

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lucie Šírová**

*Glykolýza a substrátová fosforylace u parazitických prvoků*  
*Glycolysis and substrate-level phosphorylation in parasitic protist*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Glykolýza a substrátová fosforylace u parazitických prvoků vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje informací a literaturu. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, 30. 04. 2024

Podpis

### **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Ivanu Hrdému Ph.D za odborné vedení, trpělivost, rady a doporučenou literaturu. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině, která pro mne byla velkou oporou.

## **Abstrakt**

Glykolýza představuje důležitou metabolickou dráhu, konzervující energii v buňkách. Při rozkladu glukózy dochází k syntéze molekul ATP v procesech substrátové fosforylace. Klasická dráha běží podle Embden-Meyerhofova schématu, avšak u mnoha organismů nalezneme pozoruhodné odchylky, jako tomu je například u parazitických prvoků. Průběh glykolytické dráhy závisí na enzimech, které katalyzují její jednotlivé reakce a právě zde lze nalézt odlišnosti při porovnání glykolýzy parazitických prvoků a glykolýzy modelových eukaryot.

Tato práce se zaměřuje na glykolýzu a reakce syntetizující ATP u vybraných parazitických prvoků. Konkrétně u *Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* a *Trypanosoma brucei* ssp. V jednotlivých podkapitolách jsou popsány jejich glykolytické dráhy a s nimi související enzymy, od počátečního substrátu, glukózy, až po výsledné konečné produkty.

## **Klíčová slova**

Glykolýza, substrátová fosforylace, parazitičtí prvoci, ATP, pyrofosfát, energie

## **Abstract**

Glycolysis is an important metabolic pathway that conserves energy within cells. During the breakdown of glucose, molecules of ATP are synthesized in processes of substrate-level phosphorylation. The classical pathway follows the Embden-Meyerhof scheme, but there are remarkable deviations in many organisms. This is the case of parasitic protists. Their glycolytic pathway differs in some of the enzymes used.

This thesis focuses on glycolysis and ATP-synthesizing reactions in selected parasitic protozoa. Specifically focuses on *Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trypanosoma brucei* spp. In individual subchapters, their glycolytic pathways and related enzymes are described, from the initial substrate, glucose, to the final products.

## **Key words**

Glycolysis, substrate-level phosphorylation, parasitic protists, ATP, pyrophosphate, energy

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Literární přehled .....	3
2.1	Glykolýza .....	3
2.1.1	Obecné schéma .....	3
2.2	Modifikace glykolýzy u parazitických prvoků .....	5
2.2.1	<i>Trichomonas vaginalis</i> .....	5
2.2.1.1	Pyrofosfát-dependentní fosfofruktokináza .....	5
2.2.1.2	Hydrogenosom .....	7
2.2.1.2.1	Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza .....	8
2.2.1.2.2	Acetát:sukcinát koenzym A transferáza .....	8
2.2.2	<i>Giardia intestinalis</i> .....	11
2.2.2.1	Pyruvát fosfát dikináza .....	12
2.2.2.2	Acetyl koenzym A syntetáza (ADP formující) .....	14
2.2.3	<i>Entamoeba histolytica</i> .....	16
2.2.3.1	Fosfoenolpyruvát karboxytransfosforyláza .....	18
2.2.3.2	Ferredoxin:NADP <sup>+</sup> oxidoreduktáza .....	19
2.2.3.3	Acetát kináza (PPi-dependentní) .....	21
2.2.4	Trypanosomy .....	23
2.2.4.1	Glykosom .....	24
2.2.4.2	Mitochondrie .....	24
2.2.4.3	Glykolýza long slender formy v krevním řečišti .....	25
3	Závěr .....	29
4	Použitá literatura .....	30

## Seznam používaných zkratek

ADP	adenosin difosfát
AMP	adenosin monofosfát
AOX	aleternativní oxidáza
APS	adenosin-5'-fosfosulfát
ATP	adenosin trifosfát
ACS	acetyl koenzym A syntetáza
CDP	cytidin difosfát
CoA	koenzym A
DHAP	dihydroxyaceton fosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EhNO1/2	<i>Entamoeba histolytica</i> NADPH-dependentní oxidoreduktáza 1 a 2
FAD	flavinadenindinukleotid
FADH2	redukovaný flavinadenindinukleotid
GAP	glyceraldehyd-3-fosfát
GDP	guanosin difosfát
GLUT	glukózový transportér
GPO	glycerol-3-fosfát oxidáza
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma
PEP	fosfoenolpyruvát
PFK	fosfofruktokináza
PFOR	pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza
Pi	anorganický fosfát
PK	pyruvát kináza
PPi	pyrofosfát
PPi- PFK	pyrofosfát-dependentní fosfofruktokináza
PPDK	pyruvát fosfát dikináza
SCS	sukcynyl koenzym A syntetáza

# 1 Úvod

Glykolýza představuje důležitou metabolickou dráhu probíhající téměř ve všech živých buňkách. Během postupné degradace glukózy dochází jednak ke spotřebování energie potřebné k uskutečnění reakcí, jednak také dochází k využití energie chemické vazby energeticky bohatého substrátu k syntéze univerzálně použitelné sloučeniny, ATP, která je následně buňkou dále využívána. Ústřední vstupující substrát představuje glukóza, která je v průběhu glykolytické dráhy přeměněna až na pyruvát, který může vstupovat do dalších metabolických procesů, při kterých taktéž dochází k syntéze ATP, jedná se o reakce prodloužené glykolýzy. Samotná glykolytická dráha je ve většině případů lokalizovaná do cytoplasmy, avšak existují některé výjimky. Příkladem může být specifická organela, glykosom, do které se přesunula část glykolytické dráhy u trypanosom. Konzervace energie v buňce může probíhat více způsoby. Jedním z nich je proces nazývaný substrátová fosforylace, při kterém dochází k přenosu fosfátové skupiny na molekulu ADP z jiné sloučeniny s fosfátovou skupinou, případně také volného fosfátu, za vzniku ATP. Druhým způsobem, při kterém taktéž probíhá syntéza ATP, je oxidativní fosforylace, která se uskutečňuje v mitochondriích, jejichž nepostradatelnou součástí je respirační řetězec. Produkce ATP pomocí ATP syntázy je spojená s transportem elektronů přes řetězec komplexů a s ním související pumpování protonů z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie.

*Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* a *Trypanosoma brucei* spp. jsou původci závažných onemocnění postihujících velkou část lidské populace na celém světě. Glykolýza představuje klíčový proces pro většinu živých buněk a není tomu jinak ani v případě výše zmíněných parazitických prvoků. Rozklad glukózy a s ním spojené získávání energie z velké části probíhá modelovou Embden-Meyerhofovou dráhou lišící se využívanými enzymy, které používají odlišné substráty. Zároveň mnohdy dochází k rozvětvení glykolytické dráhy a tím ke vzniku odlišných koncových produktů. Příkladem odlišných biokatalyzátorů glykolytických reakcí mohou být P<sub>Pi</sub>-dependentní enzymy, které jako substrát využívají pyrofosfát (P<sub>Pi</sub>) namísto ADP či ATP.

*T. vaginalis*, *G. intestinalis* a *E. histolytica* obývají převážně anaerobní prostředí a s tím souvisejí odlišné podmínky pro život oproti aerobním modelovým organismům. Výše jmenovaní parazitičtí prvoci se s nimi v průběhu evoluce museli nějakým způsobem vypořádat, a proto u nich mohlo dojít k přeměně mitochondrie a tím ke ztrátě standardních mitochondriálních metabolických procesů, jako je Krebsův cyklus či oxidativní fosforylace. Při konzervaci energie se proto tyto parazitičtí prvoci musí spolehnout na glykolýzu a s ní spojenou substrátovou fosforylaci. Stejně tomu je také u krevní formy *T. brucei*, avšak s tím rozdílem, že součástí trypanosomální buňky je mitochondrie využívající kyslík jako terminální akceptor elektronů. Jestliže mají někteří parazitičtí prvoci komplexní životní cykly a dochází u nich ke střídání stádií, pak se také může měnit preferovaný způsob získávání většiny energie buď substrátovou, nebo oxidativní fosforylací.

Jak již bylo řečeno, tak v průběhu evoluce došlo u některých parazitických prvoků k modifikacím původních organel na různé typy buněčných kompartmentů. Mitochondrie dala

vznik hydrogenosomu a mitosomu, naopak glykosom je organela odvozená od peroxisomu. Tyto evolučně vzniklé vnitrobuněčné struktury jsou pro výše zmíněné parazitické zástupce podstatné, jelikož představují důležitá metabolická centra.

Výzkum glykolytické dráhy a způsobů, jakým uvedení parazitických prvoci získávají energii potřebnou k životně důležitým pochodům v buňce, je podstatný mimo jiné pro možný vývoj léků. Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o, pro eukaryota, často neobvyklých procesech poskytujících energii vybraným významným parazitickým prvokům způsobujícím závažná onemocnění člověka.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Glykolýza

Glykolýza je jedna ze základních metabolických drah, kterou můžeme nalézt téměř ve všech živých buňkách. Konečným produktem glykolytické dráhy je pyruvát, jehož další osud závisí na prostředí, ve kterém se buňka nachází, a které určuje, jakým způsobem se bude regenerovat  $\text{NAD}^+$  potřebné pro reakci glykolytické glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy a tím k dalšímu pokračování glykolýzy. Typicky za aerobních podmínek dochází k reoxidaci NADH v elektron transportním řetězci v mitochondrii, za anaerobiózy je NADH reoxidováno ve fermentačních procesech vycházejících z pyruvátu. V obou případech se liší výsledné produkty reakcí navazujících na glykolýzu, v případě aerobiózy se jedná o oxid uhličitý a vodu, které vznikají v Krebsově cyklu, respektive elektron transportním řetězci, v případě anaerobních podmínek o laktát či etanol produkovaný při mléčném, respektive alkoholovém kvašení. V závislosti na prostředí, ve kterém se buňka nachází, jsou nutné rozdílné enzymy (Nelson et al. 2021).

Již podle názvu lze usoudit, že v průběhu této dráhy dochází k rozkladu glukózy. Molekuly glukózy se do buňky dostávají usnadněnou difúzí pomocí glukózových transportérů (GLUT). Při jejím odbourávání dojde v několika krocích ke vzniku dvou molekul pyruvátu, které jak již bylo řečeno, jsou obvykle následně využity v dalších metabolických drahách (Chaudhry a Varacallo 2023) Obecné schéma glykolýzy v eukaryotické buňce je popsáno v následující podkapitole a je znázorněno na obr. 1.

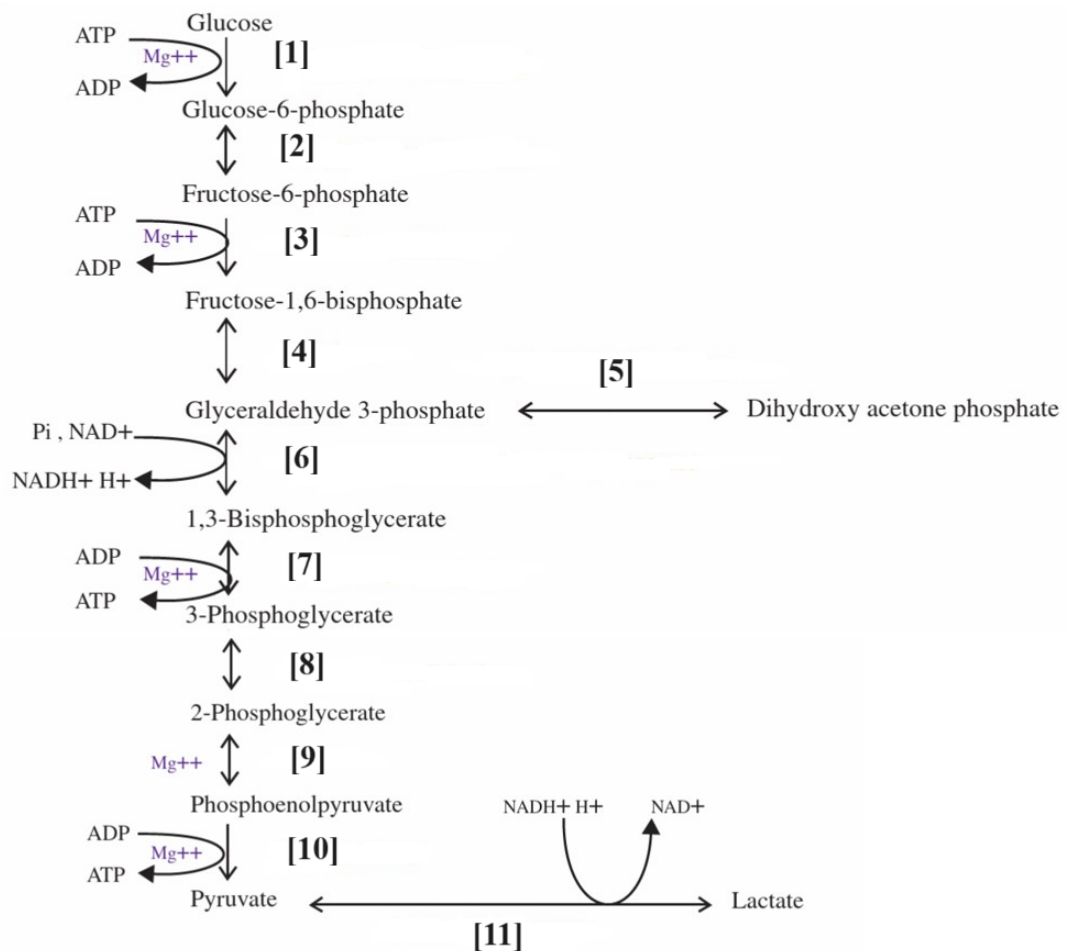
#### 2.1.1 Obecné schéma

Dráhu glykolýzy lze rozdělit do dvou fází, které se skládají z několika reakcí. První fáze ATP spotřebovává, zatímco v druhé fázi probíhá jeho produkce. V počáteční fázi dochází k fosforylaci vstupující glukózy, při které je přenesen jeden fosfát z molekuly ATP na molekulu glukózy, což vede ke spotřebování první molekuly ATP. Tato reakce je katalyzována enzymem hexokinázou (případně specifickou glukokinázou) a výsledným produktem je glukóza-6-fosfát (obr. 1, reakce 1). Molekula glukóza-6-fosfátu v následující reakci izomerizuje, za katalýzy enzymem fosfohexoizomerázou, na fruktóza-6-fosfát (obr. 1, reakce 2). V další reakci dojde pomocí fosfofruktokinázy (PFK) k fosforylaci fruktózy-6-fosfátu na fruktóza-1,6-bisfosfát (obr. 1, reakce 3) za současné spotřeby další molekuly ATP. Fruktóza-1,6-bisfosfát, která má šestiuhlíkatý řetězec, je následně štěpena působením enzymu aldolázy na dvě tříuhlíkaté molekuly, glycerinaldehyd-3-fosfát (GAP) a dihydroxyaceton fosfát (DHAP) (obr. 1, reakce 4). Pomocí enzymu trióza-fosfát izomerázy dochází k reverzibilní přeměně dihydroxyacetonfosfátu na glycerinaldehyd-3-fosfát, který vstupuje do další fáze glykolýzy (obr. 1, reakce 5).

V následující fázi dochází nejdříve k fosforylaci glycerinaldehyd-3-fosfátu. Reakce je katalyzována enzymem glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázou a dochází při ní k redukci  $\text{NAD}^+$  na NADH (obr. 1, reakce 6). Jako produkt vzniká 1,3-bisfosfoglycerát, který podléhá další reakci za vzniku 3-fosfoglycerátu. V této fázi dochází ke syntéze jedné molekuly ATP. Enzym, který je zodpovědný za tuto reakci, je fosfoglycerát kináza (obr. 1, reakce 7). V následném mezikroku dochází k přesunu fosfátové skupiny a z 3-fosfoglycerátu se

působením fosfoglycerát mutázy tvoří 2-fosfoglycerát (obr. 1, reakce 8). Enzym enoláza katalyzuje proces dehydrataci)e 2-fosfoglycerátu, což vede ke vzniku vysoce makroergní sloučeniny, fosfoenolpyruvátu (obr. 1, reakce 9). Posledním krokem glykolýzy je přeměna fosfoenolpyruvátu, při které se vytváří konečný produkt, pyruvátu. Reakce probíhá za působení enzymu pyruvát kinázy a dochází při ní k produkci další molekuly ATP (obr. 1, reakce 10).

