

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Skupina Fornicata a biologické zvláštnosti druhu
Giardia intestinalis

Bakalářská práce
Eva Rmoutilová

Školitel: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha 2012

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli Ivanu Čepičkovi za trpělivost a zkušené vedení mé práce. Rovněž děkuji svým nejbližším, kteří mě v průběhu studia podporují.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Ivana Čepičky, Ph.D. a že jsem uvedla veškeré použité zdroje.

V Praze, 14. 5. 2012

.....
Podpis

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
1. Úvod	5
2. Fornicata	6
2. 1. Fornicata jako součást skupiny Metamonada	6
2. 2. Zástupci skupiny Fornicata	7
2. 3. Mitochondrie	12
3. <i>Giardia intestinalis</i>	14
3. 1. Asymetrie jader	15
3. 2. Rozmnožování	16
3. 3. Bičíkový aparát	21
4. Závěr	24
Přehled literatury	24

Abstrakt

Fornicata jsou relativně nová skupina náležející do říše Excavata a obsahují tři skupiny anaerobních prvoků: Diplomonadida, Retortamonadida a karpediemonády. Velká část těchto prvoků žije endobioticky, ale jsou i volně žijící zástupci. Fornikáti mají typicky exkavátní morfologii, u diplomonád však došlo k redukci některých exkavátních znaků. Diplomonadida se odlišují od ostatních skupin charakteristickou zdvojenou (diplozoickou) stavbou buňky většiny jejich příslušníků. Existuje několik hypotéz ohledně evoluce této zvláštní morfologie, ale zatím žádná nebyla přijata. Fornicata jsou blízce příbuzná skupinám Parabasalia a Preaxostyla, s nimiž tvoří klan Metamonada. Ta byla spolu s dalšími skupinami prvoků řazena do říše Archezoa a považována za primárně amitochondriální. Objev homologů mitochondriálních genů a posléze i redukovaných mitochondrií u příslušníků říše Archezoa ovšem teorii nakonec vyvrátily. V rámci fornikát byl pozůstatek mitochondrie – mitosom – nalezen u parazita *Giardia intestinalis*.

Giardia intestinalis je nejen parazitem člověka a dalších savců, ale také velmi zajímavým modelovým objektem mnoha experimentů. Nejvíce zkoumanými problémy jsou její překvapivě vysoká genetická variabilita a dosud ne zcela pochopené rozmnožování, dalšími pak dvě nestejná jádra a komplikované buněčné dělení spojené se složitými přestavbami cytoskeletárních struktur.

Klíčová slova: Fornicata, Diplomonadida, Retortamonadida, karpediemonády, diplozoický, Metamonada, mitosom, *Giardia intestinalis*

Abstract

Fornicata is a recently established group of anaerobic protists that belongs to supergroup Excavata. Three main groups of Fornicata are Diplomonadida, Retortamonadida and *Carpediemonas*-like-organisms (CLOs). Most of these protists live as endobionts of various animals, several free-living representatives have been described as well. Fornicates are typical excavates, though some excavate features have been reduced in Diplomonadida. Diplomonads are unique with doubled (diplozoic) cell structure of most representatives. Several hypotheses explaining the evolution of diplozoic diplomonads were proposed, but none of them has been widely accepted. Fornicata are closely related to Parabasalia and Preaxostyla forming together clan Metamonada. Since Metamonada were considered to be primarily amitochondriate, they were classified among Archezoa. However, the kingdom Archezoa was rejected after the discovery of mitochondrial genes and reduced mitochondria in most supposedly archezoal protists. Within Fornicata, reduced mitochondria – called mitosome – was found in the parasite *Giardia intestinalis*.

Giardia intestinalis is a well known parasite of humans and other mammals. Besides epidemiology, there are many other interesting aspects of this protist that are intensively studied, e.g. its high genetic diversity, unusual reproduction, relationship between the two nuclei or complex cell division associated with cytoskeletal structure remodeling.

Key words: Fornicata, Diplomonadida, Retortamonadida, CLO, diplozoic, Metamonada, mitosome, *Giardia intestinalis*.

1. Úvod

Fornicata jsou potomkem fylogenetických a ultrastrukturálních analýz počátku 21. století a jsou tak jednou z nejmladších taxonomických skupin (Simpson, 2003). Sjednocují skupiny prvoků známé a studované již dlouho předtím. Příslušníci skupiny Fornicata jsou mikroaerofilní či anaerobní prvoci žijící většinou endobioticky, nezářídka jako paraziti – například známý rod *Giardia*, či rybí paraziti rodu *Spironucleus* (Simpson et al., 2009). Volně žijící zástupci jsou k nalezení jak ve sladkovodních (*Hexamita*, *Trepomonas*), tak i v mořských anoxických sedimentech (karpediemonády). Kromě druhu *Giardia intestinalis* je většina druhů – především těch volně žijících – zatím prostudována pouze povrchně a můžeme se nyní jen dohadovat, jak rozsáhlá je doopravdy diverzita fornikát.

Giardia intestinalis je parazitický prvok napadající široké spektrum savců, včetně člověka. Těší se neustálé pozornosti vědců, a to nejen kvůli nemoci, kterou způsobuje, ale i kvůli pozoruhodné struktuře svých buněk a adaptacím na specifický životní styl parazita trávicího traktu. Výzkum tohoto prvoka ovšem není záležitostí pouze poslední doby, ale sahá překvapivě daleko do historie. Poprvé totiž byla *Giardia intestinalis* pozorována možná už Leeuwenhoeckem v roce 1681. První popis nicméně poskytl až Lambl v roce 1859 a nazval ji tehdy *Cercomonas intestinalis*. Toto ale nebylo zdaleka poslední pojmenování, v průběhu času se totiž vystřídalo velké množství názvů: *Hexamita*, *Dicercomonas*, *Megastoma entericum*, *Lambliia intestinalis*, *Giardia lamblia*, *Giardia enterica*. Díky tomu, že tomuto prvokovi (jakožto parazitovi člověka) byla od začátku věnována značná pozornost, je to nejlépe popsaná diplomonáda a fornikát vůbec.

2. Fornicata

Skupina Fornicata byla ustavena v relativně nedávné době (Simpson, 2003). Náleží do říše Excavata, o čemž vypovídá i typický exkavátní vzhled většiny příslušníků – je přítomna ventrální rýha s procházejícím zpětným bičíkem s ploutvičkami. Společným znakem definujícím tuto skupinu je specificky klenutá B-fibrila. Pouze řád Diplomonadida tvoří výjimku, jelikož B-fibrilu sekundárně ztratil. O monofylii skupiny Fornicata prakticky nemůže být pochyb, jelikož byla potvrzena v mnoha různých nezávislých analýzách (Simpson et al., 2002; Cepicka et al., 2008; Kolisko et al., 2008, 2010; Takishita et al., 2012).

2.1. Fornicata jako součást skupiny Metamonada

Fornikáti společně se skupinami Parabasalia a Preaxostyla spadají pod sjednocující taxon Metamonada (Cavalier-Smith, 2003). Tato skupina byla vytvořena již Grassém v roce 1952 (Grassé, 1952 cit. podle Cavalier-Smith, 2003), kdy označil většinu zooflagelátů se čtyřmi nebo více bičíky jako Metamonada. Toto pojetí zůstalo zachováno, pouze byl přidán řád Diplomonadida a karpediemonády. Metamonada v této jejich finální podobě jsou pak podporována i současnými studii (Hampl et al., 2005). Později bylo pomocí fylogenomické analýzy ukázáno, že metamonády tvoří jednu ze tří linií říše Excavata; zbylými dvěma jsou Discoba a *Malawimonas* (Hampl, et al., 2009).

