYG (Tabulka č. 2). Kultura naroste do vysoké hustoty obvykle za tři dny, vhodné je kulturu přeočkovat jednou týdně.

Tabulka č. 2 – Složení kultivačního média PYG v objemu 1 l pro *Acanthamoeba castellanii*

složka	hmotnost/objem
kvasinkový extrakt (Oxoid)	7,5 g
pepton (Oxoid)	7,5 g
glukóza (Carl Roth)	15 g
KH_2PO_4 (Sigma)	0,272 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma)	0,246 g
$CaCl_2$ (1 M) (Sigma)	50 µl
thiamin (1 µg/ml)	1 ml
biotin (0,2 µg/ml)	800 µl
B12 (1 ng/ml)	10 µl
dH_2O/miliQ H_2O	do 1 l

4.2. Růstová křivka

V biologickém triplikátu byly nasazeny buňky do kultivačních nádob (25 cm^2) v množství 50 000 buněk/ml do 5 ml média PYG. Pro zjištění koncentrace původní populace buněk byl použit přístroj pro analýzu buněk (Z2™ COULTER® Counter, Beckman Coulter). Médium pro kontrolní triplikát bylo PYG. Pro ostatní triplikáty byla vytvořena média s přídavkem mědi (50 mM $CuSO_4$), nebo chelátoru mědi BCS (Bathocuproinedisulfonic acid disodium salt, 10 mM). Měření probíhalo každých 24 hodin po dobu 7 dní na průtokovém cytometru (Guava easyCyte 11HT. Luminex). Všechna měření byla provedena v 96-jamkové destičce, kdy ke 100 µl 4 % paraformaldehydu pro fixaci buněk bylo přidáno 100 µl buněk. Pro udržení stálého objemu v kultivačních nádobách bylo každý druhý den doplněno 200 µl média. Výsledné hodnoty byly zpracovány pomocí programu GraphPad, ve kterém byla vytvořena křivka doplněna chybovými úsečkami o hodnotě standardní odchylky.

4.3. Klonování

4.3.1. Výběr proteinu

Při hledání vhodných proteinů, které by mohly hrát v metabolismu mědi u *A. castellanii* důležitou roli, byl na základě proteomických dat (poskytnula Maria Grechnikova, Ph.D.), kdy byla pozorována vyšší hladina proteinu ACA1_111080 při kultivaci s chelátorem mědi (100 µM BCS), vybrán homolog proteinu CCC2 ze *Saccharomyces cerevisiae*. *A. castellanii* má v genomu dva homology této ATPázy P-typu a tato práce se zabývá pouze genem označeným ACA1_111080

(AmoebaDb, https://amoebadb.org/amoeba/app). Při hledání homologického transportéru ke kvasinkovému Ctr (copper transporter) v genomu *A. castellanii* byly zvoleny k experimentům dva homologické geny: ACA1_289610 (označován v této práci jako Ctr) a ACA1_399620 (označován jako Ctr-like) (AmoebaDb).

4.3.2. Primery

Ke každému genu z *A. castellanii* (ATPáza P-typu, Ctr, Ctr-like) byly objednány primery, vytvořené v programu Geneious, s přidanou sekvencí, na kterou cílily specifické restriktázy, viz Tabulka č. 3. Dodané primery byly naředěny v eppendorfově zkumavce do finálního objemu 100 µl na koncentraci 10 µM.

Tabulka č. 3 - souhrn použitých primerů, jejich sekvencí a restrikčních enzymů

primer	restrikční enzym	sekvence
AcATPase-golgi-R-pUG35	NdeI	5´- ATAATCGATGTCCGCCTTATGGTCTTCG – 3´
AcATPase-golgi-F-pUG35	NheI	5´- GCCACTAGTATGGCCGATGGAAGTTTCG – 3´
AcATPase-golgi2600R	NdeI	5´- AAGCCCTTGGATTGGAGCTC – 3´
AcATPase-golgi-1678-F	NheI	5´- ATCGTGTTCTGCATGTGGCT – 3´
Ctr-R-pCM189	PstI	5´- ATTCTGCAGTTAGTGGCATCCTTGTTTCATGT – 3´
Ctr-F-pCM189	NotI	5´- ATAGCGGCCGCATGCGAGAGAGAGCGTGTTTG – 3´
Ctr-R-pTPBF	NdeI	5´- ACGCATATGATGGTGGCATCCTTGTTTCATGTG – 3´
Ctr-F-pTPBF	NheI	5´- CATGCAGCATGCGAGAGAGCGTGTTTG – 3´
Ctr-like-R-pTPBF	NdeI	5´- ATCCATATGACATCCGGCTTCGTTG – 3´
Ctr-like-F-pTPBF	NheI	5´- ATTGCTAGCATGTCGATGCCAATGTACTTTC– 3´
Ctr-like-R-pCM189	PstI	5´- ATACTGCAGCTAATGACATCCGGCTTCG – 3´
Ctr-like-F-pCM189	NotI	5´- ATAGCGGCCGCATGTCGATGCCAATGTACTTTC – 3´

4.3.3. Syntéza cDNA

Z kultury buněk *A. castellanii* byla získána mRNA za použití High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Podle izolované mRNA byla za použití protokolu (SuperScript IV invitrogen reverse transcriptase) syntetizována reverzní transkriptázou cDNA, která byla v následujícím kroku využita jako templát pro PCR.

4.3.4. PCR (polymerázová řetězová reakce)

S použitím PCR metody byly zvolené sekvence DNA amplifikovány. Jako templát pro PCR byla použita extrahovaná cDNA (viz kap. 4.3.3.). V případě ATPázy P-typu byla použita PrimeStar Max DNA polymeráza (Takara) (Tabulka č. 4). V případě Ctr a Ctr-like byla použita PrimeStar, ale také Q5 HotStart polymeráza (BioLabs) (Tabulka č. 5). PCR cyklus pro polymerázu PrimeStar vychází z protokolu k této polymeráze (Takara). Cyklus byl opakován 30x a konkrétní parametry reakce jsou udány v tabulce č. 6. PCR cyklus pro polymerázu Q5 HotStart probíhá, viz tabulka č. 7.

Tabulka č. 4 – složení PCR reakce PrimeStar do celkového objemu 50 µl

složka	objem
PrimeStar mix	25 µl
forward primer	1,5 µl
reverse primer	1,5 µl
cDNA	2 µl
sterilní voda	20 µl

Tabulka č. 5 – složení PCR reakce Q5 Hot start do celkového objemu 50 µl

složka	objem
reakční pufr	10 µl
10 mM dNTPs (nukleotidy)	1 µl
forward primer	2,5 µl
reverse primer	2,5 µl
DNA templát	2 µl
Q5 Hot Start DNA-Polymerase	0,5 µl
zesilovač reakce (enhancer)	10 µl
voda bez nukleáz	21,5 µl

Tabulka č. 7 – průběh reakce PCR s Q5 Hot start

fáze	teplota (°C)	časový interval
zahájení	98	30 sekund
25-35 cyklů	98	5-10 sekund
	50-72	10-30 sekund
	72	20-30 sekund/kbp
finální prodloužení	72	2 minuty

Tabulka č. 6 - průběh reakce PCR s PrimeStar

fáze	teplota (°C)	časový interval
zahájení	98	3 minuty
30 cyklů	98	10 sekund
	55	10 sekund
	72	1 minuta
finální prodloužení	72	10 minut

4.3.5. Elektroforéza

Správná velikost produktu PCR byla ověřena pomocí elektroforézy. Byl použit 1 % agarózový gel. K 50 ml gelu bylo přidáno 20 µl UV barviva SYBR green I (Scientific ThermoFisher). Ke každému vzorku bylo po PCR reakci (objem 50 µl) přidáno 10 µl nanášecí barvy TriTrack (6X TriTrack DNA loading dye, ThermoFisher). Do první jamky v gelu bylo dáno 5µl DNA žebříku a další jamky byly naplněny 50µl PCR produktu. Elektroforéza probíhala po dobu 25 minut a výsledný band byl vyříznut a vložen v eppendorfově zkumavce do −20 °C.

4.3.6. Extrakce DNA z gelu

V dalším kroku bylo potřeba extrahovat PCR produkt z agarózového gelu. K tomu se využívá Extraction Kit (Gel extraction kit, Omega Bio-Tec). Výsledná DNA může být skladována v −20 °C. Pro další následné kroky je nutné změřit koncentraci této DNA na nanodropu (Nanodrop2000, ThermoScientific).

4.3.7. Restrikční reakce

Restrikční reakce je důležitá pro vytvoření tzv. sticky ends, díky kterým pak lze přesně zaklonovat fragmenty DNA do vektoru (plazmidu). Byly použité restriktázy, které cílí na předem vybrané sekvence primerů a místa na plazmidech. Pro každý gen byly vybrány tři plazmidy – pCM189 pro využití ve funkční komplementaci v *S. cerevisiae*, pTPBF-EGFP a pGAPDH-EGFP pro vytvoření transformovaných *A. castellanii.* Plasmidy pTPBF a pGAPDH jsou využívané u *A. castellanii* pro over-expresi proteinů a jejich značení pomocí GFP (zelený fluorescenční protein). Liší se mírou exprese, kdy pGAPDH-EGFP má silnější promotor a vede k vyšší expresi než pTPBF-EGFP (Bateman, 2010). Restrikční reakce pro plazmid má celkový objem 60 µl, pro PCR fragment 90 µl, složením se tyto reakce neliší (Tabulka č. 8). Reakční doba závisí na vybraných restrikčních enzymech. Směs byla vložena do termobloku o teplotě 30 °C na požadovaný čas. Po uplynutí reakční doby se mohou přidat 3 µl fosfatázy (Shrimp Alcaline Phosphatase) pro lepší efektivitu reakce, a to především u plazmidů pGAPDH a pCM189. Pro ukončení reakce je vhodné použít Plasmid DNA minikit (E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I, Omega, Bio-Tec).

Tabulka č. 8 – obsah restrikční reakce pro plazmid v celkovém objemu 60 µl

složka	množství
DNA	0,6 µg (dle koncentrace DNA)
pufr	6 µl
restrikční enzym 1	3 µl
restrikční enzym 2	3 µl
voda	doplnit do 60 µl

4.3.8. Ligační reakce

Pro ligační reakci a výpočty jejích komponent je vhodné využít online kalkulačku (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation), jelikož množství DNA insertu přidaného do reakce závisí na jeho délce. Pro výpočet byl zvolen poměr objemu DNA insertu ku plazmidu 3:1 (Tabulka č. 9). Pro reakci je nutné vytvořit kontrolu, kdy byla místo insertu přidána do reakce voda. Reakce probíhá 1 hodinu ve 22 °C nebo v lednici ve 4 °C přes noc.

Tabulka č. 9 – obsah ligační reakce v celkovém objemu 20 µl

složka	množství
plasmid	100 ng
DNA insertu	X ng (množství dle kalkulačky)
T4 DNA pufr	2 µl
T4 ligáza	1 µl
voda	doplnit do 20 µl

4.3.9. Transformace

Pro namnožení plazmidu s naklonovaným cílovým genem byla použita populace buněk *E. coli* typu Top10. Tyto buňky jsou skladovány v eppendorfových zkumavkách v objemu 150 µl v −80 °C. Po vyjmutí buněk z mrazicího boxu byly buňky nechány na ledu a po lehkém odtání k nim bylo přidáno 15 µl plazmidu. V ledu byly následně ponechány 20-30 minut. Po uplynutí této doby byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (heat shock), k tomu byla využita vodní lázeň o teplotě 42 °C po 30 sekund. Poté byly bakterie znovu přeneseny na led a po 2 minutách k nim bylo přidáno rozehřáté SOC medium o teplotě 37 °C (Tabulka č. 10). Po hodinové inkubaci v třepačce (37 °C, 225 rpm) byly buňky přeneseny na Petriho misky s LB médiem (Tabulka č. 11), na které bylo předtím přidáno selekční antibiotikum – v tomto případě 40 µl Ampicilinu (100 µg/ml). Pro ideální rozprostření buněk je dobré zvolit sterilní skleněné kuličky. Petriho misky s bakteriemi byly vloženy do termoboxu o 37 °C přes noc, po dobu přibližně 16 hodin. Kromě plazmidů s insertem je vhodné použít jako kontrolu plazmid bez insertu, ten by ovšem neměl narůst do takové hustoty jako bakterie s vloženým insertem. Plazmid bez insertu se může náhodně pospojovat a dát buňkám schopnost přežít na selekčním médiu.

Na Petriho miskách byly další den vybrány cca 3 kolonie, které byly vhodně oddělené od ostatních, čímž bylo zaručeno, že při následující práci bude vybrán pouze jeden klon. Pokud jsou bakterie narostlé příliš, je lepší zvolit více kolonií a úspěšnost transformace ověřit přes „crack PCR“. Kolonie byly odebrány v blízkosti kahanu pomocí pipety a vloženy do 5 ml LB média s 5 µl ampicilinu (100 µg/ml). Jednotlivé kolonie byly kultivovány přes noc v třepačce (37 °C, 225 rpm).

Druhý den byla část buněk odebrána k zamrazení. K odebraným 800 µl buněk bylo přidáno 200 µl glycerolu a buňky byly uloženy do −20 °C. Zbytek buněk byl použit pro extrakci plazmidu dle protokolu Plasmid DNA mini kit (E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I, Omega, Bio-Tec).

Zachování správné sekvence DNA vloženého insertu bylo ověřeno sekvenováním (Tabulka č.12), kterému předcházelo měření koncentrace DNA na nanodropu.

Tabulka č. 10 – složení média SOC (super optimal broth with catabolite repression) v objemu 1 l, pH = 7

složka	hmotnost/objem
trypton (Oxoid)	20 g
kvasinkový extrakt	5 g
NaCl (Sigma)	0,5 g
KCL (250 mM) (Sigma)	10 ml
$MgCl_2$ (2 M)	5 ml
glukóza (1 M)	20 ml
dH_20	do 1 l

Tabulka č. 11 – složení média LB (Luria-Bertani) v objemu 1 l, pH = 7

složka	hmotnost/objem
trypton	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
NaCl	10 g
dH_2O	do 1 l

Tabulka č. 12 – obsah směsi pro sekvenování v celkovém objemu 8 µl

složka	množství
F primer (10 µM)	0,5 µl
R primer (10 µM)	0,5 µl
plazmid	3 ng /100 kb
voda	doplnit do 8 µl

4.4. Komplementace

V tomto procesu byl modifikovaný plazmid se správnou sekvencí vložen do kvasinek *S. cerevisiae*. Jednak do nemodifikovaného kmenu „wild-type“ (WT), ale také do mutantů, které postrádají ATPázu CCC2, nebo membránové přenašeče mědi CTR1/3. Při vložení plazmidu s homologními geny z *A. castellanii* lze pozorovat, zda budou v těchto deficientních kvasinkách plnit domnělou funkci a přesouvat esenciální ionty mědi. To se projeví specifickým nárůstem kvasinek na Petriho miskách se selekčními podmínkami.