Konečný glykolytický produkt, pyruvát, následně vstupuje do dalších metabolických reakcí. V aerobním prostředí do Krebsova cyklu a v anaerobním prostředí podléhá procesům fermentace, například katalýzou laktát dehydrogenázy dochází k redukcí pyruvátu na laktát (obr. 1, reakce 11). Při výsledné sumarizaci glykolytické dráhy vidíme, že dochází ke spotřebování 2 molekul ATP a zároveň se vytvářejí 4 molekuly ATP, 2 molekuly NADH a 2 molekuly pyruvátu na jednu molekulu glukózy (Kumari 2017; Nelson et al. 2021; Chaudhry a Varacallo 2023).



**Obr. 1 Schéma glykolytických reakcí**

Legenda: [1], hexokináza/glukokináza; [2], fosfohexoizomeráza; [3], fosfofruktokináza; [4], aldoláza; [5], triózafosfát izomeráza; [6], glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza; [7], fosfoglycerát kináza; [8], fosfoglycerát mutáza; [9], enoláza; [10], pyruvát kináza; [11], laktátdehydrogenáza (Upraveno dle Kumari, 2017)

## 2.2 Modifikace glykolýzy u parazitických prvoků

V následující podkapitole se budu věnovat hlavnímu tématu mé bakalářské práce. Představím zde vybrané zástupce parazitických prvoků, jejich glykolytickou dráhu s netypickými enzymy a dále pak reakce prodloužené glykolýzy.

### 2.2.1 *Trichomonas vaginalis*

První parazitický prvek, na kterého se zaměřím, je *Trichomonas vaginalis*. Řadíme ji mezi Parabasalia ze skupiny Metamonada z původní, dnes již neuznávané, superskupiny Excavata (Burki et al. 2020). Jedná se o extracelulárního patogenního prvoka, který způsobuje onemocnění v urogenitálním traktu člověka zvané trichomoniáza nebo též trichomonóza. Tato parazitární nákaza je v populaci celosvětově rozšířená. Incidence se pohybuje kolem dvě stě milionů infikovaných ročně. V dnešní době proti ní existuje účinná léčba v podobě 5-nitroimidazolových preparátů jako je metronidazol a ornidazol (Aquino et al. 2020).

Nyní se zaměřím na způsob, kterým *T. vaginalis* získává energii k životním procesům uvnitř buňky. *T. vaginalis* patří mezi prvoky obývající semianaerobní prostředí. Z tohoto důvodu má odlišnou buněčnou stavbu a životní strategii oproti klasické eukaryotické buňce. Hlavním rozdílem je, že *T. vaginalis* nemá typické mitochondrie a související mitochondriální metabolické procesy, jako je například oxidativní fosforylace. Místo toho se při získávání energie musí spolehnout na substrátovou fosforylaci. Další odlišností je v průběhu evoluce vytvořený hydrogenosomu, který vznikl v důsledku adaptace na okolní podmínky (Lindmark et al. 1989).

Samotná glykolýza probíhá v cytoplazmě podle klasické Embden-Meyerhofovy dráhy. *T. vaginalis* využívá běžné glykolytické enzymy, jako jsou například hexokináza, aldoláza a enoláza. Kromě nich jsou dílčí glykolytické reakce katalyzovány i enzymy pro eukaryota netypickými (Slamovits a Keeling 2006). Glykolytická dráha a také od glykolýzy odbočující dráha přeměny fosfoenolpyruvátu na malát je znázorněna níže na obr. 2.

#### 2.2.1.1 *Pyrofosfát-dependentní fosfofruktokináza*

Prvním enzymem, který se nevyskytuje v typické eukaryotické glykolytické dráze je pyrofosfát-dependentní fosfofruktokináza (PPi-PFK). Tato fosfofruktokináza ke své činnosti potřebuje pyrofosfát (PPi), na rozdíl od té klasické (PFK), která jako substrát využívá ATP (Mertens 1993). Obě tyto sloučeniny mohou sloužit jako donory fosfátové skupiny. Při srovnání standardní Gibbsovy volné energie pro hydrolyzu ATP a PPi je zřejmé, že hydrolyza ATP má větší hodnotu. Delta G hydrolyzy ATP je -30,5 kJ/mol na rozdíl od delta G hydrolyzy PPi, které je -19,2 kJ/mol (Nelson et al. 2021). Ale ačkoli je hodnota hydrolyzy PPi nižší, tak PPi stále představuje makroergní sloučeninu, která je některými organismy často využívaná namísto ATP. Důvod proč *T. vaginalis* využívá jako substrát PPi je zřejmě ten, že je to pro ni energeticky výhodnější. Výtěžek ATP v případě modelové eukaryotické glykolýzy jsou 2 molekuly ATP na jednu molekulu glukózy. Při použití PPi jako substrátu pro PPi-PFK vzroste výtěžek na 3 molekuly ATP na jednu molekulu glukózy. Pro anaeroby, jako je *T. vaginalis*, je

tento výtěžek ATP velmi podstatný, jelikož není dále schopna plně oxidovat pyruvát, aby výtěžila další molekuly ATP oxidativní fosforylací (Mertens 1993; Slamovits a Keeling 2006).

K průběhu reakce katalyzované PPI-PFK je potřeba, aby byla v buňce dostatečná hladina PPI. Velké množství PPI vzniká při některých biosyntetických reakcích, jako je například syntéza proteinů. Nopak příliš vysoká hladina PPI může být pro buňku letální, jelikož by byla znemožněna biosyntéza důležitých makromolekul, a proto musí být hladina PPI regulována. Děje se tak pomocí pyrofosfatázy, která hydrolyzuje PPI na Pi, stejně jako PPI-PFK. Klasická eukaryotická pyrofosfatáza, se specifickou aktivitou v zásaditém pH, se nachází v cytosolu a je dependentní na hořčíku jako kofaktoru. Avšak v případě *T. vaginalis* je situace trochu odlišná, jelikož v jejím genomu je kódován rozdílný typ pyrofosfatázy, konkrétně pyrofosfatázy se specifickou aktivitou v kyselém pH, nezávislou na hořčíku jako kofaktoru, s lokalizací uvnitř některé buněčné organely, nejspíše hydrogenosomu, a která má menší afinitu k PPI. Z tohoto důvodu se zdá, že hlavním enzymem, který má vliv na hladinu PPI v buňce je PPI-PFK (Searle a Müller 1991; Yang et al. 2022).

Při srovnání klasické PFK a PPI-PFK vidíme další odlišnost. Reakce katalyzované PPI-PFK může probíhat i zpětně, tedy fruktózu-1,6-bisfosfát lze přeměnit na fruktóza-6-fosfát, a tak lze nejen spotřebovávat PPI, ale i jej vytvářet (Mertens 1991). PPI-PFK tak přebírá funkci fruktóza-1,6-bisfosfatázy, která katalyzuje přeměnu fruktóza-1,6-bisfosfátu na fruktóza-6-fosfát při glukoneogenetické reakci (Mertens 1993). PPI-PFK nalezneme jak u jiných parazitických prvoků, např. u *Entamoeba histolytica*, tak i u neparazitických zástupců prvoků např. u fotosyntetizující *Euglena gracilis* nebo dokonce i u vyšších rostlin (Mertens 1993). U těchto organismů existují dva typy PPI-PFK. PPI-PFK typu I můžeme najít právě u zmíněných parazitických prvoků. Aktivita tohoto typu není ovlivněna působením regulátoru fruktóza-2,6-bisfosfát (Mertens, 1993). PPI-PFK typu II se nachází u rostlin a fotosyntetizujících prvoků. Její aktivita je ovlivněna působením fruktóza-2,6-bisfosfátu a v buňce koexistuje současně s klasickou fosfofruktokinázou, využívající ATP (Mertens 1993).

Pokračování glykolytické dráhy *T. vaginalis* se shoduje s klasickou glykolýzou. Působením aldolázy se fruktóza-1,6-bisfosfát štěpí na glyceraldehyd-3-fosfát (GAP) a dihydroxyacetonfosfát (DHAP). Odlišnost od klasické glykolytické dráhy představuje degradace DHAP. V modelové eukaryotické buňce je tato sloučenina přeměněna zpět na GAP, v případě *T. vaginalis* dochází k přeměně DHAP, znázorněné na obr. 2, na glycerol-3-fosfát. Děje se tak působením NADPH-dependentního enzymu glycerol-3-fosfát dehydrogenázy (obr. 2, reakce 49). Tím však tato degradace DHAP nekončí a účinkem dalšího enzymu glycerol-3-fosfatázy se vytváří glycerol (obr. 2, reakce 50), který se formuje jako jeden z odpadních metabolitů *T. vaginalis*. GAP se dále přeměňuje podle Embden-Meyerhofovy dráhy (viz strana 4) na fosfoenolpyruvát (PEP) a následně na pyruvát. Tento krok glykolytické reakce je uskutečněn pomocí enzymu pyruvát kináza (PK) (obr. 2, reakce 9). Avšak ukázalo se, že v genomu *T. vaginalis* lze najít také geny kódující jiný enzym, katalyzující přeměnu PEP na pyruvát. Jedná se o pyruvát-fosfát dikinázu (PPDK), představující další PPI-dependentní enzym generující ATP (Slamovits a Keeling 2006). Tento enzym bude blíže popsán v kapitole 2.2.2.1 u parazitického prvoka *Giardia intestinalis*. Zdá se, že jak PK tak PPDK mohou koexistovat

v jedné buňce, stále ale není jasné do jaké míry se PPKK podílí na vzniku pyruvátu (Slamovits a Keeling 2006). Předtím než pyruvát vstoupí do hydrogenosomu, může být v cytosolu degradován na další koncové produkty. Jedním z nich je laktát. Reakce probíhá za účasti enzymu laktát dehydrogenázy (obr. 2, reakce 12). Jako další možné metabolické produkty vznikají etanol (obr. 2, reakce 34 ) a aminokyselina alanin (obr. 2, reakce 18) (Müller et al. 2012).

PEP představuje výchozí sloučeninu pro další reakce odbočující z glykolýzy. Přeměna PEP v buňkách probíhá vícero způsoby v závislosti na organismu a použitých enzimech. V případě *T. vaginalis* se může jednat o karboxylaci PEP na oxalacetát, za současného vzniku GTP, katalyzovanou fosfoenolpyruvát karboxykinázou (obr. 2, reakce 17). nebo již zmíněnou tvorbu pyruvátu pomocí pyruvát kinázy či PPKK. Karboxylací vzniklý oxalacetát vstupuje do další reakce, při které se odehrává jeho redukce na malát katalyzovaná malát dehydrogenázou (obr. 2, reakce 11). Nakonec dochází k oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát působením cytosolického jablečného enzymu (NADPdependentního) (obr. 2, reakce 5). Tvorba oxalacetátu a malátu se uskutečňuje obdobným způsobem také u parazitických prvoků *G. intestinalis* a *E. histolytica*. Důvodem proč došlo ke vzniku této z glykolýzy odbočující dráhy, při které se pyruvátu tvoří v několika krocích, je ten, že při reakci katalyzované malát dehydrogenázou se reoxiduje NADH vytvářené v průběhu glykolýzy a zároveň při využití cytosolického jablečného enzymu dochází k produkci NADPH potřebného pro produkci etanolu a v případě *T. vaginalis* již zmíněného glycerolu. Vzniklý pyruvát je následně degradován na různé koncové produkty. V cytosolu probíhá již zmíněná tvorba laktátu katalyzovaná laktát dehydrogenázou. Dále zde dochází k produkci etanolu, vznikajícího redukcí acetaldehydu katalyzované alkohol dehydrogenázou (NADPH dependentní) (obr. 2, reakce 34) (Müller 2003; Müller et al. 2012). Nicméně stále není jasné jakým způsobem dochází ke vzniku acetaldehydu, nejspíše se tak děje pomocí hydrogenosomální PFOR (Leitsch et al. 2013). Dalším osudem pyruvátu může být přeměna na alanin příslušnou aminotransferázou (obr. 2, reakce 18) (Müller et al. 2012). V následující podkapitole jsou popsány reakce probíhající v hydrogenosomu *T. vaginalis*. Při reakcích tzv. prodloužené glykolýzy dochází k degradaci pyruvátu až na konečný produkt acetát. Pro buňku jsou velmi podstatné, jelikož při nich dochází k substrátové fosforylaci a s ní spojené tvorbě dalšího ATP (Müller 2003; Müller et al. 2012).

### **2.2.1.2 Hydrogenosom**

Hydrogenosom je buněčná organela nacházející se v cytosolu některých anaerobních protist. Jako první byl objeven a popsán u parazitického prvoka *Trichomonas foetus* (Lindmark a Müller 1973). Dlouhou dobu se spekovalo, že se jedná o organelu nepříbuznou mitochondrii, odvozenou od anaerobní bakterie, avšak nynější důkazy ukazují, že se tato pozoruhodná organela vyvinula v průběhu evoluce z mitochondrie a pravděpodobně se jedná o výsledek adaptace na prostředí, ve kterém chybí kyslík. Hydrogenosom plní zásadní úlohu v energetickém metabolismu *T. vaginalis*, jelikož se zde mimo jiné odehrávají reakce prodloužené glykolýzy (Hackstein et al. 2001). Kromě toho má hydrogenosom nepostradatelnou roli v syntéze FeS klastrů, které jsou součástí některých enzymů podstatných v energetickém metabolismu. V hydrogenosomu dochází jednak k samotné formaci FeS klastrů, jednak také

k jejich inkorporaci do apoproteinů a následné maturaci. Vzniklé FeS proteiny jsou součástí mitochondriálního respiračního řetězce, konkrétně komplexu I, II a III, či enzymu akonitázy, která je součástí Krebsova cyklu. V případě *T. vaginalis* nalezneme FeS proteiny v pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáze. FeS proteiny jsou tak zapojeny do transportování elektronů (Tachezy et al. 2001).

#### 2.2.1.2.1 Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza

Metabolická dráha probíhající v hydrogenosomu začíná degradací vstupujícího pyruvátu. V prvním kroku dochází k oxidativní dekarboxylaci pyruvátu. Proces probíhá za účasti ferredoxinového elektronového přenašeče. Samotná dekarboxylace je katalyzována enzymem pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázou (obr. 2, reakce 1). Tento enzym se až na výjimky u klasických aerobních eukaryot nevyskytuje, jelikož je citlivý na kyslík. Katalyzuje stejnou reakci jako pyruvát dehydrogenáza nacházející se v mitochondrii aerobních eukaryot. V průběhu reakce dochází k odštěpení oxidu uhličitého a přenosu uvolněných elektronů na ferredoxin, vzniká redukovaná forma ferredoxinu. Akceptorem elektronů je tedy ferredoxin na rozdíl od NAD, který je využíván právě pyruvát dehydrogenázou. Redukovaná forma ferredoxinu je následně reoxidována enzymem hydrogenázou a akceptorem uvolněných elektronů se stávají vodíkové protony (obr. 2, reakce 4). Dochází ke vzniku dalšího koncového metabolitu molekulárního vodíku ( $H_2$ ), který je dále uvolňován z hydrogenosomu do cytosolu, kde se potenciálně účastní dalších reakcí. Nicméně většina, takto vzniklého, vodíku je vylučována z buňky ven jako odpadní produkt. Výsledným produktem dekarboxylace pyruvátu je acetyl-CoA, který následně vstupuje do další reakce katalyzované acetát:sukcinát koenzym A transferázou (obr. 2, reakce 2C), popsanou v další podkapitole (Lindmark et al. 1989; Carvalho-de-Araújo et al. 2023).

