

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

**katedra parazitologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Marie Glavanakovová

**Metabolismus železa u améb**

Metabolism of iron in amoebas

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Praha 2015

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 08. 2015

Marie Glavanakovová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli Róbertu Šuťákovi za jeho obrovskou trpělivost, odborné rady a lidský přístup. Moje obrovské díky také patří všem členům laboratoře, kteří mě mezi sebe vřele přijali. Především děkuji Evě Nývltové a Janu Machovi za obrovskou pomoc při sestavování této práce. Děkuji katedře parazitologie za příležitost během studia. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým kamarádům za obrovskou podporu během studia.

## Abstrakt:

Feritiny jsou proteiny s komplexní strukturou důležité pro skladování a detoxifikaci iontů železa. Typicky jsou lokalizovány v cytoplazmě buněk; nicméně byly identifikovány i v mitochondriích a chloroplastech. Feritiny jsou rozšířeny napříč organismy, ale nejsou běžné u nefotosyntetizujících protist. Z tohoto důvodu je překvapivá přítomnost genu pro feritin v genomu volně žijící améby *Naegleria gruberi*. Bioinformatická analýza potvrzuje jeho zařazení mezi eukaryotické feritiny. Protein byl lokalizován v mitochondriích *N. gruberi* pomocí protilátek vytvořených v laboratorním potkanovi. Nativní exprimovaný rekombinantní protein bez mitochondriální presekvence byl použit pro *in vitro* pokusy. Podařilo se nám prokázat pomocí růstových experimentů, že je exprese feritinu závislá na koncentraci iontů železa v médiu; nicméně přímo prokázat schopnost vazby iontů železa *in vitro* se nám nepodařilo. Funkce feritinu *N. gruberi* je tedy pravděpodobně spjatá s metabolismem železa. Vedlejší experimenty se zabývaly dalším proteinem patřícím do rodiny feritinů – Dps proteinem u *Acanthamoeba castellanii*. I přes úspěšné vytvoření protilátek jsme nedokázali tento protein detekovat v celkovém lyzátu ani ve frakcích acanthamoeb, a to ani po navození stresových podmínek.

## **Abstract:**

Ferritins are complex protein structures for iron storage and detoxification. They are typically found in the cytoplasm of the cell; however, they were also identified in mitochondria and chloroplasts. They are distributed among all living organisms but uncommon in non-photosynthetic protists. Surprisingly, a ferritin gene was found in the genome of free-living amoeba *Naegleria gruberi*. Bioinformatic analysis confirms that it belongs to a group of eukaryotic ferritins. Upon creating antibodies in a laboratory rat, we localized the protein in mitochondria of *N. gruberi*. The native recombinant protein without the mitochondrial presequence was used for further *in vitro* experiments. Using growth experiments, we established that the expression of ferritin is dependent on a concentration of iron in cultivation media; however, we were not able to directly prove its ability to bind iron *in vitro*. We concluded that the function of the ferritin of *N. gruberi* is most likely related to metabolism of iron. Side experiments were focused on a different protein from the ferritin family – Dps protein in *Acanthamoeba castellanii*. Despite of a successful creation of antibodies, we were not able to detect the expression of protein neither in total cell lysates nor in subcellular fractions of acanthamoebas under regular or stress conditions.

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Literární přehled .....	2
2.1	Železo v biologických systémech a jeho vliv na život parazitických protist.....	2
2.2	Mechanismy využívané parazitickými protisty při získávání železa od hostitele .....	3
2.3	Proteiny skladující železo - feritiny .....	6
2.4	Metabolismus železa u vybraných zástupců améb .....	11
2.4.1	<i>Naegleria</i> .....	11
2.4.2	<i>Acanthamoeba</i> .....	14
2.4.3	<i>Entamoeba</i> .....	16
3	Cíle práce.....	20
4	Použité metody a materiály .....	21
4.1	Organismy a média .....	21
4.1.1	<i>Naegleria gruberi</i> .....	21
4.1.2	<i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	21
4.1.3	<i>Escherichia coli</i> .....	21
4.2	Plazmidy .....	22
4.3	Amplifikace genů.....	22
4.4	Klonování DNA fragmentů.....	23
4.5	Transformace <i>Escherichia coli</i> .....	24
4.6	Indukce exprese proteinu v <i>Escherichia coli</i> .....	24
4.7	Izolace rekombinantního proteinu afinitní chromatografií .....	25
4.8	Imunizace potkana a zpracování protilátek.....	26
4.9	Purifikace nativní formy proteinu .....	27
4.10	SDS-PAGE a western blot.....	27
4.11	Izolace celkové RNA z buněk <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	28
4.12	Přepis celkové RNA <i>Acanthamoeba castellanii</i> do cDNA .....	29
4.13	Frakcionace <i>Naegleria gruberi</i> , <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	29
4.14	Příprava preparátů <i>N. gruberi</i> pro fluorescenční mikroskopii .....	30
4.15	Měření růstových křivek <i>N. gruberi</i> .....	31

5	Výsledky.....	33
5.1	<i>Naegleria gruberi</i> .....	33
5.1.1	Bioinformatická analýza feritinu .....	33
5.1.2	Lokalizace feritinu .....	35
5.1.3	Mitochondriální targetovací sekvence proteinu feritin.....	36
5.1.4	Purifikace nativní formy feritinu .....	37
5.1.5	Růstové experimenty .....	38
5.1.6	Expres feritinu v závislosti na podmínkách růstu.....	41
5.2	<i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	42
5.2.1	Bioinformatická analýza Dps .....	42
5.2.2	Izolace cDNA genu pro Dps <i>A. castellanii</i> .....	42
5.2.3	Protilátky a navození stresových podmínek .....	43
6	Diskuze .....	45
7	Závěr.....	48
8	Seznam použité literatury .....	49

# 1 Úvod

Již mnoho let bylo věnováno studiu chemických vlastností a biochemických drah spojených s jedním z esenciálních prvků metabolismu většiny organismů - železa. V současné době disponujeme značným množstvím informací o tomto prvku z hlediska jeho interakcí - víme, že se účastní mnoha oxidačně-redukčních reakcí, které jsou nezbytné pro přežití takřka všech organismů. Víme, že ho nalezneme ve struktuře mnoha významných enzymů, známe proteiny účastníci se jeho příjmu a v neposlední řadě známe velmi dobře i jeho chemické vlastnosti. Co bylo také prokázáno, je i odvrácená stránka tohoto prvku v organismu. Velké úskalí tkví v jeho schopnosti účastnit se i reakcí vedoucí k produkci toxických reaktivních molekul kyslíku, a tak paradoxně poškodit významné struktury jako fosfolipidové membrány, proteiny či DNA (Crichton, R. *et al* 2001).

Na význam železa pro růst a nezbytné fyziologické procesy se zaměřilo značné množství experimentů zkoumající možnost využít tento prvek jako místo zásahu léčby některých parazitárních infekcí. Životní strategie těchto organismů je především množit se a kolonizovat. Existují experimentární data, která dokazují, že železo je limitujícím faktorem pro některé patogenní organismy a jeho nedostatek významně ovlivňuje jejich schopnost infekce (např. Pollack, S. *et al.* 1987; Kulda, J. *et al.* 1999; Malafaia, G. *et al.* 2011).

Tato práce se zaměřuje na roli železa v biologických systémech s ohledem na parazitická protista a jim příbuzné organismy a proteiny sloužící ke skladování iontů železa. V centru našeho zájmu jsou améby, které jsou obligátní či oportunní parazité člověka. Jedná se konkrétně o protista rodu *Naegleria*, *Acanthamoeba* a *Entamoeba*. Literárním přehled si dává za cíl shrnout poznatky o využití železa těmito organismy. Dále detailně pojednává o proteinech z rodiny feritinů, které jakožto skladovací proteiny hrají nezbytnou úlohu v udržení homeostáze a detoxifikaci železa uvnitř buněk (Crichton, R. *et al* 2001). Tyto proteiny o komplikované struktuře byly identifikovány napříč organismy od bakterií, přes rostliny až po živočichy. Najdeme je jak v cytosolu, tak i v buněčných organelách - mitochondriích a plastidech. Obvykle ale nejsou k nalezení u heterotrofních jednobuněčných eukaryotických organismů. Námi studovaný organismus, *Naegleria gruberi* je však zástupce, u kterého jsme feritin identifikovali, určili buněčnou lokalizaci a prostudovali závislost jeho exprese na přítomnosti železa, jak je popsáno v experimentální části práce. Vedlejší pokusy byly zaměřeny na Dps protein, který také patří do rodiny feritinů, a který jsme identifikovali u améby *Acanthamoeba castellanii*.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Železo v biologických systémech a jeho vliv na život parazitických protist

Železo je bezpochyby jeden z nejvýznamnějších prvků na Zemi a jeden z esenciálních prvků metabolismu aerobních i anaerobních organismů. Vzhledem k vhodným chemickým vlastnostem došlo k velkému rozšíření tohoto prvku napříč organismy. Po chemické stránce může nabývat mnoha oxidačních stupňů, z čehož nejvýznamnější jsou železité a železnaté ionty. V biologických systémech se jako aktivní forma železa nejvíce uplatňuje  $\text{Fe}^{2+}$ , naproti tomu ionty  $\text{Fe}^{3+}$  jsou hlavní dostupnou formou železa v aerobním prostředí. Jakožto součást hemu, železo-sírných klastrů anebo přímo vázaný v proteinech, podílí se tento kov na funkcích jako roznos kyslíku, energetický metabolismus mitochondrií, transport elektronů či syntéza DNA a RNA (Crichton, R. *et al.* 2001). Nelze nezmínit ani odvrácenou stránku reaktivity tohoto kovu, zapojuje se totiž do reakcí generující tzv. ROS, neboli reaktivní kyslíkové radikály, a to například prostřednictvím Fentonovy reakce ((i)  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ , (ii)  $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HOO}\cdot + \text{H}^+$ ) (Fenton, H. 1894). Tyto molekuly poté mohou způsobovat poškození na úrovni proteinů, mastných kyselin v plazmatické membráně či modifikace DNA.

Vzhledem k tomu, jak zásadní hraje železo roli pro chod normálních buněk, je zajímavé podívat se na jeho metabolismus v buňkách parazitických organismů. Životní strategie těchto organismů je, vzhledem ke schopnosti rychlé reprodukce, velmi náročná na živiny získané od jejich hostitele. Jako jeden ze zásadních prvků pro přežití a virulenci se ukázalo být právě železo (Sutak, R. *et al.* 2008).

Existuje mnoho studií věnující se vlivu nadbytku či nedostatku železa na růst a vývoj některých významných parazitických protist. Tyto pokusy jasně dokazují, že železo může být v praxi označeno za faktor virulence. Tento efekt byl popsán například u původců malárie, protist rodu *Plasmodium*, kde látky zvané chelátory se schopností specificky vázat železo, snižují růst, potažmo virulenci (Pollack, S. *et al.* 1987; Cabantchik, Z. I. *et al.* 1999; Walcourt, A. *et al.* 2004; Ferrer, P. *et al.* 2012). Obdobné výsledky zaznamenaly experimenty zkoumající vliv koncentrace železa i u jiných významných parazitů, například u zástupců rodu *Leishmania* (Soteriadou, K. *et al.* 1995; Malafaia, G. *et al.* 2011), *Trypanosoma* (Merschjohann, K. *et al.* 2006; Arantes, J. M. *et al.* 2011) či *Trichomonas* (Ryu, J. S. *et al.*



2001) a *Tritrichomonas* (Kulda, J. *et al.* 1999). Chelatační látky způsobující deprivaci železa v médiu tak mají vysoký potenciál stát se novým terapeutickým prostředkem či fungovat v kombinaci s již osvědčenými léky. Je tedy nasnadě rozšířit naše znalosti v této oblasti interakcí mezi hostiteli a parazity a osvětlit nutriční nároky, metabolické dráhy s nimi spojené a konkrétní molekuly do těchto dějů zapojené u významných parazitických protist.

## 2.2 Mechanismy využívané parazitickými protisty při získávání železa od hostitele

Jak bylo zmíněno výše, železo je pro některá parazitická protista jedním z esenciálních prvků jejich růstu a virulence. Jednou z efektivních strategií boje proti těmto patogenům je regulace extracelulární koncentrace železa savčími buňkami, která je udržována na co nejnižší úrovni (Kehl-Fie, T. E. *et al.* 2010). Slouží k tomu proteiny jako transferin a jemu podobné molekuly.

Transferiny jsou proteiny z rodiny glykoproteinů, mezi něž patří například transferin (Tf), laktoferin (Lf), melanotransferin a ovotransferin. Jejich velikost je typicky okolo 80 kDa a skládají se z polypeptidového vlákna tvořící dvě homologní domény (tzv. C- a N-terminální laloky). Jsou schopny s vysokou afinitou vázat trojmocné ionty železa. Jejich role v organismech je u všech typů transferinů především kontrola dostupnosti železa (Baker, E. N. 1994). Tato jejich funkce je důležitá pro detoxifikaci volných atomů železa, a tím pádem ochranu před vznikem volných kyslíkových radikálů. Do buněk se ionty železa dostávají pomocí receptory zprostředkované endocytózy (Kühn, L. C. *et al.* 1984). Zásadní role transferinů v séru je transport iontů železa. Však neméně podstatný je také jejich význam v přirozené imunitě savců. Například u Lf, který je produkován epiteliálními buňkami sliznic, jsou dobře známy i jeho protizánětlivé a protinádorové vlastnosti a antimikrobiální účinek. Mechanismus poslední zmiňované charakteristiky se děje buďto přímou interakcí pozitivně nabitých aminokyselin Lf s molekulami na površích bakterií, virů, hub či některých parazitů, anebo nepřímo přes snižování koncentrace volných iontů železa v místech infekce (González-Chávez, S. A. *et al.* 2009).