Metamonada jsou pravděpodobně původně čtyřbičíkaté organismy se čtyřmi bazálními tělísky (Cavalier-Smith, 2003), která jsou rozmístěna jako tři anteriorní a jedno posteriorní. Tento stav bičíkového aparátu, který byl nazván "pravá tetrakontie", nebyl ovšem zachován zdaleka u všech zástupců skupiny Metamonada – např. u řádu Diplomonadida došlo k duplikaci karyomastigontů. Další zásadní společnou charakteristikou metamonád je nepřítomnost klasické mitochondrie, díky níž byli všichni příslušníci této skupiny (vyjma karpediemonád, se kterými se tehdy

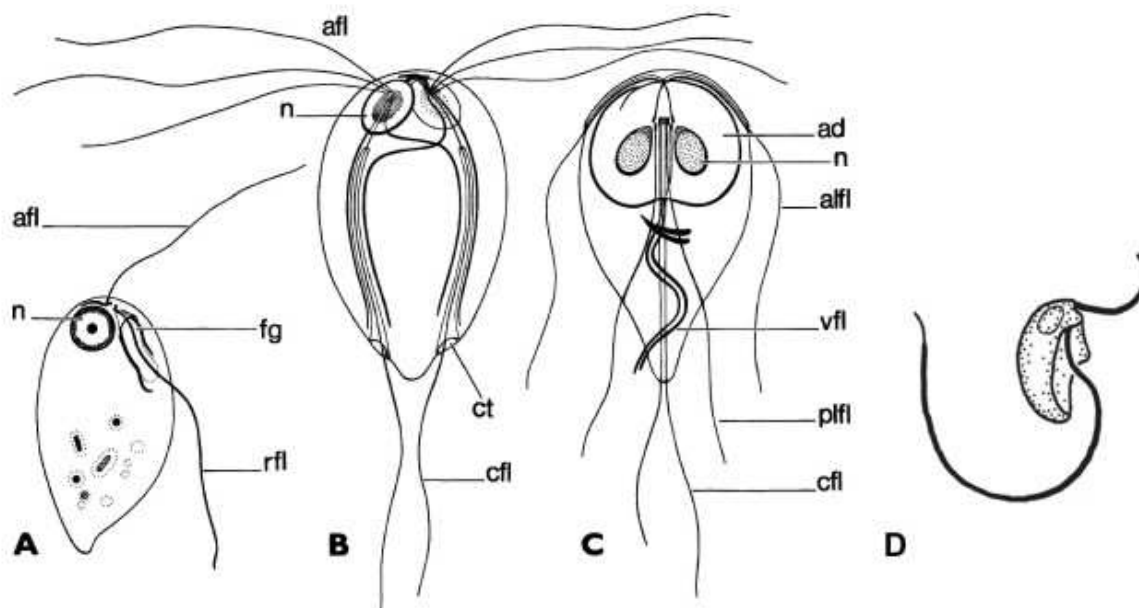
nepočítalo) řazení do nejbazálnější eukaryotické říše Archezoa (Cavalier-Smith, 1983 cit. podle Silberman et al., 2002), o které se zmiňuji v kapitole o mitochondriích.

Ačkoliv se teorie Archezoa zdála být potvrzována fylogenetickými analýzami (Sogin et al., 1989), byla posléze mnoha dalšími výzkumy vyvrácena. I po pádu teorie Archezoa, po kterém už bazální pozice skupin zahrnutých v této říši nemohla být zdůvodňována morfologií, se řád Diplomonadida a skupina Parabasalia ve fylogenetických analýzách řadily na bázi eukaryotického stromu (Andersson et al., 2005; Arisue et al., 2005; Simpson et al., 2005) a rovněž jejich blízká příbuznost zůstala zachována. Názor na jejich bazální postavení se nicméně od éry teorie Archezoa významně změnil, jelikož pozice kořene eukaryotického stromu nebyla dosud určena. V dnešní době je bazální postavení skupiny Diplomonadida a Parabasalia považováno za neplatné a četné studie jej pokládají za artefakt long-branch attraction (Philippe et al., 2000, 2000b; Hampl et al., 2009). Cavalier-Smith (2003) ve svém článku navíc naznačuje, že ribosomální RNA, podle níž je tvořena většina analýz umisťujících výše zmíněné skupiny na bázi eukaryotického stromu, není vhodná pro zjišťování dávné evoluce eukaryot.

2.2. Zástupci skupiny Fornicata

Do skupiny Fornicata spadají tyto tři skupiny: Diplomonadida, Retortamonadida a karpediemonády. Zástupci fornikát jsou jak parazitičtí (*Giardia spp.*, *Spironucleus spp.*), tak komenzální (některé retortamonády) i volně žijící (*Hexamita spp.*, *Trepomonas spp.* karpediemonády).

Řád Diplomonadida je nejvíce studovaným řádem skupiny Fornicata. Charakteristickým znakem většiny zástupců diplomonád je zdvojená stavba buňky, neboli diplozoičnost. Diplozoičtí prvoci obsahují zdvojené buněčné struktury – mají dvě jádra a dvě sady bičíků (tedy dvojité karyomastigonty). Diplomonády ztratily velkou část exkavátních znaků a také B-fibrilu charakteristickou pro Fornicata (Simpson, 2003). V rámci diplomonád existují tři hlavní skupiny, které byly určené



OBR. 1: Zástupci skupiny Fornicata.

A: Retortamonadida, *Retortamonas*; B: Diplomonadida, *Hexamita*; C: Diplomonadida, *Giardia*; D: *Carpediemonas*. Převzato ze Silberman et al. 2002 (A-C) a Takishita et al. 2012 (D).

původně podle morfologie: Enteromonadida (*Enteromonas*, *Caviomonas*, *Trimitus*), Giardiae (*Giardia*, *Octomitus*, *Brugerolleia*) a Hexamitinae (*Hexamita*, *Spironucleus*, *Trepomonas*, *Trigonomonas*, *Gyromonas*) (Kulda a Nohýnková, 1978). Podle pozdějších fylogenetických analýz sice Enteromonadida patří do skupiny Hexamitinae, rozdělení na Giardiae a Hexamitinae ale bylo potvrzeno (Kolisko et al., 2005, 2008). Enteromonády jsou unizoické diplomonády. Jejich buňky jsou velmi malé, dlouhé obvykle kolem 5 μm . Zatímco rody *Enteromonas* a *Trimitus* mají vytvořený cytostom (Kulda a Nohýnková, 1978), u rodu *Caviomonas* cytostom chybí (Brugerolle a Regnault, 2001). Počet bičků se u jednotlivých rodů liší. *Enteromonas* má čtyři bičky, *Trimitus* má tři bičky a *Caviomonas* jeden biček. Příslušníci obou dalších skupin – Giardiae i Hexamitinae – jsou vždy diplozoití a počet bičků je většinou osm, ale odlišují je od sebe významné rozdíly. Trofozoity skupiny Giardiae postrádají cytostomy, jejich bičky mají dlouhé intracytoplasmatické axonemy a vyživují se pouze pinocytoticky po celém povrchu buňky. Naproti tomu trofozoity skupiny Hexamitinae mají dva cytostomy, přičemž každým z nich prochází zpětný biček, který vychází na zádi buňky, a vyživují se fagocytózou bakterií v cytostomu.

Do určité doby byla Enteromonadida odlišována převážně podle ultrastrukturálních charakteristik (Siddall et al., 1992) jako samostatná taxonomická skupina na bázi fylogenetického stromu diplomonád. To vedlo zcela logickým myšlenkovým postupem k přesvědčení, že Enteromonadida a jejich jediný karyomastigont předcházejí diplozoickým diplomonádám, které tak jedenkrát v evoluční historii vznikly duplikací. Mechanismus vzniku pak vysvětlil Siddall et al. (1992) pomocí heterochronie – desynchronizací relativního načasování karyokineze a cytokineze vůči sobě. První fylogenetická analýza genu pro RNA malé ribosomální podjednotky ovšem celou tuto teorii boří s výsledky, kterými staví Enteromonadida dovnitř diplomonád skupiny Hexamitinae (Kolisko et al., 2005). Další studie pak tuto pozici uvnitř řádu Diplomonadida potvrzuje a navíc poukazuje na fakt, že Enteromonadida nejsou monofyletickou skupinou (Kolisko et al., 2008). Je tedy jasné, že ke změnám mezi jednoduchým a zdvojeným karyomastigontem diplomonád došlo v evoluci vícekrát a nabízejí se dvě možnosti: Buď se diplozoičtí zástupci vyvinuli z unizoického mnohokrát nezávisle (minimálně pětkrát až sedmkrát), anebo unizoické enteromonády vznikly reduktivním vývojem z diplozoických zástupců, a to nejméně třikrát. A mechanismus těchto procesů? Již dříve navrhovaná heterochronie (Siddall et al., 1992) by mohla vysvětlit jak vznik diplozoického prvoka z unizoického (karyokinezí bez cytokineze), tak i opačnou redukci zdvojeného karyomastigontu na jednoduchý (cytokinezí bez karyokineze) (Kolisko et al., 2008). Druhou možností vzniku unizoického prvoka z diplozoického je pak splynutí jader v jedné buňce se dvěma karyomastigonty, přičemž druhý mastigont zaniká. Která ze dvou možností vývoje karyomastigontů u diplomonád je platná, není dosud jasné a k rozřešení této otázky bude třeba dalších studií.