4.4.1. Média

Prvním krokem byla příprava všech médií. Jedná se o YPAD, 2xYPAD, SC-U medium (synthetic medium without uracyl), jejich složení je v tabulkách č. 13, 14, 15. Petriho misky byly vylévány 30 ml média s přidaným agarem. Médium YPAD slouží pro nárůst wild type mutantních kmenů, 2xYPAD pro nárůst kvasinek před transformací a SC-U pro následnou funkční komplementaci. Pro funkční komplementaci ATPázy P-typu z *A. castellanii* byly připraveny Petriho misky

s 30 ml média SC-U. Mutantní kmen *S. cerevisiae* s deficiencí v CCC2 nedokáže růst bez železa, tedy na Petriho misce s přidaným BPS (chelátor železa). ATPáza CCC2 přenáší ionty mědi do Golgiho aparátu, odkud jsou dále zabudovány do „multicopper" oxidáz nutných pro příjem železa.

Pro funkční komplementaci Ctr z *A. castellanii* byla jako selekční sacharid použita 20% rafinóza, kterou kvasinky nedokáží efektivně využít pro fermentaci a převážně ji využívají jako zdroj elektronů pro dýchací řetězec. Tento energetický metabolismus je závislý na dostatku mědi, která je zabudovávána do cytochrom c oxidázy, proto byly vytvořeny kombinace Petriho misek s přídavkem 3 µM BCS, chelátoru mědi, na kterém mutantní kmen *S. cerevisiae* bez přenašečů mědi Ctr1/3 nedokáže růst.

V obou případech funkční komplementace pro potvrzení selektivity bylo přidáno 90 µl doxycyklinu, v jehož přítomnosti je blokována transkripce našeho insertu (selekční podmínky viz Tabulka č. 16).

Tabulka č. 13 – složení média YPAD v objemu 250 ml

složka	hmotnost/objem
adenin (Sigma)	25 mg
pepton	5 g
kvasinkový extrakt (Sigma)	2,5 g
(agar)	3,75 g
glukóza (40 %)	12,5 ml
voda	237,5 ml
penstrep	2,5 ml

Tabulka č. 14 – složení média 2xYPAD 250 ml

složka	hmotnost/objem
adenin	25 mg
pepton	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
(agar)	3,75 g
glukóza (40 %)	25 ml
voda	237,5 ml
penstrep	2,5 ml

Tabulka č. 15 – složení média SC-U 250 ml, pH = 6

složka	hmotnost/objem
YNB (Sigma)	1,68 g
YMS – URA (Sigma)	0,48 g
MES (Sigma)	2,5 g
adenin	25 mg
glukóza (40 %) / rafinóza (20%) (Fluka)	12,5 ml / 25 ml
voda	237,5 ml
penstrep	2,5 ml
(agar)	3, 75 ml

Tabulka č. 16 – seznam užívaných selekčních podmínek při komplementaci

selekční podmínka	množství (do 30 ml)	efekt
rafinóza (20 %)	3 ml	neprobíhá fermentace
BCS (10 mM)	9 µl	chelátor mědi – měď není pro kvasinky dostupná
doxycyklin (0,5 µg/ml)	90 µl	inhibuje transkripci insertu
BPS (10 mM)	45 µl	chelátor železa – železo není pro kvasinky dostupné

4.4.2. Transformace kvasinek

Transformace byla provedena dle protokolu High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method (Gietz & Schiestl, 2007). Došlo k vnesení plazmidů se studovanými geny (a nemodifikovaných kontrolních plazmidů) do *S. cerevisiae* WT i mutantů.

4.4.3. Komplementace

Kvasinky byly nechány přes noc na třepačce (30 °C, 200 rpm) v SC-U médiu. Druhý den bylo změřeno OD_{600}, následně byly buňky naředěny na OD_{600} = 0,2 a byla vytvořena desítková ředící řada v 96-jamkové destičce. Z každé jamky bylo přeneseno 5 µl na Petriho misku se selekčním médiem. Petriho misky byly vloženy do termoboxu o teplotě 30 °C po dobu 3 dnů. Z nárůstu kvasinek byly odečteny výsledky a Petriho misky byly naskenovány.

4.5. Lokalizace proteinu

4.5.1. Transformace améb

Plazmidy se studovanými geny byly pomocí sady PolyFect transfection reagent (Quiagen) vloženy do WT *A. castellanii* . Do 6-jamkové destičky bylo dáno $5x10^6$ buněk, zde byly nechány 30 minut, aby se přichytily na dno jamek. Mezitím byly rozpuštěny 2 µg DNA ve 100 µl encystačního média (Tabulka č. 16). K směsi DNA bylo přidáno 20 µl PolyFect Transfection Reagent a takto byla směs inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Mezitím bylo od améb odsáto původní médium a bylo nahrazeno 3 ml čerstvého média PYG. K reakční směsi bylo po uplynutí inkubační doby přidáno 600 µl PYG a směs byla ihned přenesena do 6-jamkové destičky k amébám. Destička byla vložena do 27 °C na 24 hodin. Druhý

den bylo odsáto médium a nahrazeno médiem PYG s geneticinem o koncentraci 8 µg/ml. Takto byly buňky ponechány, dokud nenarostly do dostatečné hustoty. Jakmile k tomu došlo, byly buňky přeneseny do kultivační nádoby a postupně byla zvyšována koncentrace geneticinu na 50 µg/ml, čímž dochází k selekci transformovaných améb.

4.5.2. Fluorescenční mikroskopie

100 µl z kultury transformovaných buněk *A. castellanii* bylo pomocí pipety naneseno na krycí sklíčko. Po půl hodině, kdy došlo k přisednutí většiny buněk, bylo krycí sklíčko přeneseno na podložní sklíčko a vzorek byl vložen do mikroskopu. Byl použit mikroskop Leica TCS SP8 WLL SMD-FLIM. V mikroskopu byl nastaven laser na vlnovou délku dle excitačních hodnot pro GFP.

Jako značení pro Golgiho aparát byla vyzkoušena komerčně dostupná červená fluorescenční barva BODIPY^{TM} TR Ceramide (Invitrogen, ThermoFisher). K namnožené kultuře Δ CCC2 *S. cerevisiae* s vloženým plazmidem pCM189, který nese gen pro ACA1_111080, bylo přidáno 0,225 µl BODIPY a po 30 minutách inkubace byly vzorky sledovány v mikroskopu. Stejně tak byla tato barva vyzkoušena i u transformovaných buněk *A. castellanii*.

4.6. IC_{50}

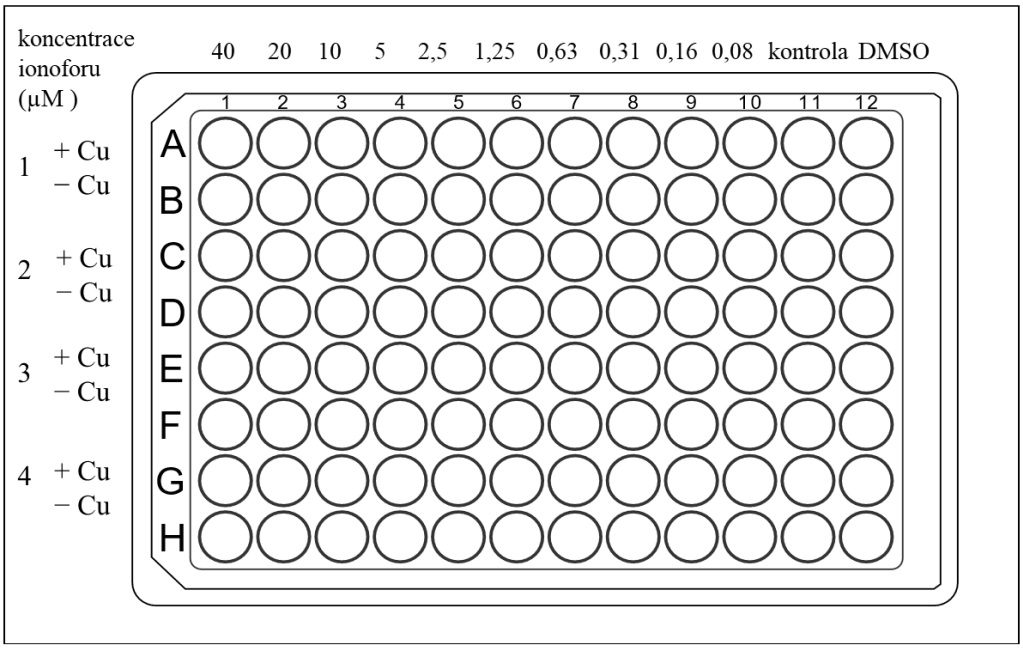
Stanovení inhibiční koncentrace je využívaná metoda pro evaluaci léčivých látek. V tomto případě jsme využili tři látky patřící mezi ionofory: 8-hydroxychinolin, disulfiram a pyrithion sulfid v kombinaci s mědí a bez mědi. Ionofory jsou po přídavku mědi velmi účinné a mohly by ukázat nový způsob boje s amébami.

4.6.1. Příprava experimentu

Nejdříve bylo připraveno médium PYG pro kultivaci améb. 10 ml média PYG bylo doplněno roztokem 50 mM $CuSO_4$, aby výsledná koncentrace byla 53,55 µM mědi. Tato koncentrace byla zvolena, aby přidáním 10 µl buněk do kultivační jamky došlo k naředění média s mědí na požadovanou koncentraci 50 µM mědi.

96-jamková destička byla naplněna ve všech jamkách, kromě prvního sloupce, 140 µl média – v řádce bylo pouze médium bez mědi nebo s mědí. Následně byl do první jamky přidán 40 µM roztok ionoforu v médiu PYG v objemu 280 µl. Následně byl ionofor pomocí dvojkové ředící řady přenesen do všech jamek v řádce. Jelikož jsou ionofory rozpuštěné v DMSO, byla vytvořena kontrola s DMSO (1,2 µl DMSO do jamky, do média s mědí i bez ní) a zároveň kontrola pouze v médiu PYG bez mědi nebo s ní (viz obrázek č. 5).

Posledním krokem bylo přidat do připravené 96-jamkové destičky buňky *A. castellanii* o koncentraci 3000 buněk v 10 µl. Buňky byly nasazeny v biologických tetraplikátech. Následně byla destička vložena do krabičky s vlhkým prostředím pro zamezení evaporace a takto byly buňky kultivovány 72 hodin ve 27 °C.



Obrázek č. 5 – **Rozvržení 96-jamkové destičky pro experiment s ionofory**
V řádcích se nachází biologické tetraplikáty buněk v médiu PYG bez mědi nebo s přídavkem 50 µM mědi. Ve sloupcích je gradient koncentrace přidaného ionoforu. Sloupec č. 11 slouží jako kontrola buněk bez přidaného ionoforu, poslední sloupec je kontrola DMSO.

4.6.2. Měření výsledků

Po uplynutí inkubační doby byly buňky v destičce položeny na led na dobu 10 minut, aby se odchytily ode dna jamek. Následně bylo 100 µl z každé jamky přeneseno do nové 96-jamkové destičky, kde již v každé jamce bylo 100 µl 4 % paraformaldehydu pro fixaci. Pro měření koncentrace byl využit průtokový cytometr (Guava easyCyte 11HT, Luminex). Výsledky byly zpracované v programu GraphPad, kde byla zjištěna poloviční maximální inhibiční koncentrace jednotlivých ionoforů.

4.7. ICP-MS

Pro přípravu vzorků pro ICP-MS je nutné získat dostatečné množství buněk. Nejprve byly v pěti středně velkých kultivačních nádobách o povrchu 75cm^2 kultivovány buňky *A. castellanii* po dobu 72 hodin. Poté byla změřena koncentrace buněk pomocí přístroje Cell counter a následně byly buňky rozděleny do velkých kultivačních nádob s povrchem 150 cm^2 do objemu 100 ml v koncentraci 60000 buněk/ml média PYG s příslušným přídavkem mědi nebo

chelátoru. Pro tento experiment byly zvoleny hodnoty koncentrace mědi 5, 250, 500 µM $CuSO_4$ a pro chelátor mědi koncentrace 25 a 100 µM BCS.

Po inkubaci buněk ve velkém objemu v odlišných podmínkách bylo nutné buňky promýt s využitím pufru HEPES (10mM HEPES, 140mM NaCl, pH = 7,2). Nejprve bylo jemně odlito původní médium z kultivační nádoby, aby se buňky stále udržely na dně kultivační nádoby. Následně bylo přidáno 20 ml pufru a pomalými pohyby byly buňky propláchnuty a HEPES byl opět vylit. Poté bylo přidáno dalších 20 ml pufru, tentokrát byly buňky mechanickými údery o nádobu odděleny ode dna a celý obsah nádoby byl přesunut do falkony a následně centrifugován 10 min při 1200 g. Následně byl odstraněn supernatant, buňky byly resuspendovány v malém objemu pufru HEPES a byla změřena koncentrace buněk. Dále byly buňky přeneseny do předem zvážených eppendorfových zkumavek, po centrifugaci byl opět odstraněn supernatant a buňky byly vloženy do termobloku o teplotě 100 °C, ve kterém byly nechány 1 hodinu k vysušení. Suché vzorky byly opět zváženy, aby se zaznamenala hmotnost sušiny v eppendorfově zkumavce. Následně byly vzorky odeslány pro analýzu na přístroji X Series II, iCAP Q ICP-MS (ThermoFisher Scientific) do laboratoře plazmové spektrometrie (Laboratoře geologických ústavů UK, Albertov 6). Analýza výsledků proběhla v programu Excel a GraphPad.

4.8. qPCR

4.8.1. Kultivace buněk

Pro qPCR analýzu byly nasazeny buňky *A. castellanii* v tetraplikátu pro jednotlivé podmínky. Jako kontrolní byla zvolena koncentrace 5 µM $CuSO_4$. Následně byla jako podmínka s vyšším přídavkem mědi vybrána koncentrace 250 µM $CuSO_4$ a jako podmínka s nedostatkem mědi 250 µM BCS. Do každé kultivační nádoby o objemu 5 ml média byly přidány buňky o koncentraci 50 000 buněk/ml média. Kultivace probíhala po dobu 72 hodin.

4.8.2. Extrakce mRNA

Po 72 hodinách bylo od buněk odstraněno kultivační médium, do kultivační nádoby bylo přidáno 5 ml sterilního PBS. Buňky byly mechanicky odděleny ode dna kultivační nádoby a přemístěny do falkony. Následně proběhla centrifugace buněk po dobu 10 minut při 8000 g. Dále bylo postupováno dle protokolu k sadě pro izolaci mRNA (High pure RNA isolation kit, Roche), z kultivovaných buněk byla extrahována mRNA, která byla uskladněna v −80 °C před dalším použitím.