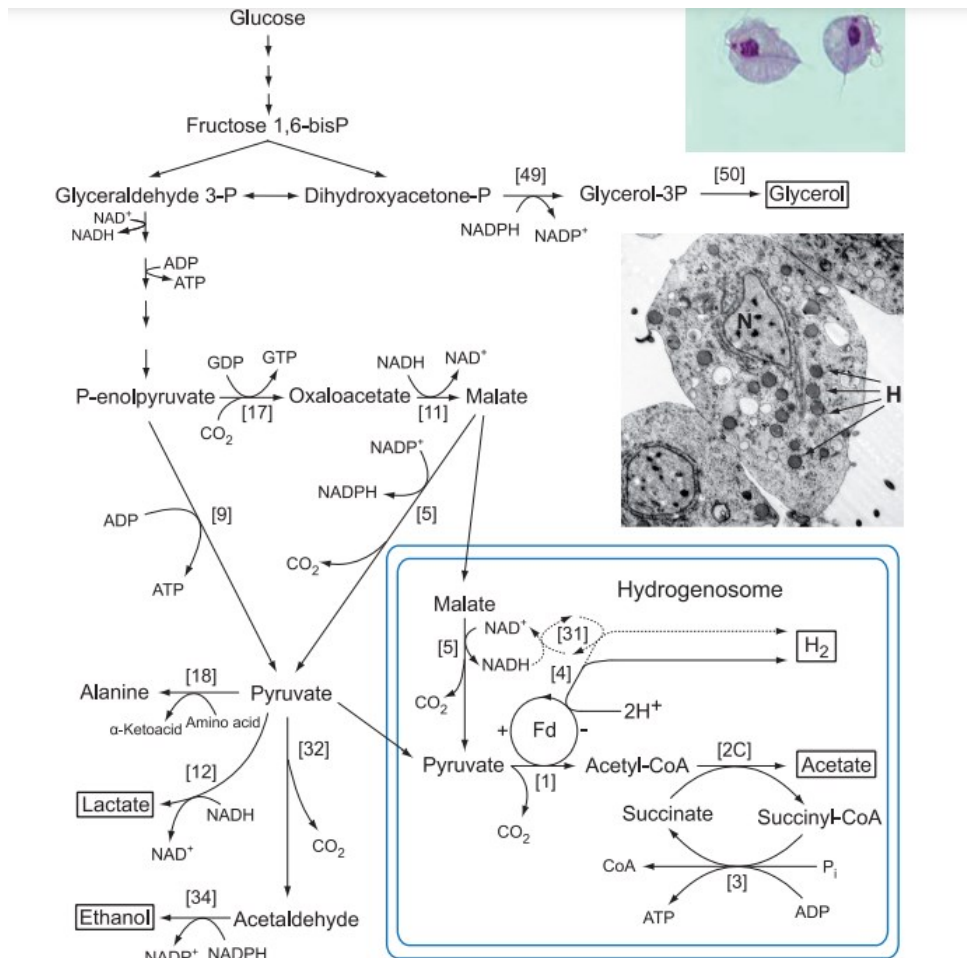
Další proces odehrávající se v hydrogenosomu je přeměna malátu na pyruvát (obr. 2, reakce 5). Tímto způsobem dochází k zajištění další tvorby pyruvátu, který je následně degradován a využit jako zdroj energie pro syntézu ATP. Enzym zodpovědný za oxidativní dekarboxylaci malátu se nazývá jablečný enzym preferující jako elektronový akceptor  $NAD^+$ , avšak může využívat také  $NADP^+$  (Doležal et al. 2004). V průběhu reakce vzniká redukovaná forma NADH, která je poté nejspíše reoxidována fragmentem komplexu I (obr. 2, reakce 31) (Hrdy et al. 2004). Při dalším výzkumu bylo zjištěno, že hydrogenosomální jablečný enzym není jediným jablečným enzymem kódovaným v genomu *T.vaginalis*. Vznikající NADPH slouží v buňce k dalším reakcím, zahrnujících tvorbu glycerolu či etanolu. Při analýze hydrogenosomálního i cytosolického jablečného enzymu vyšlo najevo, že se jedná o dva fylogeneticky odlišné enzymy. Zatímco cytosolická varianta je prokaryotického původu, tak hydrogenosomální je původu eukaryotického (Doležal et al. 2004).

#### 2.2.1.2.2 Acetát:sukcinát koenzym A transferáza

Acetát:sukcinát koenzym A transferáza (ASCT) patří do rodiny enzymů koenzym A (CoA) transferáz, které se podílejí na přenosu CoA z jedné molekuly na druhou. Nacházejí se v buňkách prokaryotických tak i eukaryotických. ASCT, která katalyzuje reakci probíhající v hydrogenosomu *T. vaginalis*, řadíme do rodiny I CoA transferáz, které mají ve svém aktivním centru glutamátový zbytek. Tato rodina může být dále rozdělena na několik podrodin, které

mezi sebou navzájem sdílejí homologní domény. Další CoA transferázy patřící do této rodiny nalezneme například u parazita *Fasciola hepatica* nebo *Leishmania major* (Tielens et al. 2010).

Enzym ACST katalyzuje přeměnu acetyl-CoA na konečný produkt oxidativní dekarboxylace pyruvátu, acetát. Při reakci dochází ke štěpení acetyl-CoA na acetyl a CoA, a následnému přenosu CoA na sukcinát za vzniku sukcinyl-CoA. Nejdříve dojde k přenosu CoA na aktivní místo enzymu, tedy glutamátový zbytek, a teprve poté je koenzymový zbytek přenesen na sukcinát (Tielens et al. 2010). Vzniklý sukcinyl-CoA se přeměňuje zpět na sukcinát působením enzymu sukcinyl-CoA syntetáza, známého též jako sukcinyl-CoA thiokináza (obr. 2, reakce 3). Jedná se o identický enzym, který se nachází v mitochondrii a je součástí Krebsova cyklu. Do této reakce vstupuje jako substrát ADP a Pi a dochází ke vzniku ATP při procesu substrátové fosforylace. Jedná se o jedinou dosud známou reakci substrátové fosforylace v hydrogenosomech trichomonád, představující proces podstatný při tvorbě další molekuly ATP a získávání potřebné energie (Jenkins et al. 1991; Coombs a Müller 1995; Van Grinsven et al. 2008). Jelikož substrátem této reakce je ADP, musí docházet k výměně vznikajícího ATP právě za ADP. To se děje přes ATP/ADP přenašeč, který se nachází v membráně hydrogenosomu (Dyall et al. 2000). K fungování syntézy ATP je zapotřebí také dostatečná hladina anorganického fosfátu (Pi). Pravděpodobně se tak děje prostřednictvím transportéru spojeného se symportem vodíkových protonů (Dick et al. 2014; Carvalho-de-Araújo et al. 2023).

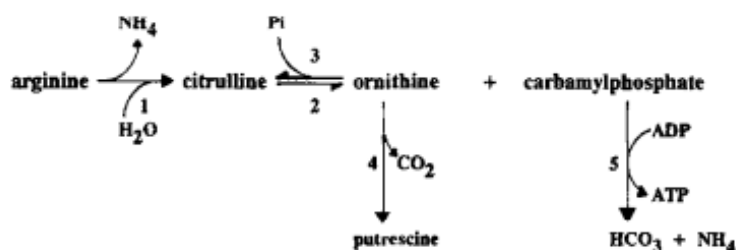


**Obr. 2 Schéma metabolických drah degradace glukózy u *T. vaginalis***

Legenda: Fd, ferredoxin; [1], pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; [2C], acetát:sukcinát koenzym A transferáza; [3], sukcinyl koenzym A syntetáza; [4], hydrogenáza; [5], jablečný enzym; [9], pyruvát kináza; [11], malát dehydrogenáza; [12], laktát dehydrogenáza; [17], fosfoenolpyruvát karboxykináza (GTP dependentní); [18], alanin aminotransferáza; [31], NADH dehydrogenáza; [32], neznámý enzym; [34], alkohol dehydrogenáza (NADPH dependentní); [49], glycerol-3-fosfát dehydrogenáza; [50], glycerol-3-fosfátáza (Müller et al., 2012)

Jestliže se tedy zaměříme na glykolytickou dráhu *T. vaginalis* v souhrnu, nalezneme určité odlišnosti od standardní eukaryotické anaerobní glykolýzy. Jedním z nich je využívání PPI jako substrátu při reakci katalyzované PPI-PFK a PPK. Tím dojde k ušetření jedné molekuly ATP. Při získávání energie se musí spolehnout výhradně na substrátovou fosforylaci. S tím jsou spojené reakce katalyzované enzymy PK, PPK, PGK a sukcinyl-CoA syntetáza. Celkový zisk ATP činí 4 molekuly, započítáme-li i reakce prodloužené glykolýzy. Dalším rozdílem je, že část prodloužené glykolýzy se přesunula do evolučně nové organely hydrogenosomu, která se zde vyskytuje místo standardní mitochondrie. Jako koncové metabolické produkty se vytváří glycerol, laktát, etanol, acetát, oxid uhličitý a molekulární vodík (Müller et al. 2012)

V neposlední řadě je třeba zmínit další reakci substrátové fosforylace v případě *T. vaginalis*, kterou je, pro eukaryota neobvyklá, arginin dihydrolázová dráha, zobrazená na obr. 3. Tento proces představuje důležitou alternativu získávání ATP, jelikož, jak již bylo zmíněno výše, *T. vaginalis* se při syntéze ATP spoléhá na substrátovou fosforylaci. Počátečním substrátem je arginin, nejprve dochází k jeho štěpení na citrulin. Tato reakce je katalyzována enzymem arginin deimináza (obr. 3, reakce 1). Následuje konverze citrulinu na ornitin pomocí katabolické ornitin karbamoyltransferázy (obr. 3, reakce 2). Společně s ornitinem se tvoří karbamoylfosfát. Nakonec je karbamoylfosfát použit k fosforylaci ADP. Katalyzátorem reakce je karbamát kináza (obr. 3, reakce 5). Produktem je bikarbonát a amoniak a při substrátové fosforylaci se vytváří molekula ATP. Taktéž ornitin podléhá následné degradaci a to při procesu dekarboxylace, katalyzované ornitin dekarboxylázou, při které vzniká sloučenina polyamin putrescin (obr. 3, reakce 4). Arginin dihydrolázová dráha se z velké části odehrává v cytosolu, kromě reakce katalyzované arginin deiminázou nacházející se v hydrogenosomu (Yarlett et al. 1996; Morada et al. 2010).



**Obr. 3 Schéma arginin dihydrolázové dráhy**

Legenda:  $\text{NH}_4$ , amoniak;  $\text{HCO}_3$ , bikarbonát; [1], arginin deimináza; [2], katabolická ornitin karbamoyltransferáza; [3], anabolická ornitin karbamoyltransferáza; [4], ornitin dekarboxyláza; [5], karbamát kináza (Yarlett et al. 1996)

## 2.2.2 *Giardia intestinalis*

Druhým parazitickým prvokem, kterým se ve své práci budu zabývat, je *Giardia intestinalis*. Radíme ji mezi Metamonada (Diplomonadida) z původní, dnes již neuznávané, superskupiny Excavata (Burki et al. 2020). *G. intestinalis* obývá trávicí soustavu, specificky tenké střevo, mnoha obratlovců, včetně člověka. V životní cyklus se střídají dvě stadia, jednak stadium cysty a jednak stadium trofozoita. Stadium cysty může být přítomné v kontaminované vodě nebo jídle, což může způsobit nákazu člověka. V lidském těle, konkrétně v tenkém střevu, z cysty excystuje trofozoit (Rodney 2001). Způsobuje onemocnění zvanému giardióza, které se projevuje těžkými průjmy, bolestí břicha a nevolností. Nicméně ani asymptomatický průběh není výjimkou (Robertson et al. 2010). Jedná se o velmi častou parazitární infekci, která celosvětově postihuje miliony lidí, nejvíce jsou jí zasaženy rozvojové části světa, odkud se onemocnění exportuje také do rozvinutých zemí. Léčba spočívá v podávání vhodných léčebných preparátů. Mezi nejvíce využívané patří 5-nitroimidazolové léky, kam patří metronidazol, tinidazol (Volf a Horák 2007)

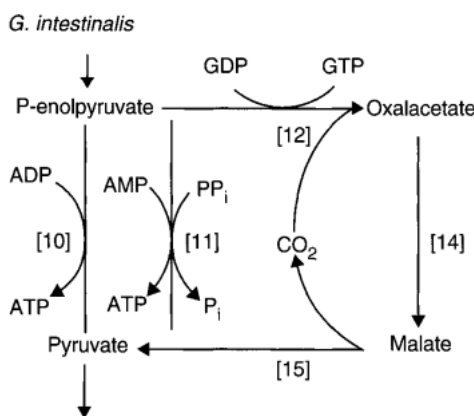
V buňce *G. intestinalis* nalezneme některé charakteristické buněčné struktury, mezi které patří mitosom, čtyři páry bičků, mediánní tělísko a adhezivní disk. Naopak postrádá typický Golgiho aparát (Volf a Horák 2007). Stejně jako předchozí parazitický prvok (*T. vaginalis*), ani u *G. intestinalis* nenajdeme typickou mitochondrii, jelikož v průběhu evoluce došlo k její redukci na mitosom (Tovar et al. 2003). Mitosom byl poprvé rozpoznán u jiného parazitického prvoka *Entamoeba histolytica* (Tovar et al. 1999), až následně byl objeven u některých dalších organismů včetně *G. intestinalis*. Na rozdíl od mitochondrie a hydrogenosomu se v mitosomu neodehrává energetický metabolismus, neprobíhá zde syntéza ATP, jako v případě mitochondrie a hydrogenosomu, ani tvorba vodíku, jako v hydrogenosomu. U *G. intestinalis* je doposud objevenou funkcí syntéza železo-sírných (Fe-S) center, prostetických skupin, které jsou součástí mnoha esenciálních proteinů, včetně pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (Tovar et al. 2003; Aguilera et al. 2008).

V následující části se zaměřím na glykolýzu, představující esenciální dráhu, využívanou k získávání energie u *G. intestinalis*. Stejně tak jako tomu bylo u *T. vaginalis*, probíhá rozklad glukózy v cytosolu. Liší se však tím, že u *G. intestinalis* se celá metabolická dráha, až k vytvoření konečných produktů, odehrává výhradně v cytosolu (Rodney 2001). Počáteční reakce degradace glukózy se shodují s Embden-Meyerhofovou drahou. Glukóza se, působením enzymu hexokinázy, fosforyluje na glukóza-6-fosfát. Následuje přeměna na fruktóza-6-fosfát a dále na fruktóza-1,6-bisfosfát. V tomto kroku se použití enzymu opět shoduje s *T. vaginalis* a reakce je katalyzovaná ATP šetřící pyrofosfát-dependentní fosfofruktokinázou, která jako substrát využívá pyrofosfát. Další reakce běží podle klasické glykolytické dráhy až dojde ke vzniku PEP. V průběhu glykolýzy dochází k substrátové fosforylaci a s ní spojené produkci ATP při reakci katalyzované fosfoglycerát kinázou a níže zmíněnou PPK (Rodney 2001; Müller 2003).