Řád Retortamonadida představují převážně endobioticky žijící komenzálové trávicího traktu obratlovců i bezobratlých. Řád je rozdělen na dva rody: *Retortamonas* a *Chilomastix* (Kulda a Nohýnková, 1978). Všechny retortamonády jsou unizoické a mají kompletní sadu exkavátních znaků (Simpson, 2003). Retortamonády mají výrazný rýhovitý cytostom situovaný na ventrální straně buňky (Kulda

a Nohýnková, 1978). Oba rody mají čtyři bazální tělíska, která jsou seskupena do dvou párů. Zatímco *Chilomastix* má všechna bazální tělíska vybavena bičíky, *Retortamonas* má pouze dva bičíky a dvě bazální tělíska zůstávají holá. Jeden bičík je vždy zpětný a prochází cytostomární rýhou. Příbuznost retortamonád a diplomonád je stále předmětem výzkumu. Původně byl řád Retortamonadida podle morfologických analýz považován za monofyletický a sesterský řádu Diplomonadida. Vyskytly se ovšem studie, v nichž se rod *Retortamonas* se slabou podporou řadí dovnitř diplomonád jako sesterský rodu *Giardia* (Silberman et al., 2002). Tomu ale odporuje analýza genu HSP90 (Kolisko et al., 2008), která robustně podporuje původně předpokládané postavení retortamonád jako sesterských diplomonádám, které bylo navrženo podle morfologie. Postavení rodu *Retortamonas* uvnitř diplomonád je v této studii považováno spíše za dosud nevyjasněný artefakt analýzy. Po přidání rodu *Chilomastix* do fylogenetických analýz však byla monofylie skupiny Retortamonadida vyvrácena. Nejprve studie navrhovaly parafylii (Cepicka et al., 2008), ale dnes již víme, že řád Retortamonadida je s největší pravděpodobností polyfyletický – v multigenové fylogenetické analýze *Retortamonas* zůstal sesterský diplomonádám, jako tomu bylo v dřívějších studiích, avšak *Chilomastix* se zařadil na bázi fornikát mezi karpediemonády (Takishita et al., 2012). Stejně jako u diplomonád ani u retortamonád nebyly nalezeny klasické mitochondrie, což celý řád společně s dalšími řadilo v minulosti mezi Archezoa. U retortamonád sice nebyl dosud nalezen žádný redukovaný pozůstatek mitochondrie, nicméně jsou díky své blízké příbuznosti s diplomonádami, u kterých byl nalezen mitosom (Tovar et al., 2003), považovány též za sekundárně amitochondriální.

Prvok v dnešní době známý jako *Carpediemonas membranifera* byl popsán Larsenem a Pattersonem v roce 1990 (Larsen and Patterson, 1990 cit. podle Ekebom et al., 1996) jako *Percolomonas membranifera* a až o několik let později pro něj byl vytvořen rod *Carpediemonas* (Ekebom et al., 1996). I když po dlouhou dobu tomuto prvokovi nebyla věnována zásadní pozornost, sehrál významnou roli v pochopení evoluce exkavát. Jednak (mimo jiné) na něm byla založena exkavátní hypotéza

(Simpson a Patterson, 1999), jednak se ukázalo, že je to nejbližší volně žijící příbuzný diplomonád a retortamonád (Simpson et al., 2002). V relativně nedávné době byli dokonce nalezeni noví volně žijící příbuzní tohoto prvoka. V roce 2007 byl popsán nový rod *Dysnectes* (Yubuki et al., 2007) s jediným druhem *D. brevis*, který ve fylogenetických analýzách (i přítomností klenuté B-fibrily) jednoznačně patří ke skupině Fornicata. Dalším přírůstkem se stal *Hicanonectes teleskopos* v roce 2009 (Park et al., 2009), rovněž jako jediný druh nového rodu, který stejně jako *Dysnectes* inklinoval ve skupině Fornicata, ale na rozdíl od něj *Hicanonectes* utvořil sesterskou skupinu ke *Carpediemonas*. Rozsáhlý rozbor osmnácti nových izolátů v roce 2010 (Kolisko et al., 2010) přinesl další nový rod, rod *Kipferlia*. Ten byl vytvořen pro již dříve popsáný (nicméně do té doby nekultivovatelný) druh *Carpediemonas bialata*. Při této studii také bylo zjištěno, že karpediemonády tvoří šest oddělených linií, které byly označeny CL1 – CL6, přičemž všem organismům v nich byl dán souhrnný název CLO (z anglického *Carpediemonas-like-organism*). Posledním popsáným CLO je pak *Ergobibamus cyprinoides* (Park et al., 2010). Linie CL2 a jeden CLO z CL5 zůstaly zatím nepopsány (Takishita et al., 2012). Celá skupina karpediemonád složená z šesti linií CLO se řadí na bázi fylogenezického stromu fornikát a je parafyletická (Kolisko et al., 2010), což bylo potvrzeno i později multigenovou fylogenetickou analýzou genů se zastoupením všech šesti linií karpediemonád (Takishita et al., 2012). Z ní také vyplývá již zmíněná polyfylie retortamonád, kdy se rod *Chilomastix* větví uvnitř karpediemonád a mohl by tak být označen jako linie CL7. Všechny CLO sdílejí exkavátní vzhled – mají zpětný bičík procházející ventrální rýhou, který má ploutvičky – a u všech je přítomna klenutá B-fibrila charakteristické pro fornikáty. Liší se ale ve stavbě bičíkového aparátu. *Carpediemonas membranifera* má dva bičíky, ale vlastní tři bazální tělíska. Naproti tomu *Dysnectes brevis* spadající do skupiny CL1 má sice rovněž dva bičíky, ale pouze dvě bazální tělíska (Yubuki et al., 2007). *Hicanonectes teleskopos* ze skupiny CL3 má také dva bičíky, ale bazální tělíska vlastní čtyři (Park et al., 2009), stejně jako *Ergobibamus cyprinoides* ze skupiny CL5 (Park et al., 2010). Je nicméně jisté, že se tato skupina vyvinula z tetrakontního předka, jelikož

karpediemonády spadají do skupiny Metamonada, jejíž synapomorfii je tetrakontie (Cavalier-Smith, 2003).

2.3. Mitochondrie

V 80. letech 20. století byla navržena teorie, že někteří prvoci, u nichž nebyla nalezena mitochondrie, jsou primárně amitochondriální – teorie Archezoa (Cavalier-Smith, 1983 cit. podle Silberman et al., 2002). Nejednalo se přitom pouze o Fornicata, ale i o Parabasalia, Preaxostyla, Microsporidia, rod *Entamoeba* a Pelobiontida. Bazální postavení těchto skupin na fylogenetickém stromě navíc celou teorii o jejich vývoji ještě před opatřením mitochondrie podporovalo. Tyto teorie nakonec byly vyvráceny, a to nejdříve nálezem mitochondriálních genů v jádře giardie (Roger et al., 1998; Morrison et al., 2001) a posléze i nálezem organel, které se ukázaly být odvozené z mitochondrie, u parazita *Entamoeba histolytica* a o něco později i u giardie (Tovar et al., 1999, 2003). Další Archezoa, u nichž byly nalezeny pozůstatky mitochondrií, jsou mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* a *Trachipleistophora hominis* (Katinka et al., 2001; Williams et al., 2002). U *Trichomonas vaginalis*, jakožto dalšího příslušníka říše Archezoa, byly sice hydrogenosomy známy již před vznikem teorie Archezoa (Lindmark a Müller, 1973), ale nebyly spojovány s mitochondriemi – souvislosti hydrogenosomu s mitochondrií začínají vyplývat na povrch až počátkem 90. let (Lahti et al., 1992).