4.8.3. qPCR

Před samotnou reakcí PCR byla změřena koncentrace RNA a naředěna na koncentraci 50 ng/µl. Dále byly naředěny primery (Tabulka č. 17) a následován protokol dle sady pro qPCR (KAPA SYBR FAST One-Step, Roche). Nejdříve bylo potřeba namíchat směs dle protokolu, postupně

směsí zaplnit jamky 96-jamkové destičky a nakonec byla do každé připravené jamky přidána RNA. Byl použit přístroj CFX96 Real time PCR instrument (Bio-Rad), který umožňuje analýzu celé 96-jamkové destičky najednou. Byl nastaven cyklus viz tabulka č. 18. Jako kontrola reakce byl použit ß-aktin. Výsledky byly zpracovány v programu Excel a GraphPad Prism.

Tabulka č. 17 – seznam použitých primerů pro qPCR

primer	sekvence
qPCR-AcCTR-like-R	5´- CATCAAGCAAGCGCGGATAG - 3‘
qPCR-AcCTR-like-F	5´- TCGAACAATGGCACGTCGAG - 3´
qPCR-AcATP-R	5´- ATGATGAACGTGATGACCACCC - 3´
qPCR-AcATP-F	5´- TACAAGGTGTTGAAGCACGGG - 3´
qPCR-AcCTR-R	5´- TACACTCCGCAACAACCGAC - 3´
qPCR-AcCTR-F	5´- ACTGCCAAATGATGCCCAAC - 3´

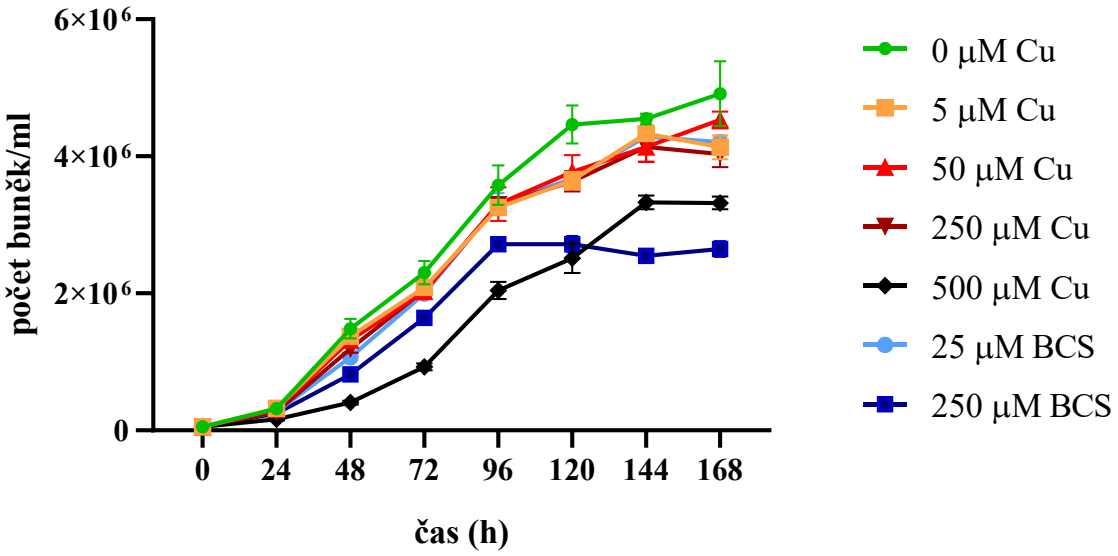
Tabulka č. 18 – průběh reakce qPCR

fáze	teplota (°C)	časový interval
zahájení	42	30 minut
	95	5 minut
39 cyklů	95	10 sekund
	56	20 sekund
	72	20 sekund
ukončení	55	5 sekund
	95	1 minuta

5. Výsledky

5.1. Růstová křivka

Vytvoření růstových křivek bylo prvním krokem práce pro lepší porozumění, jak nadbytek a nedostatek mědi ovlivňuje růst *Acanthamoeba castellanii*. Jelikož nebylo možné předem odhadnout, jaká koncentraci mědi (Cu) a chelátoru mědi (BCS) bude pro *A. castellanii* nepříznivá, bylo zvoleno širší spektrum podmínek, ve kterém byl růst buněk zaznamenán. Buňky nasazené v biologickém triplikátu byly měřeny každých 24 hodin pomocí průtokového cytometru. Z tohoto pozorování je patrné, že ve vysokém nadbytku mědi (500 µM $CuSO_4$) buňky méně prosperují. Obdobně tak působí nedostatek mědi způsobený chelátorem mědi (250 µM BCS) (Obr. 6). Naopak při nízkých koncentracích mědi nebo chelátoru mědi (BCS) nebyl růst *A. castellanii* nijak zpomalen a v těchto podmínkách dokázaly velmi dobře přežívat. Z výsledků růstové křivky byla následně vybrána kontrolní koncentrace 5 µM $CuSO_4$ pro následující experimenty.



Obrázek č. 6 – Růstová křivka *Acanthamoeba castellanii* při kultivaci v médiu s různou dostupností mědi.

Nadbytek mědi (Cu) byl dosažen zvyšující se koncentrací přídavku $CuSO_4$, nedostatek mědi byl navozen přídavkem chelátoru mědi (BCS). Koncentrace buněk je zaznamenána jako počet buněk/ml média.

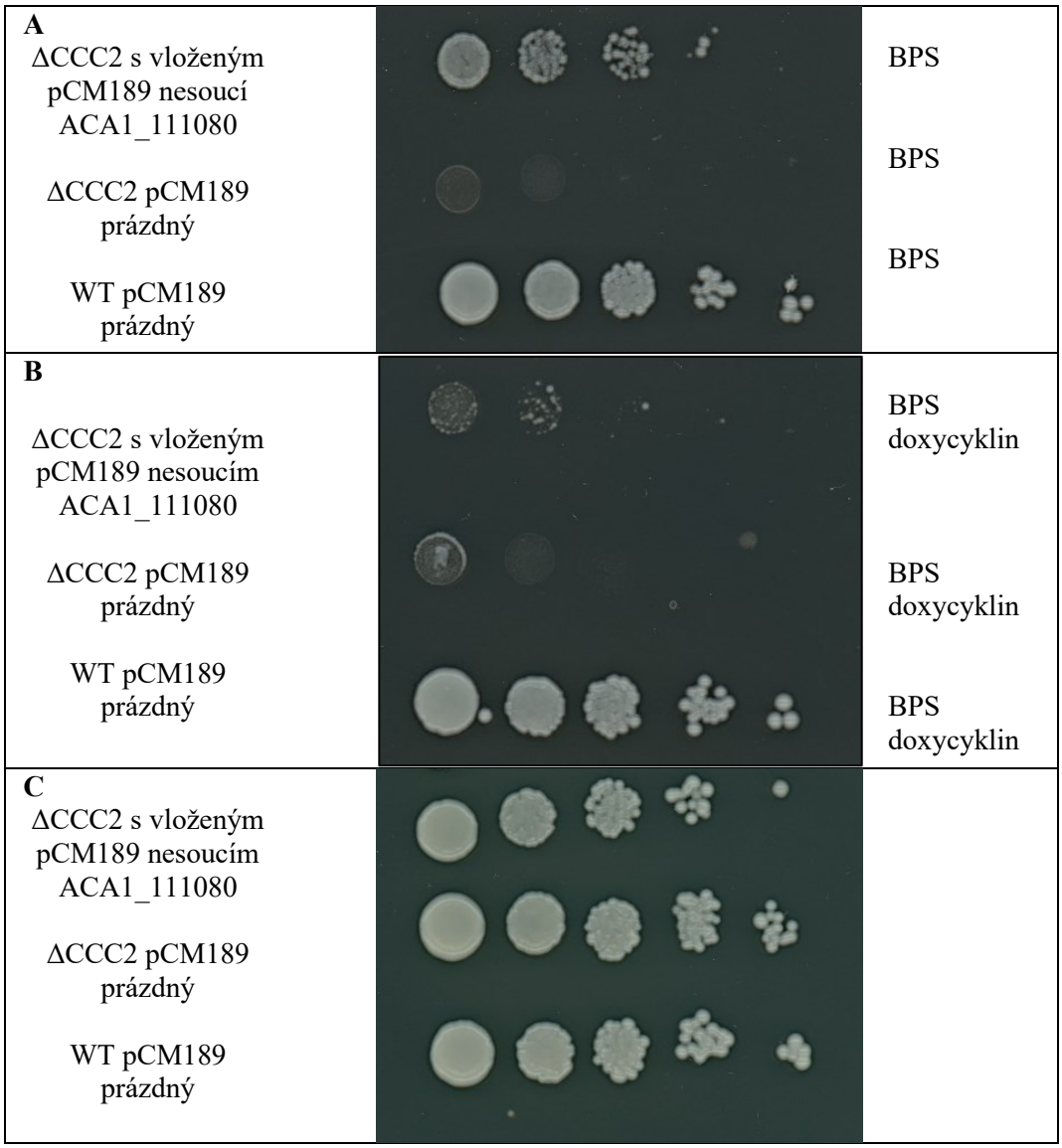
5.2. Charakterizace přenašečů mědi

5.2.1. ATPáza P-typu (gen ACA1_111080)

5.2.1.1. Funkční analýza genu

Gen ACA1_111080 kódující domnělou ATPázu P-typu byl úspěšně zaklonován do plazmidu pCM189, správnost vloženého genu byla ověřena sekvenováním. Následně byla provedena transformace *S. cerevisiae* vektorem, který nesl studovaný gen, a to u nemodifikovaného kmene (WT) a mutantního kmene postrádajícího CCC2 (měď přenášející ATPáza P-typu). Selekce transformovaných kvasinek proběhla na Petriho miskách s médiem bez uracilu (SC-U). Po úspěšné transformaci bylo možné přistoupit k poslednímu kroku, a to analýze funkční komplementace.

Transformované kvasinky byly naneseny na Petriho misky s odlišnými selekčními podmínkami. Bylo očekáváno, že gen ACA1_111080 kóduje podobný přenašeč mědi, jakým je již známá CCC2. Mutantní kmen *S. cerevisiae* postrádající tuto CCC2 (ΔCCC2) nesoucí prázdný pCM189 nedokázal na médiu s přidaným chelátorem železa (BPS) růst. Tato metoda je založena na nedostatku vložené mědi do „multicopper" oxidázy, která slouží pro příjem železa. Tím pádem na Petriho misce s chelátorem železa (BPS) nedokáže ΔCCC2 růst, jelikož mu chybí železo ve vnitřním prostředí buňky. Stejný kmen s vloženým genem ACA1_111080 původem z *A. castellanii* za stejných podmínek narostl. Tato skutečnost dokazuje, že ATPáza P-typu kódovaná genem ACA1_111080 dokáže suplovat funkci již známé CCC2. Tedy že protein kódovaný genem ACA1_111080 plní funkci přenašeče mědi (Obr. 7). Jako kontrola, že je tento nárůst opravdu specifický a závisí pouze na vloženém genu z *A. castellanii,* byla použita Petriho miska s přidaným doxycyklinem. Ten inhibuje transkripci vloženého genu na plazmidu pCM189 a na tomto médiu ani mutantní kmen CCC2 s vloženým genem ACA1_111080 nenarostl.

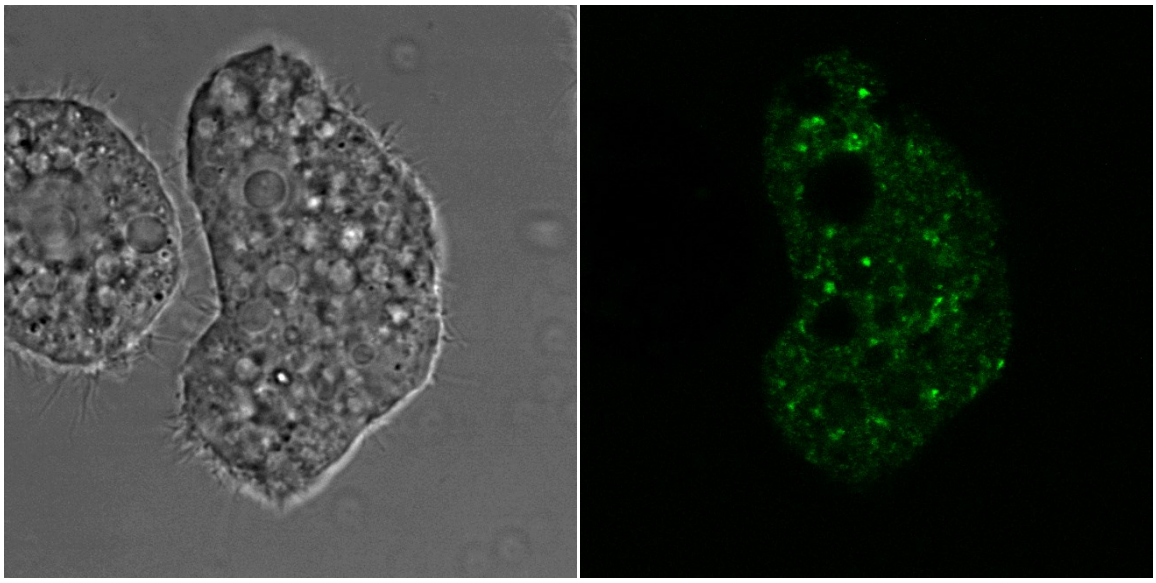


Obrázek č. 7 – Výsledky funkční komplementace genu ACA1_111080 v *S. cerevisiae*
(WT = nemodifikovaný kmen, ΔCCC2 = mutantní kmen deficientní v ATPáze P-typu CCC2, BPS = chelátor železa, doxycyklin = inhibitor transkripce vloženého genu ACA1_111080, pCM189 = plazmid)
A – Médium obsahuje chelátor železa (BPS). **B** – Médium obsahuje chelátor železa (BPS) a doxycyklin. **C –** Kontrolní Petriho miska.