### **2.2.2.1 Pyruvát fosfát dikináza**

Glykolýzou vzniklý PEP představuje výchozí sloučeninu pro následnou tvorbu pyruvátu. U *G. intestinalis* může proces přeměny PEP na pyruvát probíhat vícero způsoby, během kterých jsou zapojeny odlišné enzymy. Všechny alternativy vytvářející pyruvátu jsou znázorněny na obr. 4. První variantou je zapojení klasické pyruvát kinázy (PK) se shodným průběhem vzniku pyruvátu jako v modelové Embden-Meyerhofově dráze. Při druhé možnosti je zapojen odlišný biokatalyzátor, pyruvát fosfát dikináza (PPDK), který se nachází také u jiných organismů, například u *E. histolytica*, *T. vaginalis* ale i trypanosom, bakterií a rostlin. Porovnáním reakcí PK (obr. 4, reakce 10) a PPK (obr. 4, reakce 11) pozorujeme podstatnou odlišnost, oba enzymy se liší potřebným substrátem. Zatímco PK používá jako substrát vedle PEP také ADP, PPK funguje v přítomnosti AMP a PPI. Obě reakce generují ATP, liší se pouze tím, že v případě použití PPK dochází k následnému vzniku až dvou molekul ATP. Důvodem je přítomnost dalšího enzymu, adenylát kinázy, který je zodpovědný za vzájemnou transformaci adeninových nukleotidů, ATP a AMP na ADP. Ze 2 molekul ADP se vytváří jedna molekula AMP a ATP a tím dochází k produkci další molekuly ATP. Vznikající AMP může být následně využito PPK k tvorbě druhé molekuly ATP. Adenylát kináza představuje pro buňku zásadní enzym energetického metabolismu, jelikož se podílí na udržování rovnováhy mezi adeninovými

nukleotidy. Další rozdíl mezi reakcí katalyzovanou PK a PPDK je ten, že reakce katalyzovaná PPDK může probíhat také reversibilně, kdy se z pyruvátu tvoří PEP. Za normálních podmínek je tento krok katalyzován dvěma enzymy, pyruvát karboxylázou, tvořící oxalacetát, a PEP karboxykinázou. *G. intestinalis* tak používá jeden enzym, PPDK, který nahradí tuto dvoukrokovou reakci. PPDK se tak může podílet jak na glykolytické, tak i glukoneogenetické dráze (Mertens 1993; Park et al. 1997). Poslední alternativa tvorby pyruvátu, u *G. intestinalis*, obsahuje dva mezikroky, během kterých dochází k tvorbě oxalacetátu a následně malátu. Celá dráha je znázorněna na obr. 4. Při první reakci, kdy z PEP vzniká oxalacetát, je potřeba fosfoenolpyruvát karboxykináza (GTP dependentní) (obr. 4, reakce [12]). Následuje redukce oxalacetátu na malát katalyzovaná malát dehydrogenázou (obr. 4, reakce [14]) a jako poslední dochází k samotnému vzniku pyruvátu, při oxidativní dekarboxylaci malátu, pomocí jablečného enzymu (obr. 4, reakce [15]). Stejná sekvence reakcí probíhá taktéž v cytosolu *T. vaginalis*. Pyruvát poté vstupuje do dalších reakcí vedoucích až ke koncovým metabolitům (Müller 2003).



**Obr. 4** Schéma reakcí vedoucích ke vzniku pyruvátu u *G. intestinalis*

Legenda: [10], pyruvát kináza; [11] pyruvát fosfát dikináza; [12], fosfoenolpyruvát karboxykináza (GTP dependentní); [14], malát dehydrogenáza; [15], jablečný enzym (Müller, 2003)

Dále se zaměřím na podrobnější popis samotné PPDK, mechanismu reakce a vlivu vnějších podmínek na její průběh. PPDK obsahuje tři funkční domény. V první doméně se nachází místo, na které se váže molekula ATP, druhá doména má katalytickou funkci a na třetí se váže PEP nebo pyruvát (Bruchhaus a Tannich 1993). V průběhu tvorby ATP dochází k přenosu fosfátové skupiny z PEP a PPi na AMP, za vzniku ATP, Pi a pyruvátu (Mertens, 1993). Jak již bylo řečeno, PPDK katalyzuje také reverzibilní reakci a právě reakční mechanismus tohoto enzymu byl popsán na zpětné reakci probíhající přes enzym-fosfátové a enzym-difosfátové meziproducty. Při první reakci dochází k vazbě ATP k enzymu a tím ke vzniku prvního meziproductu, enzym-difosfátu (enzym-PP), a AMP. Následně se k enzym-difosfátu váže anorganický fosfát za vzniku pyrofosfátu a druhého meziproductu, enzym-fosfátu (enzym-P). V posledním kroku dochází k přenosu fosfátu z enzymu na pyruvát a vzniká tak PEP a volný enzym (Evans a Wood 1968). Jestliže tento chemický proces probíhá ve směru tvorby pyruvátu

a ATP, pak konkrétně dochází k přenosu fosfátové skupiny z PEP a PPi na AMP molekulu (Mertens 1993).

Na průběh reakce mají vliv také vnější podmínky. Při jejich testování bylo zjištěno, že nevhodnější hodnota pH pro aktivitu enzymu, při reakci tvořící ATP, je 6. Dále se zkoumal vliv jednomocných a dvojmocných kationtů. Ukázalo se, že na činnost PPDK mají vliv především hořečnaté kationty. Zajímavé ale bylo, že jestliže byla překročena jejich optimální koncentrace, pak došlo naopak k poklesu aktivity enzymu. Při testování vlivu jednomocných kationtů vyšlo najevo, že jejich dopad na aktivitu PPDK se liší v závislosti na organismu (Saavedra-Lira et al. 1998). Jestliže PPDK katalyzuje reakci u prvoka *E. histolytica*, pak aktivita PPDK není jednomocnými kationty téměř ovlivněna (Reeves et al. 1968). Na rozdíl od PPDK, kterou využívají *G.intestinalis* a některé rostliny, která k průběhu reakce vyžaduje amonné nebo draselné kationty (Saavedra-Lira et al. 1998).

Následnou reakcí prodloužené glykolýzy je oxidativní dekarboxylace pyruvátu spojená se zachycením CoA, jejímiž produkty jsou CO<sub>2</sub> a makroergní acetyl-CoA. Tento proces probíhá stejným způsobem jako tomu je v hydrogenosomech *T. vaginalis*, s tím rozdílem, že v případě *G. intestinalis* se odehrává výhradně v cytosolu. Dekarboxylace pyruvátu, znázorněná na obr. 5, je katalyzovaná shodným enzymem, PFOR (obr. 5, reakce 1), avšak v tomto případě se jedná o enzym nacházející se v buněčné membráně, a stejně jako v případě *T. vaginalis* zastává roli akceptoru uvolněných elektronů ferredoxin (Brown et al. 1998). Ačkoli *G. intestinalis* postrádá hydrogenosom, dochází zde také k tvorbě vodíku, která se odehrává v cytosolu. Tento proces probíhá za striktně anaerobních podmínek, jelikož katalyzátor reakce, hydrogenáza (obr. 5, reakce 4), je velmi citlivý na přítomnost kyslíku (Lloyd et al. 2002). Jedná se o jednu z alternativ, která zajišťuje redoxní rovnováhu v buňce, další možností je využití reakce spojené s tvorbou etanolu (obr. 5) (Brown et al. 1998; Müller 2003). Dekarboxylací pyruvátu vznikající acetyl-CoA vstupuje do poslední fáze prodloužené glykolýzy. Zde může dojít k jeho degradaci dvěma způsoby. První variantou je postupné odbourání acetyl-CoA na etanol přes acetaldehyd jako meziprodukt. Děje se tak za katalýzy enzymem alkohol dehydrogenázou E (Sánchez 1998). Tento typ dehydrogenázy má dvě aktivity. Nejdříve je použita její acetaldehyd dehydrogenázová aktivita na N-koncové doméně a dojde k transformaci acetyl-CoA na acetaldehyd (obr. 5, reakce 25). Poté je využita její druhá, alkohol dehydrogenázová aktivita na C-koncové doméně, která katalyzuje redukci acetaldehydu na konečný produkt etanol (obr. 5, reakce 25). K tomu, aby mohla tato alkohol dehydrogenáza E efektivně katalyzovat přeměnu acetyl-CoA, musí mít k dispozici molekuly NADH sloužící jako zdroj elektronů. K vytváření NADH dochází při přeměně glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát katalyzované enzymem glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Pineda et al. 2015). Druhou alternativou při odbourání acetyl-CoA je jeho přeměna až na acetát, za použití enzymu acetyl koenzym A syntetázy (ADP formující) popsaného níže (obr. 5, reakce 30) (Müller et al. 2012).

### **2.2.2.2 Acetyl koenzym A syntetáza (ADP formující)**

Acetyl koenzym A syntetáza (ACS), jinak známá pod názvem acetát kináza, je enzym zodpovědný za přeměnu acetyl-CoA na acetát a tvorbu ATP (Tielens et al. 2010). Tento enzym můžeme nalézt také u dalších parazitických prvoků, například *E. histolytica* a také některých

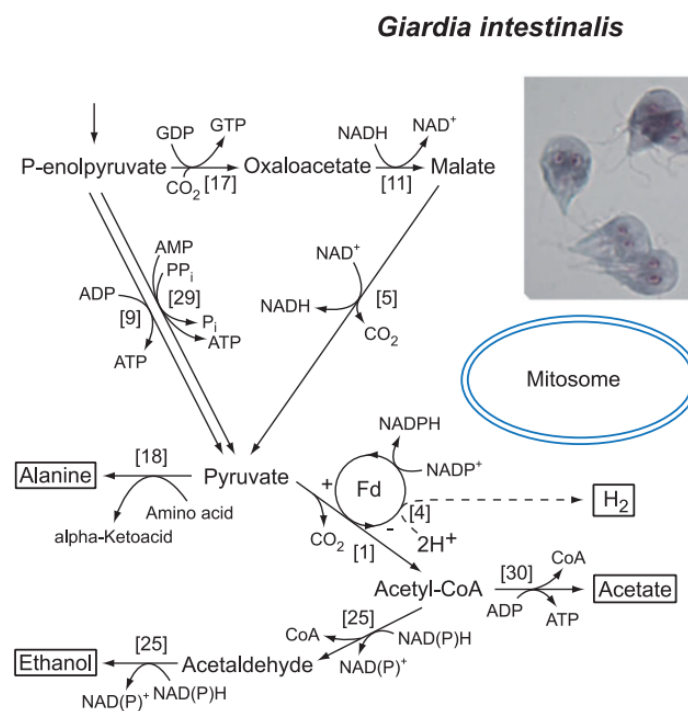
anaerobních prokaryot, například *Pyrococcus furiosus*. Řadíme ho do rodiny acyl koenzym A syntetáz. Do této rodiny patří také sukcinyl koenzym A syntetáza (SCS), která je součástí Krebsova cyklu mnoha organismů, nebo také acetyl-CoA syntetáza (AMP formující). Při porovnání acyl koenzym A syntetáz mezi sebou zjistíme, že některé aminokyselinové zbytky jsou konzervovány napříč celou jejich rodinou. Nejvýraznějším je histidinový zbytek His<sup>246</sup>, který je nepostradatelným místem při probíhající fosforylaci. Další důležitou konzervovanou oblastí je část vázající koenzym A. Na druhou stranu se jednotlivé typy liší v uspořádání domén. V klasické SCS, představující heterodimér, jsou nejdříve domény jedna a dva, které náleží alfa podjednotce, poté následují domény tři, čtyři a pět, které patří beta podjednotce. U ASC je pořadí domén podobné, liší se tím, že poslední pátá doména se zde nachází uprostřed molekuly a podjednotky alfa a beta se tak sloučily do jednoho proteinu (Sánchez et al. 2000).

ACS katalyzuje reakci, která probíhá ve směru tvorby acetátu. Enzym má výraznou substrátovou specifitu a jako substráty využívá acyl-CoA, ADP a anorganický fosfát. Při použití jiného substrátu než je acyl-CoA, například n-propionyl-CoA nebo sukcinyl-CoA, není průběh reakce tak efektivní. Jestliže na začátku vstupuje do reakce jiný nukleotid difosfát než je ADP, například dADP, je aktivita ACS také méně efektivní a dokonce při použití UDP, CDP nebo GDP jako substrátu, nemá enzym žádnou aktivitu. Tento fakt vypovídá o velmi vysoké specifitě k molekule ADP. Ke správné činnosti ACS přispívají také dvojmocné kationty. Při využití kobaltnatých a manganatých kationtů měla ACS stejnou aktivitu jako při použití hořečnatých kationtů. Naopak vápenaté kationty její aktivitu snižovaly a po přidání monovalentních kationtů nedošlo k žádnému ovlivnění její aktivity (Sánchez a Müller 1996).

ACS, podobně jako hydrogenosomální SCS u *T. vaginalis*, má velký podíl na tvorbě ATP v procesu substrátové fosforylace. Další reakce, při kterých dochází k syntéze ATP, jsou již zmíněná PEPCK spojená s alternativní odbočkou glykolýzy nebo reakce využívající degradaci aminokyselin. Stejně jako v případě *T. vaginalis* i *G. intestinalis* využívá arginin dihydrolázovou dráhu, při které dochází k rozkladu aminokyseliny arginin. Mechanismus reakce a katalyzující enzymy se shodují s arginin dihydrolázovou dráhou u *T. vaginalis*. Podstatné je, že v poslední reakci katalyzované karbamát kinázou dochází k tvorbě ATP substrátovou fosforylací. Důležité také je, že v průběhu této reakce nevznikají žádné redukované kofaktory, které by musely být následně reoxidovány. *G. intestinalis* proto není zcela závislá na přítomnosti glukózy v prostředí a jako zdroj energie může zužitkovávat již zmíněný arginin. Arginin dihydrolázová dráha tak může být z energetického hlediska významnější než glykolýza, jelikož v jejím průběhu dochází k potenciálně většímu zisku energie (Schofield et al. 1992; Brown et al. 1998).

*G. intestinalis* generuje rozkladem glukózy více konečných metabolitů. Hlavní jsou acetát, etanol a CO<sub>2</sub>, avšak dalším možným produktem je vodík a také aminokyselina alanin vznikající z pyruvátu katalýzou alanin aminotransferázou (obr. 5, reakce 18). V případě využívání argininu jako zdroje uhlíku a energie dochází k produkci ornitinu a amoniaku. Výsledná produkce metabolitů je závislá mimo jiné na vnějších podmínkách, největší vliv představuje přítomnost kyslíku v prostředí. Jestliže se *G. intestinalis* nachází v anaerobním prostředí, pak převažuje tvorba alaninu a etanolu na rozdíl od produkce acetátu a CO<sub>2</sub>, která klesá (Paget et al. 1993).

V souhrnu lze říci, že se glykolytická dráha *G. intestinalis* z velké části shoduje s dráhou využívanou parazitickým prvokem *T. vaginalis*. Liší se jednak tím, že se celá odehrává v cytosolu a jednak také tím, že zde neprobíhá tvorba glycerolu a s ní spojené enzymy u *G. intestinalis* nenalezneme. Nachází se zde jak PK tak i PPK, které katalyzují přeměnu PEP na pyruvát. V případě, že *G. intestinalis* využívá PPK, pak použitím enzymu adenylát kinázy dochází k další produkci ATP. Do následné dráhy prodloužené glykolýzy jsou zapojeny taktéž některé rozdílné enzymy. Příkladem může být acetyl koenzym A syntetáza (ADP formující) podílející se na tvorbě ATP substrátovou fosforylací, kterou u modelových eukaryot, ani u předchozího parazitického prvoka *T. vaginalis*, nenalezneme. Jako další varianta produkce ATP substrátovou fosforylací slouží arginin dihydrolázová dráha. Hlavními metabolickými produkty glykolýzy jsou acetát, etanol, alanin, CO<sub>2</sub> a vodík, jejichž produkce závisí na vnějších podmínkách (Müller et al. 2012).



**Obr. 5 Schéma metabolických drah degradace PEP a reakcí prodloužené glykolýzy u *G. intestinalis***

Legenda: Fd, ferredoxin; [1], pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; [4], hydrogenáza; [5], jablečný enzym [9], pyruvát kináza; [11], malát dehydrogenáza; [17], fosfoenolpyruvát karboxykináza (GDP dependentní); [18], alanin aminotransferáza; [25], alkohol dehydrogenáza E; [29], pyruvát fosfát dikináza; [30], acetyl-CoA syntetáza (ADP formující) (Müller et al., 2012)

### 2.2.3 *Entamoeba histolytica*

Dalším parazitickým prvokem, na kterého se ve své práci zaměřím, je *Entamoeba histolytica* náležící mezi archaméby ze skupiny Amoebozoa (Burki et al. 2020). Jedná se o původce parazitárního onemocnění nazývaného améboza. Ročně se tímto střevním onemocněním nakazí zhruba padesát milionů lidí po celém světě (Zulfiqar et al. 2024). Nejvíce se vyskytuje v rozvojových zemích, kde v těžkých případech může skončit až smrtí. Životní cyklus *E. histolytica* se skládá ze dvou stádií. Ve vnějším prostředí se nachází stadium cysty, které

může kontaminovat vodu či jídlo. Tímto způsobem také nejčastěji dochází k nákaze člověka. Cysta putuje až do tenkého střeva, kde dochází k její excystaci a vzniká tak druhé stádium, trofozoit, putující až do tlustého střeva, které začne kolonizovat (Begum et al. 2021). Při rozvoji onemocnění v lehčích případech postižený člověk trpí častými krvácivými průjmy, v horších případech se infekce může rozšířit do jiných orgánů a způsobit zde značné škody. Nejčastěji takto bývají postižena játra a jestliže pacient nedostane včasnou léčbu, může být toto onemocnění smrtelné. Ročně takto zemřou desetitisíce lidí. Stejně jako u některých dalších parazitárních onemocnění také amébóza se léčí pomocí 5-nitroimidazolových preparátů, například metronidazolu nebo tinidazolu (Begum et al. 2021; Zulfiqar et al. 2024).