Jak už bylo řečeno, Fornicata postrádají klasickou mitochondrii. S adaptací na prostředí s velmi nízkou nebo žádnou koncentrací kyslíku mitochondrie jejich buňky postupně ztrácí své funkce spojené s přístupem kyslíku a v některých případech naopak získávají funkce nové, výhodné pro anoxické prostředí. Dochází pak ke změnám v mitochondriální morfologii – zanikají krysty a organela se zmenšuje – a také k částečné až úplné redukci elektrontransportního řetězce a především genomu (Simpson a Cepicka, 2009). V určité pokročilé fázi tohoto redukčního procesu už pak proto nemluvíme o mitochondrii, ale podle funkcí

v buňce buď o hydrogenosomu, nebo o mitosomu. Existují ovšem i přechody mezi klasickou mitochondrií a těmito odvozenými organelami, které nelze přímo zařadit do zmíněných kategorií. Takovouto mitochondrii vlastní například *Blastocystis hominis* nebo *Nyctotherus ovalis* (Akhmanova et al., 1998; Stechmann et al., 2008)

Hydrogenosomy jsou přibližně stejných rozměrů jako mitochondrie. Jsou oválného nebo kulatého tvaru, nemají krysty a genom často není přítomen. Produkují ATP anaerobním metabolismem a jako odpadní produkt vzniká plynný vodík. Vyskytují se například u zástupců skupiny Parabasalia, blíže příbuzné skupině Fornicata, dále u některých hub a nálevníků (Benchimol, 2009). V rámci skupiny Fornicata hydrogenosomy nebyly nalezeny, nicméně karpediemonády obsahují organely větší než mitosomy, které vzhledem spíše připomínají hydrogenosomy (Simpson a Patterson, 1999; Yubuki et al., 2007; Park et al., 2009, 2010).

Mitosomy jsou nejvíce redukované formy mitochondrií a jsou podstatně menších rozměrů než klasická mitochondrie. Mají sice dvě membrány, ale krysty zcela chybí a genom právě tak (Tovar et al., 1999, 2003). Na rozdíl od hydrogenosomů nemají mitosomy žádnou funkci v energetickém metabolismu buňky a po nějaký čas nebylo jasné, jakou funkci mitosom v buňce má. Pak byl ovšem u giardie identifikován a sekvenován gen pro enzym zásadní při syntéze Fe-S center – cystein desulfarázu (IscS) – u kterého byl ve fylogenetických analýzách prokázán mitochondriální původ (Tachezy et al., 2001). O něco později byl sekvenován i gen pro protein IscU, rovněž zásadní pro syntézu Fe-S center (Tovar et al., 2003). Přitom byla pomocí fluorescenční mikroskopie prokázána kompartmentalizace obou těchto proteinů. Imunoznačením byla dokázána přítomnost organel odvozených z mitochondrií – mitosomů – nahloučených v cytosolu kolem axonem bičíků, většinou v centru buňky. U giardie je syntéza Fe-S center zatím jedinou nalezenou funkcí mitosomu, ale u již zmíněné entaméby byla nalezena souvislost mitosomu s aktivací sulfátu (Mi-ichi et al., 2009).

Kromě výše uvedených zjednodušení vzhledem ke klasické mitochondrii je u mitosomu giardie velmi redukován i proteom (Jedelský et al., 2011). V něm byly

dosud nalezeny pouze proteiny pro syntézu Fe-S center, protein s NADPH reduktázovou aktivitou, minimální transportní systém pro import proteinů a proteiny, které pravděpodobně slouží k interakci mitosomů s ostatními buněčnými kompartmenty.

3. *Giardia intestinalis*

Rodu *Giardia*, a zejména pak druhu *Giardia intestinalis*, věnuji celou kapitolu z toho důvodu, že je zdaleka nejvíce zkoumaným příslušníkem skupiny Fornicata. Výzkumem na druhu *G. intestinalis* byly odhaleny jevy v eukaryotické říši dosud nevídané (například velmi složitý systém distribuce bičíků během dělení buňky) a rovněž byla zjištěna fakta rozšiřující naše dosavadní poznání celých eukaryot.

Členové rodu *Giardia* jsou paraziti trávicího traktu širokého spektra obratlovců. Z pohledu člověka nejdůležitější druh *G. intestinalis* způsobuje průjmová onemocnění. Šíří se pomocí odolných cyst, a to buď fekálně-orální cestou nebo kontaminovanou vodou (Adam, 2001). Příznaků nemoci je více: například průjmy, malabsorpce, nevolnost, zvracení, ztráta váhy apod. Infekce však často bývá asymptomatická a je považována za lehce léčitelnou. V určitých případech se nicméně onemocnění stane chronickým a způsobuje dlouhodobé zdravotní potíže (Robertson et al., 2009).

Životní cyklus giardie zahrnuje dvě stádia. Trofozoit žijící v tenkém střevě je hruškovitého tvaru, 12 – 15 μm dlouhý a 5 – 9 μm široký. Má dvě jádra, která jsou v buňce umístěna v přední části symetricky podle podélné osy, charakteristický přísavný disk



OBR. 2: *Giardia intestinalis* (skenovací elektronový mikroskop).
Autor: CDC/ Janice Haney Carr.

a dvě čtveřice bičíků. Cysty giardie jsou čtyřjaderné, obklopené odolnou stěnou a jsou určeny k přenosu prvoka mezi hostiteli a k přežití nepříznivých životních podmínek (Adam, 2001).

Na základě morfologie a fylogenetických analýz byl rod *Giardia* rozdělen na čtyři druhové skupiny: *Giardia agilis*, *G. muris*, *G. intestinalis* a *G. microti* (Kulda a Nohýnková, 1978; Feely, 1988 cit. podle Monis et al., 1999; Filice, 1952 cit. podle Monis et al., 1999). *G. intestinalis* je parazitem mnoha různých druhů savců včetně člověka, a je proto nejvíce zkoumaným druhem rodu *Giardia*. Genetické analýzy prokázaly, že *G. intestinalis* je pestrým komplexem, který se dělí na sedm genetických skupin – asambláží – s označením A – G. Všechny lidské izoláty spadají do asambláží A a B, které vykazují rozsáhlejší hostitelské spektrum než asambláže C – G, které byly izolovány pouze ze psů (C, D), dobytka (E), koček (F) a krys (G) (Monis et al., 2003). Tato vnitrodruhová diverzita *G. intestinalis* je předmětem mnoha výzkumů, které se zabývají genetickou variabilitou i uvnitř jednotlivých asambláží.

3.1. Asymetrie jader

Giardia intestinalis se řadí mezi diplozoické zástupce prvoků řádu Diplomonadida, a obsahuje tedy kromě jiných zdvojených buněčných struktur také dvě jádra. Tato jádra byla zprvu pokládána za ekvivalentní, a to hned z několika důvodů: množství DNA v jádrech je přibližně stejné, v obou jádrech je přítomna ribosomální DNA, obě jádra jsou transkripčně aktivní (Kabnick a Peattie, 1990) a obsahují minimálně jednu kompletní kopii genomu (Yu et al., 2002). Poslední studie nicméně dokázaly, že, ač v mnoha aspektech shodná, jádra giardie (a možná tedy i ostatních diplozoických diplomonád) nejsou zcela rovnocenná.

Významným rozdílem mezi jádry je jejich odlišný karyotyp (Tůmová et al., 2007), který zůstával donedávna neznámý. Již dříve sice existovaly odhady počtu chromosomů v jádrech *G. intestinalis* (např. Rodenwalt, 1912 cit. podle Tůmová et al., 2007; Filice, 1952 cit. podle Tůmová et al., 2007; Kabnick a Peattie, 1990), ale ty se

mezi sebou různily a byly nepřesné – pravděpodobně kvůli omezeným možnostem odlišení malých chromosomů s použitím světelné mikroskopie. Pomocí nových cytogenetických metod byl před několika lety určen přesný karyotyp jader (Tůmová et al., 2007) a zjištění je bezesporu pozoruhodné: počet chromosomů v jádrech jedné buňky není stejný. Kromě jiných se vyskytovaly dva převažující modely karyotypů: 9+11 (charakteristický pro asambláž A) a 10+11 (charakteristický pro asambláž B). Stabilita této asymetrie byla testována a nebyla zaznamenána žádná změna v karyotypu po dobu 3 800 generací. Zajímavé je rovněž zjištění, že se liší relativní délka chromosomů mezi jádry se stejným karyotypem z buněk jedné asambláže.