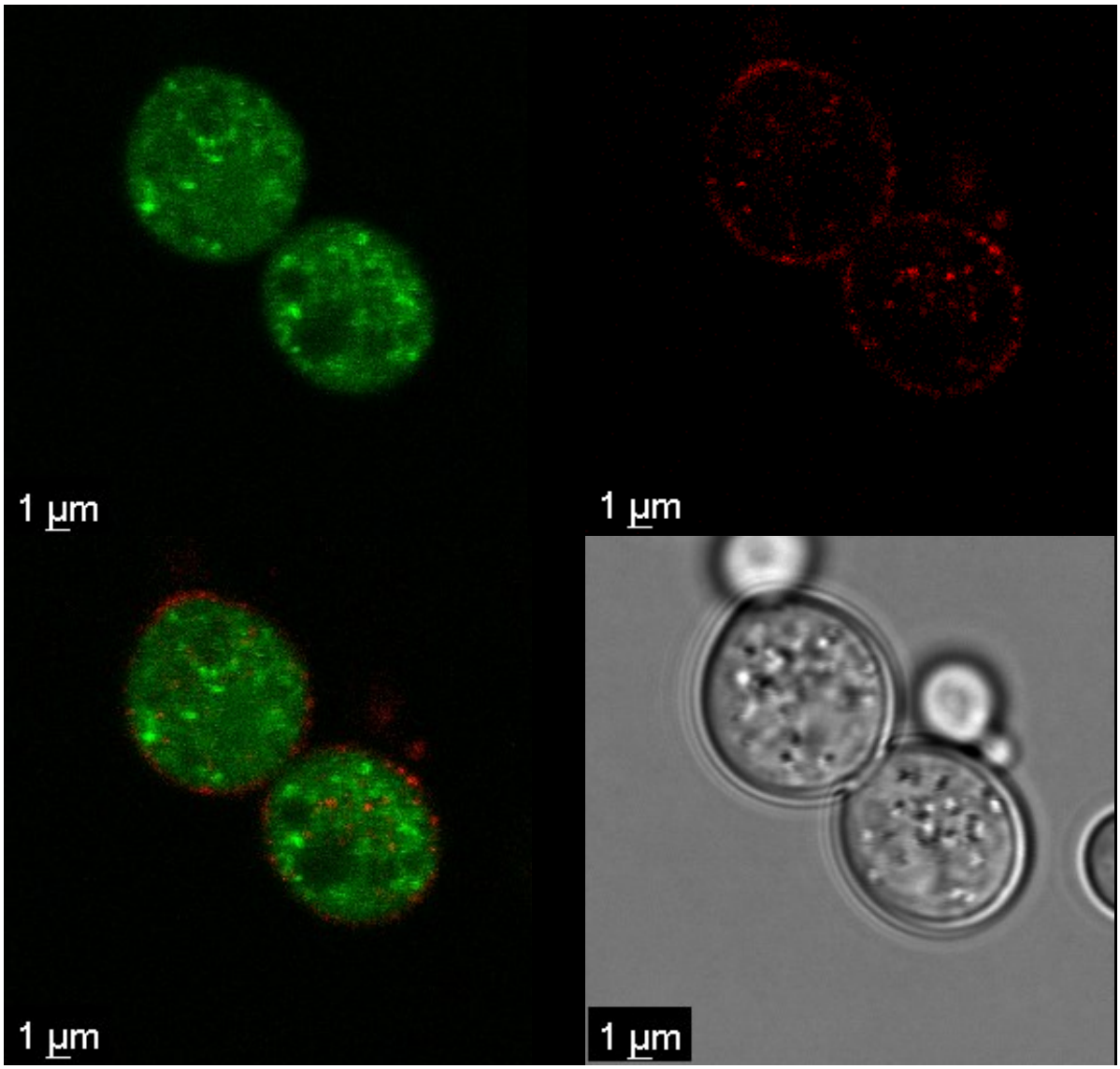
5.2.1.2. Lokalizace proteinu

Nejdříve byla vyzkoušena lokalizace proteinu kódovaného genem ACA1_111080 v transformovaných amébách. Do buněk *A. castellanii* byly vneseny plazmidy pGAPDH-EGFP a pTPBF-EGFP nesoucí ACA1_111080 a zároveň GFP (green fluorescent protein). Pozorování *in vivo* pod fluorescenčním mikroskopem (Leica TCS SP8 WLL SMD-FLIM) nepřineslo jednoznačné výsledky a vzhledem k absenci vhodných markerů buněčné lokalizace u *A. castellanii* nešlo tuto metodu využívat pro určení lokalizace (Obr. 8). *S. cerevisiae* má tento protein lokalizován v Golgiho aparátu, proto bylo vyzkoušeno označit

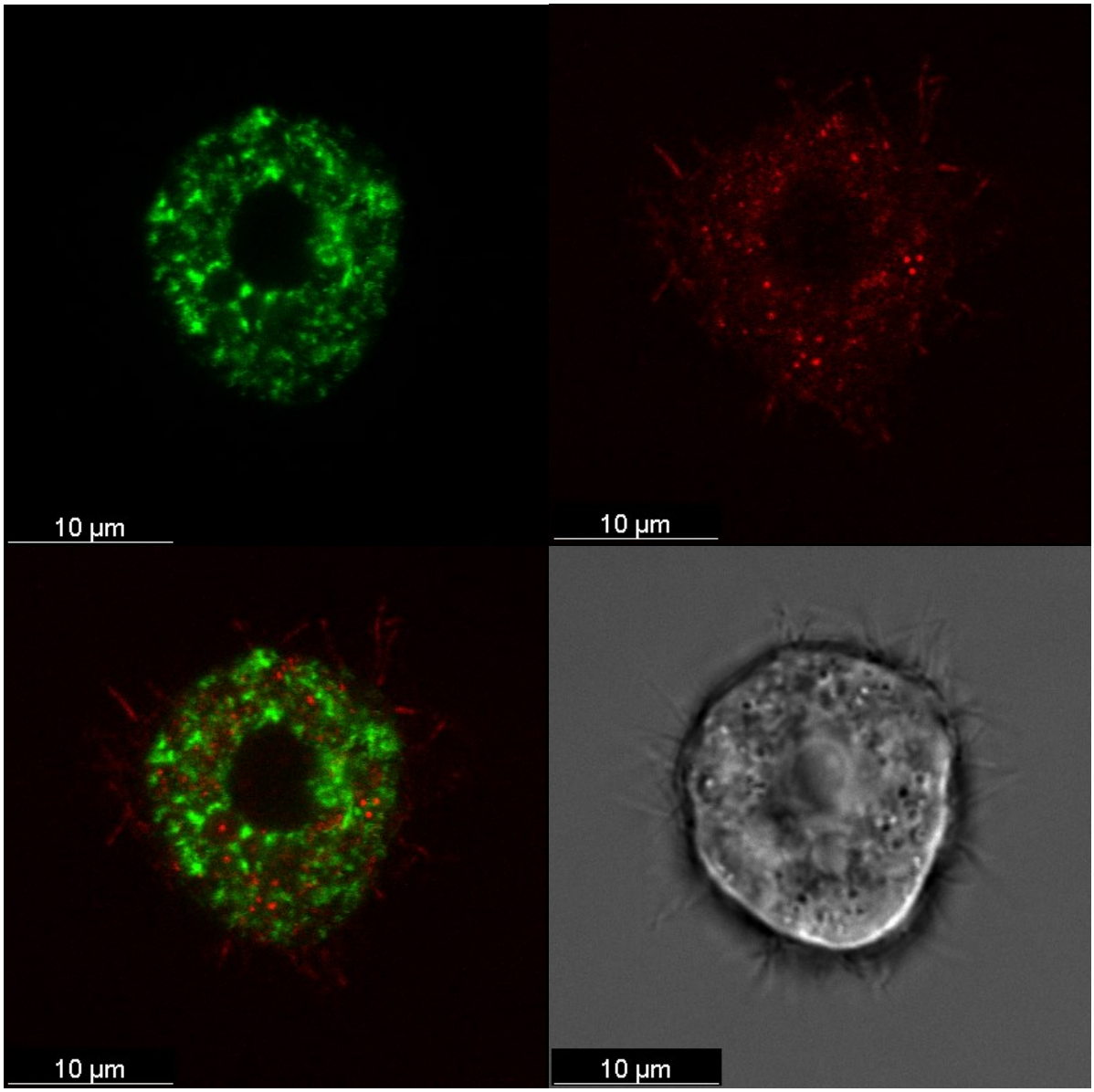
Golgiho aparát pomocí komerční fluorescenční barvy BODIPY^{TM} TR Ceramide (Obr. 9). Červený fluorescenční signál je viditelný nejen uvnitř buňky, ale i na periferiích a je patrné, že BODIPY v *S. cerevisiae* nekolokalizuje s ATPázou kódovanou genem ACA1_111080. Výsledkem analýzy buněčné lokalizace je, že v *S. cerevisiae* tento protein za daných podmínek s přidaným GFP není lokalizován v Golgiho aparátu. Následně bylo vyzkoušeno využití BODIPY v transformovaných *A. castellanii* (Obr. 10), kdy BODIPY nekolokalizovalo s ATPázou P-typu. Není jasné, zda byl BODIPY vhodný marker Golgiho aparátu pro *A. castellanii,* a tak bude potřeba využít jiných metod pro lokalizaci ATPázy P-typu.



Obrázek č. 8 – Vizualizace proteinu kódovaného ACA1_111080 pomocí GFP v *A. castellanii*



Obrázek č. 9 – Vizualizace proteinu kódovaného genem ACA1_111080 v *S. cerevisiae* označeného GFP s využitím BODIPY jako fluorescenčního značení Golgiho aparátu
Gen ACA1_111080 byl vnesen do *S. cerevisiae* v plazmidu pCM189. ATPáza kódovaná tímto genem je značena pomocí GFP, BODIPY je červená fluorescenční barva označující Golgiho aparát.



Obrázek č. 10 – Vizualizace proteinu kódovaného genem ACA1_111080 v *A. castellanii* označeného GFP s využitím BODIPY jako fluorescenčního značení Golgiho aparátu
Gen ACA1_111080 byl vnesen do *A. castellanii* v plazmidu pTPBF-EGFP. ATPáza kódovaná tímto genem je značena pomocí GFP, BODIPY je červená fluorescenční barva označující Golgiho aparát.

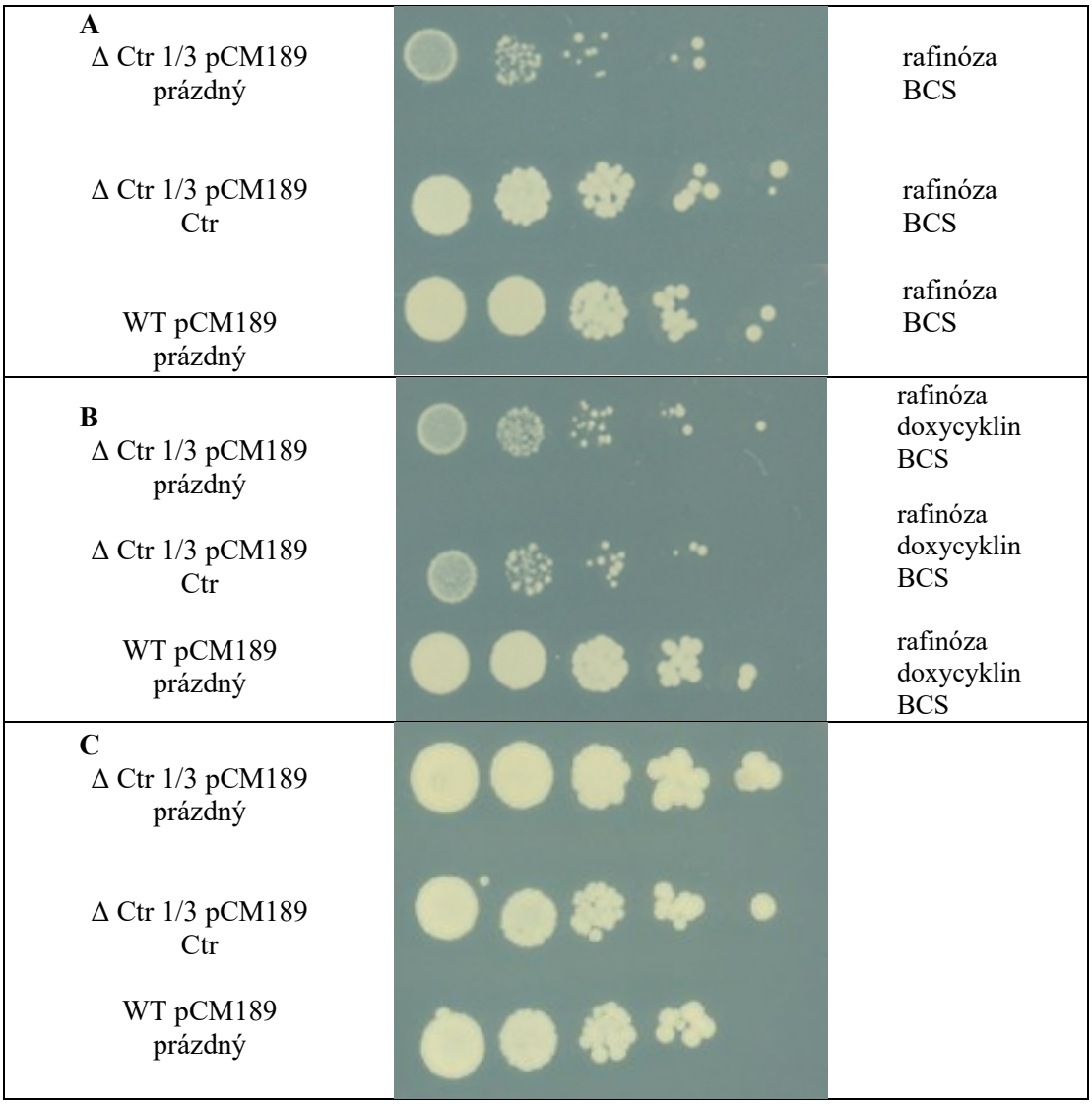
5.2.2. Ctr (geny ACA1_289610 a ACA1_399620)

5.2.2.1. Funkční analýza genu

Zaklonování Ctr-like genu (ACA1_399620) do plazmidu pCM189 nebylo úspěšné. Při kontrolním sekvenování se v sekvenci genu vždy objevil stop kodon. Při opakování pokusu sekvenování přineslo vždy stejné výsledky, takže nebylo možné v práci s tímto genem pokračovat.

Zaklonování genu ACA1_289610 (Ctr) do plazmidu pCM189 bylo naopak úspěšné. Po transformaci nemodifikovaného kmene *S. cerevisiae* i ΔCtr1/3 (kmen deficientní v přenašečích mědi Ctr) tímto vektorem nesoucím studovaný gen byla provedena analýza funkční komplementace (Obr. 11). Pro ni bylo využito médium SC-U obsahující 2 % rafinózu, která představuje neredukující cukr, a proto ji *S. cerevisiae* nemůže využívat tak efektivně jako zdroj energie pro fermentaci. Kvasinky více využívají respiraci a oxidativní fosforylaci. Dýchací řetězec je závislý na dostatku mědi a jejím zabudování do cytochrom c oxidázy. Na Petriho misce byly vytvořeny pomocí rafinózy a chelátoru mědi (BCS) podmínky, ve kterých mutantní kmeny deficientní v přenašečích mědi (ΔCtr1/3) nedokázaly narůst. Stejný kmen po vložení pCM189 s genem ACA1_289610 v těchto podmínkách narostl. Tento gen ACA1_289610 původem z *A. castellanii* tedy kóduje přenašeč mědi, který je schopný nahradit funkci známého kvasinkového Ctr.

Pro ověření specifity výsledku byl opět použit doxycyklin, který specificky zastavil transkripci genu neseného na vektoru pCM189. Na takové Petriho misce nedokázal ani kmen ΔCtr 1/3 s vloženým genem z *A. castellanii* narůst. Pro kontrolu bylo použito pouze médium SC-U.