Z těchto charakteristik je patrné, že transferiny hrají podstatnou roli pro hostitelské organismy v udržení nízkých koncentrací iontů železa v prostředí, a že mají také obrannou funkci proti některým parazitům. V *in vitro* studiích byl prokázán efekt Lf na intracelulární růst *Toxoplasma gondii* (Dzitko, K. *et al.* 2007), *Babesia caballi* (Ikadai, H. *et al.* 2005),

či jeho schopnost fatálně poškodit membrány trofozoitů *Entamoeba histolytica* (León-Sicaireo, N. *et al.* 2006).

Častou odpovědí parazitických protist na tuto strategii hostitele je exprese specifických povrchových receptorů pro Tf nebo Lf. Lf je potenciálním zdrojem železa pro *Tritrichomonas foetus* (Tachezy, J. *et al.* 1996) či *Entamoeba histolytica* (viz podrobněji kapitola 2.4.3; León-Sicaireo, N. *et al.* 2005). Tf je významný pro *Trypanosoma brucei* (Ligtenberg, M. J. *et al.* 1994), kde je vychytáván specifickými receptory a následně endocytován do buňky. Tyto kroky jsou podobné mechanismu, který uplatňují i savčí buňky, nicméně je zdě několik významných rozdílů. Receptory *Trypanosoma brucei* se výrazně liší nejenom v jejich počtu exprimovaných na povrchu buňky, ale také ve své struktuře. Mechanismus samotného procesu je také rozdílný. U trypanosom je komplex receptor-transferin nejprve disociován v endosomech a posléze transferin proteolyticky degradován v lysozomu, kdežto receptor je navrácen zpět na povrch. Naproti tomu je u savčích buněk uvolňováno pouze transferinové železo, přičemž komplex receptor-transferin je recyklován (Steverding, D. *et al.* 1995).

Další využívanou možností je příjem železa v jeho redukované formě železnatých iontů. K tomuto využívají například *Tritrichomonas foetus* okyselení jejich mikroprostředí a redukcí železa navázaného v nízkomolekulárních látkách anebo v transferinu (Tachezy, J. *et al.* 1996, 1998). Tato strategie byla identifikována také u *Leishmania chagasi*, kde ale hraje roli aktivita NADPH-reduktázy (Wilson, M. E. *et al.* 2002). Oba tyto modely vedou k redukcí železa navázaného v extracelulárních proteinech hostitele, čímž se sníží jeho afinita k těmto molekulám a železo se tak stává dostupnější pro příjem parazity. U *Leishmania amazoniensis* byly pak identifikovány specifické, pro přežití naprosto nezbytné transportéry železnatých iontů, které exprimuje uvnitř makrofágů (Huynh, C. *et al.* 2006). Redukční mechanismus příjmu iontů železa je znám také u procyklických forem *Trypanosoma brucei* (Mach, J. *et al.* 2013).

Další významnou skupinou proteinů sloužící jako zdroj železa pro některé mikroorganismy jsou hemoproteiny, v nichž jsou ionty železa navázány na čtyři atomy dusíku do molekuly hemu (protoporfyrinu IX). Inkorporaci iontů železa do molekuly protoporfyrinu zprostředkovává v mitochondrii enzym ferochelatáza (Jones, M. S. *et al.* 1969), naopak jeho uvolnění z hemu je katalyzováno hemoxygenázou, která štěpí molekulu protoporfyrinu (Tenhunen, R. *et al.* 1968). Hemoproteiny mají pro hostitele obecně mnoho esenciálních funkcí v organismu. Jejich nejvýznamnější úlohou je bezpochyby roznos kyslíku

(hemoglobin, myoglobin), dále jsou součástí enzymů (peroxidázy, oxidázy) a v neposlední řadě také slouží jako přenašeče elektronů (cytochromy) (Williams, R. J. 1985). Některá protista jsou schopna tyto proteiny, anebo produkty jejich degradace, štěpit a využívat jako zdroj iontů železa. U zástupců rodu *Tritrichomonas* je známo, že přijímají produkty rozkladu hemoglobinu – hemin (Sutak, R. *et al.* 2004). Činí tak i *Leishmania* (Carvalho, S. *et al.* 2009), která je ale mimo to schopna specificky vázat i celou molekulu hemoglobinu a tu následně přijímat pomocí receptorem řízené endocytózy (Wilson, M. E. *et al.* 2002). Molekuly hemoglobinu slouží jako zdroj železa také pro *Entamoeba histolytica* (viz kapitola 2.4.3). U zástupců rodu *Plasmodium* výsledky recentních studií nenaznačují, že by disponovali prostředky, jak enzymaticky hem degradovat (Sigala, P. A. *et al.* 2012), a to i přes to, že se část svého životního cyklu nachází přímo v červené krvi.

Je také známo, že mikroorganismy produkují nízkomolekulární látky, které s vysokou afinitou a specificitou váží železité ionty z nehemových zdrojů železa. Tyto látky jsou nazývané siderofory a jsou běžně známé u bakterií a hub (Hider, R. C. *et al.* 2010). U protist, není zatím znám jediný zástupce schopný tyto látky produkovat. Nicméně bylo prokázáno, že siderofory mohou sloužit jako zdroj železa pro *Tritrichomonas foetus* (Sutak, R. *et al.* 2004). Toto se zdá být fyziologicky relevantní informace v tom smyslu, že *T. foetus* obývá prostředí urogenitálního traktu, kde se mohou vyskytovat mikroorganismy schopné produkce těchto látek.

## 2.3 Proteiny skladující železo - feritiny

Intracelulární zásoby železa hrají neméně podstatnou roli v interakci mezi hostiteli a parazity, a to zejména těmi vnitrobuněčně lokalizovanými. V případě, kdy dojde k destrukci buněk a vylití jejich obsahu, by se také mohlo jednat potenciálně o zdroj železa pro extracelulárně se vyskytující parazity. Řeč je zde o příjmu iontů železa z feritinu, který je detailně popsán dále, nebo z tzv. „labile iron pool“ (LIP), což je přechodně se vyskytující zásoba železa v cytosolu buněk. LIP je zásobárna dobře chelatovatelných, oxido-redukčně aktivních iontů železa a slouží jako křižovatka mezi příjmem extracelulárního železa a jeho asociací s cytosolickými proteiny (Kakhlon, O. *et al.* 2002).

Pro udržení homeostáze železa v buňce je velmi důležité disponovat mechanismy, jak přebytečné železo uskladnit pro jeho opětovné využití. Vzhledem k toxicitě volného železa je nezbytné zajistit jeho detoxifikaci. Pro tyto účely využívá většina buněk napříč eukaryotickou a prokaryotickou říší proteiny zvané feritiny, resp. feritin-like proteiny. Proteiny patřící mezi feritiny rozděluje Crichton, R. *et al.* (2001) do těchto podskupin:

- (i) feritin neobsahující hem – eukaryotický a bakteriální
- (ii) bakterioferitin – obsahující hem
- (iii) feritin-like proteiny

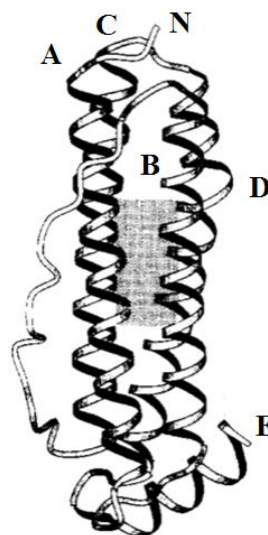
Struktura feritinů je vysoce konzervovaná (Harrison, P. M. *et al.* 1996). Nejlépe prostudovanou formou je cytosolický eukaryotický feritin. Skládá se ze dvou podjednotek H a L, přičemž každý typ je zodpovědný za jiný proces. H-podjednotka vykazuje feroxidázovou aktivitu a je tedy zodpovědná za oxidaci  $Fe^{2+}$  na nesolubilní  $Fe^{3+}$  (Lawson, D. M. *et al.* 1989). L-typ se podílí především na krystalizaci železitého jádra uvnitř molekuly (Wade, V. J. *et al.* 1991). Na vzniku celého proteinu, který se u eukaryot skládá z 24 nekovalentně vázaných podjednotek, se většinou podílí oba typy; heteropolymery jsou biologicky preferovány (Santambrogio, P. *et al.* 1993), jelikož kooperace obou podjednotek vede k efektivnějšímu ukládání železa (Levi, S. *et al.* 1992). Můžeme se ale setkat i s homopolymery, a to především u feritinu v mitochondriích (podrobněji viz níže; Levi, S. *et al.* 2001) anebo také v patologických případech, jako je například dědičné onemocnění HHCS (hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome; Levi, S. *et al.* 1998). Také zastoupení z hlediska H:L poměru záleží na konkrétním orgánu. Například v srdci a mozku, kde je důležitá především účinná detoxifikace železa, nalezneme feritiny složené až ze 2/3

z H-podjednotek. Oproti tomu v játrech a slezině, které slouží jako zásobárny železa, bude dominovat především L-typ podjednotky, a to až z 90% (Arosio, P. *et al.* 1978).

Regulace feritinu je v organismu zajištěna posttranskripčně, tzv. IRE/IRP systémem a již dlouho je známo, že je přímo vázána na hladinu intracelulárního železa (Drysdale, J. W. *et al.* 1966). mRNA feritinu (H- i L-podjednotek) obsahuje konzervované strukturní motivy známé jako IRE (iron responsive elements; Stevens, P. W. *et al.* 1987). V buňkách, kde je nedostatek železa, je toto místo rozpoznáno regulačními proteiny IRP1 a IRP2, které se sem s vysokou afinitou váží a inhibují translaci mRNA feritinu tím, že zablokují připojení ribosomu k mRNA. V opačném případě, kdy má buňka železa dostatek, IRP se na mRNA neváží, a tím se zpřístupní mRNA pro translaci (Caughman, S. W. *et al.* 1988). Ve výše zmíněných patologických případech, u HHCS, může docházet k mutacím v IRE sekvencích v mRNA pro L-podjednotku. Výsledkem je kontinuální a na železe nezávislá exprese L-podjednotek. Následné feritiny jsou sestaveny pouze z těchto podjednotek a u takto postižených jedinců to může vést až k anémii vzhledem k nedostatku železa v organismu (Girelli, D. *et al.* 1995).

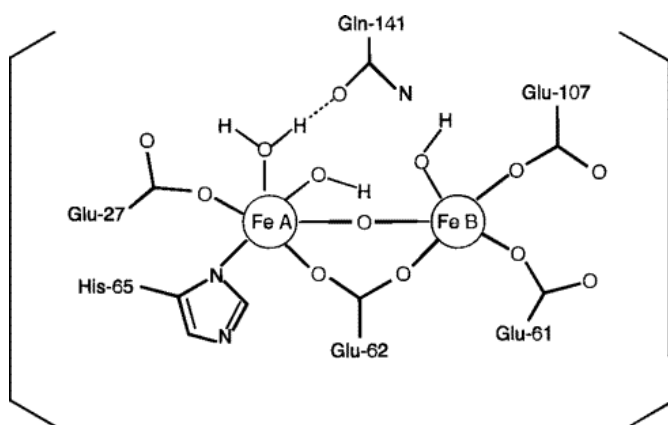
Struktura každé podjednotky, jak je znázorněno na obrázku č. 1, čítá centrální svazek čtyř paralelních a antiparalelních helixů (A-D) a jeden pátý (E), krátký mezi dvojicí z nich (Hempstead, P. D. *et al.* 1997). Důležitý je ze struktury přesahující N-terminální konec proteinu, který se účastní řady intra- i inter-podjednotkových interakcí a může obsahovat tzv. targetovací sekvence, které po rozpoznání směřují molekulu do specifických kompartmentů, např. do mitochondrií (Levi, S. *et al.* 2001) či plastidů u rostlin (Lobreaux, S. *et al.* 1992). Další důležitou oblastí podjednotky je její centrální hydrofilní část (viz obrázek č. 1), která je u H-podjednotek místem feroxidázové aktivity a u L-podjednotek se zde vyskytují solné můstky, které přispívají ke stabilitě proteinu (Lawson, D. M. *et al.* 1991).

Jak bylo řečeno, zásadním rozdílem mezi H- a L-typem je v tom, že L-podjednotky postrádají feroxidázovou aktivitu. Je to způsobeno nahrazením specifických konzervovaných aminokyselin v aktivním místě H-podjednotek, které se vyskytují v hydrofilní části každé podjednotky. U H-typu najdeme koordinovanou skupinu Glu-27, Glu-62, His-65 a Glu-107



**Obrázek č. 1:** Diagram H-podjednotky lidského feritinu. A-E označují helixy, N poté N-terminální konec proteinu. Šrafování vyznačuje centrální hydrofilní oblast. (Harrison, P. M. *et al.* 1996)

sloužící jako ligand kovových iontů (Lawson, D. M. *et al.* 1989). Tato skupina tvoří



**Obrázek č. 2:** Schématické znázornění binukleárního centra H-podjednotky lidského ferritinu (podle Harrison, P. M. *et al.* 1996).