Zaměříme-li se na buněčnou stavbu *E. histolytica* zjistíme, že postrádá pro modelovou eukaryotickou buňku typické mitochondrie. Zvláštní organelou nacházející se v buňce *E. histolytica* je mitosom, který byl poprvé objeven a popsán právě u tohoto parazita (Tovar et al. 1999). Jak již bylo řečeno jedná se o organelu příbuznou mitochondrii, která se v buňce zachovala jako její pozůstatek. Kompletní funkce této organely není zcela jasná. V případě již zmíněného prvoka *G. intestinalis* se jako hlavní funkce uvádí biosyntéza železo-sírných center, u *E. histolytica* mitosom tuto funkci postrádá a podílí se na aktivaci sulfátu (Mi-ichi et al. 2009). Tato mitosomální aktivita je unikátní a u jiných parazitických prvoků ji nenalezneme. Nejprve probíhá aktivace anaorganického sulfátu pomocí ATP sulfurylázy na adenosin-5'-fosfosulfát (APS), který je následně při reakci katalyzované APS kinázou převeden na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát, který tak představuje důležitý zdroj sulfurylové skupiny potřebné v syntézách některých makromolekul, například sulfolipidů. Aktivace sulfátu tak zastává důležitou roli v proliferaci buňky (Mi-ichi et al. 2011). Stejně jako dříve zmínění parazitičtí prvoci se také *E. histolytica* řadí mezi mikroaerofilní prvoky, v jejichž buňce nenalezneme respirační řetězec ani Krebsův cyklus. Při syntéze molekul ATP se proto nemůže spolehnout na proces oxidativní fosforylace a při zisku energie je závislá na glykolytických reakcích a s nimi spojené substrátové fosforylace. Všechny dráhy energetického metabolismu se odehrávají v cytosolu (Müller 1988; Coombs a Müller 1995).

V další části se budu zabývat samotnou glykolytickou dráhou u *E. histolytica*. Tato dráha se skládá ze standardních i pro eukaryotickou glykolýzu neobvyklých enzymů, jako jsou již dříve popsané PPi-PFK či PPK. Naopak v prodloužené glykolýze *E. histolytica* využívá některé specifické enzymy, například ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza, jejíž mechanismus bude popsán níže. Do buňky vstupující glukóza je fosforylována enzymem hexokinázou, která se v genomu *E. histolytica* vyskytuje ve dvou izoformách, hexokináza I a II. Rozdíl mezi nimi je ten, že u izoformy hexokináza I se vyskytuje větší afinita k substrátu ATP. Jako regulační systém tohoto enzymu funguje poměr mezi množstvím AMP a ADP ku ATP, jestliže je v buňce vyšší koncentrace AMP nebo ADP než ATP, pak dochází k inhibici reakce (Pineda et al. 2015). Také další krok, izomerace glukóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát, probíhá standardně a je tak katalyzován glukóza-6-fosfát izomerázou. Stejně jako dříve zmínění parazitičtí prvoci i *E. histolytica* využívá při další reakci enzym pyrofosfát-dependentní fosfofruktokinázu (PPi-PFK), avšak v jejím genomu se nachází i gen kódující klasickou ATP-dependentní fosfofruktokinázu, jejíž aktivita je ale mnohem menší než u PPi-PFK a na vznik fruktóza-1,6-

bisfosfátu nemá téměř žádný vliv (Pineda et al. 2015). Následující reakce opět probíhají podle klasického schématu, vzniká glycerinaldehyd-3-fosfát, dále 1,3-bisfosfoglycerát, 3-fosfoglycerát, 2-fosfoglycerát až nakonec dojde k tvorbě PEP. Přeměna PEP, znázorněná na obr. 6, může probíhat více způsoby použitím specifických enzymů. V prvních dvou případech jsou využity již zmíněné enzymy, konkrétně PK (obr. 6, reakce 9) a PPDK (obr. 6, reakce 29). Průběh reakce katalyzované PK se shoduje s klasickým eukaryotickým modelem vyžadujícím ADP jako substrát. Druhým způsobem jak docílit vzniku pyruvátu je reakce katalyzovaná PPDK, tento proces probíhá stejným způsobem jako tomu bylo u parazitického prvoka *G. intestinalis*, kromě PEP jsou substrátem PPi a AMP. V obou případech dochází k tvorbě ATP, nicméně více využívanou alternativou k přeměně PEP představuje PPDK poskytující potenciálně více ATP (Reeves 1985; Pineda et al. 2015). Poslední varianta, dávající vznik pyruvátu, se skládá ze tří reakcí vytvářející meziprodukty oxalacetát a malát. Počáteční krok, karboxylaci PEP, katalyzuje pro *E. histolytica* specifický a u jiných eukaryot se nevyskytující enzym fosfoenolpyruvát karboxytransfosforyláza nebo též fosfoenolpyruvát karboxytransferáza (PPi dependentní) (viz níže) (obr. 6, reakce 28) a vznikající PPi tak může být použit v jiných PPi dependentních reakcích (Müller et al. 2012).

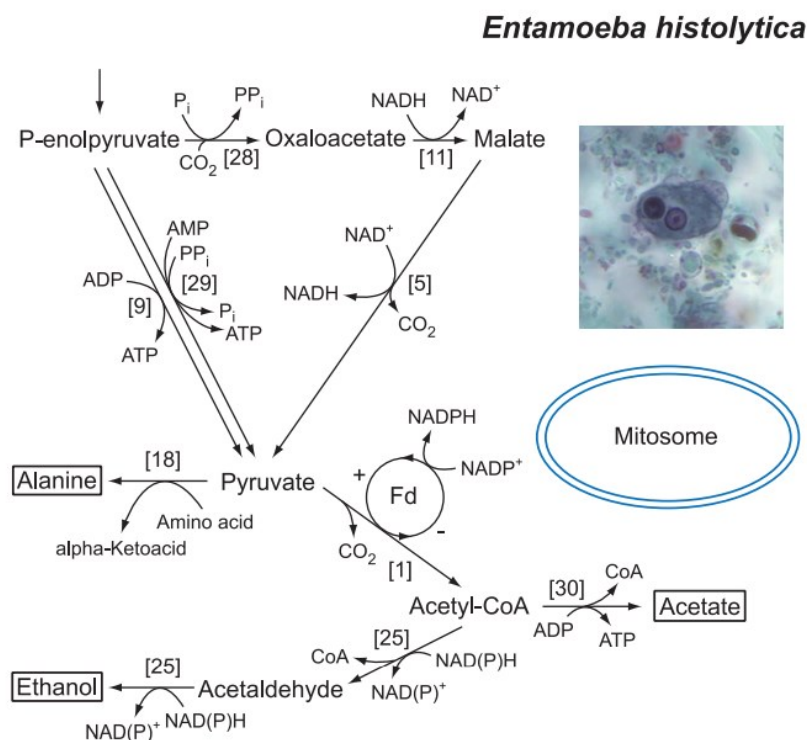
### **2.2.3.1 Fosfoenolpyruvát karboxytransfosforyláza**

Fosfoenolpyruvát karboxytransfosforylázu můžeme, kromě *E. histolytica*, nalézt taktéž u bakterie *Propionibacterium shermanii*. Jedná se o enzym, který katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na oxalacetát. Tato reakce je jedna ze tří možných, jak lze docílit vzniku oxalacetátu z PEP, nicméně jde o jedinou používanou v případě *E. histolytica*. Druhou variantou, která rovněž vede k vytvoření oxalacetátu, je karboxylace PEP probíhající za účasti enzymu fosfoenolpyruvát karboxykinázy, která se liší použitým substrátem, jelikož místo Pi využívá GDP. Tento krok představuje běžný způsob syntézy oxalacetátu. Posledním enzymem je fosfoenolpyruvát karboxyláza, která se nachází například v některých rostlinných buňkách a jako substráty zužitkovává pouze PEP a CO<sub>2</sub> (Siu et al. 1961; Mertens 1993). V případě fosfoenolpyruvát karboxytransfosforylázy u *E. histolytica* vstupuje do reakce PEP, CO<sub>2</sub> a Pi a dochází k produkci oxalacetátu a PPi. Pro energetický metabolismus představuje zmíněná reakce velký přínos, jelikož se podílí na vytváření Pi a PPi rovnováhy. Vznikající PPi může vstupovat do dalších reakčních procesů jako substrát, děje se tak například při reakci katalyzované PPDK, a naopak Pi, který se v buňce uvolňuje například při glykolytické reakci katalyzované PPi-PFK, je v rámci této karboxylace PEP zužitkován (Reeves 1985; Mertens 1993). Fosfoenolpyruvát karboxytransfosforyláza katalyzuje také reversibilní reakci, během které se vytváří PEP a Pi, jako substrát slouží oxalacetát a PPi, jedná se ale o značně pomalejší proces v porovnání s reakcí vytvářející oxalacetát a PPi. K efektivní činnosti enzymu jsou nezbytné některé ionty, například kobaltnaté nebo hořečnaté. Naopak ionty draselné či sodné aktivitu enzymu inhibují (Lochmüller et al. 1966; Reeves 1970).

Následující kroky přeměny oxalacetátu až na pyruvát se shodují s procesy u *G. intestinalis* a jsou zachyceny na obr. 6. Vznikající oxalacetát vstupuje do navazující reakce, při které dochází k jeho redukci na malát, katalyzované NADH-dependentní malát dehydrogenázou (obr. 6, reakce 11). Nakonec probíhá dekarboxylace a oxidace malátu pomocí jablečného

enzymu (NADP dependentního) (obr. 6, reakce 5). Výsledným produktem této dráhy je pyruvát, který podléhá dalším reakcím. Důvodem proč *E. histolytica* používá tuto dráhu, obcházející reakci PPK či PK, je jednak redukce NADP na NADPH a reoxidace NADH, které jsou potřeba k průběhu dalších metabolických procesů, a jednak dochází k tvorbě PPi, důležitého substrátu pro již zmíněné PPK-PFK nebo PPK (Pineda et al. 2015; Carvalho-de-Araújo et al. 2023).

Všechny varianty reakcí, přeměňujících PEP, mají jedno společné, všechny generují stejný koncový produkt, pyruvát, který v následujícím kroku podléhá oxidativní dekarboxylaci (obr. 6, reakce 1). Tento děj se rovněž jako u dříve zmíněných parazitických prvoků odehrává za katalýzy PFC, která stejně tak využívá jako akceptor elektronů ferredoxin. Taktéž u parazitického prvoka *E. histolytica* je nezbytné zredukovanou formu ferredoxinu opět reoxidovat. Proces reoxidace ferredoxinu je popsán níže (Muller 1988; Carvalho-de-Araújo et al. 2023).



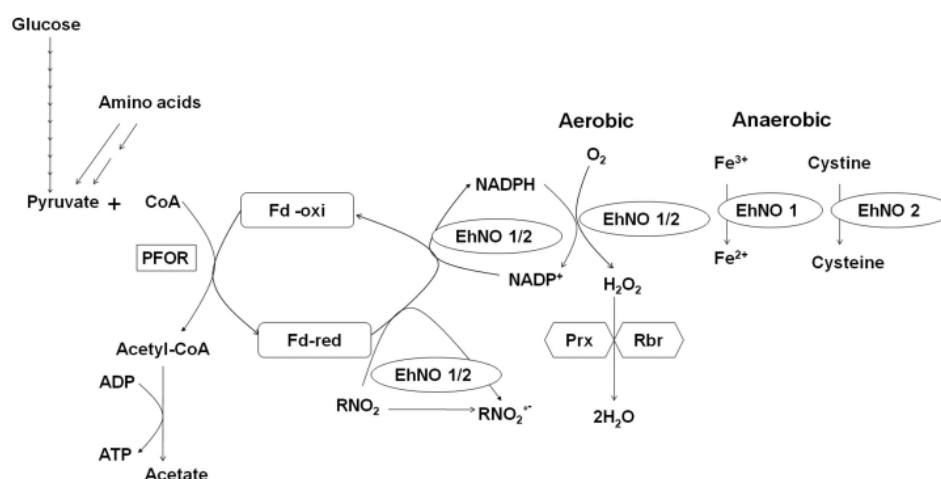
**Obr. 6 Schéma metabolických drah degradace PEP a reakcí prodloužené glykolýzy u *E. histolytica***

Legenda: Fd, ferredoxin; [1], pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; [5], jablečný enzym; [9], pyruvát kináza; [11], malát dehydrogenáza; [18], alanin aminotransferáza; [25], alkohol dehydrogenáza E; [28], fosfoenolpyruvát karboxytransferáza (PPi dependentní); [29], pyruvát fosfát dikináza; [30], acetyl-CoA syntetáza (ADP formující) (Müller et al. 2012)

### 2.2.3.2 Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza

K reoxidaci ferredoxinu, *E. histolytica*, využívá další specifický enzym, NADPH-dependentní oxidoreduktázu. Tento enzym zřejmě zastává více metabolických funkcí a jedna z jeho aktivit funguje jako ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza (Jeelani et al. 2010). V cytosolu

buňky se nacházejí dvě izoformy této oxidoreduktázy, *E. histolytica* NADPH-dependentní oxidoreduktáza 1 a 2 (EhNO1/2), představující enzymy příbuzné malé podjednotce glutamát syntázy vyskytující se mimo jiné u některých bakterií. EhNO 1/2 jsou důležité pro reoxidaci redukované formy ferredoxinu vznikajícího při reakci katalyzované PFOR. Podstatnou aktivitou EhNO1/2 je ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza redukující NADP<sup>+</sup> na NADPH, který je dále využit při NADPH dependentních redukčních reakcích. Dále pomocí EhNO1 dochází k redukci L-cystinu na L-cystein a následně EhNO2 katalyzuje redukci železitých iontů. Všechny tyto redoxní reakce jsou znázorněny na obr. 7. Zapojení EhNO1/2 při katalýze zmíněných reakcí se liší, nicméně oba enzymy jsou vysoce NADPH specifické. Aktivita EhNO1 při redukci železitých iontů je účinnější než aktivita EhNO2, naopak EhNO2 zastává větší roli při redukci L-cystinu. Jako ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza pracuje spíše EhNO1, jelikož s ferredoxinem vytváří stabilnější komplex. V průběhu oxidativní dekarboxylace pyruvátu dochází k přenosu elektronů na oxidovanou formu ferredoxinu a tím dojde k jeho redukci. Redukovaný ferredoxin poskytuje elektrony NADP<sup>+</sup> a prostřednictvím EhNO1 dochází k regeneraci cytosolického poolu NADPH, zároveň dochází k reoxidaci ferredoxinu zpět na oxidovanou formu. Tento krok je v energetickém metabolismu podstatný, jelikož buňce pomáhá doplňovat NADPH potřebné pro udržení redoxní rovnováhy a s tím spojené pokračování metabolických procesů. Další důležitou vlastností EhNO1/2, která stojí za zmínku, je, že se jedná o flavoproteiny obsahující FAD. Za aerobních podmínek tak dochází k redoxní reakci, při které jsou elektrony z NADPH předány FAD a vzniká tak FADH<sub>2</sub>, které je následně kyslíkem oxidováno zpět na FAD a zároveň dochází k tvorbě peroxidu vodíku, který poté vstupuje do další reakce, při které je konvertován na vodu. V neposlední řadě EhNO1/2 má schopnost redukovat metronidazol používaný jako léčivo. K tomu, aby byl metronidazol účinný, musí být nejprve aktivován tím, že dojde k jeho redukci na cytotoxické radikály a právě tento proces redukce může být katalyzován EhNO1/2. Nadměrnou expresí genů těchto enzymů může dojít k tomu, že se *E. histolytica* stane více senzitivní k léčbě pomocí metronidazolu a tím se tato léčba může stát efektivnější (Jeelani et al. 2010). Udržení redoxní-rovnováhy v buňce představuje problém pro všechny buňky. *G. intestinalis* k tomu využívá například hydrogenázu či alkohol dehydrogenázu E (Müller et al. 2012).