Obrázek č. 11 – Výsledky funkční komplementace genu ACA1_289610 kódující přenašeč mědi

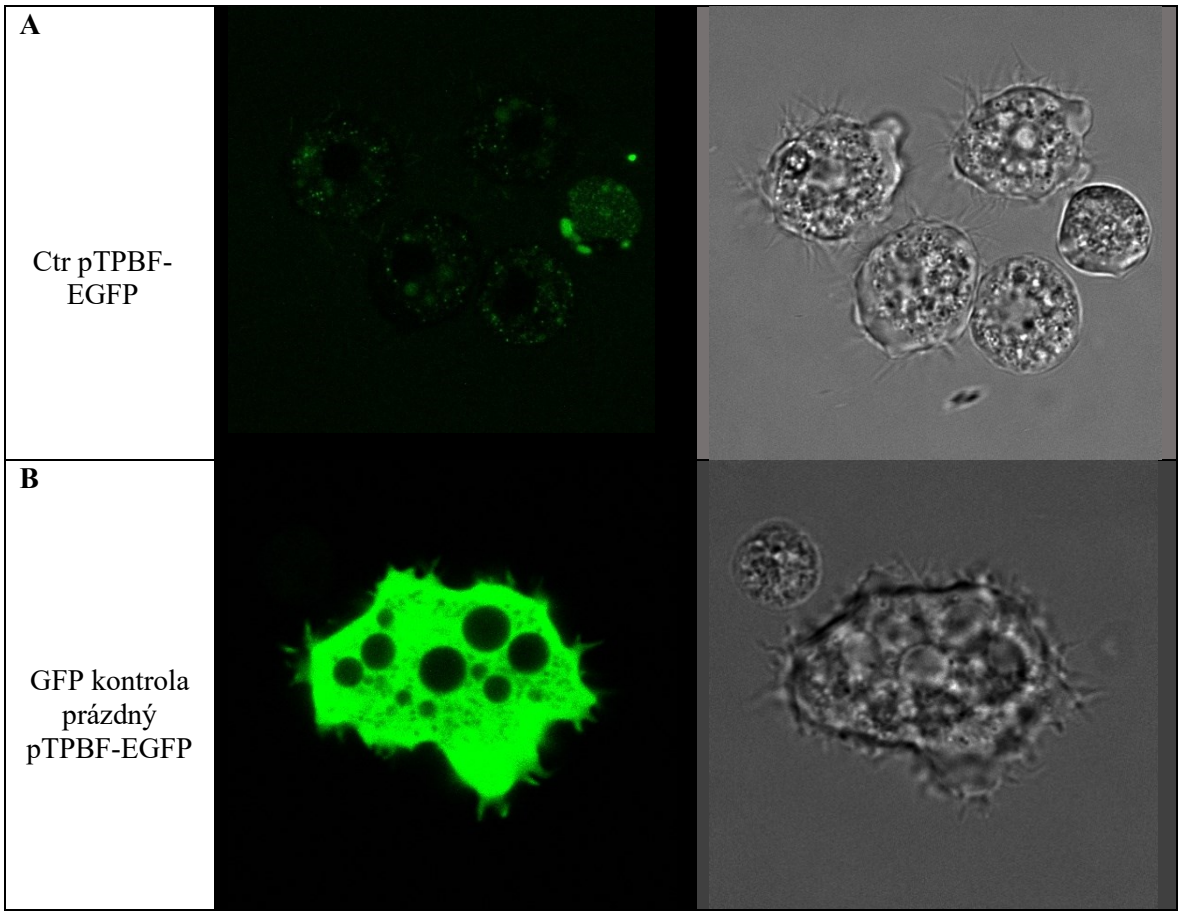
(WT = nemodifikovaný kmen, ΔCtr1/3 = mutantní kmen deficientní v přenašečích mědi Ctr, doxycyklin = inhibitor transkripce vloženého genu ACA1_289610, rafinóza = neredukující sacharid)

A – Médium obsahuje rafinózu a chelátor mědi (BCS). **B** – Médium obsahuje rafinózu, chelátor mědi (BCS) a doxycyklin, který inhibuje transkripci genu ACA1_289610. **C –** Kontrolní Petriho miska, kde je médium SC-U bez jakékoliv modifikace.

5.2.2.2. Lokalizace proteinu

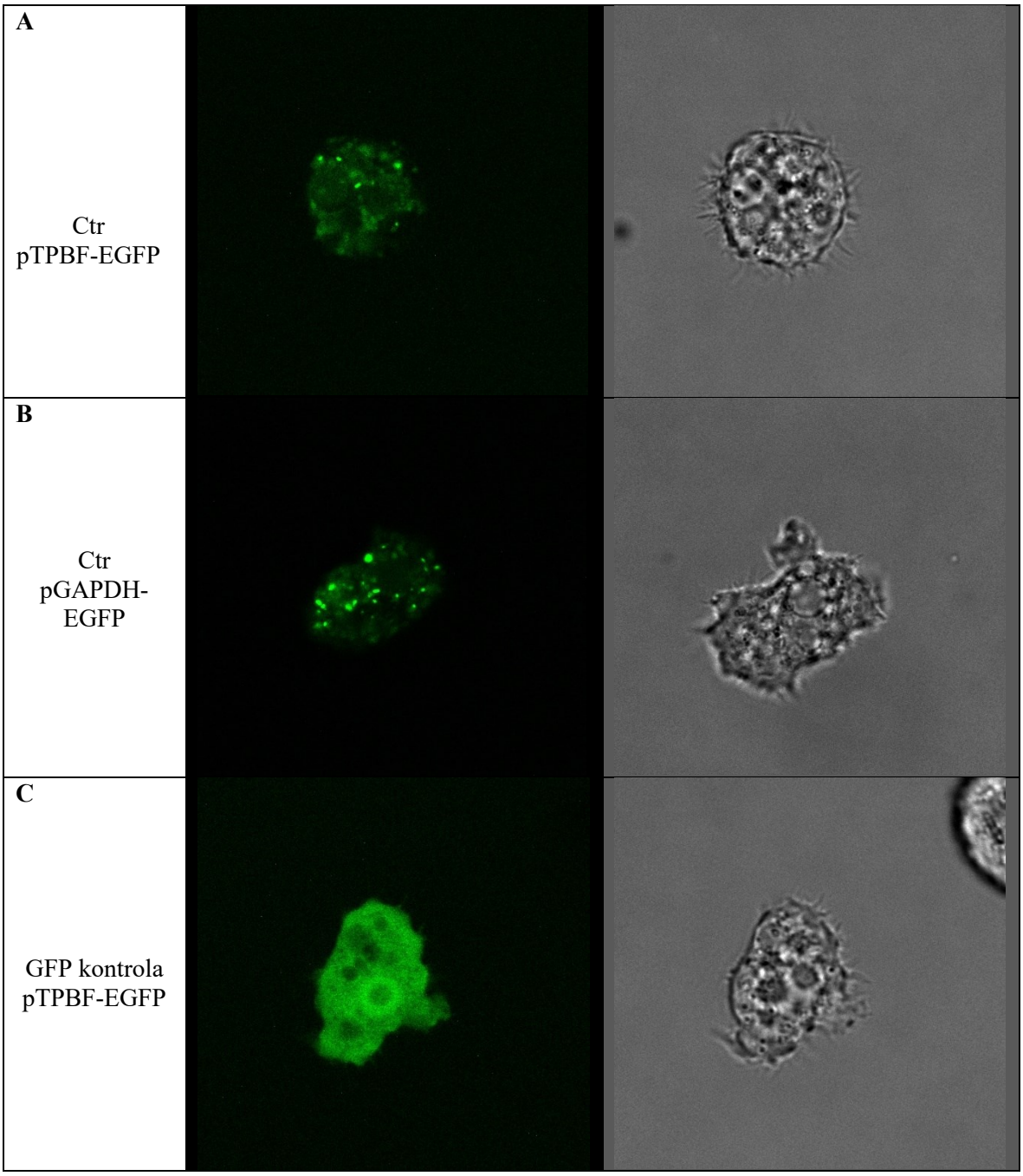
Lokalizace proteinu kódovaného genem ACA1_289610 značeného GFP byla analyzována na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 WLL SMD-FLIM. Nejdříve bylo provedeno pozorování živých transformovaných améb, do kterých byly vloženy plazmidy pTPBF-EGFP a pGAPDG-EGFP nesoucí gen pro přenašeč mědi a GFP na konci sekvence genu (Obr. 12). Transportér mědi Ctr, jak je známý u *S. cerevisiae,* je lokalizovaný v cytoplazmatické membráně, a proto byla očekávána stejná lokalizace i u *A. castellanii*. Pozorování v mikroskopu nepřineslo

jednoznačné výsledky a nebylo možné vyvodit žádné závěry o lokalizace. Proto bylo vyzkoušeno umístit GFP na začátek genu a byly vytvořeny nově transformované *A. castellanii* (Obr. 13). Na snímcích z mikroskopu není patrná membránová lokalizace přenašeče mědi Ctr. Navíc je možné, že přítomnost GFP neumožňuje správné složení proteinu, který tak lokalizuje jinam, než je běžné. Kvůli pozorovanému fluorescenčnímu signálu ale odhadujeme, že by Ctr s připojeným GFP mohl být lokalizován v Golgiho aparátu, ale potvrzení této domněnky vyžaduje další experimenty.



Obrázek č. 12 – Vizualizace přenašeče mědi v *A. castellanii* pomocí GFP umístěného na N-konci proteinu

(Ctr = přenašeč mědi kódovaný studovaným genem ACA1_289610, pTPBF-EGFP = plazmid nesoucí GFP a rezistenci vůči antibiotiku geneticin, GFP = zelený fluorescenční protein) **A** – Vizualizace proteinu kódovaného genem ACA1_289610. Tento gen je vložen do *A. castellanii* na vektoru pTPBF. **B** – Kontrolní snímky transformovaných *A. castellanii* s prázdným pTPBF-EGFP.



Obrázek č. 13 – Vizualizace proteinu kódovaného genem ACA1_289610 v *A. castellanii* pomocí GFP, jehož sekvence je přidána na C-konci proteinu

(Ctr = přenašeč mědi kódovaný genem ACA1_289610, pTPBF-EGFP = vektor nesoucí GFP a rezistenci vůči antibiotiku geneticin, pGAPDFH-EGFP = vektor pro větší expresi proteinu, GFP = zelený fluorescen;ční protein)

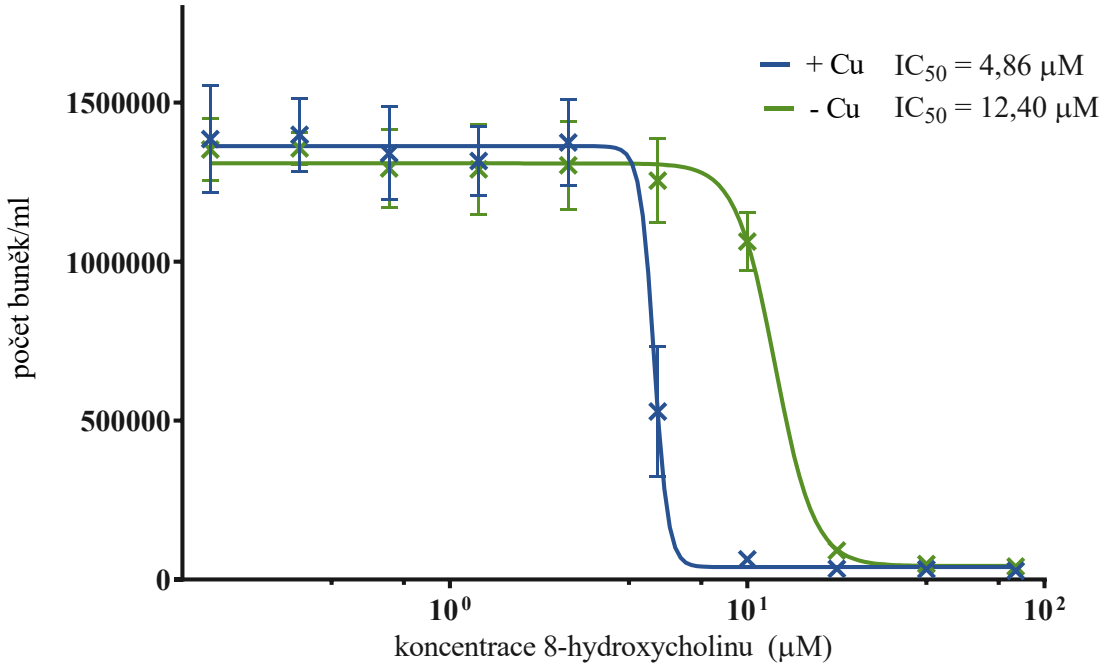
A – *A. castellanii* s vloženým vektorem pTPBF-EGFP nesoucí přenašeč mědi Ctr. **B** – *A. castellanii* s vloženým vektorem pGAPDH-EGFP, který má silnější expresi vloženého přenašeče mědi. **C** – Kontrolní snímek transformované *A. castellanii* s prázdným vektorem pTPBF-EGFP.

5.3. Stanovení IC_{50} pro jednotlivé ionofory

Měďnaté ionofory přenáší ionty mědi přes plazmatickou membránu, mohou být pro *A. castellanii* toxické i samotné, ale s přidanou mědí je tento projev mnohem silnější. Výsledkem experimentu jsou křivky inhibiční koncentrace, které popisují odlišný účinek jednotlivých ionoforů a vliv jejich koncentrace na růst *A. castellanii*. S přidanou mědí v podobě 50 µM $CuSO_4$ pozorujeme zvýšený účinek ionoforu a snížení hodnoty IC_{50} (poloviční maximální inhibiční koncentrace).

5.3.1. 8-HQ (8-hydroxychinolin)

Počet buněk *A. castellanii* po 72 hodinové kultivaci s 8-hydroxychinolinem byl změřen na průtokovém cytometru Guava. Křivka z naměřených hodnot byla zpracována v programu GraphPad (Obr. 14). Poloviční maximální inhibiční koncentrace samotného ionoforu je 12,4 µM. Při přidání mědi ve formě 50 µM $CuSO_4$ tato hodnota klesne na 4,86 µM. Kombinace 8-hydroxychinolinu s mědí snížila 3x hodnotu IC_{50} a efektivně snižuje přežívání buněk.