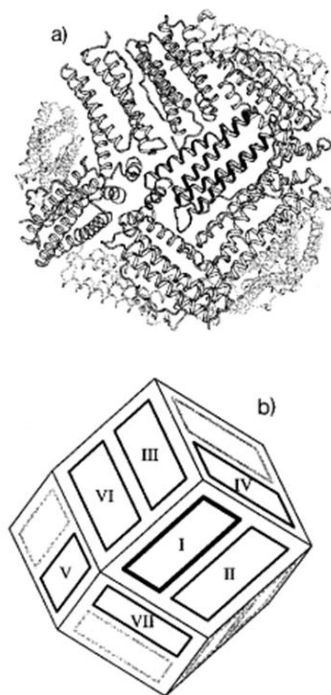
binukleární centrum feroxidázové aktivity, kde se nachází dvě vazebná místa pro ionty železa (místo A a B; viz obrázek č. 2). Výše zmíněná residua (vyjma Glu-107, které se u bakterioferitinů liší) společně s Gln-141 jsou vysoce konzervovaná napříč nehemovými ferritiny a bakterioferitiny (Crichton, R. *et al.* 2001). V lidském

L-typu je toto místo inaktivováno substitucí Glu-27 za Tyr, Glu-62 za Lys a His-65 za Gly

(Levi, S. *et al.* 1988). Dalším významným rozdílem ve funkcích a ve struktuře je, že u L-podjednotek se na vnitřní straně molekuly vyskytuje skupina čtyř karboxylových aminokyselin (4 x Glu), které díky svému negativnímu náboji přispívají ke tvorbě parakrystalického jádra. U H-podjednotek jsou pouze dvě takto nabitá rezidua, která nalezneme v blízkosti feroxidázového centra. Toto je velmi důležité pro H-homopolymery (například mitochondriální ferritiny), u nichž je nedostatek karboxylovaných reziduí kompenzován blízkostí Glu-61, které tak mohou přispívat k přenosu  $Fe^{3+}$  a tedy tvorbě jádra bez přítomnosti L-podjednotek (Chasteen, N. D. *et al.* 1999).

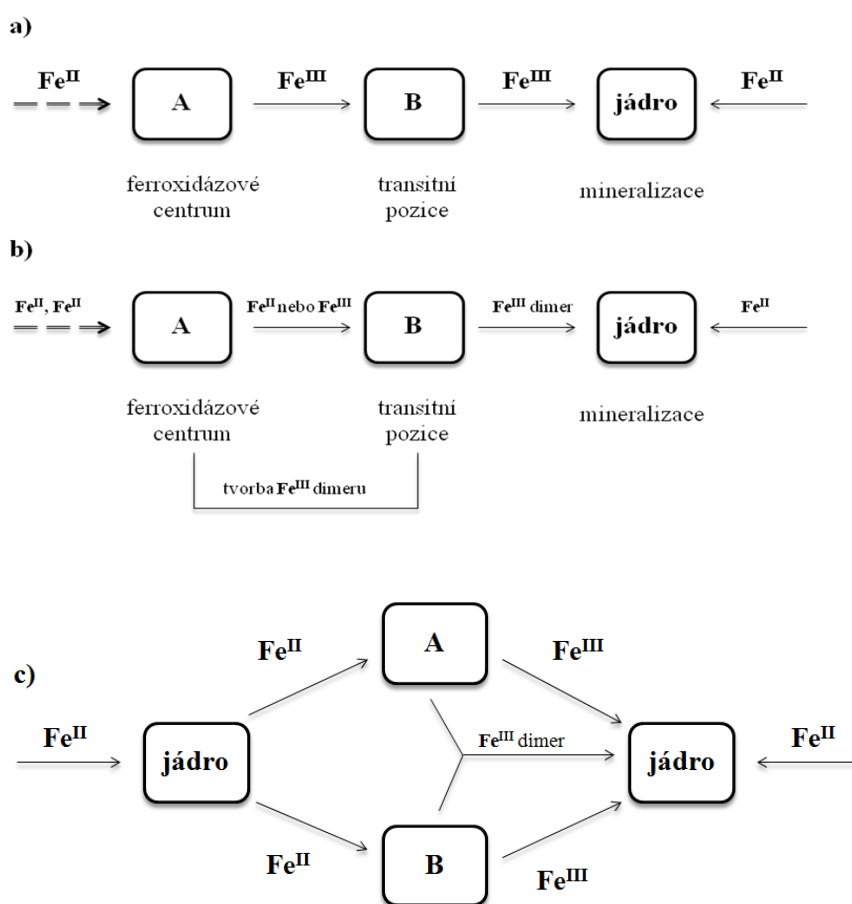
Po správném poskládání podjednotek, které probíhá spontánně (Zhang, Y. *et al.* 2011), vzniká stabilní, velice dobře organizovaná struktura o velikosti zhruba 500 kDa podobná kleci, ve které je možné uskladnit až 4 500 atomů železa. Na terciární struktuře je patrná symetrie a obrázek č. 3 dokumentuje interakce jednotlivých podjednotek (Hempstead, P. D. *et al.* 1997).

Proces inkorporace železa do molekuly ferritinu probíhá v několika krocích. Nejprve se musí železnaté ionty dostat



**Obrázek č. 3:** (a) Celkový pohled na molekulu ferritinu (pro přehlednost pouze polovina) odhalující pozici jednotlivých symetrických podjednotek; (b) Schématické znázornění jednotlivých podjednotek a jejich interakce s ostatními. (Hempstead, P. D. *et al.* 1997)

do molekuly feritiny, aby mohly být zoxidovány. Místo oxidace leží na vnitřní straně podjednotky (myšleno vzhledem ke složené molekule), 7 – 10 Å od povrchu (celková tloušťka povrchu je okolo 24 Å). Jak se zdá, železité ionty komunikují s vnitřní i vnější stranou proteinu pomocí úzkých kanálků uvnitř podjednotek (Lawson, D. M. *et al.* 1989). Po tomto kroku migrují do samotného jádra proteinu (Bauminger, E. R. *et al.* 1991a). To, že se oxidace děje blíže povrchu podjednotky dokumentuje i fakt, že si molekuly feritiny mohou mezi sebou  $\text{Fe}^{3+}$  předávat (Bauminger, E. R. *et al.* 1991b). Shrnutí možných cest železnatých iontů je znázorněno na obrázku č. 4.



**Obrázek č. 4:** Schematické znázornění možných kroků spojených s formováním železitého jádra uvnitř feritinu. Ionty železa se mohou dostávat do jádra různými cestami. Přerušované šipky naznačují cestu iontů skrze ferroxidázové centrum podjednotky (místo A a místo B, viz obrázek č. 2). Jednoduché šipky pak alternativní cestu, jako například skrze hydrofilní kanál. Schéma a):  $\text{Fe}^{\text{II}}$  vstupuje do molekuly skrz kanál mezi podjednotkami a je oxidováno v místě A. Poté se přesouvá do jádra přes místo B. Schéma b): Další možnost oxidace  $\text{Fe}^{\text{II}}$  v místě A a B pomocí jedné molekuly  $\text{O}_2$ . I přesto, že existují data o pohybu  $\text{Fe}^{\text{III}}$  jako dimeru, alternativně může docházet k jeho rozpadu a přenosu monomerů do jádra. Schéma c) ukazuje možnost vstupu iontů železa například přes hydrofilní kanál do jádra a až poté jejich pohyb do místa ferroxidázové aktivity. Ionty pak mohou odcházet do jádra jako  $\text{Fe}^{\text{III}}$  atomy nebo jako dimery. Všechna tři schémata naznačují možnost vstupu železnatých iontů do jádra bez jejich předešlé oxidace (šipky zprava). Ty jsou pak v přítomnosti již utvořeného ferrihydrátového jádra přímo oxidovány na jeho povrchu. (podle Bauminger, E. R. *et al.* 1991a)

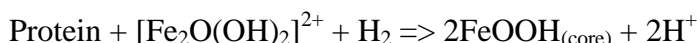
Při uskladnění železa v jádru proteinu dochází k tvorbě parakrystalického jádra za vzniku ferrihydritových krystalů. Celý proces by se dal chemicky vyjádřit ve dvou krocích (Yang, X. *et al.* 1998):

- a. oxidace a hydrolyza v místě feroxidázové aktivity



kde  $[\text{Fe}_2\text{O}(\text{OH})_2]^{2+}$  reprezentuje hydrolyzované dinukleární  $\text{Fe}^{3+}$  centrum v místě feroxidázové aktivity (feroxidázový komplex)

- b. přenos železa do jádra mineralizace



Jakmile jádro dosáhne >100 atomů železa, oxidace a hydrolyza probíhá alternativní cestou na samotném povrchu rostoucího jádra.

- c.  $4\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 4\text{FeOOH}_{(\text{core})} + 8\text{H}^+$

I přesto, že *in vitro* reaguje  $\text{Fe}^{2+}$  s molekulou feritinu přímo, mechanismus, kterým se *in vivo* železo do molekuly dostává, je pravděpodobně komplexnější děj. Byly nalezeny molekuly, v jejichž přítomnosti se výrazně zvyšuje ukládání železa, například lidský PCBP1 (Poly r(C)-Binding Protein 1), který je běžným RNA-vázajícím proteinem v savčích buňkách. Experimenty ukázaly, že buňky, které PCBP1 neexprimovaly vykazovaly vysoký nárůst koncentrace železa v cytosolu a inhibici jeho ukládání do feritinu (Shi, H. *et al.* 2008). Dá se tedy uvažovat, že feritiny vyžadují *in vivo* molekuly typu chaperonů pro efektivní ukládání železa.

Jak ale dochází k následné mobilizaci takto uskladněného železa není zatím příliš objasněné. *In vitro* studie ale naznačují možné cesty iontů železa ven z feritinu. Děje se tak buďto v proteasomu anebo uvnitř lysozomu. Oba procesy mohou být indukovány chelatačními látkami, které snižují koncentraci železa (De Domenico, I. *et al.* 2009; Zhang, Y. *et al.* 2010). Jak tomu ale opravdu je za fyziologických podmínek, je stále nejasné.

Mitochondriální feritin (MtF) je podstatný pro homeostázi železa uvnitř tohoto kompartmentu. Jak je známo, nachází se zde velké množství železa pro potřebu syntézy hemu či železosirných klastrů (Ponka, P. *et al.* 1997; Lill, R. *et al.* 2000). MtF jsou kódovány jedním genem. Jsou to homopolymery složené z H-podjednotek o velikosti 30 kDa se signální sekvencí, která je po transportu do matrix mitochondrie odštěpena. Vzniklé 22kDa podjednotky jsou schopné se poskládat do klasické struktury feritinu (Levi, S. *et al.* 2001). Jak bylo osvětleno výše, feroxidázová aktivita H-podjednotek tak zajišťuje i následnou inkorporaci železa do MtF (Corsi, B. *et al.* 2002).



Bakterioferitin byl poprvé izolován z gram-negativní bakterie *Azotobacter vinelandii*. Jeho podobnost s klasickými feritiny naznačovala molekulární hmotnost, aminokyselinové složení, velikost a tvar a také tvorba železitého jádra (Bulen, W. A. *et al.* 1973). V čem se ale zásadně liší je kromě rozšíření také přítomnost hemových skupin v jeho struktuře (Yariv, J. *et al.* 1981). Bakterioferitiny jsou evolučně příbuzné feritinům, ze sekvenční podobnosti se dá usuzovat, že se pravděpodobně vyvinuly ze stejného ancestrálního proteinu bakterií (Andrews, S. C. *et al.* 1991).

Do poslední skupiny feritinů, tzv. ferritin-like proteinů patří Dps proteiny (DNA-binding protein from starved cells). Skládají se oproti klasickým feritinům pouze z 12-ti podjednotek, které jsou navíc strukturně odlišné, nenajdeme zde totiž E helix (Grant, R. A. *et al.* 1998). Stále si ale zachovali schopnost vázat železo, oxidovat ho a tvořit krystalické jádro uvnitř poskládaného proteinu (Zhao, G. *et al.* 2002). Nicméně jeho role není ani tak skladovací, jako spíše protekční. Právě zamezení přístupu volných iontů železa k samotné DNA slouží jako ochrana před jejím poškozením. Dále jsou tyto proteiny schopné DNA nespecificky vázat a tím v podstatě mechanicky zabránit jejímu štěpení v místech narušení kyslíkovými radikály (Martinez, A. *et al.* 1997). Tvorba komplexu Dps-DNA se ale ukázala jako ne nutně nezbytná v *in vitro* studiích při zachování detoxifikační funkce (Ceci, P. *et al.* 2003).

Feritiny hrají podstatnou roli pro většinu organismů od bakterií, přes rostliny až po živočichy, což indikuje jejich význam v metabolismu železa a potenciálně ho staví do role esenciálního proteinu aerobního metabolismu. Nicméně co se týče parazitických protist, staví nás dnešní poznatky před menší záhadu. U většiny zástupců parazitických protist, nebo u kvasinek, nebyl feritin vůbec nalezen (Sutak, R. *et al.* 2008).

