

Abstrakt

Améby rodu *Acanthamoeba* jsou celosvětově rozšířená, volně žijící, fakultativně patogenní jednobuněčná eukaryota. Jejich nebezpečnost pro člověka spočívá ve schopnosti pronikat do organismu, odolat obranným mechanismům, množit se, poškozovat napadené tkáně a tím vyvolat onemocnění, proti kterým chybí kauzální léčba a která nejčastěji postihují oko a centrální nervovou soustavu (CNS). Jedním z hlavních důvodů často neúspěšné terapie je schopnost akantaméb vytvářet v postižených tkáních cysty, vysoce rezistentní klidová stádia. Kromě cyst, které akantaméby tvoří jak v přírodě, tak v infikovaných tkáních pod vlivem dlouhodobého stresu, se tyto organismy vlivem akutního ohrožení rychle transformují v méně odolná klidová stádia, pseudocysty. Předkládaná práce se zaměřuje na dosud neznámé aspekty odolnosti obou rezistentních stádií akantaméb, cyst a pseudocyst, a současně si klade za cíl popsat další charakteristiky odlišující cysty a pseudocysty a procesy spojené s jejich tvorbou a rezistencí.

Jedním ze studovaných aspektů odolnosti klidových stádií akantaméb byla přítomnost cukerného alkoholu manitolu a neredukujícího cukru trehalózy, sacharidů, které se v buňkách mnoha organismů účastní obranných reakcí vůči abiotickému stresu. Ačkoli v genomu *A. castellanii* jsou enzymy pro syntézu obou cukrů popsány, v buňkách akantaméb jsme prokázali pouze přítomnost disacharidu trehalózy a to jak v klidových stádiích, cystách a pseudocystách, tak v aktivně se množících trofozoitech. Manitol se nám nepodařilo prokázat u žádné ze studovaných životních forem. Podrobnější analýza sekvencí genů kódujících enzymy podílející se na syntéze trehalózy, trehalóza fosfát syntázy (TPS), trehalóza fosfát fosfatázy (TPP) a trehalóza syntázy (TS), odhalila, že v genomu se nachází enzymy dvou syntetických drah, z nichž jedna je prokaryontního původu. qRT-PCR pak prokázala rozdíly v míře exprese těchto genů v závislosti na dané životní formě, cysty vs. pseudocysty. V průběhu tvorby pseudocyst se na syntéze trehalózy podílí geny obou syntetických drah a v mnohem větší míře, než je tomu v průběhu encystace. K nárůstu množství trehalózy však dochází v průběhu obou ochranných reakcí. Trehalóza přetrvává, i když v menší míře, i v buňkách zralých cyst a pseudocyst, jak bylo doloženo pomocí hmotnostní spektrometrie.

Studovali jsme také vztah mezi encystací resp. tvorbou pseudocyst a buněčným cyklem resp. množstvím DNA. Pomocí průtokové cytometrie jsme prokázali, že u akantaméb lze jasně rozlišit dvě populace buněk s odlišným množstvím DNA, populaci v G1 fázi buněčného cyklu a populaci s již nově nasyntetizovanou DNA v G2 fázi. Zjistili jsme, že zatímco encystaci vždy předchází syntéza DNA, probíhá tedy z G2 fáze buněčného cyklu, tvorba pseudocyst je na pozici v buněčném cyklu nezávislá a může k ní dojít kdykoli během buněčného cyklu. Co je však pro obě rezistentní stádia totožné, je obsah DNA u zralých cyst a pseudocyst. Obě rezistentní stádia přecházejí dobu nepříznivých vnějších podmínek s G2 fázovým, obsahem DNA. Popsali jsme také účinek inhibitorů afidikolinu a hydroxyurey na růst a buněčný cyklus akantaméb. Zjistili jsme, že ani jedna ze studovaných látek nesynchronizuje akantaméby a nezastavuje je v množení na rozhraní G1/S fáze, jak je to popsáno u jiných protozoí a savčích buněk. Současně jsme pozorovali koncentračně závislý vliv hydroxyurey na míru množení trofozoitů akantaméb. Klasifikace a následná fylogenetická analýza hlavních regulátorů buněčného cyklu odhalila přítomnost celkem 14 genů 9 typů cyklinů a 6 genů 3 typů cyklin-dependentních kináz.