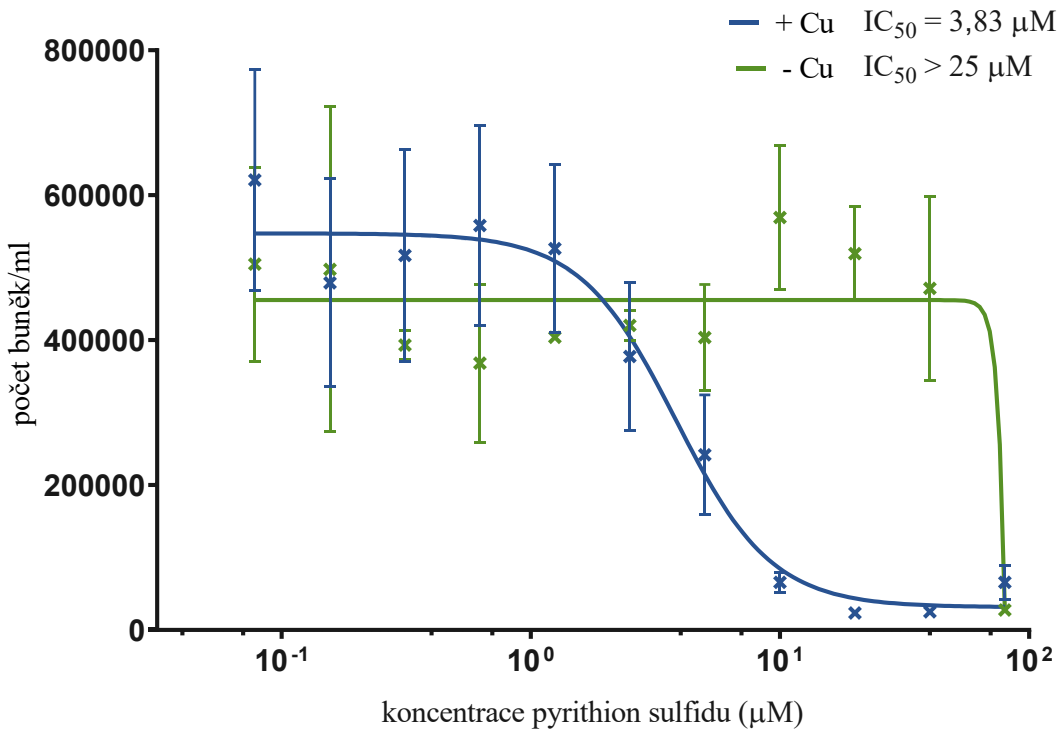
Obrázek č. 14 – Zobrazení vlivu 8-hydroxycholinu na růst *A. castellanii*

Poloviční maximální inhibiční koncentrace pro 8-hydroxycholin bez přidání mědi (- Cu) je 12,4 µM. S přidanou mědí ve formě 50 µM $CuSO_4$ (+ Cu) je hodnota IC_{50} 4,86 µM.

5.3.2. PyS (pyrithion sulfid)

Stejně jako v předchozím pokusu v kapitole 5.3.1. byly získané výsledky zpracovány do křivky popisující efekt pyrithion sulfidu na růst *A. castellanii* (Obr. 15). Samotné užití pyrithion sulfidu bylo překvapivě velmi neúčinné proti *A. castellanii*. Hodnota IC_{50} získána v programu GraphPad

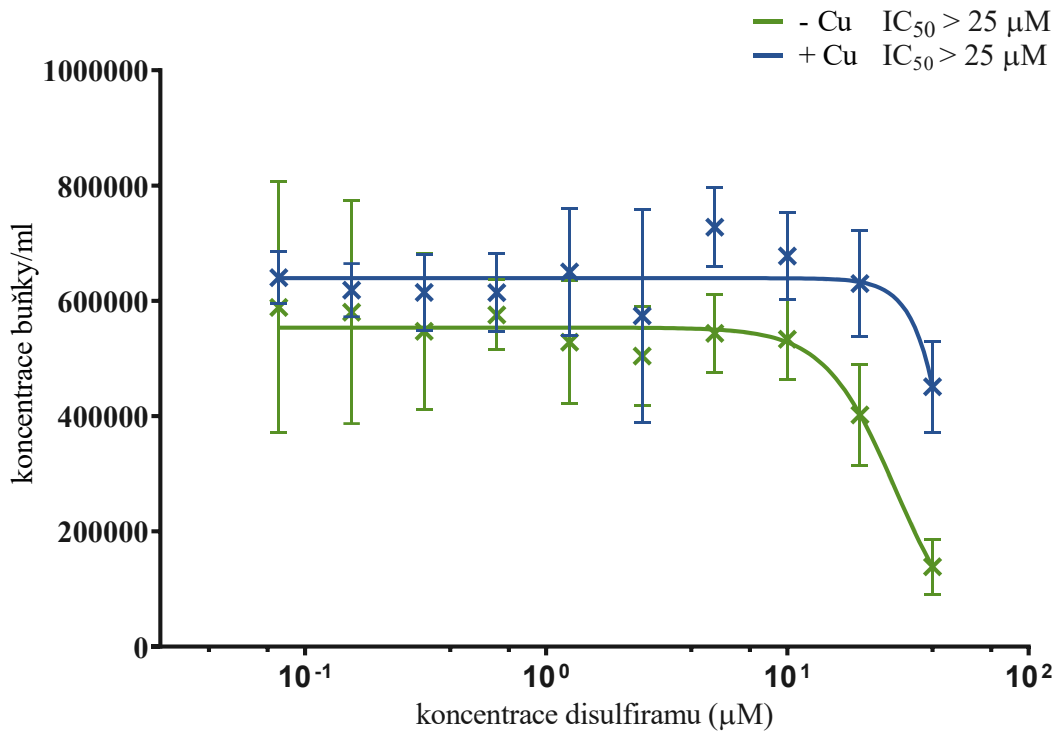
byla 123,10 µM. Přídavek 50 µM mědi k pyrithion sulfidu naopak snížilo poloviční maximální inhibiční koncentrace velmi výrazně, a to na 3,83 µM.



Obrázek č. 15 – Zobrazení výsledků měření *A. castellanii* kultivované s pyrithion sulfidem Polovina maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) pyrithion sulfidu je 123,10 µM (- Cu). S přídavkem 50 µM mědi (+ Cu) je IC_{50} výrazně snížená na 3,83 µM.

5.3.3. DSF (disulfiram)

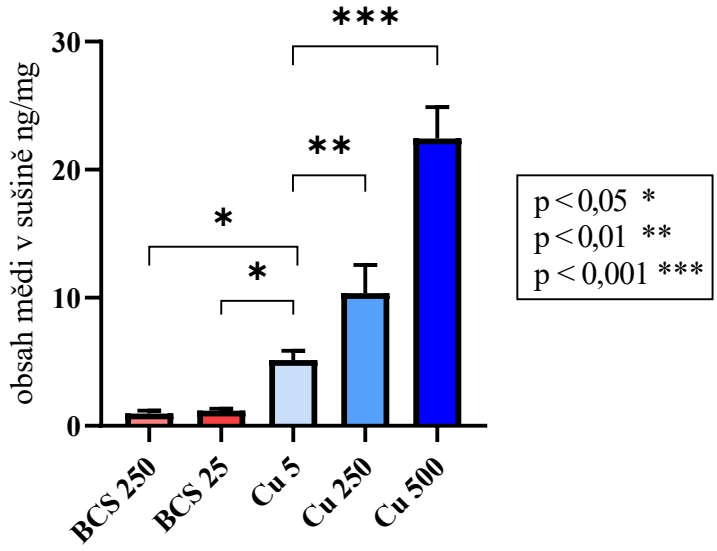
Stejným způsobem jako v kapitole 5.3.1. byly získány a zpracovány výsledky pro určení IC_{50} pro disulfiram. V obou případech bylo použití disulfiramu neúčinné a hodnoty IC_{50} vždy přesahovaly 25 µM (Obr. 16). Pokus byl opakován několikrát, aby bylo vyvráceno, že dochází k systematické chybě.



Obrázek č. 16 - Zobrazení výsledků měření *A. castellanii* kultivované s disulfiramem
Hodnoty IC_{50} pro disulfiram překročily s mědí i bez hodnotu 25 µM.

5.4. Obsah mědi v *A. castellanii* v závislosti na kultivačních podmínkách

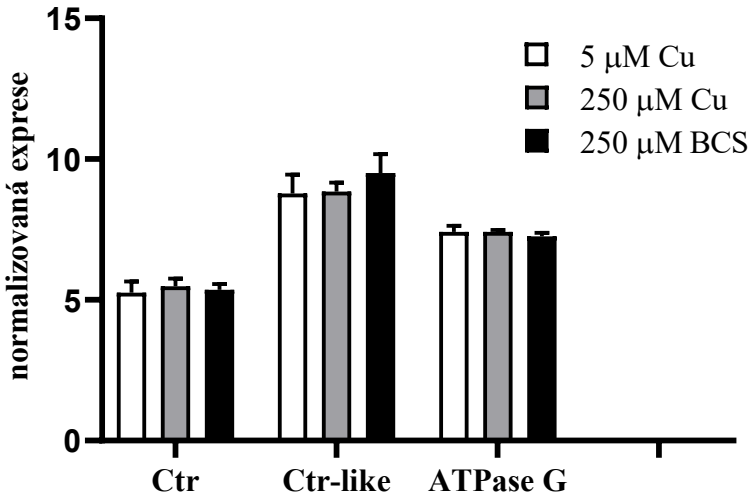
Pomocí metody ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) bylo určeno množství mědi v dehydratovaném vzorku *A. castellanii*. Biologické triplikáty byly kultivovány 72 hodin v nadbytku mědi (250 µM $CuSO_4$, 500 µM $CuSO_4$) a v nedostatku mědi s využitím chelátoru mědi (25 µM BCS, 250 µM BCS). Výsledný obsah mědi v těchto vzorcích byl porovnán s kontrolní kulturou *A. castellanii*, která byla kultivována v 5 µM $CuSO_4$ (Obr. 16). Výsledek byl zpracován v GraphPadu. Statistika byla vypracována pomocí testu ANOVA a následně pomocí Dunnetova testu, kdy došlo k porovnání jednotlivých vzorků s kontrolou. Hodnoty p zobrazené v obr. 17 tedy popisují porovnání s kontrolou (5 µM $CuSO_4$). Při vyšší koncentraci mědi v kultivačním médiu (250 µM $CuSO_4$, 500 µM $CuSO_4$) má *A. castellanii* násobně vyšší obsah mědi uvnitř buňky. Naopak při nedostatku mědi (25 µM BCS, 250 µM BCS) je obsah mědi v *A. castellanii* výrazně nižší.



Obrázek č. 17 – Obsah mědi v sušině *A. castellanii* v závislosti na kultivačních podmínkách (BCS = bathocuproin disulfonát, Cu = měď v kultivačním médiu ve formě $CuSO_4$) Výsledky hmotnostní spektrometrie (ICP-MS) v jednotlivých kultivačních podmínkách (udávány v µM). Vyhodnocení proběhlo pomocí testu ANOVA a Dunnetova testu, kdy byly jednotlivé kultivační podmínky porovnány s kontrolou (5 µM $CuSO_4$).

5.5. q-PCR

Pro popsání změn exprese přenašečů mědi (Ctr, Ctr-like a ATPáza P-typu) v závislosti na kultivačních podmínkách bylo zvoleno využití qPCR. Pro experiment byly použity *A. castellanii* kultivované v médiu s přídavkem 5 µM mědi (ve formě $CuSO_4$) jako kontrola. Pro pozorování změny exprese přenašečů ve snížené koncentraci mědi bylo do média přidáno 250 µM BCS, a ve zvýšené 250 µM $CuSO_4$. Výsledná zachycená fluorescence byla normalizovaná, od průměru triplikátu byl odečten průměr aktinu a výsledky zachycuje graf (Obr. 18) a zároveň byla vypočítána násobná změna exprese (fold change) (Tabulka č. 19). Výsledná data byla statisticky vyhodnocena pomocí jednostranného testu ANOVA a výsledek byl nesignifikantní. Závěrem je, že exprese jednotlivých genů v nadbytku ani nedostatku mědi nebyla změněná.



Obrázek č. 18 – Exprese jednotlivých studovaných genů v *A. castellanii* v závislosti na dostupnosti mědi v kultivačním médiu

(BCS = bathocuproin sulfonát, chelátor mědi, Cu = měď v kultivačním médiu, ve formě $CuSO_4$) Graf znázorňuje expresi jednotlivých genů v odlišných kultivačních podmínkách. 5 µM měď v kultivačním médiu slouží jako kontrola.

Tabulka č. 19 – Porovnání změn exprese přenašečů mědi v závislosti na dostupnosti mědi vyjádřených jako násobek exprese (fold change)

jednotlivé geny	fold change 250 µM Cu oproti kontrole	fold change 250 µM BCS oproti kontrole
Ctr	1,28 ↑	1,18 ↑
Ctr-like	1,03 ↑	1,42 ↑
ATPáza P-typu	0,99 ↓	1,11 ↑

6. Diskuze

Měď patří mezi esenciální prvky a díky své redoxní aktivitě se stala důležitým komponentem metabolismu většiny organismů. Je zabudovaná do enzymů podílejících se na oxidaci, dismutaci či zisku energie (Culotta et al., 1997; Horn & Barrientos, 2008). Zároveň je to toxický prvek, se kterým musí každý organismus precizně manipulovat, aby nedošlo k jeho negativnímu působení. Měď v buňce dokáže narušit Fe-S klastry při jejich vzniku a zároveň může dojít k nespecifické vazbě mědi na různé proteiny, což vyústí v jejich dysfunkci a agregaci (Macomber & Imlay, 2009). V takovém případě dochází k buněčné smrti, která se liší od ostatních typů a bývá někdy označována jako „cuproptóza“ (Tsvetkov et al., 2022).

Tato práce se zabývala zhodnocením výsledků v oblasti metabolismu mědi u *Acanthamoeba castellanii*. Celkově vychází ze znalostí a metod použitých pro výzkum metabolismu mědi u *Naegleria fowleri,* ačkoliv jsou tyto amfizoické améby evolučně odlišné (Grechnikova et al., 2020; Ženíšková et al., 2022). Je však nutné zmínit, že obě améby žijí v obdobných podmínkách a v lidském organismu mají podobně nezvratné patogenní působení. Nejbližším evolučně příbuzným modelovým organismem *A. castellanii* je *Dictyostelium discoideum*, ve kterém byla ATPáza zapojená do metabolismu mědi již popsána a z těchto poznatků bylo také vycházeno (Burlando et al., 2002).

Volně žijící amfizoické améby najdeme v půdě, vodě i ve vzduchu, kde panují pokaždé jiné podmínky (Visvesvara et al., 2007). Zároveň dokáží přežít i uvnitř lidského organismu, kde je navíc během počátku infekce vyšší koncentrace mědi v séru (Moreno et al., 1998). Možností pro tyto améby je tvorba cyst, které jim umožní přečkat nepříznivé podmínky a zachovat si životaschopnost i virulenci (Mazur et al., 1995). Kvůli tomu se jedná o velmi zajímavou skupinou parazitů, která pro své přežívání potřebuje mechanismy pro rychlou a efektivní adaptaci na konkrétní prostředí.