## **2.4 Metabolismus železa u vybraných zástupců améb**

### **2.4.1 *Naegleria***

Zástupci rodu *Naegleria* (třída Heterolobosea) jsou kosmopolitně se vyskytující améboflageláti, které najdeme ve sladkých vodách, a půdě všech kontinentů. *Naegleria gruberi*, nejlépe studovaný zástupce tohoto rodu, je pozoruhodným eukaryotem, který je význačný po stránce evoluční, biochemické i biomedicínské. Vzhledem k tomu, že je to volně žijící protist a zároveň je blízce příbuzný s vysoce patogenním druhem *Naegleria fowleri*

způsobující primární mozkovou meningoencefalitidu (PAM) s obvykle fatálním průběhem (Butt, C. G. 1966; Heggie, T. W. 2010), je *Naegleria gruberi* velice dobrým laboratorním modelem.

Přestože byla protista rodu *Naegleria* studována po stránce morfologické či ekologické již více než jedno století, experimentální data vypovídající o jejich biochemické kapacitě téměř zcela chybí. Teprve v posledních letech se díky novým přístupům dostáváme i ‘pod pokličku’ dějům na úrovni jejich metabolismu. V roce 2010 se L. K. Fritz-Laylin a kolektivu podařilo kompletně osekvenovat genom volně žijícího zástupce *Naegleria gruberi*, což přineslo obrovský posun v rozkrývání nejen komplexity tohoto organismu po stránce molekulární, ale také evoluce eukaryot jako takových. Z hlediska jejich metabolismu je analýza 15 727 protein-kódujících genů významná proto, že mimo jiné indikuje schopnost naeglerií využívat jak aerobní, tak i anaerobní metabolické pochody (Fritz-Laylin, L. K. *et al.* 2010).

I přes fakt, že pro laboratorní účely jsme schopni již mnoho let kultivovat *N. gruberi* (kmen NEG-M) v axenické kultuře, v přirozeném vodním či půdním prostředí se naeglerie živí fagocytováním bakterií ze svého okolí (Fulton, C. 1970). Tento fakt dokládá i identifikace etherázy (Veiga-da-Cunha, M. *et al.* 2009) - jednoho z enzymů potřebných pro degradaci buněčné stěny bakterií. Co se ale týče nutričních nároků na železo, nejsou dostupné informace nijak jasné. Víme, že některé mikrobiální chelatační látky, která váží železo a běžně se vyskytující v přírodě, mají inhibiční efekt na patogenní *N. fowleri* (Newsome, A. L. *et al.* 1983). Experimenty s kultivačními médii ukazují, že přidání porfyrinů s navázaným železem (hemin, hematin) mohou zvyšovat resistenci buněk *N. fowleri* k lyzi komplementu, stejně tak jako jejich patogenitu v myších (Bradley, S. D. *et al.* 1996). Dnes se běžně *N. gruberi* kultivuje v M7 médiu (Fulton, C. 1974), kde díky přidání hovězího séra a kvasinkového extraktu není jasně definovaná koncentrace železa.

Jak bylo zmíněno výše, narážíme při bližším popisu procesů spojených s utilizací železa na úskalí nedostatku experimentálních dat. Jen několik málo teoretických možností se nám dostává při prohledávání genomové databáze (<http://genome.jgi-psf.org/Naegr1/Naegr1.home.html>, [vid. 2015-03-11; 2015-06-06]). V genomu se nachází několik proteinů/enzymů, které mají své homology v kvasinkách a podílejí se na transportu železa. U *Saccharomyces cerevisiae* je například znám výskyt ferireduktázy (Fre1, Fre2), transmembránového enzymu, který redukuje extracelulární železité komplexy na jejich dvojmocné ionty (Dancis, A. *et al.* 1992). V genomu naeglerie byl nalezen homolog

ferireduktázy (Protein ID: 67431 – cytochrom b561 / ferric reductase). Kvasinky využívají také multi-copper feroxidázu (Fet3), která v komplexu s permeázou (Ftr1) zajišťuje nejprve oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ , a poté jejich transport do buňky (Askwith, C. *et al.* 1994). U naeglerie byl Fet3 v databázi identifikován (Protein ID: 79419 – multicopper oxidase, type 1; putative ferroxidase), Ftr1 však zatím identifikován v genomu nebyl. Transport iontů železa do mitochondrie zajišťuje u *S. cerevisiae* mimojiné přenašeč Mrs3 (Mühlenhoff, U. *et al.* 2003). Sekvence genu pro tento transportér byla nalezena i u naeglerie (Protein ID: 2625 – mitochondrial substrate carrier). Export z buněk zajišťuje obecně významný transmembránový protein ferroportin (Donovan, A. *et al.* 2005), jehož sekvence byla v genomu také nalezena (Protein ID: 72259 – ferroportin1). Informace o výskytu těchto predikovaných proteinů nám dává alespoň teoretický náhled na systémy spjaté s utilizací železa u buněk naeglerií.

Recentní experimenty zabývající se příjmem iontů železa u patogenní *N. fowleri* přináší nová empirická data. Martínez-Castillo a kolektiv (2015) identifikovali sekretované cysteinové proteázy, které jsou schopny degradace některých proteinů vázajících ionty železa, konkrétně laktoferinu, transferinu a hemoglobinu. Během postupu infekce do mozku se *N. fowleri* setkává s mj. oligodendrocyty, astrocyty a gliovými buňkami. Jak feritin, tak i transferin byl v těchto buněčných typech nalezen (Connor, J. R. *et al.* 1990). Nekróza tkání mozku, která doprovází PAM, také zahrnuje přítomnost erytrocytů v místě infekce. Fagocytóza erytrocytů buňkami naeglerie byla v minulosti již prokázána (Alonso, P. *et al.* 1985) a nedávno byla také prokázána hydrolytická aktivita exkrečně sekrečních proteáz patřící mezi katepsiny u *N. fowleri* vůči hemoglobinu (Lee, J. *et al.* 2014). Identifikované cysteinové proteázy (Martínez-Castillo, M. *et al.* 2015) však nejsou schopny štěpit feritin, což je překvapivé nejenom proto, že je feritin hlavní skladovací protein v lidském těle, ale protože je prokázáno, že *N. gruberi* váže molekuly feritinu na svém povrchu (King, C. A. *et al.* 1977). Jen velmi málo je známo o následné endocytóze a vesikulárnímu transportu v buňkách naeglerií. V tomto směru je tak prostor pro získávání dalších empirických dat.

Rozkrytí sekvence genomu *Naegleria gruberi*, a tudíž i kompletní informace o DNA mitochondrie (GenBank, Accession No. AF288092) poukazují na fakt, že naeglerie jsou schopné úplné oxidace sacharidů na vodu a oxid uhličitý a nalezneme zde tedy funkční dýchací řetězec a Krebsův cyklus, jehož všechny enzymy byly identifikovány (Fritz-Laylin, L. K. *et al.* 2010). Co se týče syntézy hemu, nebyly u naeglerie kromě ferochelátázy identifikovány enzymy nutné pro jeho syntézu. Vzhledem k tomu, že studované minimální

médium obsahovalo hematin (Fulton, C. *et al.* 1984), je pravděpodobné, že naeglerie využívají hem z fagocytovaných bakterií. Pro další typickou mitochondriální dráhu spojenou se železem, biosyntézu Fe-S klastrů, již naeglerie kóduje nezbytné enzymy. Nalezneme zde homolog NifU, frataxin či cystein desulfurázu, které se zapojují do drah tvorby Fe-S klastrů. Dá se tedy předpokládat, že je mitochondrie naeglerii zapojená do tvorby těchto významných prostetických skupin některých enzymů (Opperdoes, F. *et al.* 2011.).

Zajímavostí je, že zde nalezneme také alternativní oxidázu (EC 1.10.3.11), což je protein známý především z rostlin (Elthon, T. E. *et al.* 1987), který ale byl identifikován i u jiných protist, jako například u krevní formy *Trypanosoma brucei* (Chaudhuri, M. *et al.* 1995). Tento enzym, obsahující železo v centru svého aktivního místa (Siedow, J. N. *et al.* 1995), je alternativou k cytochromu c oxidáze, je tedy také schopný redukci kyslíku na vodu, a to nezávisle na klasickém proudu elektronů v dýchacím řetězci (Medentse, A. G. *et al.* 2004; Kern, A. *et al.* 2007).

Relativně nedávno se také ukázalo, že mimo tyto dráhy mají mitochondrie naeglerie kapacitu pro anaerobní metabolismus (Fritz-Laylin, L. K., *et al.* 2011). Z hlediska metabolismu železa je toto zjištění důležité proto, že byl objeven gen pro [FeFe]-hydrogenázu (Fritz-Laylin, Lillian K., *et al.* 2010). Dokonce byla potvrzena aktivita hydrogenázy, překvapivě ale v cytosolu. Toto je poprvé, kdy byl tento enzym včetně příslušných maturáz, což jsou proteiny nezbytné pro poskládání katalytického místa enzymu, lokalizován u eukaryot mimo organely (Tsaousis, A. D. *et al.* 2014).

Jak bylo zmíněno výše, jsou experimentální data o příjmu a utilizaci železa u zástupců rodu *Naegleria* velmi kusé. Následující části této práce se snaží osvětlit naše poznatky alespoň o skladování železa v buňkách těchto améb a popisují zásobní protein feritin (viz kapitola 5.1).

### **2.4.2 *Acanthamoeba***

*Acanthamoeba* je rod prvoků patřící do třídy Amoebozoa, neboli klasických améb. Jsou to měňavkovité organismy, které nalezneme téměř ve všech prostředích, tzn. přes půdu, slanou i sladkou vodu, až po jejich roztroušené cysty ve vzduchu. V jejich životních cyklech se objevují nejenom trofozoiti, ale jak již bylo zmíněno, i za nepříznivých podmínek vytvořené odolné cysty. Zástupci acanthaméb jsou kosmopolitní a volně žijící prvoci. (Marshall, M. M. *et al.* 1997) Nicméně jejich medicínský význam je minimálně dvojitý. Jsou to

původci granulomatozní amébové encefalitidy (GAE) u imunokomprimovaných jedinců a jsou také schopny způsobovat kutánní léze, sinusoidální infekce či amébovou keratitidu u imunokompetentních jedinců (Khan, N. A. *et al.* 2006). Dalším význam je spojený s všudypřítomností těchto améb. Mnoho bakterií (např. *Legionella*, *Chlamydia*, *Mycobacterium*, *Escherichia coli*, *Salmonella* aj.) (Baker, J. *et al.* 1994; Marciano-Cabral, F. *et al.* 2003) se totiž adaptovalo na přežití v buňkách acanthamoeb, kde jsou schopny se i pomnožovat (Rowbotham, T. J. *et al.* 1980); někdy toto soužití napomáhá zvyšovat i virulenci těchto bakterií (Cirillo, J. D. *et al.* 1999).

I přesto, že *Acanthamoeba* slouží jako modelový organismus pro studium cytoskeletu, mitochondriálních funkcí a také eukaryotické transkripce, nebyla doposud téměř vůbec studována z hlediska utilizace železa. Rozkrytí jejího genomu (Clarke, M. *et al.* 2013) rozhodně napomohlo k zodpovězení některých otázek, nicméně empirických dat je obrovský nedostatek.

Acanthamoeby jsou v porovnání například s *Entamoeba histolytica* daleko flexibilnější v jejich metabolismu. Mají podobnou kapacitu syntetizovat esenciální nutrienty jako kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Anderson, I. J. *et al.* 2005). Pravděpodobně tomu přispívá jejich rozšíření do rozmanitých prostředí. Acanthamoeby jsou také schopny, jak vyplývá z genomových dat a predikcí mnoha enzymů, efektivní produkce ATP i v anaerobním prostředí. Vzhledem k jejich časté endosymbióze s bakteriemi, je jejich genom obohacen o mnoho bakteriálních genů. Laterální genový transfer (LGT) se ukázal být významným fenoménem u těchto améb při rozkrývání jejich genomu (Clarke, M. *et al.* 2013). Jak je dále popsáno v experimentální části (kapitola 5.2), podařilo se nám v genomu acanthamoeb identifikovat prokaryotický Dps protein.

O příjmu iontů železa acanthamoebami se toho vzhledem k nedostatku empirických dat mnoho neví. Recentní studie identifikují proteázy, které degradují některé proteiny vázající železo. Jedná se o několik cysteinových proteáz, které jsou schopny štěpit lidský laktoferin, transferin a hemoglobin, a také koňský feritin (Ramírez-Rico, G. *Et al.* 2015). Dalo by se tak uvažovat, že hrají významnou roli v příjmu iontů železa od hostitele a v postupu infekce acanthamoeb.

### 2.4.3 *Entamoeba*

*Entamoeba* je rod patřící do třídy Amoebozoa, který zahrnuje značný počet zástupců žijících v trávicím traktu obratlovců. Pro člověka je klinicky nejvýznamnější extracelulární parazit *Entamoeba histolytica* jakožto původce střevní (a mimostřevní) amébozy. Toto gastrointestinální onemocnění se projevuje exsudativním průjmem a ve vážných případech kolitidou či rozsevem do jiných orgánů, nejčastěji do jater, mozku nebo plic. Vzhledem k fekálně-orálnímu přenosu cystami kontaminovanou vodou či jídlem, vyskytuje se především v rozvojových zemích (Espinosa-Cantellano, M. *et al.* 2000).