Během výzkumu asymetrie jader byla použita nová metoda pro alespoň částečnou synchronizaci zkoumané populace, která byla ještě donedávna velmi problematická. Buněčné dělení giardie totiž probíhá velmi rychle, během několika minut (Adam, 2001). Během něj totiž musí buňky giardie dezintegrovat svůj přísavný disk a je pro ni výhodné aby trofozoiti svou schopnost přisátí ke sliznici během dělení ztratili na co nejkratší dobu a omezili tím možnost vyloučení z organismu peristaltikou. Tato nová metoda synchronizace byla založena na použití albendazolu (Nohýnková et al., 2006), na který je senzitivní přísavný disk a dělicí vřetenko. U dělicích se buněk sice nastane dělení, ale bez mitózy a bez regenerace přísavného disku – buňky tudíž zůstanou plavat volně v roztoku a jsou později odstraněny, zatímco nedělicí se přisáté buňky zůstávají a jsou dále použity k experimentům. Díky tomuto postupu byla kultura giardie významně obohacena o buňky, které právě vstupovaly do mitózy.

3.2. Rozmnožování

Rozmnožování giardie je již dlouho diskutovaným tématem, do kterého v průběhu času stále přibývají nové poznatky podněcující k dalším debatám. Dříve byl rod *Giardia* považován za čistě asexuálně se množící, protože nebyly pozorovány žádné známky sexuální reprodukce (Adam, 2001). Ve spojení s tímto názorem a míněním,

že *Giardia* je postavena na bázi eukaryotického stromu (Sogin et al., 1989), vyvstala otázka, zda je *Giardia* primárně asexuální, a vyvinula se tedy ještě před vznikem meiózy u eukaryotních organismů, nebo sekundárně asexuální, a to po ztrátě schopnosti sexuálně se množit. V případě skutečné primární asexuality by byla *Giardia* zásadním chybějícím článkem eukaryotické evoluce (Logsdon, 2007). Tato možnost byla ale nakonec vyloučena objevem pěti genů klíčových pro meiózu v genomu *G. intestinalis* (Ramesh et al., 2005; Melo et al., 2008). Zkoumané geny byly vybrány pro testování, jelikož mají hlavní meiotické funkce u živočichů, rostlin a hub, a nejsou u nich známe žádné jiné funkce než meiotické. Přítomnost jejich homologů v genomu *G. intestinalis* představuje podle objevitelů dostatečný důkaz o tom, že dosud domněle asexuální prvoci jsou schopni meiózy.

Z tohoto objevu nicméně nebylo jednoznačně zřejmé, zda *Giardia* sexuální reprodukci doopravdy uskutečňuje, nebo alespoň v minulosti uskutečňovala (Logsdon, 2007). Meiotické geny použité při výzkumu Rameshovou et al. (2005) totiž mohou mít v giardii i jinou funkci – například opravu DNA. V organismech, ve kterých byly tyto geny zkoumány, mají sice výhradně meiotickou funkci, ale tyto organismy jsou od giardie příbuzensky velmi vzdálené a biologicky odlišné (Birky, 2009).

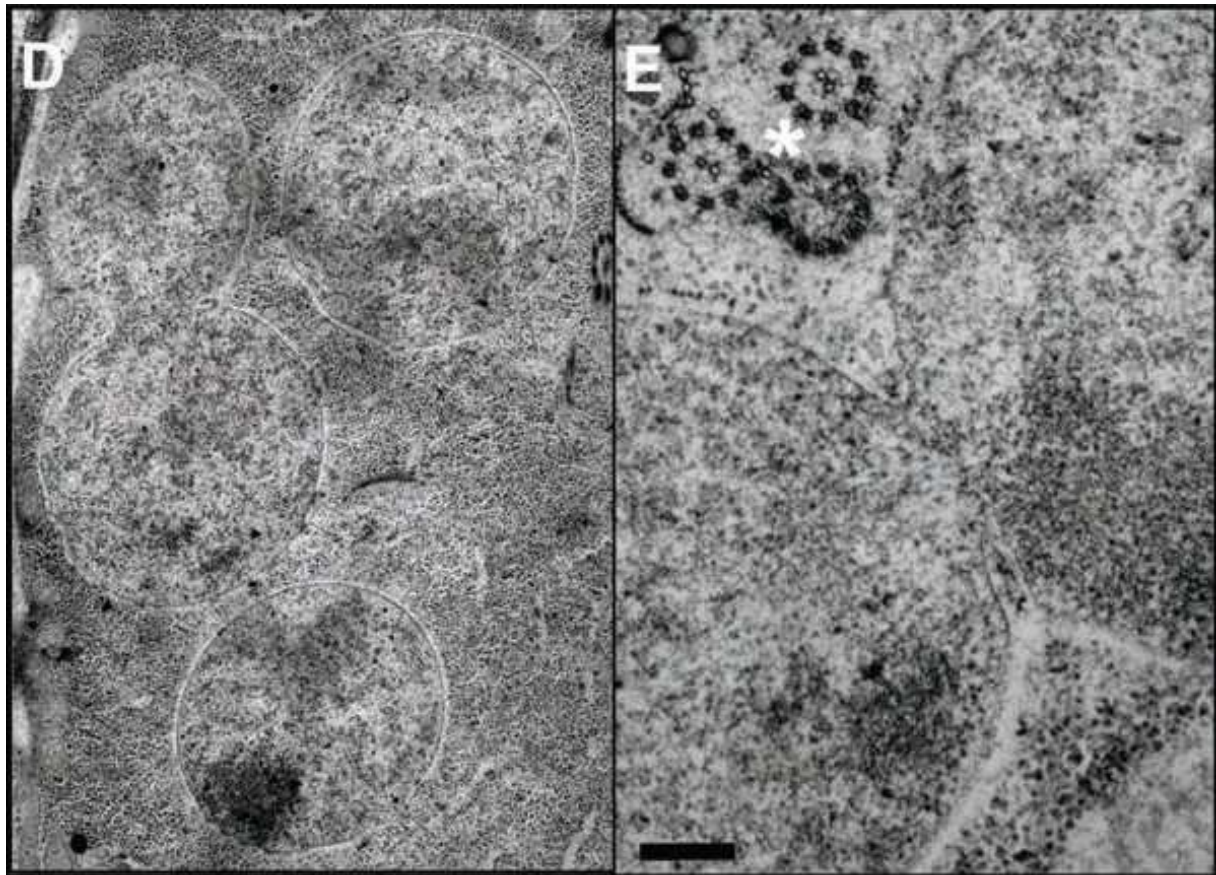
Trochu světla na celý problém vrhnul populačně genetický experiment prokazující přítomnost rekombinace u giardie (Cooper et al., 2007). U šesti izolátů *G. intestinalis* patřících do asambláže A byly osekvenovány úseky tří různých chromosomů a byly vytvořeny fylogenetické stromy. Jejich topologie se mezi jednotlivými chromosomy výrazně lišily. Příbuznosti mezi izoláty se v rámci jednotlivých stromů natolik různily, že o existenci proběhnuvší rekombinace nemůže být pochyb. Pokud by totiž docházelo pouze k asexuálnímu rozmnožování (a nebereme-li v úvahu laterální genový transfer), topologie fylogenetických stromů založených na různých částech genomu by měla být přibližně stejná.

Otázkou je, zda může u *G. intestinalis* docházet k rekombinaci nejen mezi trofozoity ze stejné asambláže, ale i mezi příslušníky různých asambláží. Je velmi

pravděpodobné, že ano (Lasek-Nesselquist et al., 2009). Frekvence těchto rekombinací je nicméně podle nejnovějších studií tak nízká, že se jednotlivé asambláže druhu *Giardia intestinalis* mohou považovat za geneticky izolované, a tudíž by měly být odlišeny na jednotlivé druhy (Xu et al., 2012).

Zatímco rekombinace mezi trofozoity (ať už ze stejné či odlišné asambláže) zůstává poněkud nenázornou, jelikož nebylo pozorováno splývání trofozoitů, o rekombinaci mezi jadernými genomy v rámci jedné buňky jsou podstatně jistější důkazy. V její prospěch už dříve svědčila nízká heterozygosita genomu giardie (Cooper et al., 2007). Pokud se organismus rozmnožuje pouze asexuálně, heterozygosita je vysoká a alely homologických chromosomů se od sebe postupem času čím dál více liší, protože mezi nimi nedochází k rekombinaci. Nicméně *G. intestinalis* vykazuje heterozygositu velmi nízkou, a to nejen v rámci jednotlivých jader, ale i mezi nimi. Možným vysvětlením této nízké rozdílnosti mezi jádry by teoreticky mohlo být přijetí dvou kopií stejného jádra během buněčného dělení, ale výzkum dokazoval, že každá dceřiná buňka obdrží jednu kopii od každého mateřského jádra (Yu et al., 2002). Nízká heterozygosita je tudíž velmi důležitým důkazem o rekombinaci probíhající v giardii.