Vyhledávání genů pro potenciální přenašeče mědi v genomu *A. castellanii* i u jiných organismů vychází z dosavadních poznatků, že přenašeče mědi sdílí strukturní podobnosti. Převážně se jedná o aminokyselinový měď-vazebný motiv CxxC, někdy MxCxxC, který se často v ATPázách přenášejících měď opakuje několikanásobně (Badarau & Dennison, 2011; Voskoboinik et al., 1999; Zhou et al., 2008). Pro hledání proteinů byl použit program BlastP, kdy byla v genomu *A. castellanii* hledána obdoba CCC2, Ctr1 a Ctr3 ze *S. cerevisiae* (https://amoebadb.org/amoeba/app/). Následně byly vybrané geny dále zkoumány, jestli sdílí sekvenční podobnost s již identifikovanými geny z dalších organismů, převážně s *D. discoideum*. Jelikož se měď transportující ATPázy i transportéry Ctr nachází vždy v membránách, pro lepší zhodnocení vybraného genu byl použit program pro predikci

transmembránových domén ze sekvence proteinu (https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM) (Lutsenko & Petris, 2003).

Vybraná domnělá ATPáza P-typu, kódovaná genem ACA1_111080, byla s využitím funkční komplementace *S. cerevisiae* určena jako přenašeč mědi. Lokalizace tohoto proteinu v *A. castellanii* nepřinesla jednoznačné výsledky, takže nemáme další informace pro vyvození přesné funkce tohoto přenašeče. ATPáza P-typu (NfCu-ATPase) byla popsána u *N. fowleri*, kde má detoxifikační funkci, zatímco ATPáza CCC2 u *S. cerevisiae* má roli v transportu iontů do Golgiho aparátu (Fu et al., 1995; Grechnikova et al., 2020). Je možné, že tato ATPáza u *A. castellanii* bude fungovat obdobně jako CCC2. V nepublikovaných proteomických datech, které zpracovává M. Grechnikova, Ph.D., bylo patrné, že má tato ATPáza P-typu zvýšenou hladinu při nedostatku mědi (při použití 100 µM BCS), takže je regulována dostupností mědi v médiu . Tato domněnka ale nejde potvrdit, dokud nebude známá přesná lokalizace této ATPázy a nebude vytvořený mutantní kmen *A. castellanii* bez této ATPázy nebo alespoň s její sníženou expresí.

Následně stejnou metodikou bylo potvrzeno, že *A. castellanii* kóduje genem ACA1_289610 přenašeč mědi a jeho funkce je homologická k přenašečům Ctr1/3 ze *S. cerevisiae*, jelikož mutantnímu kmenu Δ Ctr1/3 *S. cerevisiae* umožnil přežít v selekčních podmínkách.

Lokalizace tohoto proteinů *in vivo* byla v *A. castellanii* nejasná. Nemůžeme určit, zda dochází ke správnému skládání studovaného proteinu vlivem přidaného GFP a následně jeho lokalizaci na správné místo v buňce. Navíc zatím neexistuje účinný sytém pro genový knockout nebo knockdown v *A. castellanii*, který by umožnil funkce těchto přenašečů mědi definitivně identifikovat. Pokračování výzkumu těchto přenašečů se zaměřuje právě na zavedení efektivního systému pro genový knockout a knockdown v *A. castellanii* a vytvoření markerů pro jednotlivé organely.

Pro evaluaci toxického působení mědi na *A. castellanii* byly zvoleny růstové křivky při kultivaci s několika odlišnými koncentracemi mědi a jejího chelátoru (BCS) v médiu. Při koncentraci 500 µM $CuSO_4$ bylo zpomalení růstu améb po 72 hodinách přibližně o 50 %. Ukazuje se, že *A. castellanii* je vůči mědi odolnější než například *L. major*, jejíž růst byl inhibován už při 50 µM $CuSO_4$ (Paul et al., 2022). Naopak *N. fowleri* je odolnější a její růst je zpomalen o 50 % (IC_{50}) při koncentraci 1,6 mM $CuSO_4$(Grechnikova et al., 2020).

Když k tomu přihlédneme na výsledky z analýzy ICP-MS, kdy byla *A. castellanii* vystavena vyšším koncentracím extracelulární mědi, vidíme kumulaci mědi ve vnitřním prostředí buňky. Při kultivaci buněk ve stejné koncentraci, kdy nastala inhibice růstu (500 µM $CuSO_4$), je hmotnost mědi v sušině buněk přibližně 4x větší než v kontrole. Není jasné, zda jsou ionty mědi v buňce volně a působí toxicky, nebo zda jsou vázané v proteinech. Je ale velmi pravděpodobné,

vycházíme-li z pozorování růstových křivek, že při této koncentraci extracelulární mědi dochází k toxickým důsledkům a že *A. castellanii* není schopná se s vyšší koncentrací mědi v médiu vypořádat. Ačkoliv *N. fowleri* dokáže růst i ve vyšších koncentracích mědi než *A. castellanii*, ukazuje se, že kumulace mědi ve vnitřním prostředí *N. fowleri* je přibližně 10x vyšší (Grechnikova et al., 2020). *A. castellanii* tedy pravděpodobně dokáže efektivněji regulovat příjem nebo vylučování nadbytečných iontů mědi, ale je citlivější k množství tohoto iontu v buňce.

Detoxifikační systém nebyl u *A. castellanii* popsán a není jasné, zda dokáže využít identifikovanou ATPázu P-typu pro detoxifikaci mědi, tak jako to dokáží například lidské buňky pomocí ATP7A (Petris & Mercer, 1999). Jak bylo uvedeno výše, předpokládanou detoxifikační funkci má ATPáza P-typu u *N. fowleri* (Grechnikova et al., 2020), ale také například u *Aspergillus fumigatus* (Wiemann et al., 2017). Na rozdíl od toho však CCC2 v *S. cerevisiae* slouží jako přenašeč mědi z cytosolu do Golgiho aparátu (Fu et al., 1995). Důležitou roli pro detoxifikaci kovů má skupina látek zvaná metalothioneiny, tyto cytosolické proteiny bohaté na cystein na sebe váží volné ionty mědi (Cu^{+}) a tím zabrání jejich toxicitě. Metalothioneiny byly popsány u *S. cerevisiae* a jejich exprese je ovlivněna množstvím mědi v buňce (Butt et al., 1984; Karin et al., 1984). Tyto proteiny byly popsány i u *Trypanosoma cruzi*, ale nebyla potvrzena jejich funkce v detoxifikaci mědi (Maya et al., 2004). U jiných parazitů zatím popsány nebyly a bylo by přínosné zjistit, jestli je najdeme v genomu *A. castellanii*.

Překvapivá mohou být získaná data z analýzy pomocí qPCR, která byla použita, abychom zjistili, jestli je exprese těchto přenašečů ovlivněna množstvím mědi v buňce. V mnoha organismech tato regulace exprese probíhá. Často je ve vyšší intracelulární koncentraci mědi více exprimovaná ATPáza P-typu. Toto bylo potvrzeno u *N. fowleri* (Grechnikova et al., 2020), *Candida albicans* (Mackie et al., 2016) nebo u *Escherichia coli* (Rensing et al., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* v nedostatku mědi zvýší expresi přenašeče Ctr1 (Kommuguri et al., 2012). V *A. castellanii* se ale exprese jednotlivých přenašečů mědi nezměnila v nadbytku ani nedostatku mědi. Z nepublikovaných proteomických dat vyplývá, že je možné, že regulace této ATPázy neprobíhá na úrovni exprese ale spíše posttranslačně. Hladina Ctr nebyla změněna ani v této proteomické analýze.

Léčba parazitárních onemocnění je většinou velmi obtížná. Tyto organismy jsou eukaryotické, takže je obtížné vyvinout antiparazitika s nízkou toxicitou pro hostitele. Navíc paraziti musí být schopní se adaptovat na rychlou změnu okolního prostředí, většinou při přechodu z vektoru do hostitele nebo jako *A. castellanii* z vnějšího prostředí do člověka. Parazité k tomu používají rozličné prostředky, od existence různých životních stádií po mechanismy, které nakonec umožňují vznik rezistence vůči užívaným léčivům. Proto je pořád silný tlak na výzkum nových léčiv pro parazitární onemocnění. Velmi zajímavým přístupem posledních let je testování již

užívaných a patentovaných léčiv a látek pro nové účely. Měďnaté ionofory jsou jedny z nich. Tyto látky jsou schopné přenášet ionty mědi do vnitřního prostředí buňky. Některé z nich jsou účinné i samostatně, ale jejich účinek je efektivnější v přítomnosti mědi. Nově se ukazuje že jejich užití může přinést výsledky dokonce i ve výzkumu nádorových onemocnění (Ji et al., 2012; Y. Li et al., 2020; Song et al., 2015). Na experimentech s *A. castellanii* se ukazuje potenciální využití ionoforů 8-hydroxycholinu (8HQ) a pyrithion sulfidu (PyS). Ty vycházejí z předchozího úspěšného testování ionoforů u *Cryptococcus neoformans* (Helsel et al., 2017). Využití ionoforů společně s mědí ukázalo efektivní inhibici růstu *A. castellanii*, které bylo pozorováno i v případě *N. fowleri* (Grechnikova et al., 2020). *N. fowleri* je však více citlivá vůči těmto ionoforům a IC_{50} pro 8HQ s mědí byla přibližně dvakrát nižší, než je tomu u *A. castellanii* a IC_{50} pro PyS přibližně 4x nižší. Zajímavým rozdílem mezi těmito parazity je užití disulfiramu. Tento ionofor byl u *N. fowleri* vysoce účinný, u *A. castellanii* neměl téměř žádný efekt a není vůbec jasné proč. Přes opakování pokusu jsme vždy došli ke stejnému výsledku. I tak by ale tyto nebo jiné ionofory mohly otevřít novou cestu v léčbě parazitárních onemocnění včetně těch způsobených *A. castellanii*.

7. Závěr

Metabolismus mědi u *Acanthamoeba castellanii* i dalších organismů je velmi přesně koordinovaný proces udržování iontů mědi v dostatečné nízké koncentraci, aby nedošlo k toxickým projevům tohoto prvku. V této práci byly identifikovány dva přenašeče mědi na základě funkční komplementace. ATPáza P-typu a přenašeč mědi Ctr jsou funkčně homologické ke svým protějškům CCC2 a Ctr1/3 v *Saccharomyces cerevisiae.* Určení buněčné lokalizace ATPázy P-typu ani Ctr nebylo úspěšné a bude vyžadovat další postupy v budoucnu. Exprese těchto přenašečů nebyla změněna vlivem zvýšení či snížení dostupnosti mědi v kultivačním médiu.

Další část práce se zabývala popisem toho, jak *A. castellanii* přežívá v podmínkách s nadbytkem extracelulární mědi. Stejně jako je tomu i v jiných organismech, bylo ukázáno, že vyšší koncentrace mědi inhibuje růst *A. castellanii* a působí toxicky. I přes efektivní vylučování nadbytečných iontů mědi dochází k její intracelulární kumulaci, vůči které je *A. castellanii* citlivá.

Dále bylo zjištěno, jak na *A. castellanii* působí měďnaté ionofory a jestli je možné tyto látky využít pro případnou léčbu. Značnou výhodou je, že ionofory jako disulfiram a pyrithion sulfid patří mezi schválené a užívané látky, které díky svým vlastnostem nabízí další možnosti využití. Princip jejich působení spočívá v tom, že přenáší ionty mědi do vnitřního prostředí buňky, které následně vyvolají buněčnou smrt. V této práci se podařilo prokázat, že 8-hydroxychinolin a pyrithion sulfid účinně inhibují růst *A. castellanii*. Tyto poznatky by mohly přinést nový směr v léčbě onemocnění způsobených tímto parazitem.

8. Seznam zkratek

BCS bathocuproin disulfonát

BPS bathofenantrolin disulfonát

PCR polymerázová řetězová reakce

ICP-MS hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

GFP zelený fluorescenční protein

MBD doména pro vazbu kovů

ROS reaktivní formy kyslíku

TGN trans-golgi network

CNS centrální nervová soustava

GAE granulomatózní amébová encefalitida

Ctr copper transporter, přenašeč mědi

CCO cytochrom c oxidáza

CCC2 Ca^{2+}sensitive cross complementer 2, měď transportující ATPáza P-typu v *S. cerevisiae*

8-HQ 8-hydroxychinolin, měďnatý ionofor

DSF disulfiram, měďnatý ionofor

PyS pyrithion sulfid, měďnatý ionofor

8-HQ 8-hydroxychinolin, měďnatý ionofor

9. Seznam použité literatury

Alfonso, I., & Quesada, R. (2013). Biological activity of synthetic ionophores: Ion transporters as prospective drugs? *Chemical Science*, *4*(8), 3009–3019.

Antoszczak, M. (2019). A medicinal chemistry perspective on salinomycin as a potent anticancer and anti-CSCs agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *164*, 366–377.

Badarau, A., & Dennison, C. (2011). Copper trafficking mechanism of CXXC-containing domains: Insight from the pH-dependence of their Cu(I) affinities. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(9), 2983–2988.

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Felli, I. C., Gonnelli, L., Hadjiliadis, N., Pierattelli, R., Rosato, A., & Voulgaris, P. (2006). The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nature Chemical Biology 2006 2:7*, *2*(7), 367–368.

Banci, L., Bertini, I., Chasapis, C. T., Rosato, A., & Tenori, L. (2007). Interaction of the two soluble metal-binding domains of yeast Ccc2 with copper(I)–Atx1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *364*(3), 645–649.

Bao, X. Z., Dai, F., Li, X. R., & Zhou, B. (2018). Targeting redox vulnerability of cancer cells by prooxidative intervention of a glutathione-activated Cu(II) pro-ionophore: Hitting three birds with one stone. *Free Radical Biology & Medicine*, *124*, 342–352.

Bateman, E. (2010). Expression plasmids and production of EGFP in stably transfected *Acanthamoeba*. *Protein Expression and Purification*, *70*(1), 95.

Burlando, B., Evangelisti, V., Dondero, F., Pons, G., Viarengo, A., & Camakaris, J. (2002). Occurrence of Cu-ATPase in *Dictyostelium*: Possible role in resistance to copper. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *291*(3), 476–483.

Butt, T. R., Sternberg, E. J., Gorman, J. A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M., & Crooke, S. T. (1984). Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(11), 3332–3336.

Castellani, A. (1930). An amoeba growing in cultures of a yeast. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *33*, 160.

Castellanos-González, A., Jiménez, L., & Landa, A. (2002). Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology*, *32*(9), 1175–1182.

Chelly, J., Tümer, Z., Tønnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N., & Monaco, A. P. (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genetics*, *3*(1), 14–19.

Choveaux, D. L., Krause, R. G. E., Przyborski, J. M., & Goldring, J. P. D. (2015). Identification and initial characterisation of a *Plasmodium falciparum* Cox17 copper metallochaperone. *Experimental Parasitology*, *148*, 30–39

Choveaux, D. L., Przyborski, J. M., & Goldring, J. P. D. (2012). A *Plasmodium falciparum* copper-binding membrane protein with copper transport motifs. *Malaria Journal*, *11*(1), 1–15.

Chun, H., Sharma, A. K., Lee, J., Chan, J., Jia, S., & Kim, B. E. (2017). The intestinal copper exporter CUA-1 is required for systemic copper homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(1), 1–14.