**Obr. 7** Reakce katalyzované NADPH-dependentní oxidoreduktázou

Legenda: PFOR, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; Fd -oxi, oxidovaný ferredoxin; Fd -red, redukovaný ferredoxin; RNO<sub>2</sub> metronidazol; RNO<sub>2</sub><sup>•</sup>, redukovaný metronidazol; EhNO1, *E. histolytica* NADPH-dependentní oxidoreduktáza 1; EhNO2, *E. histolytica* NADPH-dependentní oxidoreduktáza 2 (Jeelani et al. 2010)

Při následující reakci prodloužené glykolýzy katalyzované již výše zmíněnou PFOR spojenou s reoxidací ferredoxinu dochází k dekarboxylaci pyruvátu na acetyl-CoA, který je následně redukován na jeden z hlavních konečných metabolitů, etanol. Stejně jako v případě *G. intestinalis* je tato reakce katalyzovaná alkohol dehydrogenázou E s acetaldehyd dehydrogenázovou a alkohol dehydrogenázovou aktivitou (obr. 6, reakce 25). Rovněž *E. histolytica* využívá tentýž zdroj elektronů, NADH, vznikající při reakci katalyzované glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázou (Coombs a Müller 1995; Pineda et al. 2015). Dalším možným konečným produktem odbourání acetyl-CoA je acetát, k jehož tvorbě dochází hlavně za aerobních podmínek. *E. histolytica* využívá dva možné mechanismy. Prvním způsobem je použití již zmíněného enzymu acetyl-CoA syntetázy (ADP formující) (obr. 6, reakce 30). V průběhu této reakce vzniká jednak acetát a jednak také dochází k syntéze ATP, podobně jako tomu je u *G. intestinalis*. Druhou možností, která ale doposud nebyla dostatečně prozkoumána, je použití enzymu acetát kinázy (PPi-dependentní) popsané níže (Pineda et al. 2015).

### 2.2.3.3 Acetát kináza (PPi-dependentní)

Acetát kinázu (PPi-dependentní) řadíme do rodiny enzymů acetát kináz, katalyzující konverzi acetyl fosfátu na acetát. *E. histolytica* představuje jediného dosud známého eukaryotického zástupce, u kterého najdeme tento PPi-dependentní enzym. Standardní reakce vzniku acetátu, katalyzovaná klasickou acetát kinázou, probíhá ve dvou krocích. Při prvním dochází působením enzymu fosfotransacetyláza ke vzniku acetyl-fosfátu. Až následný druhý krok je katalyzován acetát kinázou, z acetyl-fosfátu je přenesena fosfátová skupina na ADP a vzniká konečný produkt acetát spolu s ATP (Tielens et al. 2010). Tento průběh reakce využívá například *Escherichia coli*. V případě PPi-dependentní acetát kinázy slouží jako fosforylový donor Pi. Jedná se o jediný známý enzym z této rodiny, který využívá jako donor Pi a v případě

*E. histolytica* jej řadíme mezi čtyři pyrofosfát dependentní enzymy nacházející se v glykolytické dráze a souvisejících reakcích (Mertens 1993). Jelikož ke správné činnosti PPI-dependentní acetát kinázy je potřeba acetyl-fosfát, musí být *E. histolytica* schopna ho syntetizovat. K tomu slouží spřažené enzymy, jako je například právě fosfotransacetyláza, využívající acetyl-CoA. Nicméně gen kódující tento enzym v genomu *E. histolytica* nenajdeme a je stále předmětem výzkumů, jaký jiný enzym by mohl být zodpovědný za syntézu potřebného acetyl-fosfátu (Ingram-Smith et al. 2006). V nedávné studii byla jako možný spřažený enzym označena glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, která se za normálních okolností při glykolýze podílí na vzniku 1,3-bisfosfoglycerátu, bylo ale zjištěno, že může katalyzovat také přeměnu acetaldehydu na acetyl-fosfát (Dang et al. 2022). Tímto způsobem vzniklý acetyl-fosfát se v případě *E. histolytica* syntetizuje výhradně v přítomnosti PPI-dependentní acetát kinázy a je tedy možné, že tímto způsobem dochází u *E. histolytica* k jeho vzniku. Během reakce dochází k redukci  $\text{NAD}^+$  na NADH, a proto má tento způsob vzniku acetátu důležitou roli při vyrovnávání poměru mezi  $\text{NAD}^+$ /NADH, které jsou potřebné k průběhu glykolytické reakce (Dang et al. 2022). Použitím PPI-dependentní acetát kinázy dochází také ke vzniku PPI, který je následně využit jako substrát pro glykolytické reakce katalyzované PPI-PFK a PPK (Fowler et al. 2012).

Jako energetický výtěžek PPI- dependentní glykolýzy se uvádí pět molekul ATP na molekulu glukózy (Mertens 1993). Nicméně je třeba zohlednit reakce, které vedou k tvorbě PPI představujícího substrát pro PPI-PFK a PPK. K tomu, aby mohla PPI-dependentní glykolýza probíhat, musí být v buňce dostatečné množství PPI. *E. histolytica* proto využívá další reakce, při kterých dochází k tvorbě PPI. Jako varianta se jeví již zmíněná tvorba oxalacetátu katalyzovaná enzymem fosfoenolpyruvát karboxytransfosforyláza nebo produkce acetátu pomocí PPI-dependentní acetát kinázy. Avšak obě tyto reakce nezajišťují dostatečné množství potřebného PPI, a tak *E. histolytica* musí využívat ještě další mechanismy k doplnění zásoby PPI. Hlavní zdroj PPI představuje především proteosyntéza a syntéza nukleových kyselin, které však nemusí dostatečně pokrýt poptávku buňky. Z toho důvodu je také využíván metabolismus glykogenu, při kterém se ale spotřebovává ATP na úkor produkce PPI. Při metabolismu glykogenu dochází k cyklování mezi jeho syntézou, katalyzovanou glykogen syntázou a UDP-glukóza pyrofosforylázou, a degradací, katalyzovanou glykogen fosforylázou. Při reakci katalyzované UDP-glukóza pyrofosforylázou dochází k tvorbě PPI. Na jednu vytvořenou molekulu PPI připadá jedna spotřebovaná molekula ATP, k průběhu glykolytické dráhy jsou potřeba 3 molekuly PPI, a proto celkový energetický výtěžek glykolýzy není uváděných pět molekul, ale dvě až tři (Saavedra et al. 2019).

Při souhrnném zaměření na glykolytickou dráhu *E. histolytica* vidíme, že představuje hlavní dráhu energetického metabolismu využívanou k získávání ATP, jelikož v buňce tohoto parazitického prvoka nenalezneme standardní mitochondrii a s ní spojený Krebsův cyklus a oxidativní fosforylaci využívanou k syntéze ATP u klasické eukaryotické buňky. Průběh glykolýzy se z velké části shoduje s jejím průběhem u prvoka *G. intestinalis*. Liší se až v následné degradační dráze PEP, při které jsou použity pro *E. histolytica* specifické enzymy, například fosfoenolpyruvát karboxytransfosforyláza. Při degradaci acetyl-CoA je zapojen unikátní enzym, PPI-dependentní acetát kináza, který v klasické eukaryotické buňce

nenalezneme. Pozoruhodným enzymem je také NADPH-dependentní oxidoreduktáza, která je v buňce využívána při některých redoxních reakcích, například při redukci  $\text{NADP}^+$  na NADPH, kdy zdrojem elektronů je redukováná forma ferredoxinu. Touto redukcí *E. histolytica* také přispívá k udržení redoxní rovnováhy v buňce. Jako hlavní metabolické produkty jsou vytvářeny etanol a acetylát.

#### 2.2.4 Trypanosomy

V poslední části se budu věnovat trypanosomám. *Trypanosoma* je rod parazitických prvoků, do kterého patří zástupci *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. cruzi* a další druhy trypanosom (Maxfield a Bermudez 2024). V rámci fylogenetického systému eukaryot řadíme trypanosomy mezi Euglenozoa ze skupiny Discoba z původní superskupiny Excavata (Burki et al. 2020). Jedná se o prvoky způsobující onemocnění trypanosomiázu, jednak africkou trypanosomiázu neboli spavou nemoc, jejímž původcem způsobujícím toto onemocnění, je *T. rhodesiense* a *T. gambiense*, přenašečem je moucha rodu *Glossina*, a jednak americkou trypanosomiázu neboli Chagasovu chorobu, jejímž původcem je *T. cruzi*, která je přenášena krev sajícími plošticemi rodu *Triatoma*, *Rhodnius* (Volf a Horák 2007). Obě onemocnění nalezneme především v málo rozvinutých zemích Afriky a Jižní a Střední Ameriky. Udává se, že spavou nemocí onemocní tisíce obyvatel, především chudé části Afriky, na rozdíl od Chagasovy choroby, se kterou se potýkají milióny lidí především z chudých oblastí Ameriky (Maxfield a Bermudez 2024). Mezi typické příznaky spavé nemoci patří horečka, bolest kloubů a bolest hlavy. V pozdější fázi onemocnění je postižena centrální nervová soustava a pacienti mají neuropsychické symptomy či poruchy spánku. Jak na spavou nemoc, tak i na akutní fázi Chagasovy choroby existují v dnešní době účinné léky. Pokud jde ale o léčbu chronické fáze Chagasovy choroby, tak stále neexistuje stoprocentní léčba (Maxfield a Bermudez 2024). V životním cyklu trypanosom se střídá několik stadií. Na počátku životního cyklu *T. brucei*, jejíž glykolýza a s ní související reakce je popsána níže, je epimastigot nacházející se ve slinných žlázách vektora, ten se v hostiteli mění v metacyklickou formu, následuje forma „long slender“ a „short stumpy“ v krevním řečišti hostitele. Poté co jsou „short stumpy“ formy vektorem znovu nasáty, tak se ve střevě mění na procyklickou formu, která se následně transformuje na epimastogoty (Romero-Meza a Mugnier 2020).

Trypanosomy se svou buněčnou stavbou podobají klasické eukaryotické buňce s tím rozdílem, že se v buňce trypanosom vykytuje pouze jediná mitochondrie a pro trypanosomy specifická organela glykosom, popsány níže. Unikátní strukturou je kinetoplast, nacházející se v jedné části mitochondrie a který obsahuje uspořádané kruhové DNA molekuly, jejichž součástí jsou minikroužky a maxikroužky vytvářející síť. Tyto maxikroužky kódují geny mitochondriálních proteinů, jako jsou například proteiny respiračního řetězce. Naopak minikroužky kódují guide RNA, které se podílejí na editingu mRNA molekul (van Hellemond et al. 2005a; Szöör et al. 2014). Glykosom i mitochondrie jsou detailněji popsány v následující části společně s jejich přínosem pro energetický metabolismus trypanosom.

### 2.2.4.1 Glykosom

Glykosom je buněčná organela spadající do rodiny peroxisomů, ze kterého se během evoluce vyvinul. Najdeme ho u všech zástupců kinetoplastid, vyskytuje se jak u trypanosom, tak i u leishmanií a v jedné jejich buňce mohou být až stovky glykosomů (Hannaert a Michels 1994). Samotný název je odvozen od glykolýzy, jelikož se zde velká část této metabolické dráhy odehrává. V případě krevních forem *T. brucei* se uvádí, že až devadesát procent všech glykosomálních enzymů patří především proteinům glykolytických enzymů. Glykosom může plnit rozmanité funkce závislé na životním cyklu trypanosom a prostředí, ve kterém se nacházejí, a tak v něm můžeme nalézt enzymy pro glykolytické reakce, syntézu pyrimidinů, biosyntézu ether-lipidů a nejspíše hrají roli i v beta-oxidaci mastných kyselin (Michels et al. 2006). Důvodem, proč u trypanosom v průběhu evoluce došlo ke kompartmentalizaci glykolytické dráhy do glykosomu, je ten, že se podílí na regulaci aktivity glykolytických enzymů HK a PFK. V modelové glykolytické dráze je aktivita těchto enzymů inhibována jejich produkty, například glukóza-6-fosfát inhibuje aktivitu HK, avšak u trypanosomální HK k této regulaci nedochází, a tak musí být glykosomální HK a PFK regulovány jiným způsobem. V případě, že by k žádné regulaci nedocházelo, pak by v glykolýze produkované ATP autokatalyticky pohánělo její počáteční reakce a tím by docházelo k produkování glykolytických meziproductů (jako jsou glukóza-6-fosfát, fruktóza-6-fosfát, fruktóza-1,6-bisfosfát) nad kapacitu, kterou jsou ostatní glykolytické enzymy schopny přeměnit. Tyto meziproducty by se začaly v buňce hromadit, což by způsobilo některé patologické jevy v buňce. Při regulaci má velký význam poměr mezi ATP a ADP v glykosomu, který je kvůli kompartmentalizaci odlišný oproti poměru ATP a ADP v cytosolu. K tvorbě ATP v glykosomu dochází při reakcích katalyzovaných fosfoglycerát kinázou a glycerol kinázou a naopak je ATP využíváno v reakcích katalyzovaných HK a PFK. Aktivita HK a PFK je inhibována klesajícím poměrem mezi ATP a ADP v glykosomu a tímto způsobem je zabráněno hromadění glykolytických meziproductů. Další výhodou, kterou představuje přítomnost glykosomu v buňce, je při případném znovunastartování glykolýzy poté, co se buňka nacházela v krátkém období nedostatku glukózy. Glykosom, především fosforylované metabolity, zajišťuje dostatečné množství ATP potřebného k iniciování prvního kroku glykolýzy při jejím opětovném rozběhnutí (Bakker et al. 2000; Haanstra et al. 2008).

### 2.2.4.2 Mitochondrie

Organelou, kterou u předchozích zástupců nalezneme pouze v evolučně odvozené formě, je mitochondrie. Nejedná se však o klasickou mitochondrii, kterou nalezneme v modelové eukaryotické buňce, ale jde o zvláštní druh aerobní mitochondrie, která sice jako terminální akceptor elektronů využívá kyslík, nicméně do buňky vstupující glukóza není degradována až na oxid uhličitý, jako tomu je v případě klasické aerobní mitochondrie, ale výsledkem rozkladu glukózy je v případě krevní formy *T. brucei* pyruvát, v případě procyklické formy především acetát a sukcinát. Další odlišností od klasické aerobní mitochondrie je, že k syntéze ATP dochází také v rámci substrátové fosforylace, a hlavním zapojeným enzymem je acetát:sukcinát CoA-transferáza. V neposlední řadě se v případě krevních forem trypanosom mitochondrie

zapouje taktéž do reoxidace glykolytického NADH. Tento proces je podrobněji popsán níže (Tielens et al. 2002; van Hellemond et al. 2005b).

V další části se zaměřím na glykolytickou dráhu u trypanosom. Konkrétně se budu věnovat této metabolické dráze u parazitického prvoka *T. brucei*, který v průběhu životního cyklu střídá více stádií. Detailněji se budu zabývat long slender formou v krevním řečišti hostitele, pro kterou je glykolytická dráha a s ní spojená substrátová fosforylace při získávání energie esenciální.