Avšak do určité doby nebylo pozorováno žádné splývání jader. Až do okamžiku kdy se Poxleitnerová et al. (2008) začala zabývat možností výměny genetického materiálu ve stádiu cysty u *G. intestinalis*. Jedno z jader giardie bylo během pokusů uměle infikováno episomálním plasmidem. Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace, při níž byly aplikovány sondy na tyto plasmidy, bylo zjištěno, že mezi jádry v cystě skutečně dochází k výměně genetického materiálu. Přibližně ve dvou třetinách případů byl model standardní: plasmidy se nacházely ve dvou jádrech ze čtyř. V jedné třetině případů ale byla pozorována přítomnost plasmidů ve třech jádrech. Z tohoto faktu plyne, že v přibližně jedné třetině případů se jádra setkávají a dochází k výměně plasmidů. Aby bylo ověřeno, zda skutečně dochází k fúzi jader v cystě giardie, byla použita transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Pomocí této metody bylo u přibližně 15% pozorovaných cyst skutečně zjištěno



OBR. 3: *Giardia intestinalis* – detail dospělé cysty (transmisní elektronový mikroskop).
D, E: Propojení jader. Převzato z: Poxleitner et al. 2008.

propojení jader celistvou membránou. Tato membrána přitom vzhledem k uspořádání cytoskeletu nemohla být důsledkem nekompletní mitózy a spojení jader během stádia cysty navíc pozoruje později ve své studii mitotického dělení giardie také Jiráková et al. (2012). Jádra giardie se tedy v cystě propojují, což patrně vede k přenosu plasmidů mezi nimi. Plasmidy ovšem nebyly nikdy pozorovány ve všech čtyřech jádrech cysty, z čehož se usuzuje, že jejich propojení je omezeno pouze na jeden pár. Ve prospěch splývání jader v cystě rovněž svědčí fakt, že na rozdíl od trofozoitu, kde jsou jádra pevně ukotvena pomocí cytoskeletu, v cystě dochází k častým pohybům jader (Poxleitner et al., 2008). Díky propojení jader svazkem axonem se jádra v cystě pohybují vždy společně v příslušných párech, a bylo pozorováno několikero uspořádání. Nejčastějším pozorovaným modelem byla čtyři jádra umístěná blízko sebe, ale byla často pozorována rovněž tři jádra – respektive jeden pár a jedna "chromatinová masa", vše ve velmi těsné blízkosti.

Při tomto "trojjaderném" uspořádání může dojít (a patrně dochází) ke karyogamii mezi nestejnými jádry. Proces splývání jader a výměny episomů nazvali autoři diplomixií a ačkoliv je předpokládán i u ostatních příslušníků řádu Diplomonadida, pozorován byl zatím pouze u giardie.

Problematikou cyst se s navazující prací zabývá dále Carpenterová et al. (2012). S pomocí markerů zaměřených na epitopy trofozoitů *G. intestinalis* nejprve předkládá důkazy o tom, že cysty skutečně vznikají pomocí mitózy s absencí cytokineze, nikoliv splynutím dvou trofozoitů, a posléze se věnuje studiu rozdělení jader mezi dceřiné buňky po excystaci. Ačkoliv – na rozdíl od předešlých výzkumů – jako jeden z mechanismů vedoucí ke snížení heterozygosity zcela nezavrhuje ani možnost, že dceřiné buňky v minoritním počtu případů zdědí dvě shodná jádra, za převládající označuje model, v němž dceřiné buňky při cytokinezi obdrží dvě různá jádra. Jelikož během encystace dochází k expresi už dříve zjištěných meiotických genů (Ramesh et al., 2005), lze se domnívat, že během diplomixie by mohlo docházet k homologní rekombinaci, která by vysvětlovala nízkou heterozygositu a byla by alternativou pohlavního rozmnožování, které u giardie nebylo dosud pozorováno.

Pokud ale dochází mezi jádry k rekombinaci, jak je tedy možné, že si jádra zachovala odlišný karyotyp? Touto otázkou se zabývá ve své studii mechanismů rozmnožování giardie Andersson (2011) a jako možné vysvětlení podává parasexuální rozmnožování. Během tohoto procesu, jak jej navrhuje autor studie, by došlo k syngamii dvou tetraploidních trofozoitů a posléze karyogamii za vzniku jednoho dočasně oktoploidního jedince. V této fázi by ovšem nedošlo k redukci počtu chromozómů pomocí meiózy, ale čistě náhodně. Efekt rozdílných karyotypů by pak mohl vzniknout jako přechodný stav během této náhodné redukce. Je to ovšem pouze pracovní hypotéza, která nedokáže vysvětlit řadu faktů, například značnou stabilitu této asymetrie jader anebo stejné množství DNA v obou jádrech.

Ačkoliv tedy fakta potvrdila přítomnost rekombinace v giardii a vyloučila tak definitivně možnost, že by giardia byla čistě asexuálně se množícím prvokem, stále

není zřejmé, zda se jedná o rekombinaci v rámci sexuálního či parasexuálního procesu. Rozřešení této otázky je tak předmětem dalších výzkumů, ze kterých se patrně dočkáme ještě velmi zajímavých výsledků.

3.3. Bičíkový aparát

Vývojový cyklus bičíků je dalším předmětem výzkumu na druhu *G. intestinalis*. Vzhledem ke své diplozoičnosti je *Giardia* pozoruhodným objektem zkoumání bičíkového cyklu, jelikož obsahuje dvě sady bičíků po čtyřech a stejný počet bazálních tělísek. Bičíky jsou typické nadstandardně dlouhými intracytoplazmatickými částmi axonem, všechny směřují vzad vzhledem k orientaci trofozoita a dělí se podle svého umístění a funkce do čtyř párů: anterolaterálního, posterolaterálního, ventrálního a kaudálního (Nohýnková et al., 2006). Bazální tělíska se nachází mezi jádry buňky a jsou seskupena do dvou oddělených skupin po čtyřech – takzvaných tetrad – umístěných souměrně podél svislé osy buňky. Každá tetrada obsahuje bazální tělíska všech čtyř typů bičíků a tvoří tedy jeden mastigont.

Semikonzervativní distribuce bičíků během buněčného dělení je známa již od 60. let 20. století (Cleveland, 1963 cit. podle Nohýnková et al., 2006). Při dělení buňky obdrží každá dceřiná buňka jednu polovinu mateřských bičíků (včetně jejich bazálních tělísek; v případě, že jsou bičíky před dělením resorbovány, dceřiná buňka zdědí pouze bazální tělíska). Druhou polovinu bičíků si pak dceřiné buňky musí samy dosyntetizovat. I když byl znám tento princip, velmi dlouho nebylo jasné, jak je možné, že bičíky se v rámci jedné buňky funkčně i strukturálně liší. Až Melkonian et al. (1991) (cit. podle Nohýnková et al., 2006) zjistil, že bičíky jednoho druhu zelených řas dozrávají a že proces maturace trvá déle, než jeden buněčný cyklus. (Na rozdíl od jiných buněčných organel, které dozrají v rámci jediného buněčného cyklu.) Tento proces, který se nazývá flagelární transformace, vysvětluje

heterogenitu bičků v rámci jedné buňky a byl posléze objeven i u mnoha dalších bičkatých prvků, včetně giardie.