O metabolismu železa u *Entamoeba histolytica* je toho známo o něco více, než u předešlých zástupců. Již vývoj média pro kultivaci entaméb naznačoval vysoké nutriční nároky na železo - až 44 $\mu$ M koncentraci pro dosažení maximálního růstu (Latour, N. G. *et al.* 1965). To bylo později zpochybněno experimenty s již axenizovanou kulturou. V těchto pokusech Smithe a Meerovitche (1982) probíhala kultivace při 12  $\mu$ M koncentraci železa se stejnou úspěšností. V pokusech probíhajících o více než deset let později se naopak jako optimální hladina železa ukázalo velké rozpětí mezi 40 a 100  $\mu$ M (Serrano-Luna, J. *et al.* 1998). Ve všech případech však byl použit jiný kmen entamoeb, což, jak se ukazuje, hraje také roli v případě nutričních nároků.

Jaké molekuly je ale tato améba schopna využívat jako zdroj železa? V počátcích infekce, kdy dochází ke kolonizaci tlustého střeva, využívá jako zdroj železa lidský laktoferin (Lf), který je zodpovědný za vychytávání extracelulárně dostupného železa na površích sliznic (González-Chávez, S. A. *et al.* 2009). Entamoeby jsou schopny specificky vázat Lf přes membránové proteiny exprimované v závislosti na dostupnosti Lf v prostředí. Následně dochází k endocytóze Lf za vzniku kaveolárních váčků (León-Sicairos, N. *et al.* 2005). Internalizaci Lf do intracelulárních vesikulů dokazují pozorování elektronovým mikroskopem (Batista, E. *et al.* 2000). Transferiny (Tf) jsou také možné zdroje iontů železa u entamoeb. U trofozoitů entamoeb byly identifikovány dva proteiny, které váží Tf *in vitro*. Jeden z těchto proteinů cross-reagoval s lidským Tf membránovým receptorem a druhý byl lokalizován v cytoplasmě. Tato studie také ukazuje, že je komplex Tf – Tf receptor těmito parazity endocytován (Reyes-López, M. *et al.* 2001).

Při postupu infekce mimo zažívací trakt hostitele se dostává entaméba do krve a následně do jater, do prostředí bohatého na další zdroj železa - hemoglobin. Již v minulém století bylo pozorováno, že entamoeby jsou schopny fagocytózy červených krvinek (Trissl, D. *et al.* 1978) a následně degradace hemoglobinu. Byly popsány proteázy účastnící se degradace

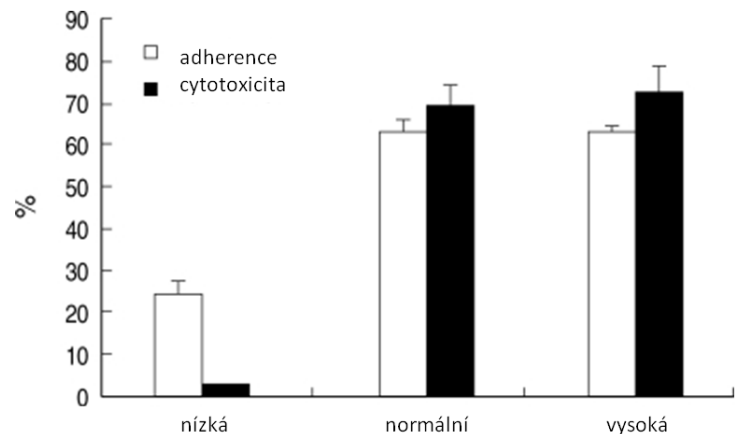
hemoglobinu z různých kmenů entaméb, s různou specifitou k lidským či bovinním hemoglobinům a různými vlastnostmi jejich aktivace (López-Soto, F. *et al.* 2009b). Například byla identifikována cysteinová proteáza, která v *in vitro* studiích degraduje lidský, prasečí i bovinní hemoglobin (Serrano-Luna, J. *et al.* 1998). Byly také identifikovány hemoglobin vázající proteiny 26 a 45 (Ehhmbp26, Ehhmbp45), které tyto améby sekretují do média. Jsou to tzv. hemofory, obdoba bakteriálních sideroforů, které jsou schopny s vysokou afinitou a též vysokou specifitou vázat hem, a podílet se tak na jeho příjmu buňkou (Cruz-Castaneda, A. *et al.* 2011). Recentní studie zkoumající geny *E. histolytica*, jejichž exprese je závislá na dostupnosti železa, poukazuje na některé molekuly, u kterých se předpokládá, že se zapojují do příjmu a utilizaci iontů železa. Je to například ABC transportér, P-glykoprotein 5 (Pgp5) a MFT transportér, které by se mohly zapojit do přenosu komplexu hem-hemophor přes membránu (Hernández-Cuevas, N. A. *et al.* 2014). Mechanismus transportu komplexu a exportu hemoforů zůstává zatím neobjasněn. Nicméně je pravděpodobné, že by tyto transportéry mohly sloužiti k přenosu sideroforů, jelikož u ABC transporteru byla identifikována podobná doména jako u iroC exportéru sideroforu u *Salmonella typhi* (Crouch, M. L. *et al.* 2008), Pgp5 vykazuje homologii k PvdE exportéru sideroforu u *Pseudomonas aeruginosa* (Reimann, C. *et al.* 2001), a MFT vykazuje podobnost s MFS1 (exportér sideroforu u *Azobacter vineldii* (Page, W. J. *et al.* 2003)) a FLVCR1 (lidský cytoplasmatický exportér hemu (Keel, S. B. *et al.* 2008)). Při pěstování buněk entamoeb za snížených koncentrací železa, dochází také k modulaci transkriptů, jejichž produkty se v bakteriích, rostlinách či u člověka zapojují do biosyntézi a degradace hemu; glutamyl-tRNA syntetáza, S-adenosylmethionin syntetáza a monooxygenáza (Hernández-Cuevas, N. A. *et al.* 2014). Ve stejné studii byl také identifikován hypotetický protein vykazující homologii s ferochelatázou, což je enzym zajišťující v syntéze hemu poslední krok inkorporace  $Fe^{2+}$  do protoporfyrinu IX (Jones, M. T. *et al.* 1969). Další experimenty jsou nezbytné pro potvrzení rolí ABC, Pgp5 a MFT transportérů v příjmu železa entamoebami. U *E. histolytica* byl také identifikován transportér elektronů (trans-PMET), který je důležitý pro udržení oxido-redukční rovnováhy v buňkách (Bera, T. *et al.* 2006). Tento transmembránový transportér by také mohl být zapojen do redukce a příjmu iontů železa. Kromě toho, že bylo identifikováno několik enzymů (NifS, NifU a rubrerythrin) zapojených do tvorby železo-sírných klastrů (Ali, V. *et al.* 2004; Maralikova, B. *et al.* 2010), je potřeba naše znalosti rozšířit i o poznatky spojené s utilizací iontů železa *E. histolytica*.

Je také prokázané, že hem samotný podporuje růst buněk víc než hemoglobin jako zdroj železa (Cruz-Castaneda, A. *et al.* 2011). Studie López-Soto a kolektivu (2009b) dospěla k výsledkům, že kultivace entaméb v médiu, kde hem je jediným zdrojem železa, je stejně úspěšná jako kultivace za podmínek přidaného citrátu železitého. Toto může mít význam nejenom v případě, že se entaméba dostane do krve, ale také v momentě, kdy se při kolonizaci tlustého střeva vytvářejí krvácivé vředy.

Přímo v játrech se poté entaméba dostává k dalšímu možnému zdroji železa - feritinu. Pokusy *in vitro* dokazují schopnost jeho fagocytózy pomocí klatrinových váčků a následnou degradaci (López-Soto, F. *et al.* 2009a). Možná právě schopnost efektivního a rychlého využití feritinu jako zdroje železa může být jedno z vysvětlení, proč jsou právě játra, kde jsou jeho zásoby největší, majoritním místem výskytu entaméb při jejich rozsevu do krevního řečiště.

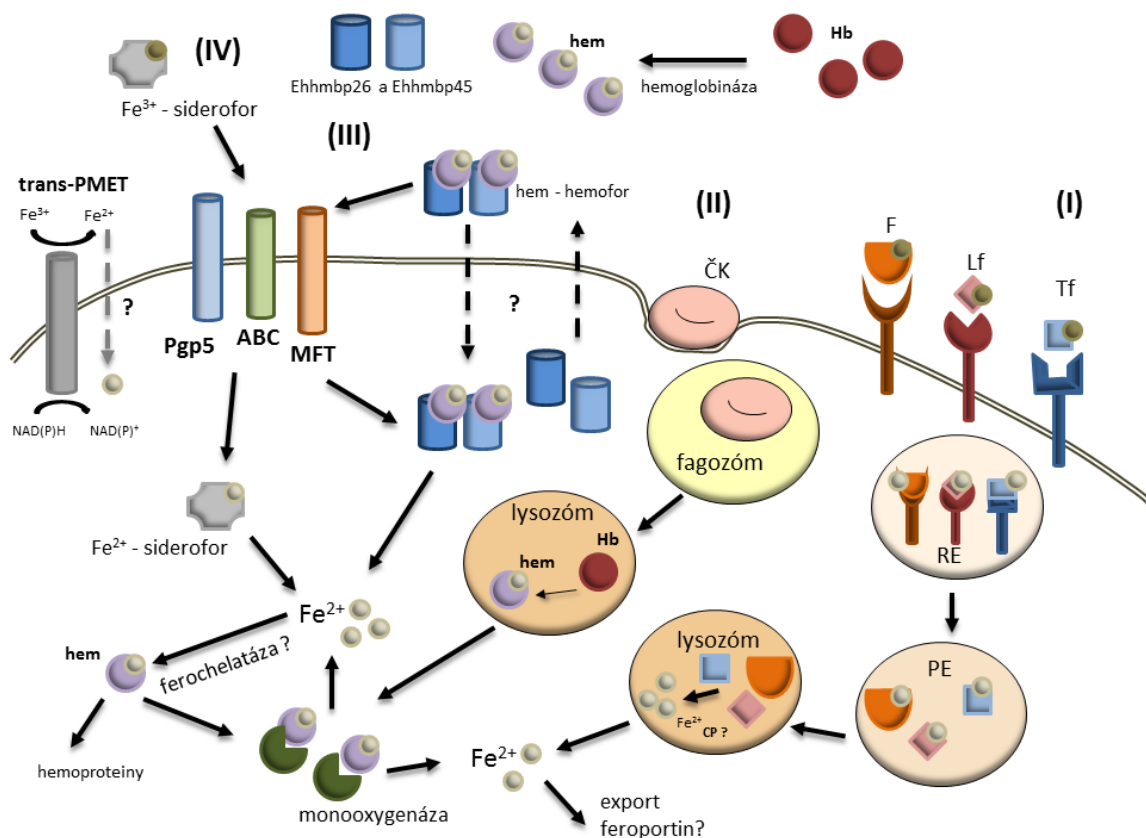
Jaký vliv má nadbytek nebo nedostatek železa je u tohoto organismu také dobře prostudován. Studie sledující, jak působí různé koncentrace železa na růst a cytotoxicitu, resp. adherenci buněk *in vitro*, poukazují na význam železa pro virulenci entamoeb. Není překvapivé, že v médiu bez železa trofozoiti nebyli schopni růstu. Nicméně v médiu s nízkou koncentrací železa je evidentní, že se snižuje i schopnost adherence entaméb; viz obrázek č. 5 (Lee, J. *et al.* 2008), což je jeden z faktorů virulence při kolonizaci sliznice střeva a nezbytné pro následnou schopnost lyzovat hostitelské buňky (Ravdin, J. I. *et al.* 1981). Můžeme tedy hovořit o tom, že vyšší koncentrace extracelulárního železa zvyšují virulenci *Entamoeba histolytica*.

Z dostupných informací je vidno, že v porovnání s naegleriemi a acanthamoebami jsou naše poznatky o příjmu železa entaméb o mnoho bohatší. Velké množství informací již bylo dáno i do souvislostí s jejich patogenitou a virulencí. Přehled toho, co je nám známo o příjmu a utilizaci železa *E. histolytica*, je shrnuto na obrázku č. 6.



**Obrázek č. 5.:** Srovnání schopnosti adherence (□) a cytotoxicity (■) trofozoitů *E. histolytica*. Kultivace probíhala za nízké (21.4 μM), normální (71.4 μM), a vysoké koncentrace železa (285.6 μM). Pokusy byly prováděny na CHO (Chinese Hamster Ovary cells). Výsledky ukazují průměr s odchylkami ze tří nezávislých experimentů (Lee, J. *et al.* 2008).