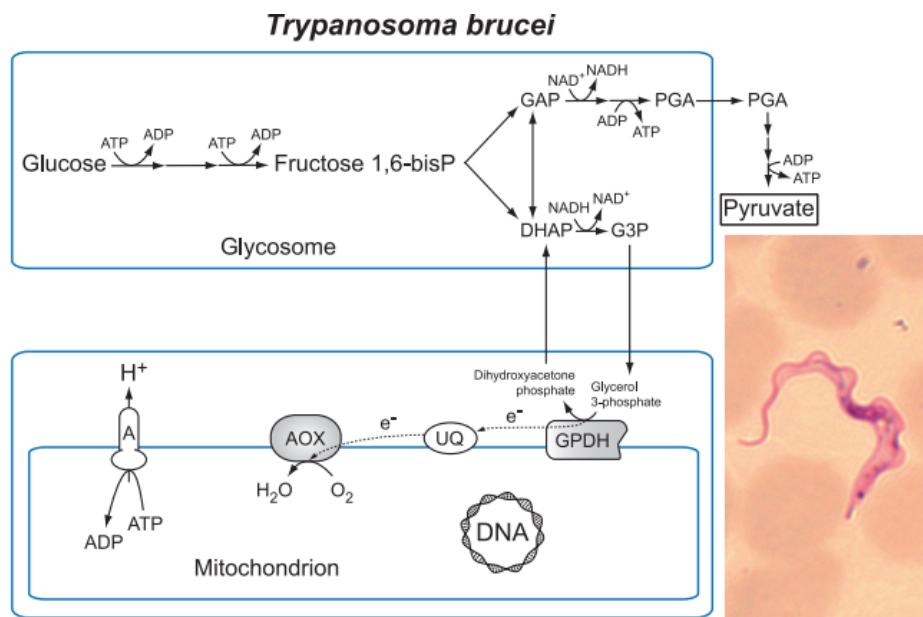
### **2.2.4.3 Glykolýza long slender formy v krevním řečišti**

Long slender forma trypanosomy se vyskytuje v krevním řečišti hostitele, obsahujícím velké množství glukózy, z toho důvodu glykolýza představuje hlavní zdroj energie. Glykolytická dráha long slender formy je zobrazena na obr. 8. Jak již bylo zmíněno výše většina kroků se odehrává v glykosomu. Pouze poslední část, zahrnující přeměnu 3-fosfoglycerátu a vznik pyruvátu, se odehrává v cytosolu. Rozklad glukózy probíhá klasickou Embden-Meyerhovou dráhou. Glukóza je působením enzymu hexokináza přeměněna na glukóza-6-fosfát. Následují dvě možnosti degradace, buď glukóza-6-fosfát vstupuje do pentózo-fosfátového cyklu nebo je dále přeměněn na fruktóza-6-fosfát za katalýzy glukóza-6-fosfát izomerázy. Posledním krokem glykolýzy v glykosomu je přeměna 1,3-bisfosfoglycerátu na 3-fosfoglycerát, katalyzovaná fosfoglycerát kinázou. Následně se průběh glykolýzy přesouvá do cytosolu, kam je 3-fosfoglycerát transportován. Zde probíhá jeho přeměna podle standardního schématu glykolýzy. Vzniká 2-fosfoglycerát, jehož dehydratací se vytváří fosfoenolpyruvát. Při posledním glykolytickém kroku dochází k produkci ATP a pyruvátu, který je následně vylučován z buňky do krevního řečiště hostitele jako metabolický produkt a oproti klasické eukaryotické buňce či již zmíněným parazitickým prvokům, neprobíhá jeho následná degradace (van Hellemond et al. 2005b; Michels et al. 2006).

U long slender formy se evolučně zachovaná mitochondrie podílí na vytváření redoxní rovnováhy v glykosomu. NADH, vznikající při reakci katalyzované glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázou, se reoxiduje přes systém reakcí spojených s NADH-dependentní glycerol-3-fosfát dehydrogenázou, nacházející se v membráně glykosomu a katalyzující přeměnu dihydroxyacetonfosfátu na glycerol-3-fosfát. Zároveň glycerol-3-fosfát dehydrogenáza funguje jako glycerolfosfátový shuttle vyměňující glycerol-3-fosfát, vznikající v glykosomu, za dihydroxyacetonfosfát, vytvářený v mitochondrii. Při zachování redoxní rovnováhy v glykosomu je nepostradatelná glycerol-3-fosfát oxidáza (GPO), která je součástí mitochondrie. Skládá se z více komponentů, prvním z nich je mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, dále ubichinon a koncová alternativní oxidáza (AOX). V glykosomu vznikající glycerol-3-fosfát je přemístěn pomocí glycerolfosfátového shuttle do mitochondrie, kde je přeměněn mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázou na DHAP. Elektrony uvolněné při mitochondriálním vzniku DHAP jsou transportovány přes jednotlivé komponenty GPO až na konečný akceptor kyslík (Michels et al. 2006; Chaudhuri et al. 2006). V případě aerobních podmínek představuje kyslík finální akceptor uvolněných elektronů, které jsou na AOX přenášeny z ubichinonu. Kyslík je nakonec pomocí AOX redukován na vodu. Při přenosu elektronů přes AOX nedochází k translokaci protonů a s tím spojené syntéze ATP, jako tomu je

v případě cytochrom oxidázy v klasické eukaryotické buňce. Na vytváření membránového potenciálu mitochondrie se podílí  $F_0-F_1$ -ATPáza, která pumpuje protony do intermembránového prostoru na úkor hydrolyzy molekuly ATP. Membránový potenciál představuje hnací sílu pro transport některých iontů, metabolitů a proteinů přes mitochondriální vnitřní membránu (Nolan a Voorheis 1992; Chaudhuri et al. 2006).

K rozkladu glukózy může docházet taktéž za anaerobních podmínek. Glykolytická dráha má shodný průběh jako za podmínek aerobních a stejně tak vzniká i pyruvát představující hlavní metabolit. Jako druhý glykolytický produkt tvoří long slender forma *T. brucei* glycerol. Katalýzou glycerol-3-fosfát dehydrogenázy se z dihydroxyacetonfosfátu vytváří glycerol-3-fosfát, který následně podléhá další reakci katalyzované enzymem glycerol kinázou za vzniku glycerolu. Glycerol je transportován ven z glykosomu a následně vylučován mimo buňku. V případě anaerobního prostředí nedochází k reoxidaci glykolytického NADH, vznikajícího při reakci katalyzované glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázou, přes GPO v mitochondrii, ale děje se tak použitím glycerol-3-fosfát dehydrogenázy při redukce DHAP na glycerol-3-fosfát (Michels et al. 2006).

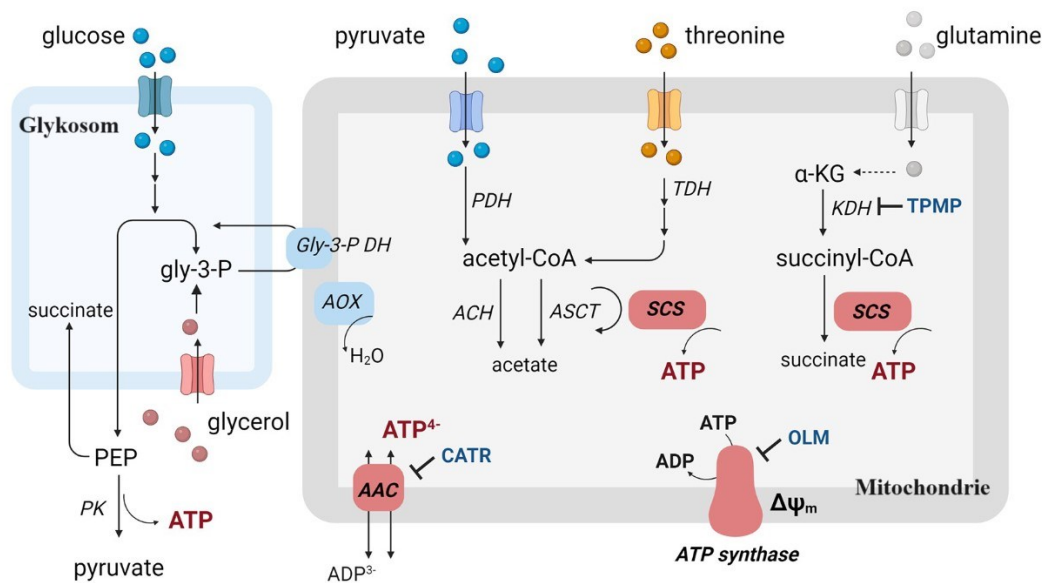


**Obr. 8 Schéma glykolytické dráhy u long slender formy *T. brucei***

Legenda: GAP, glycerinaldehyd-3-fosfát; PGA, 3-fosfoglycerát; DHAP, dihydroxyaceton fosfát; G3P, glycerol-3-fosfát; GPDH, glycerol-3-fosfát dehydrogenáza; AOX, alternativní oxidáza; UQ, ubichinon; A, ATPáza (Müller et al. 2012)

Stejně jako tomu bylo u již zmíněných parazitických prvků, dochází u long slender formy k syntéze ATP v průběhu glykolytické dráhy při procesech substrátové fosforylace. Jednak při vzniku 3-fosfoglycerátu z 1,3-bisfosfoglycerátu katalyzovaného fosfoglycerát kinázou a jednak při přeměně fosfoenolpyruvátu na pyruvát, pyruvát kinázou. Další možnost syntézy ATP probíhá za anaerobních podmínek, kdy dochází k prodloužení dráhy o vznik glycerolu

katalyzovaný glycerol kinázou (van Hellemond et al. 2005b). Takto je ATP syntetizováno v glykosomu a cytosolu, avšak bylo zjištěno, že k jeho syntéze dochází nečekaně také v mitochondrii. Nikoli v procesu oxidativní fosforylace jako v případě klasické eukaryotické buňky, ale při některých reakcích substrátové fosforylace, znázorněných na obr. 9. Děje se tak při degradaci pyruvátu a aminokyseliny threonin, které jsou transportovány do mitochondrie, kde jsou dále degradovány pomocí pyruvát dehydrogenázy, respektive threonin dehydrogenázy až na acetyl-CoA, který je následně konvertován na acetát pomocí acetyl-CoA thioesterázy či acetát:sukcinát-CoA transferázy. Činnost této transferázy probíhá ve spojení se sukcinyl-CoA syntetázou, která se podílí na produkci ATP. Do mitochondrie může být transportována také aminokyselina glutamin, která je následně přeměněna na alfa-ketoglutarát, který je degradován na sukcinyl-CoA představující substrát pro již zmíněnou sukcinyl-CoA syntetázu katalyzující vznik sukcinátu spojený se syntézou ATP. Molekuly ATP vznikající při těchto reakcích představuje důležitý substrát pro  $F_0F_1$ -ATPázu, která, jak již bylo řečeno, hydrolýzou ATP zajišťuje polarizaci membrány a s ní spojené další mechanismy. Další alternativu jak zjistit dostatečné množství ATP v mitochondrii představuje ATP/ADP přenašeč, který transportuje cytosolické ATP vznikající při glykolýze (Taleva et al. 2023).



**Obr. 9 Schéma možných substrátových fosforylací u long slender formy *T. brucei***

Legenda: gly-3-P, glycerol-3-fosfát; PEP, fosfoenolpyruvát; AAC, ATP/ADP přenašeč; ACH, acetyl-CoA thioesteráza; ASCT, acetát:sukcinát-CoA transferáza; AOX, koncová alternativní oxidáza; Gly-3-P-DH, glycerol-3-fosfát dehydrogenáza; KDH, alfa-ketoglutarát dehydrogenáza; PK, pyruvát kináza; SCS, sukcinyl-CoA syntetáza (Upraveno dle Taleva et al. 2023)

V souhrnu jsou trypanosomy parazitičtí prvoci vyznačující se střídáním stádií v životním cyklu. Dochází tak u nich ke změnám nejen morfologickým, ale i metabolickým. Od již zmíněných parazitických prvků se trypanosomy odlišují tím, že glykolytická dráha probíhá z velké části v evolučně odvozené organelle, glykosomu. Zároveň dochází k využití mitochondrie při reoxidaci glykolytických kofaktorů, konkrétně k využití glycerol-3-fosfát oxidázy. U long slender formy představuje glykolýza podstatnou dráhu při získávání energie, musí se spoléhat na reakce substrátové fosforylace, jelikož v mitochondrii neprobíhá oxidativní fosforylace. Zajímavým aspektem jsou reakce substrátové fosforylace probíhající také v mitochondrii, při kterých je mimo jiné zapojena sukcinyl-CoA-syntetáza. Long slender forma produkuje jako konečný metabolit pyruvát, který je následně vylučován mimo buňku.

### 3 Závěr

Glykolytická dráha představuje klíčovou metabolickou dráhu téměř ve všech živých buňkách a jinak tomu není ani v případě parazitických prvoků *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosomy brucei*. V průběhu glykolýzy dochází k reakcím generujícím vznik univerzálně použitelné sloučeniny, ATP, která je následně buňkou dále využívána. Dalšími reakcemi konzervujícími energii v buňce, jsou reakce prodloužené glykolýzy a s nimi související substrátová fosforylace. Klasická glykolytická dráha běží podle Embden-Meyerhofovy dráhy, avšak u výše zmíněných parazitických prvoků nalezneme specifické odchylky od této dráhy. Ať už se jedná o reakce katalyzované unikátními enzymy, využívání odlišných substrátů či rozvětvení standardní dráhy produkující rozdílné koncové metabolity.

Pro již zmíněné parazitické prvoky představuje substrátová fosforylace při konzervaci energie nepostradatelný biochemický děj. Při získávání energie se nemohou spolehnout na proces oxidativní fosforylace, jelikož se nacházejí převážně v anaerobním prostředí a z tohoto důvodu u nich došlo k redukci typických mitochondriálních metabolických procesů, jako jsou Krebsův cyklus a respirační řetězec. Při adaptaci na okolní prostředí u nich došlo jednak ke vzniku různých evolučně odvozených buněčných organel, jako jsou hydrogenosomy, mitosomy a glykosomy a jednak k redukci počtu a funkce mitochondrií, která se v případě trypanosom nachází v buňce pouze jedna.

Přesné znalosti energetického metabolismu, spojeného s glykolýzou a substrátovou fosforylací u zmíněných parazitických prvoků, jsou podstatné k identifikaci možných terapeutických cílů a pro vývoj nových účinných léčiv, blokujících specifické enzymy. U všech zmíněných parazitických prvoků se jedná o původce, jak závažných, život ohrožující onemocnění, tak i méně vážných onemocnění člověka, které postihují celosvětově velkou část populace.

## 4 Použitá literatura

AGUILERA, Penelope, Tara BARRY a Jorge TOVAR, 2008. *Entamoeba histolytica* mitochondria: Organelles in search of a function. *Experimental Parasitology* [online]. **118**(1), 10–16. ISSN 0014-4894. Dostupné z: doi:10.1016/j.exppara.2007.08.004

AQUINO, Marina Ferrari Klemm de, Annabel Sabine HINDERFELD a Augusto SIMOES-BARBOSA, 2020. *Trichomonas vaginalis*. *Trends in Parasitology* [online]. **36**(7), 646–647. ISSN 1471-4922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2020.01.010

BAKKER, Barbara M., Femke I. C. MENSONIDES, Bas TEUSINK, Pim VAN HOEK, Paul A. M. MICHELS a Hans V. WESTERHOFF, 2000. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **97**(5), 2087–2092. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.030539197

BEGUM, Sharmin, Hayley GORMAN, Attinder CHADHA a Kris CHADEE, 2021. *Entamoeba histolytica*. *Trends in Parasitology* [online]. **37**(7), 676–677. ISSN 1471-4922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2021.01.001

BROWN, D.M., J.A. UPCROFT, M.R. EDWARDS a P. UPCROFT, 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *International Journal for Parasitology* [online]. **28**(1), 149–164. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-7519(97)00172-0

BRUCHHAUS, Iris a Egbert TANNICH, 1993. Primary structure of the pyruvate phosphate dikinase in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **62**(1), 153–156. ISSN 0166-6851. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6851(93)90193-2

BURKI, Fabien, Andrew J. ROGER, Matthew W. BROWN a Alastair G.B. SIMPSON, 2020. The new tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. **35**(1), 43–55. ISSN 01695347. Dostupné z: doi:10.1016/j.tree.2019.08.008

CARVALHO-DE-ARAÚJO, Ayra Diandra, Luiz Fernando CARVALHO-KELLY a José Roberto MEYER-FERNANDES, 2023. Anaerobic energy metabolism in human microaerophile parasites. *Experimental Parasitology* [online]. **247**, 108492. ISSN 0014-4894. Dostupné z: doi:10.1016/j.exppara.2023.108492

COOMBS, Graham H. a Miklós MÜLLER, 1995. Energy metabolism in anaerobic protozoa. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites* [online]. B.m.: Elsevier, s. 33–47 [vid. 2024-02-13]. ISBN 978-0-12-473345-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012473345-9/50004-0

DANG, Thanh, Matthew ANGEL, Jin CHO, Diana NGUYEN a Cheryl INGRAM-SMITH, 2022. The role of acetate kinase in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitologia (Basel, Switzerland)* [online]. **2**(2), 147–159. ISSN 2673-6772. Dostupné z: doi:10.3390/parasitologia2020014

DICK, Claudia F., André L. A. DOS-SANTOS a José R. MEYER-FERNANDES, 2014. Inorganic phosphate uptake in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. **1840**(7), 2123–2127. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.014

DOLEŽAL, Pavel, Štěpánka VAŇÁČOVÁ, Jan TACHEZY a Ivan HRDÝ, 2004. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene* [online]. **329**, 81–92. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2003.12.022

DYALL, Sabrina D., Carla M. KOEHLER, Maria G. DELGADILLO-CORREA, Peter J. BRADLEY, Evelyn PLÜMPER, Danielle LEUENBERGER, Christoph W. TURCK a Patricia J. JOHNSON, 2000. Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: Conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*. **20**(7), 2488–2497. ISSN 0270-7306.