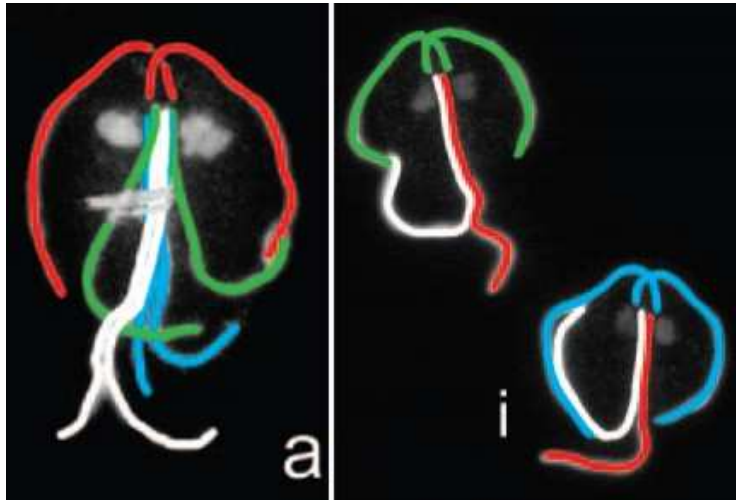
Během flagelární transformace bičky migrují. "Mladší" bičky (tedy bičky, které byly dosyntetizovány před menším počtem dělení) se posouvají na místo "starších" a naposled na místo zcela zralých bičků, přičemž si osvojí jejich funkci i morfologii. Pokud vezmeme za příklad jednodušší buňku se dvěma bičky – anteriorním a posteriorním – je proces velmi prostý. Posteriorní biček zděděný jednou dceřinou buňkou zůstává posteriorním, zatímco anteriorní biček zděděný druhou buňku se přeměňuje a stává se též posteriorním. Obě buňky pak dosyntetizují anteriorní biček (viz Roger a Simpson, 2008).

Záleží ovšem na počtu bičků, kolik buněčných cyklů dozrávání jednoho bičku trvá. *Giardia* má celkem čtyři páry bičků – jeden celý pár je po dělení dceřinou buňkou vždy dosyntetizován, a trvá tedy tři buněčné cykly, než bičky giardie zcela dozrají a zaujmou pozici zralého bičku, kterým je biček kaudální (Nohýnková et al., 2006). Migrace bičků během dělení je u giardie ovšem mnohem složitější, než pouze migrace "mladších" bičků na pozice "starších".

Giardia má dva mastigonty – jeden se vždy skládá z tetrády bazálních tělísek s příslušnými bičky a z dalších cytoskeletárních struktur. Původní předpoklad, že mastigonty giardie se během buněčného cyklu vyvíjejí samostatně, je chybný. Bylo totiž prokázáno, že během mitózy dochází mezi mastigonty ke vzájemné výměně bazálních tělísek (Nohýnková et al., 2006). Tento fakt činí proces vývoje bičků u giardie mnohem složitějším, než by se i navzdory její diplozoičnosti mohlo na první pohled zdát.

K výměně bazálních tělísek mezi mastigonty dochází už v časných fázích mitózy, zatímco k pohybům samotné flagelární transformace – tedy k migraci "mladších" bičků na pozici "starších" – dochází až v pozdních fázích mitózy kolem cytokineze. Základem těchto přesunů v časných fázích mitózy je pohyb bazálních tělísek, který byl sledován pomocí barvení protilátkou. Výsledkem bylo zjištění, že zatímco vnější části bičků setrvávají po většinu času na své pozici, některá bazální

tělíska uvnitř buňky migrují, a způsobují tak asymetrické rozložení typů bičíků v dceřiných buňkách. Byl sledován přesun anterolaterálních bičíků, které si mezi sebou vyměnily pozici, a dále pravého posterolaterálního a levého ventrálního bičíku na opačnou stranu buňky. K přesunům ostatních bičíků nedocházelo.



OBR. 4: Bičíkový aparát giardie.
a: Výchozí stav bičíkového aparátu v mateřské buňce;
i: Přeskupené a nekompletní bičíkové aparáty dceřiných buněk. Červeně: anterolaterální, zeleně: posterolaterální, modře: ventrální, bíle: kaudální bičíky. Převzato z Nohýnková et al. 2006.

Výsledkem migračních pohybů je stav, ve kterém se před cytokinezí nachází v levé části buňky pravý anterolaterální, oba posterolaterální a levý kaudální bičík, zatímco v pravé části je situován levý anterolaterální, oba ventrální a pravý kaudální bičík. S postupujícím dělením a cytokinezí pak přichází na řadu transformace posterolaterálních a ventrálních bičíků v dceřiných buňkách na bičíky anterolaterální a anterolaterálního bičíku na kaudální. V první fázi dceřiné buňky tedy obsahují pouze anterolaterální a kaudální bičíky. Oba chybějící páry (posterolaterální a ventrální) si buňky záhy po flagelární transformaci dosyntetizují *de novo*.

Výsledkem migračních pohybů a flagelární transformace je heterogenní složení bičíku v buňce co se věku, stavby a funkce týče (Nohýnková et al., 2006). Dosyntetizované posterolaterální a ventrální bičíky představují nejmladší generaci bičíků, anterolaterální pak o jeden cyklus starší generaci, a nejstarší (a zralé) jsou bičíky kaudální.

4. Závěr

Fornicata jsou zcela jistě monofyletická, avšak názory na fylogenetické vztahy uvnitř této skupiny byly zatím nejednotné. Studie z poslední doby nicméně podávají uspokojivá vysvětlení dříve sporných otázek. Několik druhů – zejména CLO – zůstává dosud blíže nepopsaných, a proto můžeme očekávat zajímavé ultrastrukturální studie, které by mohly ještě rozšířit už tak velkou rozrůzněnost modelů bičíkových aparátů. Rovněž výzkum diverzity volně žijících diplomonád, kterým se chci zabývat ve své budoucí práci, může přinést neočekávané výsledky a i rozšíření skupiny Fornicata o další druhy.

Je jisté, že výzkumy na giardii zdaleka nejsou u konce. Ohledně karyotypů jader se v blízké době jistě dočkáme nových zajímavých výsledků, a ačkoliv již byly od původních předpokladů, že je tento prvok primárně asexuální, učiněny velké pokroky a byla potvrzena přítomnost rekombinace, stále zbývá rozřešit otázku způsobu jejího mysteriózního rozmnožování.

Přehled literatury

Adam R. D. (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 447–475

Aguilera P., Barry T., Tovar J. (2007) *Entamoeba histolytica* mitochondria: Organelles in search of a function. *Experimental Parasitology* **118**: 10–16

Akhmanova A., Voncken F., van Alen T., van Hoek A., Boxma B., Vogels G., Veenhuis M., Hackstein J. H. P. (1998) A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**: 527–528

Andersson J. O. (2011) Double peaks reveal rare diplomonad sex. *Trends in Parasitology* **28**: 46–52

Andersson J. O., Sarchfield S. W., Roger A. J. (2005) Gene transfers from Nanoarchaeota to an ancestor of Diplomonads and Parabasalids. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 85–90

- Arisue N., Hasegawa M., Hashimoto, T.** (2005) Root of the Eukaryota tree as inferred from combined maximum likelihood analyses of multiple molecular sequence data. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 409–420
- Benchimol M.** (2009) Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue and Cell* **41**: 151–168
- Birky W. C., Jr.** (2009) *Giardia* Sex? Yes, but how and how much? *Trends in Parasitology* **26**: 70–74
- Brugerolle G., Regnault J.-P.** (2001) Ultrastructure of the enteromonad flagellate *Caviomonas mobilis*. *Parasitology Research* **87**: 662–665
- Carpenter M. L., Assaf Z. J., Gourguechon S., Cande W. Z.** (2012) Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of Cell Science*, in press
- Cavalier-Smith T.** (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpediemonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematics and Evolutionary Biology* **53**: 1741–1758
- *Cleveland L. R. (1963)** Functions of flagella and other centrioles in cell reproduction. In Levine, L. (ed.) *The cell in mitosis*. Academic Press, Inc., New York, pp 3–53
- Cooper M. A., Adam R. D., Worobey M., Sterling Ch. R.** (2007) Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Current Biology* **17**: 1984–1988
- Cepička I., Kostka M., Uzlíková M., Kulda J., Flegr J.** (2008) Non-monophyly of Retortamonadida and high genetic diversity of the genus *Chilomastix* suggested by analysis of SSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**: 770–775
- Ekebom J., Patterson D. J., Vørs N.** (1996) Heterotrophic flagellates from coral reef sediments (Great Barrier Reef, Australia). *Archiv für Protistenkunde* **146**: 251–272
- HAMPL V., Horner D. S., Dyal P., Kulda J., Flegr J., Foster P. G., Embley T. M.** (2005) Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: Support for Metamonada and Excavata. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 2508–2518
- HAMPL V., Hug L., Leigh J. W., Dacks J. B., Lang B. F., Simpson A. G. B., Roger A. J.** (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *PNAS* **106**: 3859–3864