**Obrázek č. 6: Předpokládané dráhy příjmu iontů železa u *E. histolytica*.** (I) Trofozoiti jsou schopni přijímat železo z proteinů hostitele. Transferin (Tf), laktoferin (Lf) a feritin (F) váží tyto améby pomocí specifických receptorů na jejich povrchu. Komplexy jsou poté endocytovány za vzniku klatrinových váčků (pro F a Tf) anebo kalveolárních váčků (Lf). Komplex disociuje v endozómech (RE – raný endozóm; PE – pozdní endozóm) a ionty železa jsou uvolněny v lysozómech. Není jasné, zda jsou receptory degradovány cystein proteázou (CP) anebo zda jsou recyklovány zpět na povrch buňky. (II) *E. histolytica* je schopna fagocytovat červené krvinky (ČK) a následně degradace hemoglobinu (Hb). Hb je degradován hemoglobinázami a cystein proteázou (López-Soto, F. et al. 2009). Monoxygenáza poté degraduje hem a dochází k uvolnění iontů železa. Hernández-Cuevas a kolektiv (2014) navrhují, že nalezený homolog monoxygenázi se podílí na degradaci hemu u *E. histolytica*. (III) Entamoebly mohou získat hem i díky sekretovaným hemoferům (Ehmbp 26, Ehmbp45), které specificky váží hem. Příjem komplexu hem-hemofer a export hemoferů zatím není objasněn (černé přerušované šipky). Transportéry ABC a MFT by také mohly být zapojeny do přenosu hemoferů. Po příjmu hemu buňkou může být degradován monoxygenázou. (IV) Železo by mohly entamoebly přijímat i ze sideroformů, jelikož transportéry ABC, MFT a P-glykoprotein 5 (Pgp5) vykazují homologii s exportními systémy sideroformů u bakterií. Transmembránový elektron transportní systém (trans-PMET), který má kapacitu přenášet elektrony, a tak by mohl mít důležitou roli v redukcí a přenosu železa (šedé přerušované šipky). Výše popsané mechanismy popisují možné cesty příjmu železa buňkami *E. histolytica*. Ionty železa mohou být využívány v biosyntéze železo-sírných klastřů v mitochondriích. Syntéza hemu nebyla u *E. histolytica* zatím popsána. Feroportin, zprostředkovávající export železa, nebyl u *E. histolytica* identifikován. (podle Hernández-Cuevas, N. A. et al. 2014)

### 3 Cíle práce

Hlavním cílem experimentální části této práce bylo charakterizovat feritin, protein identifikovaný v buňkách protist *Naegleria gruberi*. Jednotlivé dílčí cíle byly vytyčeny následovně:

- (i) Exprimovat gen pro feritin v bakteriích *Escherichia coli* a následně vytvořit protilátky v laboratorním potkanovi
- (ii) Lokalizovat protein v buňkách *N. gruberi*
- (iii) Purifikovat nativní protein v systému SUMO a ověřit jeho schopnost vázat ionty železa
- (iv) Prostudovat vliv nadbytku a nedostatku železa na růst *N. gruberi* pomocí růstových experimentů a s tím spjatou závislost exprese feritinu na přítomnosti železa

Vedlejší experimenty se zabývali Dps proteinem v buňkách *Acanthamoeba castellanii*, kde jsme se zabývali následujícími úkoly:

- (i) Exprimovat gen pro Dps v bakteriích *E. coli* a následně vytvořit protilátky v laboratorním potkanovi
- (ii) Lokalizovat protein v buňkách *A. castellanii* za normálních podmínek a podmínek oxidativního stresu navozeného pomocí  $H_2O_2$

## 4 Použité metody a materiály

### 4.1 Organismy a média

#### 4.1.1 *Naegleria gruberi*

Pro všechny pokusy jsme použili axenickou kulturu trofozoitů *N. gruberi* kmene NEG-M (laskavě poskytla Lillian Fritz-Laylin), kterou jsme kultivovali při 27 °C v médiu M7 (Fulton, C. 1984). Každých 3 – 5 dní byla tato kultura přeočkována.

Složení M7 média:

450 ml	dH <sub>2</sub> O
22,5 mg	L-Methionine (Sigma)
0,63 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O
0,181 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,5 g	Yeast Extract (Oxoid)
2,7 g	D-glukóza
50 ml	inaktivovaného hovězího séra (Gibco®)

Médium bylo sterilizováno přefiltrováním.

#### 4.1.2 *Acanthamoeba castellanii*

V pokusech jsme využívali axenickou kulturu trofozoitů *Acanthamoeba castellanii* kmene Neff (izoloval Dr. Červa, 1966), kterou jsme pěstovali v 2% peptonu při 30 °C. Kultura nebyla náročná na pěstování a nepřerůstala, tudíž její přeočkování probíhalo nepravidelně.

Složení média:

2%	Proteose Pepton (Oxoid)
----	-------------------------

Médium bylo sterilizováno v autoklávu 20 min, 120 °C

#### 4.1.3 *Escherichia coli*

Pro namnožení námi vytvořených rekombinantních plazmidů jsme použili bakterie *Escherichia coli* kmen XL-1 blue nebo expresní kmen BL21 DE3, které jsme kultivovali ve 37 °C v LB médiu (Sigma). Pro selekci pozitivních kolonií po transformaci jsme použili LB médium s antibiotikem – ampicilin (Sigma) o koncentraci 200 µg/ml; kanamycin (Sigma) o koncentraci 50 µg/ml.

## 4.2 Plazmidy

Pro zaklonování PCR produktu jsme použili komerčně dostupný p-GEM®-T Easy Vector (Promega). Selekcí zajistilo antibiotikum ampicilin.

Pro expresi genu pro feritin v *E. coli* jsme zvolili vektor pET28 (Novagen) s využitím vzniku C-terminálního histidinového tagu, pro expresi genu pro Dps vektor pET42b (Novagen). Exprese byla následně u obou indukována pomocí isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG; Sigma).

Pro potřebu exprese nativní formy feritinu *N. gruberi* bez přidaných tagů v *E. coli*, jsme vybrali vektor pETM11-SUMO3GFP (EMBL). Tento modifikovaný pET vektor je díky unikátní terciární struktuře specificky rozpoznáván SUMO Proteázou 2 (Life Sensors), která je schopna štěpit vzniklý fúzní protein i s histidinovým tagem.

Pro všechny expresní vektory bylo využito jako selekční antibiotikum kanamycin.

## 4.3 Amplifikace genů

Amplifikaci genu jsme provedli metodou PCR (Polymerase Chain Reaction). Pro efektivnější průběh reakce byl využit EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (2 × premix; TaKaRa). Jako templát sloužila pro amplifikaci genu pro feritin genomová DNA *Naegleria gruberi*, která byla izolována pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) podle uvedeného protokolu. Pro amplifikaci genu pro Dps protein byla využita cDNA *Acanthamoeba castellanii*. RNA *A. castellanii* jsme získali pomocí TRIzol® Reagent (Gibco), jak je popsáno v kapitole 4.11 a následně přepsali do cDNA (kapitola 4.12).

Primery jsou uvedeny v tabulce č. 1, jejich sekvence obsahovaly restrikční místa, která byla následně využita pro klonování.

PCR měla následující kroky:

1. Počáteční denaturace DNA – 95 °C, 4 min
2. 30 cyklů amplifikace genu
  - a. Denaturace – 95 °C, 1 min
  - b. Nasedání primerů – 52 °C, 30 s
  - c. Syntéza řetězce – 72 °C, 7 min
3. Závěrečné dosyntetizování řetězců – 72 °C, 7 min

Výsledek PCR jsme analyzovali v 1% agarózovém gelu horizontální elektroforézou. Detekce DNA fragmentů UV zářením probíhala po přidání barviva SYBR® Safe (Invitrogen) do gelu před ztuhnutím. Pro následnou extrakci z gelu byl použit High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche), kde jsme postupovali podle přiloženého protokolu.

**Tabulka č. 1:** Použité primery (restrikční místa vyznačena tučně)

<i>N. gruberi</i> – feritin – pET28 ( <i>E.coli</i> )		restrikční enzym
Forward	5' - ACAC <b>CATGG</b> ATGTTCCACTCCCAATCCT - 3'	NcoI
Reverse	5' - A <b>CACTCGAG</b> TTATTGAGAAGCAGATG - 3'	XhoI

<i>N. gruberi</i> – feritin – pETM11-SUMO3GFP ( <i>E.coli</i> )		restrikční enzym
Forward*	5' - <b>GGATCC</b> ATGTTCCACTCCCAATCCTTCCA - 3'	BamHI
Reverse	5' - <b>AAGCTT</b> TTCATTATTGAGAAGCAGATGATGAATTTGA - 3'	HindIII

<i>A. castellanii</i> - Dps - pET 42b ( <i>E. coli</i> )		restrikční enzym
Forward	5' - ACAC <b>ATATGG</b> CCCAAGTGCAAGTGCAGA - 3'	NdeI
Reverse	5' - ACAG <b>CGGCGC</b> TAGTGCTGGGCCTTGC - 3'	NotI

\*) Označení forward primerů bez mitochondriální targetovací sekvence.

## 4.4 Klonování DNA fragmentů

Fragmenty jsme po amplifikaci pomocí PCR a extrakci z gelu nejprve zaklonovali do pGEM®-T Easy plasmidu podle uvedeného protokolu. Při klonování do expresních vektorů jsme nejprve štěpili jak fragment, tak i expresní vektor příslušnými restrikčními enzymy (Fermentas) podle uvedeného protokolu. Takto připravené fragmenty genu a vektory jsme oddělili od odštěpených úseků na 1% agarózovém gelu na horizontální elektroforéze. Po vyříznutí z gelu byly opět přečištěny pomocí High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche). Ligace fragmentu do vektoru probíhala za přítomnosti T4 DNA ligázy (Fermentas) podle příslušného protokolu. Poté jsme transformovali buňky *E.coli* touto ligační směsí pomocí tepelného šoku jak je uvedeno v následující kapitole 4.5.

## 4.5 Transformace *Escherichia coli*

Kompetentní bakterie XL-1 blue nebo BL21 DE3 jsme po rozmražení inkubovali 20 min na ledu s přidaným plasmidem (5 µl) po ligaci. Buňky byly poté transformovány tepelným šokem 35 s při 42 °C a ihned poté umístěny na led po dobu 2 min. Následně jsme po přidání 250 µl SOC média inkubovali bakterie na třepačce při 37 °C po dobu minimálně 40 min. Takto transformované buňky jsme nechali do druhého dne narůst na LB plotně s příslušným selekčním antibiotikem při 37 °C.

Složení SOC média:

2 g	Tryptone (Oxoid)
0,5 g	Yeast Extract (Oxoid)
0,58 g	NaCl
1 ml	250mM KCl
1,8 ml	20% glukóza
0,5 ml	2M MgCl <sub>2</sub>
100 ml	dH <sub>2</sub> O

pH 7

Sterilizace v autoklávu 20 min při 120 °C

Správný průběh transformace jsme ověřovali na několika narostlých koloniích, kdy tyto kultury sloužily jako templát pro kontrolní PCR. Pozitivní kolonie jsme kultivovali na třepačce (180 RPM) v 5 ml tekutého LB média s 5 µl selekčního antibiotika při 37 °C přes noc. Plasmid jsme z bakterií izolovali pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Jeho koncentraci jsme ověřovali na NanoDrop Spektrofotometru (ND-1000).

Před další prací s plasmidem jsme vždy provedli kontrolní restrikci příslušnými restrikčními enzymy. Přítomnost DNA fragmentu byla opět analyzována na horizontální elektroforéze. Případné mutace v sekvenci DNA jsme vyloučili sekvenací vzorku.

## 4.6 Indukce exprese proteinu v *Escherichia coli*

Několik kolonií bakterií BL21 s expresním vektorem a správně vloženým fragmentem jsme nasadili do 3 ml tekutého LB média se 3 µl selekčního antibiotika a nechali kultivovat přes noc na třepačce při 37 °C. Z těchto kultur jsme odebrali 50 µl do 1 ml LB média bez antibiotik (do celkového objemu 5 ml LB média) a nechali třepat po dobu 1 h při 37 °C. Kultury během té doby narostli do O.D. 0,4 – 0,6. Z nich jsme odebrali 1 ml neindukované

kultury pro pozdější analýzu na Western Blot (viz kapitola 4.10) a také 500  $\mu$ l kultury do 120  $\mu$ l 50% glycerolu pro uchování v  $-80$  °C. U zbytku jsme indukovali expresi proteinu přidáním IPTG (finální koncentrace 1 mM) a nechali třepat 4 h při 37 °C. Následně jsme indukované a neindukované kolonie analyzovali na western blotu pro zjištění, jestli a v jaké míře jsou schopné protein exprimovat.

Kolonie schopná exprimovat námi požadovaný protein byla poté stejným způsobem indukována, tentokrát však v objemu 1,5 l LB média. Následně jsme tuto kulturu stočili na centrifuze při  $4\ 000 \times g$ , 10 min, 4 °C. Po promytí v PBS pufru a opětovném stočení jsme z usazeného peletu purifikovali exprimovaný protein, viz kapitola 4.7.