Culbertson, E. M., Khan, A. A., Muchenditsi, A., Lutsenko, S., Sullivan, D. J., Petris, M. J., Cormack, B. P., & Culotta, V. C. (2020). Changes in mammalian copper homeostasis during microbial infection. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, *12*(3), 416–426.

Culotta, V. C., Klomp, L. W. J., Strain, J., Casareno, R. L. B., Krems, B., & Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(38), 23469–23472.

Dalecki, A. G., Haeili, M., Shah, S., Speer, A., Niederweis, M., Kutsch, O., & Wolschendorf, F. (2015). Disulfiram and copper ions kill Mycobacterium tuberculosis in a synergistic manner. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(8), 4835–4844.

De Moraes, J. E., & Alfieri, S. C. (2008). Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *EMS Microbiol Ecol.*, *66*(2), 221–229.

Feingold, J. M., Abraham, J., Bilgrami, S., Ngo, N., Visvesara, G. S., Edwards, R. L., & Tutschka, P. J. (1998). Acanthamoeba meningoencephalitis following autologous peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation 1998 22:3*, *22*(3), 297–300.

Fu, D., Beeler, T. J., & Dunn, T. M. (1995). Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca2+-sensitive phenotype of csg1 mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu^{2+}-ATPase subfamily. *Yeast*, *11*(3), 283–292.

Gao, L. Y., & Kwaik, Y. A. (2000). The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, *2*(1), 79–90.

Garcia-Santamarina, S., Uzarska, M. A., Festa, R. A., Lill, R., & Thiele, D. J. (2017). *Cryptococcus neoformans* iron-sulfur protein biogenesis machinery is a novel layer of protection against Cu stress. *MBio*, *8*(5). e01742-17.

Georgatsou, E., Mavrogiannis, L. A., Fragiadakis, G. S., & Alexandraki, D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(21), 13786–13792.

Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, *2*(1), 31–34.

Grechnikova, M., Ženíšková, K., Malych, R., Mach, J., & Sutak, R. (2020). Copper detoxification machinery of the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri* involves copper-translocating ATPase and the antioxidant system. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, *14*, 126–135

Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(2), 413–433.

Hellman, N. E., & Gitlin, J. D. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition*, *22*, 439–458.

Helsel, M. E., White, E. J., Razvi, S. Z. A., Alies, B., & Franz, K. J. (2017). Chemical and functional properties of metal chelators that mobilize copper to elicit fungal killing of *Cryptococcus neoformans*. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, *9*(1), 69–81.

Horn, D., & Barrientos, A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome C oxidase. *IUBMB Life*. *60*(7), 421-429.

Isah, M. B., Goldring, J. P. D., & Coetzer, T. H. T. (2020). Expression and copper binding properties of the N-terminal domain of copper P-type ATPases of African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *235*, 111245.

Ji, C., Miller, P. A., & Miller, M. J. (2012). Iron transport-mediated drug delivery: Practical syntheses and in vitro antibacterial studies of tris-catecholate siderophore-aminopenicillin conjugates reveals selectively potent antipseudomonal activity. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(24), 9898–9901.

Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J., & Fogel, S. (1984). Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the CUP1 locus of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(2), 337–341.

Kenthirapalan, S., Waters, A. P., Matuschewski, K., & Kooij, T. W. A. (2014). Copper-transporting ATPase is important for malaria parasite fertility. *Molecular Microbiology*, *91*(2), 315–325.

Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J. R., & Russell, A. D. (1998). *Acanthamoeba castellanii*: Growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *Journal of Infection*, *36*(1), 43–48.

Kommuguri, U. N., Bodiga, S., Sankuru, S., & Bodiga, V. L. (2012). Copper deprivation modulates CTR1 and CUP1 expression and enhances cisplatin cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *26*(1), 13–19.

Kunze, M., Steiner, T., Chen, F., Huber, C., Rydzewski, K., Stämmler, M., Heuner, K., & Eisenreich, W. (2021). Metabolic adaption of *Legionella pneumophila* during intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii*. *International Journal of Medical Microbiology*, *311*(4). 151504.

LaGier, M. J., Zhu, G., & Keithly, J. S. (2001). Characterization of a heavy metal ATPase from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Gene*, *266*(1–2), 25–34.

Lahey, M. E., Gubler, C. J., Cartwright, G. E., & Wintrobe, M. M. (1953). Studies on copper metabolism. Blood copper in pregnancy and various pathologic states. *The Journal of Clinical Investigation*, *32*(4), 329–339.

Li, A. H., Kong, Y., Cho, S. H., Lee, H. W., Na, B. K., Pak, J. K., & Kim, T. S. (2005). Molecular cloning and characterization of the copper/zinc and manganese superoxide dismutase genes from the human parasite *Clonorchis sinensis*. *Parasitology*, *130*(6), 687–697.

Li, A. H., Na, B. K., Kong, Y., Cho, S. H., Zhao, Q. P., & Kim, T. S. (2005). Molecular cloning and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase of *Paragonimus westermani*. *The Journal of Parasitology*, *91*(2), 293–299.

Li, Y., Chen, F., Chen, J., Chan, S., He, Y., Liu, W., & Zhang, G. (2020). Disulfiram/copper induces antitumor activity against both nasopharyngeal cancer cells and cancer-associated fibroblasts through ROS/MAPK and ferroptosis pathways. *Cancers*, *12*(1). 138.

Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., & Walochnik, J. (2015). An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, *22*(10).

Lutsenko, S., & Petris, M. J. (2003). Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: Insights from biochemical and cell biological approaches. *Journal of Membrane Biology*, *191*(1), 1-12.

Mackie, J., Szabo, E. K., Urgast, D. S., Ballou, E. R., Childers, D. S., MacCallum, D. M., Feldmann, J., & Brown, A. J. P. (2016). Host-imposed copper poisoning impacts fungal micronutrient acquisition during systemic *Candida albicans* infections. *PLOS ONE*, *11*(6), e0158683.

Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(20), 8344–8349.

Macomber, L., Rensing, C., & Imlay, J. A. (2007). Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *189*(5), 1616–1626.

Maryon, E. B., Molloy, S. A., Ivy, K., Yu, H., & Kaplan, J. H. (2013). Rate and regulation of copper transport by human copper transporter 1 (hCTR1). *Journal of Biological Chemistry*, *288*(25), 18035–18046.

Mathers, W. D., Nelson, S. E., Lane, J. L., Wilson, M. E., Allen, R. C., & Folberg, R. (2000). Confirmation of confocal microscopy diagnosis of Acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Archives of Ophthalmology 118*(2), 178–183.

Maya, J. D., Rodríguez, A., Pino, L., Pabón, A., Ferreira, J., Pavani, M., Repetto, Y., & Morello, A. (2004). Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Biological Research*, *37*(1), 61–69.

Mazur, T., Hadaś, E., & Iwanecka, I. (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. Trop Med Parasitol. *46*(2), 106-108.

Mishra, A., Djoko, K. Y., Lee, Y.-H., Lord, R. M., Kaul, G., Akhir, A., Saxena, D., Chopra, S., & Walton, J. W. (2023). Water-soluble copper pyrithione complexes with cytotoxic and antibacterial activity. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *21*(12), 2539–2544.

Moreno, T., Artacho, R., Navarro, M., Pérez, A., & Ruiz-López, M. D. (1998). Serum copper concentration in HIV-infection patients and relationships with other biochemical indices. *The Science of the Total Environment*, *217*(1–2), 21–26.

Olivares, M., & Uauy, R. (1996). Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr*, *63*, 7918–7924.

Oliveri, V. (2020). Biomedical applications of copper ionophores. *Coordination Chemistry Reviews*, *422*, 213474.

Oliveri, V. (2022). Selective targeting of cancer cells by copper ionophores: An overview. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*, 841814.

Oliveri, V., Giuffrida, M. L., Vecchio, G., Aiello, C., & Viale, M. (2012). Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. *Dalton Transactions*, *41*(15), 4530–4535.

Ozawa, T., & Hanaki, A. (1991). The first ESR spin-trapping evidence for the formation of hydroxyl radical from the reaction of copper(II) complex with hydrogen peroxide in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, *5*, 330–332.

Paul, R., Banerjee, S., Sen, S., Dubey, P., Maji, S., Bachhawat, A. K., Datta, R., & Gupta, A. (2022). A novel leishmanial copper P-type ATPase plays a vital role in parasite infection and intracellular survival. *The Journal of Biological Chemistry*, *298*(2). 101539.

Petris, M. J., & Mercer, J. F. B. (1999). The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal. *Human Molecular Genetics*, *8*(11), 2107–2115.

Petris, M. J., Mercer, J. F. B., Culvenor, J. G., Lockhart, P., Gleeson, P. A., & Camakaris, J. (1996). Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: A novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO Journal*, *15*(22), 6084–6095

Pham, A. N., Xing, G., Miller, C. J., & Waite, T. D. (2013). Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis*, *301*, 54–64.

Poyton, M. F., Sendecki, A. M., Cong, X., & Cremer, P. S. (2016). Cu^{2+} binds to phosphatidylethanolamine and increases oxidation in lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(5), 1584–1590.

Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., & O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, *284*(5415), 805–808.

Randag, A. C., Rooij, J. van, Goor, A. T. van, Verkerk, S., Wisse, R. P. L., Saelens, I. E. Y., Stoutenbeek, R., Dooren, B. T. H. van, Cheng, Y. Y. Y., & Eggink, C. A. (2019). The rising incidence of Acanthamoeba keratitis: A 7-year nationwide survey and clinical assessment of risk factors and functional outcomes. *PLoS ONE*, *14*(9), e0222092.

Rasoloson, D., Shi, L., Chong, C. R., Kafsack, B. F., & Sullivan, D. J. (2004). Copper pathways in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes indicate an efflux role for the copper P-ATPase. *Biochemical Journal*, *381*(3), 803-811.

Reeder, N. L., Kaplan, J., Xu, J., Youngquist, R. S., Wallace, J., Hu, P., Juhlin, K. D., Schwartz, J. R., Grant, R. A., Fieno, A., Nemeth, S., Reichling, T., Tiesman, J. P., Mills, T., Steinke, M., Wang, S. L., & Saunders, C. W. (2011). Zinc pyrithione inhibits yeast growth through copper influx and inactivation of iron-sulfur proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(12), 5753–5760.

Rees, E. M., Lee, J., & Thiele, D. J. (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54221–54229.

Ren, F., Logeman, B. L., Zhang, X., Liu, Y., Thiele, D. J., & Yuan, P. (2019). X-ray structures of the high-affinity copper transporter Ctr1. *Nature Communications*, *10*(1), 1–9.

Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., & Rosen, B. P. (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(2), 652–656.

Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*, *20*(3), 225–241.

Salman, A. A., & Goldring, J. P. D. (2022). Expression and copper binding characteristics of *Plasmodium falciparum* cytochrome c oxidase assembly factor 11, Cox11. *Malaria Journal*, *21*(1), 1–15.

Seal, D. V. (2003). Acanthamoeba keratitis update—incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye, 17*(8), 893–905.

Shah, S., Dalecki, A. G., Malalasekera, A. P., Crawford, C. L., Michalek, S. M., Kutsch, O., Sun, J., Bossmann, S. H., & Wolschendorf, F. (2016). 8-hydroxyquinolines are boosting agents of copper-related toxicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(10), 5765–5776.

Shanholtzer, C. N., Rice, C., Watson, K., Carreon, H., & Long, T. E. (2022). Effect of copper on the antifungal activity of disulfiram (Antabuse®) in fluconazole-resistant *Candida* strains. *Medical Mycology*, *60*(4), 16.

Song, Y., Xu, H., Chen, W., Zhan, P., & Liu, X. (2015). 8-hydroxyquinoline: a privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. *MedChemComm*, *6*(1), 61–74.

Stabel, J. R., & Spears, J. W. (1989). Effect of copper on immune function and disease resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *258*, 243–252.

Torno, M. S., Babapour, R., Gurevitch, A., & Witt, M. D. (2000). Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *42*(2), 351–354.

Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *8*(7), 579–591.

Tsang, T., Davis, C. I., & Brady, D. C. (2021). Copper biology. *Current Biology*, *31*(9), 421–427.

Tsvetkov, P., Coy, S., Petrova, B., Dreishpoon, M., Verma, A., Abdusamad, M., Rossen, J., Joesch-Cohen, L., Humeidi, R., Spangler, R. D., Eaton, J. K., Frenkel, E., Kocak, M., Corsello, S. M., Lutsenko, S., Kanarek, N., Santagata, S., & Golub, T. R. (2022). Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, *375*(6586), 1 254–1261.

van den Berg, G. J., & McArdle, H. J. (1994). A plasma membrane NADH oxidase is involved in copper uptake by plasma membrane vesicles isolated from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1195*(2), 276–280.

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp*., Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *50*(1), 1–26.

Voskoboinik, I., Strausak, D., Greenough, M., Brooks, H., Petris, M., Smith, S., Mercer, J. F., & Camakaris, J. (1999). Functional analysis of the N-terminal CXXC metal-binding motifs in the human menkes copper-transporting P-type ATPase expressed in cultured mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 22008–22012.

Wang, Y., Zhang, L., & Zhou, F. (2022). Cuproptosis: a new form of programmed cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, *19*(8), 867–868.

White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., & Petris, M. J. (2009). A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(49), 33949–33956.

Wiemann, P., Perevitsky, A., Lim, F. Y., Shadkchan, Y., Knox, B. P., Landero Figueora, J. A., Choera, T., Niu, M., Steinberger, A. J., Wüthrich, M., Idol, R. A., Klein, B. S., Dinauer, M. C., Huttenlocher, A., Osherov, N., & Keller, N. P. (2017). *Aspergillus fumigatus* copper export machinery and reactive oxygen intermediate defense counter host copper-mediated oxidative antimicrobial offense. *Cell Reports*, *19*(5), 1008–1021.

Yuan, S., Sharma, A. K., Richart, A., Lee, J., & Kim, B. E. (2018). CHCA-1 is a copper-regulated CTR1 homolog required for normal development, copper accumulation, and copper-sensing behavior in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(28), 10911.

Ženíšková, K., Grechnikova, M., & Sutak, R. (2022). Copper metabolism in *Naegleria gruberi* and its deadly relative *Naegleria fowleri*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 853463.

Zhang, H., & Cheng, X. (2021). Various brain-eating amoebae: the protozoa, the pathogenesis, and the disease. *Frontiers of Medicine*, *15*(6), 842–866.

Zhou, L., Singleton, C., & Le Brun, N. E. (2008). High Cu(I) and low proton affinities of the CXXC motif of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemical Journal*, *413*(3), 459–465.

Zuily, L., Lahrach, N., Fassler, R., Genest, O., Faller, P., Sénèque, O., Denis, Y., Castanié-Cornet, M. P., Genevaux, P., Jakob, U., Reichmann, D., Giudici-Orticoni, M. T., & Ilbert, M. (2022). Copper induces protein aggregation, a toxic process compensated by molecular chaperones. *MBio*, *13*(2). e03251-21