- Jedelský P. L., Doležal P., Rada P., Pyrih J., Šmíd O., Hrdý I., Šedinová M., Marcinčíková M., Voleman L., Perry A. J., Beltrán N. C., Lithgow T., Tachezy J.** (2011) The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS ONE* **6**: 17285
- Jiráková K., Kulda J., Nohýnková E.** (2012) How nuclei of *Giardia* pass through cell differentiation: Semi-open mitosis followed by nuclear interconnection. *Protist* **163**: 465–479
- Kabnick K. S., Peattie D. A.** (1990) In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Journal of Cell Science* **95**: 353–360
- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Méténier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyeretaillade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., El Alaoul H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivarés Ch. P.** (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**: 450–453
- Kolisko M., Silberman J. D., Cepicka I., Yubuki N., Takishita K., Yabuki A., Leander B. S., Inouye I., Inagaki Y., Roger A. J., Simpson A. G. B.** (2010) A wide diversity of previously undetected free-living relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. *Environmental Biology* **12**: 2700–2710
- Kolisko M., Cepicka I., Hampl V., Leigh J., Roger A. J., Kulda J., Simpson A. G. B., Flegr J.** (2008) Molecular phylogeny of diplomonads and enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin and HSP90 genes: Implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 205–218
- Kolisko M., Čepička I., Hampl V., Kulda J., Flegr J.** (2005) The phylogenetic position of enteromonads: a challenge for the present models of diplomonad evolution. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* **55**: 1729–1733
- Kulda J., Nohýnková, E.** (1978) Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In Kreier, J.P. (ed.) *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, Vol. **2**: 1–138
- Lahti C. J., D'Oliviera, Ch. E., Johnson, P. J.** (1992) β -Succinyl-Coenzyme a synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *Journal of Bacteriology* **174**: 6822–6830

- Lasek-Nesselquist E., Welch D. M., Thompson R. Ch. A., Steuart R. F., Sogin M. L.** (2009) Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 504–518
- Lindmark D. G., Müller M.** (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmatic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 7724–7728
- Logsdon J. M., Jr.** (2007) Evolutionary genetics: Sex happens in *Giardia*. *Current Biology* **18**: 66–68
- *Melkonian M., Reize I. B., Preisig H. R.** (1987) Maturation of a flagellum/basal body requires more than one cell cycle in algal flagellates: studies on *Nephroselmis olivacea* (Prasinophyceae). In Wiessner, W., Robinson, D. G., Starr, R. C. (eds) *Algal development: molecular and cellular aspects*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 102–113
- Melo S. P., Gómez V., Castellanos I. C., Alvarado M. E., Hernández P. C., Gallego A., Wasserman M.** (2008) Transcription of meiotic-like-pathway genes in *Giardia intestinalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro* **103**: 347–350
- Mi-ichi F., Yousuf M. A., Nakada-Tsukui K., Nozaki T.** (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *PNAS* **106**: 21731–21736
- Monis P. T., Andrews R. H., Mayrhofer G., Ey P. L.** (2003) Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution* **3**: 29–38
- Monis P. T., Andrews R. H., Mayrhofer G., Ey P. L.** (1999) Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1135–1144
- Morrison H. G., Roger A. J., Nystul T. G., Gillin F. D., Sogin M. L.** (2001) *Giardia lamblia* expresses a proteobacterial-like DnaK homolog. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 530–541
- Nohýnková E., Tůmová P., Kulda J.** (2006) Cell division of *Giardia intestinalis*: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryotic Cell* **5**: 753–761
- Park J. S., Kolisko M., Heis A. A., Simpson A. G. B.** (2009) Light microscopic observations, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Hicanonectes teleskopos* n. g.,

n. sp., a deep-branching relative of Diplomonads. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 373–384

Park J. S., Kolisko M., Simpson A. G. B. (2010) Cell morphology and formal description of *Ergobibamus cyprinoides n. g., n. sp.*, another *Carpediemonas*-like relative of Diplomonads. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **57**: 520–528

Philippe H., Germot, A. (2000b) Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: Long-branch attraction and models of sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 830–834

Philippe H., Lopez P., Brinkmann H., Budin K. Germot A., Laurent J., Moreira D., Müller M., Le Guyader H. (2000) Early-branching or fast evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions. *Proceedings of the Royal Society of London* **267**:1213–1221

Poxleitner M. K., Carpenter M. L., Mancuso J. L., Wang Ch.-J. R., Dawson S. C., Cande W. Z. (2008) Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science* **319**: 1530–1533

Ramesh M. A., Malik S.-B., Logsdon J. M., Jr. (2005) A phylogenomic inventory of meiotic genes: Evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology* **15**: 185–191

Robertson L. J., Hanevik K., Escobedo A. A., Mørch K., Langeland N. (2009) Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology* **26**: 75–82

Roger A. J., Simpson A. G. B. (2008) Evolution: Revisiting the root of the Eukaryote tree. *Current Biology* **19**: 165–167

Roger A. J., Svård S. G., Tovar J., Clark C. G., Smith M. W., Gillin F. D., Sogin M. L. (1998) A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 229–234

Siddall M. E., Hong H., Desser S. S. (1992) Phylogenetic analysis of the Diplomonadida (Wen yon, 1926) Brugerolle, 1975: Evidence for heterochrony in protozoa and against *Giardia lamblia* as a “missing link”. *Journal of Protozoology* **39**: 361–367

- Silberman J. D., Simpson A. G. B., Kulda J., Cepicka I., Hampl V., Johnson P. J., Roger A. J.** (2002) Retortamonad flagellates are closely related to Diplomonads—implications for the history of mitochondrial function in Eukaryote evolution. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 777–786
- Simpson A. G. B., Čepička I.** (2009) Amitochondriate protists (Diplomonads, Parabasalids and Oxymonads). In Schaechter, M. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Elsevier, 545–557
- Simpson A. G. B., Patterson D. J.** (1999) The ultrastructure of *Carpodiemonas membranifera* (Eukaryota) with reference to the "Excavate hypothesis". *European Journal of Protistology* **35**: 353–370
- Simpson A. G. B.** (2003) Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* **53**: 1759–1777
- Simpson A. G. B., Roger A. J., Silberman J. D., Leipe D. D., Edgcomb V. P., Jermini L. S., Patterson D. J., Sogin M. L.** (2002) Evolutionary history of “early-diverging” Eukaryotes: The Excavate taxon *Carpodiemonas* is a close relative of *Giardia*. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1782–1791
- Simpson A. G. B., Inagaki Y., Roger A. J.** (2005) Comprehensive multigene phylogenies of Excavate protists reveal the evolutionary positions of “primitive” Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 615–625
- Sogin M. L., Gunderson J. H., Elwood H. J., Alonso R. A., Peattie D. A.** (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: An unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**: 75–77
- Stechmann A., Hamblin K., Pérez-Brocal V., Gaston D., Richmond G. S., van der Giezen M., Clark C. G., Roger A. J.** (2008) Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* **18**: 580–585
- Tachezy J., Sánchez L. B., Müller M.** (2001) Mitochondrial rype iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1919–1928
- Takishita K., Kolisko M., Komatsuzaki H., Yabuki A., Inagaki Y., Cepicka I., Smejkalová P., Silberman J. D., Hashimoto T., Roger A. J., Simpson A. G. B.** (2012)

Multigene phylogenies of diverse *Carpodomonas*-like organisms identify the closest relatives of 'amitochondriate' diplomonads and retortamonads. *Protist* **163**: 344–355

Tovar J., León-Avila G., Sánchez L. B., Sutak R., Tachezy J., van der Giezen M., Hernández M., Müller M., Lucocq J. M. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**: 172–176

Tovar J., Fischer A., Clark C. G. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* **32**: 1013–1021

Tůmová P., Hofštetrová K., Nohýnková E., Hovorka O., Král J. (2007) Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma*: **116**: 65–78

Williams B. A. P., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. (2002) A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophota hominis*. *Nature* **418**: 865–869

Xu F., Jerlström-Hultqvist J., Andersson J. O. (2012) Genome-wide analyses of recombination suggest that *Giardia intestinalis* assemblages represent different species. *Molecular Biology and Evolution*, in press

Yu L. Z., Birky W. C., Jr., Adam R. D. (2002) The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryotic Cell* **1**: 191–199

Yubuki N., Inagaki Y., Nakayama T., Inouye I. (2007) Ultrastructure and ribosomal RNA phylogeny of the free-living heterotrophic flagellate *Dysnectes brevis* n. gen., n. sp., a new member of the Fornicata. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **54**: 191–200

Vysvětlivky: * značí sekundární citaci.