Složení PBS pufru (10  $\times$  koncentrovaný):

1 l	dH <sub>2</sub> O
80 g	NaCl
2 g	KCl
15,3 g	Na <sub>2</sub> HO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O
2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## 4.7 Izolace rekombinantního proteinu afinitní chromatografií

Pelet indukovaných bakterií byl rozsuspendován ve 30 ml lyzačním pufru s přidáním lyzozymem (Sigma), DNázou (Sigma) a inhibitory proteáz TLCK (N-tosyl-L-lysin chlorometylketon) o koncentraci 25  $\mu$ g/ml a leupeptin o koncentraci 5  $\mu$ g/ml (vždy 2  $\mu$ l proteázy na 1 ml pufru). Buňky jsme dezintegrovali pomocí sonikace s amplitudou 60 po dobu  $3 \times 1$  min s délkou pulzu 1 s. Vše jsme měli neustále na ledu. Vzniklý lyzát jsme stočili na  $40\ 000 \times g$ , 20 min při 4 °C na ultracentrifuze Beckman Optima™ L-90K (rotor Ti50). Odebraný supernatant jsme smíchali s 1 ml niklové agarózy Ni-NTA Agarose (PerfectPro) a nechali inkubovat 15 min za mírného míchání při pokojové teplotě. Následně jsme celý objem postupně převedli na kolonu a nechali protéct první frakci tzv. flow through (FT). Další frakce jsme odebírali po přidání následujících pufrů:

1. Promývací pufr –  $2 \times 1$  ml
2. Eluační pufr I –  $4 \times 0,5$  ml
3. Eluační pufr II –  $3 \times 0,5$  ml

Složení lyzačního pufru:

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300mM NaCl  
10mM imidazol  
pH 8

Složení eluačního pufru I:

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300mM NaCl  
250mM imidazol  
pH 8

Složení promývacího pufru:

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300mM NaCl  
20mM imidazol  
pH 8

Složení eluačního pufru II:

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300mM NaCl  
400mM imidazol  
pH 8

Z odebraných frakcí během purifikace jsme vytvořili vzorky (popsáno v kapitole 4.10) na SDS-PAGE a po obarvení Coomassie Brilliant Blue analyzovali, ve které frakci exprimovaný protein nejlépe eluován. Vybrané frakce byly spojeny a separovány na velké preparativní SDS-PAGE elektroforéze. Odpovídající proteinový band byl z gelu vyříznut a opláchnut ve sterilním PBS pufru. Následně byl homogenizován v Douncenově homogenizátoru.

Složení Coomassie Brilliant Blue:

400 – 500 g Coomassie Brilliant Blue (SERVA)  
100 ml kyselina octová  
450 ml denat. etanol  
450 ml dH<sub>2</sub>O

## 4.8 Imunizace potkana a zpracování protilátek

Homogenní suspenze proteinu byla využita pro vytvoření specifické polyklonální protilátky v laboratorním potkanovi. Imunizace probíhala minimálně 3krát pomocí 200 – 300 µg proteinu, vždy po 28 dnech. Po třetí (popřípadě i další) imunizaci byl odebrán kontrolní vzorek séra. Potkan byl vykrcen poté, co byl vzorek pozitivní.

Odebranou krev jsme nechali stát při pokojové teplotě 30 min a poté stočili při 2 000 × g, 15 min, při pokojové teplotě. Sérum jsme odebrali a opět stočili za stejných podmínek. Pomocí western blotu jsme poté testovali protilátku na frakcích *N. gruberi* či *A. castellanii* při ředění 1 : 100.

Z důvodu, že *Acanthamoeba* se běžně vyskytuje v prostředí, bylo nutné před výběrem potkana pro vytvoření protilátek proti Dps *A. castellanii* otestovat krev dostupných potkanů



na již vytvořené protilátky proti antigenům *acanthamoeb*. Celkový lyzát buněk *A. castellanii* byl použit jako vzorek na SDS PAGE, vzorky krve potkanů byly využity jako primární protilátky. K imunizaci byl vybrán potkan, v jehož séru jsme nedetekovali protilátky proti *A. castellanii*.

## 4.9 Purifikace nativní formy proteinu

Pro získání nativní formy feritinu jsme využili výše uvedeného pETM11-SUMO3GFP plazmidu. Po zaklonování, expresi v bakteriích BL21 a purifikaci na niklové koloně jsme spojili 3 nejčistší frakce (jejichž celkový objem byl poté 1,5 ml). Ty jsme následně převedli do pufru bez imidazolu. Protein jsme štěpili SUMO proteázou podle příslušného protokolu a opětovně převedli přes niklovou kolonu, jak bylo popsáno výše, abychom se zbavili odštěpeného His-tagu.

Složení SUMO pufru (10 ×):  
500mM Tris-HCl  
10mM DTT (Sigma)  
0,2% Triton (Sigma)  
1,5M NaCl  
pH 8

## 4.10 SDS-PAGE a western blot

Při analýze proteinových vzorků jsme využívali metody SDS-PAGE, separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS). Využívali jsme 13,5% gelu a separaci prováděli při 100 – 150 V, cca 1 h (dokud vzorky nedoputovaly na spodní okraj gelu). Pro určení relativní molekulové hmotnosti byl využit standard PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas). Gel jsme poté barvili pomocí Coomassie Brilliant Blue a ihned analyzovali. Vzorky jsme vždy před nanášením na gel denaturovali 5 min při 100 °C ve vzorkovém pufru (buďto 1x nebo 5x koncentrovaném) a stočili na 15 000 × g, 2 min, při pokojové teplotě.

Pro detekci specifického proteinu pomocí protilátek jsme využívali western blotové analýzy, neboli imunoblotu. Proteiny separované na SDS-PAGE jsme přenášeli na nitrocelulózovou membránu pomocí zařízení pro polosuché blotování 1 h, 1,5 mA/cm<sup>2</sup> gelu. Přítomnost proteinů na membráně jsme ověřili promytím membrány v roztoku Ponceau S. Následně byly na membráně blokovány nespécifické proteiny v roztoku sušeného mléka

minimálně 1 h za jemného třepání při pokojové teplotě, nebo přes noc při 4 °C. Specifický protein byl detekován primární protilátkou min 1 h při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C. Použitá koncentrace byla 1 : 100 při testování protilátky, 1 : 1000 při následných pokusech. Membránu jsme poté promyli 3 × 15 min v mléce a inkubovali min 1 h se sekundární protilátkou anti-kryší (alkalická fosfatáza, Sigma; peroxidáza, Sigma) v poměru 1 : 2000. Následovalo opět promytí 3 × 15 min a poté vyvolání blotu v závislosti na použité sekundární protilátce buďto kolorimetricky (alkalická fosfatáza), nebo chemiluminiscenčně (peroxidáza; Chemiluminescent Peroxidase Substrate-1, Sigma) v přístroji LAS 4000.

Složení vzorkového pufru (1 × koncentrovaný) :

2,4 ml	roztok A: 3 g Trisma base (Sigma) / 50 ml dH <sub>2</sub> O, pH 6,8
2 ml	10% SDS (Sigma)
1 ml	glycerol (Sigma)
4 ml	H <sub>2</sub> O
0,1 ml	roztok 10 mg bromfenolové modři / 1ml roztoku A
0,5 ml	2-merkaptoetanol

Skladovat při -20 °C

Složení blotovacího pufru:

100 ml	10 × TGS (BioRad)
200 ml	methanol
700 ml	dH <sub>2</sub> O

Složení blokovacího a promývacího roztoku na western blot:

10 g	odtučněné sušené mléko
10 ml	PBS
500 µl	Tween 20 (0,5%, Sigma)

Složení vyvolávacího substrátu pro alkalickou fosfatázu (10 ×):

50 mg	BCIP (Sigma)
100 mg	NTB (Sigma)
4 g	Trizma Base (Sigma)
340 mg	MgCl <sub>2</sub>
33,3 ml	dH <sub>2</sub> O

## 4.11 Izolace celkové RNA z buněk *Acanthamoeba castellanii*

Narostlá kultura *A. castellanii* o objemu 400 ml byla nejprve odsonikována od stěn nádoby pomocí sonikační lázně, poté sterilně sklizena a stočena při 1500 × g, 15 min, 4 °C. Pelet byl převeden do sterilní DEPC mikrozkušavky (Eppendorf). Následně jsme jej resuspendovali v 1 ml TRIzol® Reagent a nechali 5 min inkubovat při pokojové teplotě.

Po přidání 200  $\mu$ l chloroformu a opatrném promíchání se nám směs mléčně zakalila; nechali jsme směs 3 min na stole. Poté následovala centrifugace při 11 500  $\times$  g, 15 min, 4  $^{\circ}$ C. Směs se rozdělila na spodní červenou fázi obsahující DNA a proteiny, interfázi a vrchní bezbarvou fázi s RNA, kterou jsme přenesli do nové mikrozkušavky a přidali 500  $\mu$ l isopropanolu. Směs jsme opět inkubovali 10 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace o stejných parametrech. RNA vytvořila na dně bílý pelet. Po odsátí supernatantu jsme pelet promyli v 75% etanolu. RNA jsme centrifugovali při 7500  $\times$  g, 5 min, 4  $^{\circ}$ C. Po odsátí supernatantu jsme nechali pelet uschnout cca 30 min na vzduchu a poté rozpustili ve 40  $\mu$ l vody bez RNáz. Pelet jsme rozpouštěli při 55  $^{\circ}$ C, 10 min.

Koncentraci RNA ve vzorku jsme měřili na NanoDrop Spektrofotmetru (ND-1000). RNA jsme použili jako templát pro PCR reakci, abychom se přesvědčili o tom, že není znečištěná zbytky DNA. Primery byly použity výše zmíněné pro *A. castellanii* a v kontrolní reakce zde byla použita genomová DNA *A. castellanii*, kterou jsme získali pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Výsledek PCR byl analyzován na horizontální elektroforéze v 1% agaru.

#### **4.12 Přepis celkové RNA *Acanthamoeba castellanii* do cDNA**

Pro přepis celkové RNA jsme využili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) podle příloženého protokolu. cDNA jsme použili jako templát pro PCR reakci s primery pro *A. castellanii*, jako pozitivní kontrola reakce sloužila genomová DNA. Výsledek byl analyzován na horizontální elektroforéze na 1% gelu.

#### **4.13 Frakcionace *Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba castellanii***

Dobře narostlé inokulum 3  $\times$  10ml *N. gruberi* jsme celé převedli do objemu 300 ml média a nechali růst po dobu 2 – 3 dnů, dokud nevytvořili v tkáňové lahvi souvislou vrstvu buněk. Pro frakcionaci *A. castellanii* jsme vycházeli z 1,5 l kultury, kterou jsem nechali růst minimálně 10 dní.

S oběma kulturama jsme poté postupovali stejně. Buňky jsme sklidili a stočili při 1000  $\times$  g, 15 min, 4  $^{\circ}$ C. Pelet byl opatrně resuspendován v pufu I. a opět stočen při 900  $\times$  g, 10 min, 4  $^{\circ}$ C. Pelet jsme opět rozsuspendovali v pufu I s přidávanými inhibitory

proteáz TLCK a leupeptin. Následně jsme buňky dezintegrovali sonikací. Odebrali jsme část vzorku jako buněčný lyzát. Poté jsme stočili nerozbité buňky, jádra a membrány na  $1000 \times g$ , 15 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant jsme točili při  $10\,000 \times g$ , 20 min. Supernatant jsme odebrali jako cytosolickou frakci. Vzniklý pelet jsme opatrně resuspendovali a znovu stočili za stejných podmínek. Pelet jsme následně použili jako frakci obohacenou o mitochondrie. Všechny frakce jsme použili k analýze na SDS-PAGE a western blotu.

Složení pufru I.:

250mM	sacharóza
10mM	MOPS (Sigma)
10mM	DTT (Sigma)
pH 7	

#### 4.14 Příprava preparátů *N. gruberi* pro fluorescenční mikroskopii

Narostlé kultuře *N. gruberi* bylo vyměněno médium za nové, do kterého byl přidán pro označení mitochondrií MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) v poměru 1 : 10 000. Po inkubaci 30 min při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  jsme buňkám opět vyměnili médium, tentokrát za fixační směs, která obsahovala médium s formaldehydem (Sigma) o výsledné koncentraci 1 %. Takto jsme buňky fixovali po dobu 30 min. Následně jsme je opatrně stočili na  $800 \times g$ , 5 min, při pokojové teplotě. Buňky jsme promyli v 5 ml  $1 \times$  PEM a opět stočili. Buňky jsme poté velmi opatrně rozsuspendovali v  $300 \mu\text{l}$   $1 \times$  PEM.

V mezičase jsme si připravili krycí sklíčka, na která jsme rovnoměrně rozetřeli  $10 \mu\text{l}$  polylyzinu (Sigma) a nechali oschnout. Na takto připravená sklíčka jsme nanášeli  $100 \mu\text{l}$  buněčné kultury a inkubovali 20 min při pokojové teplotě. Přebytečnou tekutinu jsme odsáli. Buňky přichycené na sklíčku jsme permeabilizovali přidáním  $100 \mu\text{l}$   $1 \times$  PEM s 1% Tritonem-X (Sigma) po dobu 10 min. Následovalo promytí  $3 \times 5$  min v  $1 \text{ ml}$   $1 \times$  PEM. Nespecifická vazebná místa byla blokována  $100 \mu\text{l}$  sterilního roztoku PEMBALG.

Pro detekci feritinu v buňkách jsme použili námi vytvořenou polyklonální protilátku v poměru 1 : 1000 a 1 : 500. Jako sekundární protilátku jsme využili anti-kryší Alexa Fluor®488 (Invitrogen) ředěnou 1 : 1000. Obě protilátky jsme ředili v roztoku PEMBALG a inkubovali po dobu 1 h. Mezi inkubacemi jsme preparáty promývali  $3 \times 5$  min v  $1 \text{ ml}$   $1 \times$  PEM. Mitochondrie byly označeny červeně pomocí MitoTracker® již na začátku. Posledním krokem bylo označení DNA pomocí DAPI obsažené v montovacím médiu VECTASHIELD® (Vector Laboratories).

Pro pozorování preparátů byl využit fluorescenční mikroskop Olympus IX81. Veškeré snímky jsme pořídili digitální kamerou Hamamatsu Orca-AG za použití programu Cell<sup>^</sup>R imaging.