EVANS, H J a H G WOOD, 1968. The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **61**(4), 1448–1453. ISSN 0027-8424.

FOWLER, Matthew L., Cheryl INGRAM-SMITH a Kerry S. SMITH, 2012. Novel pyrophosphate-forming acetate kinase from the protist *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell* [online]. **11**(10), 1249–1256. ISSN 1535-9778, 1535-9786. Dostupné z: doi:10.1128/EC.00169-12

HAANSTRA, Jurgen R., Arjen VAN TUIJL, Peter KESSLER, Willem REIJNDERS, Paul A. M. MICHELS, Hans V. WESTERHOFF, Marilyn PARSONS a Barbara M. BAKKER, 2008. Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(46), 17718–17723. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0806664105

HACKSTEIN, Johannes H. P., Anna AKHMANOVA, Frank VONCKEN, Angela VAN HOEK, Theo VAN ALEN, Brigitte BOXMA, Seung Yeo MOON-VAN DER STAAY, Georg VAN DER STAAY, Jack LEUNISSEN, Martijn HUYNEN, Jörg ROSENBERG a Marten VEENHUIS, 2001. Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments | Presented at the 94th Annual Meeting of the Deutsche Zoologische Gesellschaft in Osnabrück, June 4–8, 2001. *Zoology* [online]. **104**(3), 290–302. ISSN 0944-2006. Dostupné z: doi:10.1078/0944-2006-00035

HANNAERT, V. a P. A. MICHELS, 1994. Structure, function, and biogenesis of glycosomes in *kinetoplastida*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* [online]. **26**(2), 205–212. ISSN 0145-479X. Dostupné z: doi:10.1007/BF00763069

HRDY, Ivan, Robert P. HIRT, Pavel DOLEZAL, Lucie BARDONOVÁ, Peter G. FOSTER, Jan TACHEZY a T. MARTIN EMBLEY, 2004. Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* [online]. **432**(7017), 618–622. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature03149

CHAUDHRY, Raheel a Matthew VARACALLO, 2023. Biochemistry, glycolysis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/>

CHAUDHURI, Minu, Robert Daniel OTT a George C. HILL, 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology* [online]. **22**(10), 484–491. ISSN 1471-4922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2006.08.007

INGRAM-SMITH, Cheryl, Stephen R. MARTIN a Kerry S. SMITH, 2006. Acetate kinase: not just a bacterial enzyme. *Trends in Microbiology* [online]. **14**(6), 249–253. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2006.04.001

JEELANI, Ghulam, Afzal HUSAIN, Dan SATO, Vahab ALI, Makoto SUEMATSU, Tomoyoshi SOGA a Tomoyoshi NOZAKI, 2010. Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **285**(35), 26889–26899. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.106310

- JENKINS, Timothy M., Thomas E. GORRELL, Miklós MÜLLER a P. D. J. WEITZMAN, 1991. Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **179**(2), 892–896. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(91)91902-O
- KUMARI, Asha. Glycolysis. In. *Sweet biochemistry : Remembering structures, cycles, and pathways by Mnemonics*, San Diego, Elsevier Science & Technology, 2017, s. 22-27. ISBN. 9780128144541. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?docID=5102185>.
- LEITSCH, David, Catrin F. WILLIAMS, David LLOYD a Michael DUCHÊNE, 2013. Unexpected properties of NADP-dependent secondary alcohol dehydrogenase (ADH-1) in *Trichomonas vaginalis* and other microaerophilic parasites. *Experimental Parasitology* [online]. **134**(3), 374–380. ISSN 0014-4894. Dostupné z: doi:10.1016/j.exppara.2013.03.034
- LINDMARK, Donald G., Barbara L. ECKENRODE, Leslie A. HALBERG a Iveta D. DINBERGS, 1989. Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*<sup>1</sup>. *The Journal of Protozoology* [online]. **36**(2), 214–216. ISSN 00223921. Dostupné z: doi:10.1111/j.1550-7408.1989.tb01076.x
- LINDMARK, Donald G. a Miklós MÜLLER, 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **248**(22), 7724–7728. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)43249-3
- LLOYD, David, James R. RALPHS a Janine C. HARRIS, 2002. *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology (Reading, England)* [online]. **148**(Pt 3), 727–733. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-148-3-727
- LOCHMÜLLER, Hans, Harland G. WOOD a Judith J. DAVIS, 1966. Phosphoenolpyruvate carboxytransphosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **241**(23), 5678–5691. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)96398-2
- MAXFIELD, Luke a Rene BERMUDEZ, 2024. Human african trypanosomiasis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2024-04-23]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535413/>
- MERTENS, E., 1991. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS letters* [online]. **285**(1), 1–5. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(91)80711-b
- MERTENS, E., 1993. ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitology Today* [online]. **9**(4), 122–126. ISSN 0169-4758. Dostupné z: doi:10.1016/0169-4758(93)90169-G
- MICHELS, Paul A. M., Frédéric BRINGAUD, Murielle HERMAN a Véronique HANNAERT, 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1763**(12), Peroxisomes: morphology, function, biogenesis and disorders, 1463–1477. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.019
- MI-ICHI, Fumika, Takashi MAKIUCHI, Atsushi FURUKAWA, Dan SATO a Tomoyoshi NOZAKI, 2011. Sulfate activation in mitosomes plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [online]. **5**(8), e1263. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0001263

- MI-ICHI, Fumika, Mohammad Abu YOUSUF, Kumiko NAKADA-TSUKUI a Tomoyoshi NOZAKI, 2009. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **106**(51), 21731–21736. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0907106106
- MORADA, Mary, Mafruha MANZUR, Brian LAM, Cho TAN, Jan TACHEZY, Paola RAPPELLI, Daniele DESSI, Pier L. FIORI a Nigel YARLETT, 2010. Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology* [online]. **156**(Pt 12), 3734–3743. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.042192-0
- MÜLLER, M., 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology* [online]. **42**(1), 465–488. ISSN 0066-4227, 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.mi.42.100188.002341
- MÜLLER, Miklós, 2003. Chapter 7 - Energy metabolism: Part I: Anaerobic protozoa. In: J. Joseph MARR, Timothy W. NILSEN a Richard W. KOMUNIECKI, ed. *Molecular Medical Parasitology* [online]. London: Academic Press, s. 125–139 [vid. 2024-02-12]. ISBN 978-0-12-473346-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012473346-6/50008-9
- MÜLLER, Miklós, Marek MENDEL, Jaap J. VAN HELLEMOND, Katrin HENZE, Christian WOEHLER, Sven B. GOULD, Re-Young YU, Mark VAN DER GIEZEN, Aloysius G. M. TIELENS a William F. MARTIN, 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* [online]. **76**(2), 444–495. ISSN 1098-5557. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.05024-11
- NELSON, David L., Michael M. COX, Aaron A. HOSKINS a Albert L. LEHNINGER, 2021. Lehninger principles of biochemistry. Eighth edition. New York, NY: Macmillan International, Higher Education. ISBN 978-1-319-38149-3.
- NOLAN, Derek P. a H. Paul VOORHEIS, 1992. The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. *European Journal of Biochemistry* [online]. **209**(1), 207–216. ISSN 0014-2956, 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17278.x
- PAGET, T. A., M. L. KELLY, E. L. JARROLL, D. G. LINDMARK a D. LLOYD, 1993. The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **57**(1), 65–71. ISSN 0166-6851. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6851(93)90244-r
- PARK, Jeong-Hyun, Philip J. SCHOFIELD a Michael R. EDWARDS, 1997. Pyruvate kinase is present in *Giardia intestinalis*. *Experimental Parasitology* [online]. **87**(2), 153–156. ISSN 00144894. Dostupné z: doi:10.1006/expr.1997.4206
- PINEDA, Erika, Rusely ENCALADA, Citlali VÁZQUEZ, Zabdi GONZÁLEZ, Rafael MORENO-SÁNCHEZ a Emma SAAVEDRA, 2015. Glucose metabolism and its controlling mechanisms in *Entamoeba histolytica*. In: Tomoyoshi NOZAKI a Alok BHATTACHARYA, ed. *Amebiasis* [online]. Tokyo: Springer Japan, s. 351–372 [vid. 2023-04-13]. ISBN 978-4-431-55199-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-4-431-55200-0\_20
- REEVES, R E, R A MENZIES a D S HSU, 1968. The Pyruvate-phosphate dikinase reaction. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **243**(20), 5486–5491. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)91972-1
- REEVES, Richard E., 1970. Phosphopyruvate carboxylase from *Entamoeba histolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* [online]. **220**(2), 346–349. ISSN 00052744. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2744(70)90021-5

- REEVES, Richard E., 1985. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. In: J. R. BAKER a R. MULLER, ed. *Advances in Parasitology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 105–142 [vid. 2024-02-14]. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-308X(08)60286-9
- ROBERTSON, Lucy J., Kurt HANEVIK, Angel A. ESCOBEDO, Kristine MØRCH a Nina LANGELAND, 2010. Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology* [online]. **26**(2), 75–82. ISSN 1471-5007. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2009.11.010
- RODNEY, Adam D., 2001. Biology of *Giardia lamblia* [online] [vid. 2023-04-05]. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001
- ROMERO-MEZA, Gabriela a Monica R. MUGNIER, 2020. *Trypanosoma brucei*. *Trends in Parasitology* [online]. **36**(6), 571–572. ISSN 1471-4922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2019.10.007
- SAAVEDRA, Emma, Rusely ENCALADA, Citlali VÁZQUEZ, Alfonso OLIVOS-GARCÍA, Paul A. M. MICHELS a Rafael MORENO-SÁNCHEZ, 2019. Control and regulation of the pyrophosphate-dependent glucose metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **229**, 75–87. ISSN 1872-9428. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbiopara.2019.02.002
- SAAVEDRA-LIRA, Emma, Leticia RAMIREZ-SILVA a Ruy PEREZ-MONTFORT, 1998. Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [online]. **1382**(1), 47–54. ISSN 0167-4838. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4838(97)00139-8
- SÁNCHEZ, Lidya B., 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanism of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **354**(1), 57–64. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1998.0664
- SÁNCHEZ, Lidya B., Michael Y. GALPERIN a Miklós MÜLLER, 2000. Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of Acyl-CoA synthetases (nucleoside diphosphate-forming)\*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(8), 5794–5803. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.275.8.5794
- SÁNCHEZ, Lidya B. a Miklós MÜLLER, 1996. Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *FEBS Letters* [online]. **378**(3), 240–244. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(95)01463-2
- SEARLE, Stephen M. J. a Miklós MÜLLER, 1991. Inorganic pyrophosphatase of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **44**(1), 91–96. ISSN 0166-6851. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6851(91)90224-T
- SCHOFIELD, Philip J., Michael R. EDWARDS, Jacqueline MATTHEWS a Justine R. WILSON, 1992. The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **51**(1), 29–36. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6851(92)90197-R
- SIU, Patrick M. L., Harland G. WOOD a Rune L. STJERNHOLM, 1961. Fixation of CO<sub>2</sub> by phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **236**(4), PC21–PC22. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)64271-1

- SLAMOVITS, Claudio H. a Patrick J. KEELING, 2006. Pyruvate-phosphate dikinase of oxymonads and parabasalia and the evolution of pyrophosphate-dependent glycolysis in anaerobic eukaryotes. *Eukaryotic Cell* [online]. **5**(1), 148–154. Dostupné z: doi:10.1128/EC.5.1.148-154.2006
- SZÖÖR, Balázs, Jurgen R HAANSTRA, Melisa GUALDRÓN-LÓPEZ a Paul AM MICHELS, 2014. Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of *trypanosomatids*. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **22**, Growth and development: eukaryotes/ prokaryotes, 79–87. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2014.09.006
- TACHEZY, J., L. B. SÁNCHEZ a M. MÜLLER, 2001. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **18**(10), 1919–1928. ISSN 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003732
- TALEVA, Gergana, Michaela HUSOVÁ, Brian PANICUCCI, Carolina HIERRO-YAP, Erika PINEDA, Marc BIRAN, Martin MOOS, Petr ŠIMEK, Falk BUTTER, Frédéric BRINGAUD a Alena ZÍKOVÁ, 2023. Mitochondrion of the *Trypanosoma brucei* long slender bloodstream form is capable of ATP production by substrate-level phosphorylation. *PLoS pathogens* [online]. **19**(10), e1011699. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1011699
- TIELENS, Aloysius G. M, Carmen ROTTE, Jaap J VAN HELLEMOND a William MARTIN, 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **27**(11), 564–572. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(02)02193-X
- TIELENS, Aloysius G. M., Koen W. A. VAN GRINSVEN, Katrin HENZE, Jaap J. VAN HELLEMOND a William MARTIN, 2010. Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. *International Journal for Parasitology* [online]. **40**(4), 387–397. ISSN 0020-7519. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpara.2009.12.006
- TOVAR, Jorge, Anke FISCHER a C. Graham CLARK, 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* [online]. **32**(5), 1013–1021. ISSN 0950-382X, 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01414.x
- TOVAR, Jorge, Gloria LEÓN-AVILA, Lidya B. SÁNCHEZ, Robert SUTAK, Jan TACHEZY, Mark VAN DER GIEZEN, Manuel HERNÁNDEZ, Miklós MÜLLER a John M. LUCOCQ, 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* [online]. **426**(6963), 172–176. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature01945
- VAN GRINSVEN, Koen W.A., Silke ROSNOWSKY, Susanne W.H. VAN WEELDEN, Simone PÜTZ, Mark VAN DER GIEZEN, William MARTIN, Jaap J. VAN HELLEMOND, Aloysius G.M. TIELENS a Katrin HENZE, 2008. Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(3), 1411–1418. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M702528200
- VAN HELLEMOND, J. J., F. R. OPPERDOES a A. G. M. TIELENS, 2005a. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions* [online]. **33**(Pt 5), 967–971. ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/BST20050967
- VAN HELLEMOND, Jaap J., Barbara M. BAKKER a Aloysius G. M. TIELENS, 2005b. Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*. In: Robert K. POOLE,

ed. *Advances in Microbial Physiology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 199–226 [vid. 2023-04-19]. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2911(05)50005-5

VOLF, Petr a Petr HORÁK, 2007. Paraziti a jejich biologie. Vyd. 1. Praha: TRITON. ISBN 978-80-7387-008-9.

YANG, Xuke, Xiaoyan YIN, Jiaojiao LIU, Zhipeng NIU, Jichao YANG a Bang SHEN, 2022. Essential role of pyrophosphate homeostasis mediated by the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens* [online]. **18**(2), e1010293. ISSN 1553-7366. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1010293

YARLETT, N., M. P. MARTINEZ, M. A. MOHARRAMI a J. TACHEZY, 1996. The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. **78**(1–2), 117–125. ISSN 0166-6851. Dostupné z: doi:10.1016/s0166-6851(96)02616-3

ZULFIQAR, Hassam, George MATHEW a Shawn HORRALL, 2024. Amebiasis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2024-02-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519535/>