Složení PEM pufru (2 × koncentrovaný):

200mM	PIPES (Sigma)
2mM	EGTA (Sigma)
0,2mM	MgSO <sub>4</sub>
pH 6,9	

Složení roztoku PEMBALG:

1%	BSA (Sigma)
0,1%	NaN <sub>3</sub>
100mM	L-lysine (Sigma)
0,5%	želatina (Sigma)
200 ml	1 × PEM

#### 4.15 Měření růstových křivek *N. gruberi*

Růstové křivky *N. gruberi* jsme měřili v různě upravených M7 mediích, kde jsme navodili podmínky nedostatku či nadbytku železa. Využili jsme k tomu železo ve formě Fe(III)-nitrilotriacetát (Fe-NTA), které jsme přidávali do média tak, aby finální koncentrace byla 50  $\mu$ M a 150  $\mu$ M. Nedostatek tohoto kovu byl zajištěn přidáním chelatoru železa 2-2' dipyridylu (Sigma) o finálních koncentracích 25  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Jako kontrola sloužila kultura v čistém M7 médiu (označována jako „0“). Pokus probíhal nezávisle na sobě třikrát, vždy v tripletech uvedených podmínek.

Buňky jsme kultivovali v celkovém objemu 10 ml v plastových tkáňových lahvích (Orange Scientific, 25 cm<sup>2</sup>) při 27 °C. Počáteční inokulum obsahovalo 50 000 buněk. Každý den, po dobu jednoho týdne, byly kultury přepočítány na cytometru Z2 Coulter Counter (rozsah měřených buněk 8  $\mu$ m – 18  $\mu$ m). Abychom zajistili, že budou buňky stále v exponenciální fázi, byla každá kultura obden přeočkována do nové tkáňové lahve a naředěna zpět na hodnotu počátečního inokula.

Hodnoty růstových křivek byly zaznamenány do grafu a vyhodnoceny.

Složení Fe-NTA:

470 mg                    NTA . Na<sub>2</sub> (Sigma)  
135 mg                    FeCl<sub>3</sub> . 6H<sub>2</sub>O  
50 ml                    dH<sub>2</sub>O  
pH 6,2 – 6,5

Za účelem porovnání exprese feritinu jsme po přeočkování stočili dohromady buňky pěstované ve stejných podmínkách. Stáčení probíhalo při 1000 × g, 10 min, 4 °C. Ve vzorcích jsme stanovili koncentraci proteinů pomocí Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma) podle uvedeného protokolu. Stanovení koncentrací poté proběhlo spektrofotometricky (Shimadzu UV-2600). Na gel jsme nanášeli 30 µg proteinu z každého vzorku.

# 5 Výsledky

## 5.1 *Naegleria gruberi*

### 5.1.1 Bioinformatická analýza feritinu

Sekvence genu pro feritin byla identifikována na základě databáze JGI Genome Portal. V databázi byla nalezena pouze jedna kopie genu.

Na následujícím alignmentu (obrázek č. 7) jsme provedli srovnání primárních sekvencí vybraných eukaryotických feritinů. Sekvenční podobnost řadí protein *N. gruberi* mezi feritiny. Tato analýza poukazuje i na funkční podobnost proteinů na základě přítomnosti konzervovaných míst feroxidázové aktivity.

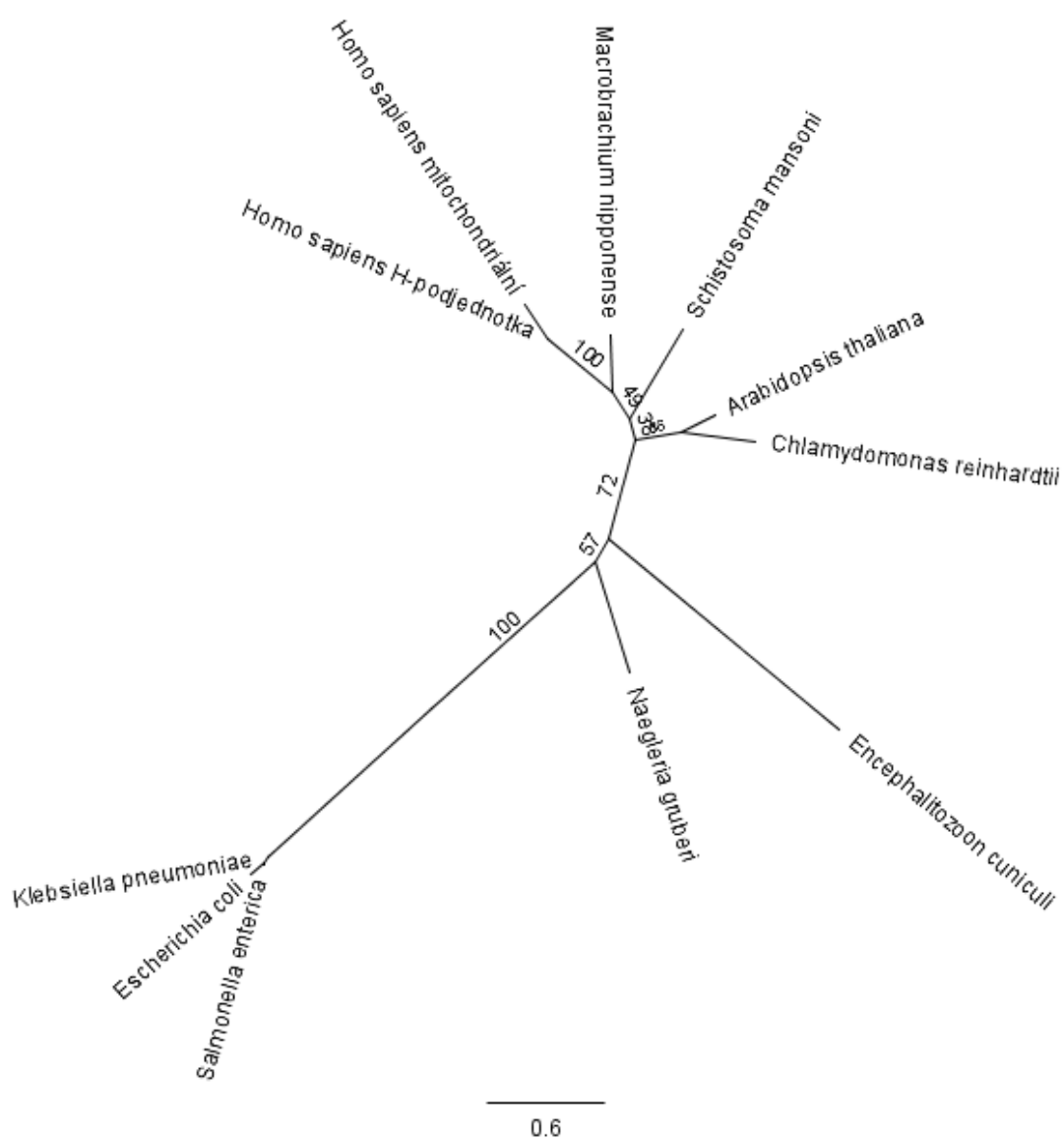


**Obrázek č. 7:** Z alignmentu vybraných feritinů je zřejmé, že sekvenční podobnost proteinu *Naegleria gruberi* ho řadí mezi feritiny. Ze zástupců eukaryot byla vybrána *Schistosoma mansoni*, *Chlamydomonas reinhardtii*, sekvence pro lidskou H-podjednotku feritinu (*Homo sapiens* H-podjednotka) a lidský mitochondriální feritin (*Homo sapiens* – mitochondriální). Konzervovaná místa feroxidázové aktivity jsou vyznačena v sekvencích hvězdičkou (podle Long, J. C. *et al.* 2008). Jejich výskyt v sekvenci proteinu naeglerie poukazuje i na funkční podobnost s vybranými feritiny.

Pro ověření, zda feritin naeglerie patří mezi eukaryotické či prokaryotické feritiny, jsme využili fylogenetické analýzy PhyML (Guindon, S. *et al.* 2003), viz obrázek č. 8. Vybrali

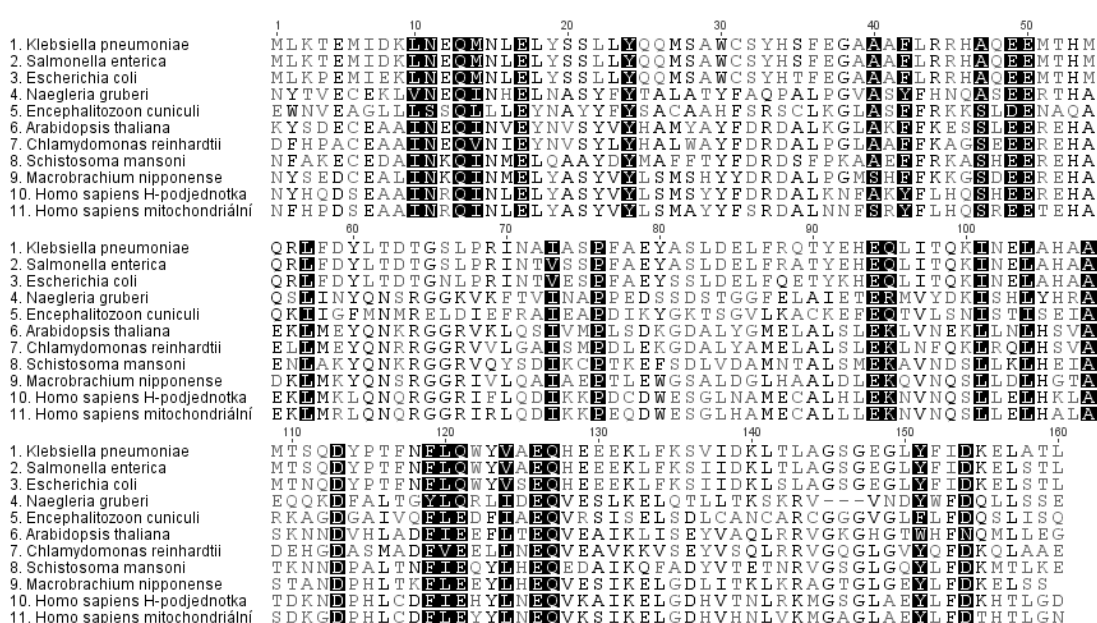
jsme tři sekvence bakteriálních feritinů (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*) a sekvence zástupců eukaryot (*Homo sapiens* H-podjednotka, *Homo sapiens* – mitochondriální, *Schistosoma mansoni*, *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Macrobrachium nipponense* a *Naegleria gruberi*). Samotnou analýzu v programu PhyML provedl Mgr. Jan Mach. Vzhledem k délce větve a hodnotě bootstrapu (statistická metoda hodnotící spolehlivost jednotlivých větvení stromu) je vysoce pravděpodobné, že feritin naeglerie spadá do skupiny eukaryotických feritinů.

(A)





(B)



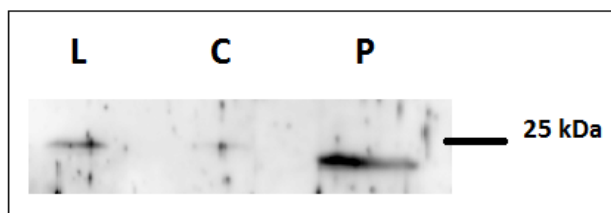
**Obrázek č. 8:** (A) Fylogenetický strom vybraných 11ti eukaryotických a prokaryotických feritinů. Tato analýza má za účel ukázat, že feritin *Naegleria gruberi* patří s vysokou pravděpodobností do skupiny eukaryotických feritinů. Fylogenetický strom byl zkonstruován pomocí PhyML 2.2.0 (Guindon, S. et al. 2003). Alignment (B) byl proveden v programu MUSCLE (Edgar, R. C. 2004) a oříznut v programu BMGE 1.1 (Criscuolo, A. et al. 2010) (matrice BLOSUM30). Test modelu byl proveden pomocí PROTTEST 3.4 (Darriba, D. et al. 2011).

Pomocí predikčních programů jsme zjistili předpokládanou lokalizaci feritinu. Algoritmy programů MitoProt II. – v1.101 a PSORT II poukazovaly na možnost lokalizace v mitochondrii pravděpodobností 99,12%, respektive 82,6%. Program MitoProt II. předpovídal mitochondriální targetovací sekvenci o 16ti aminokyselinách.

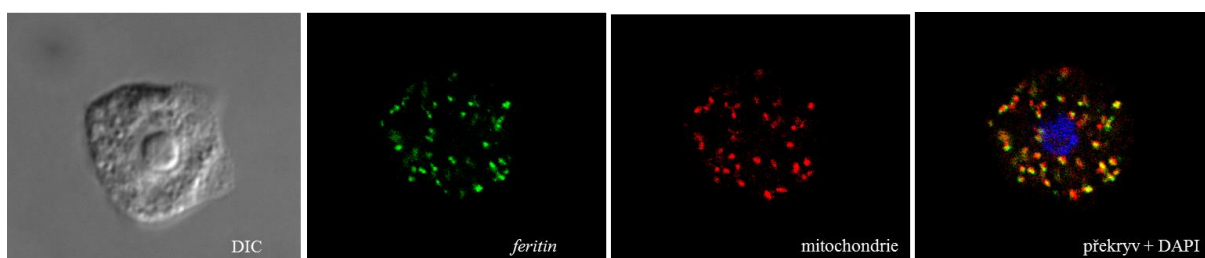
### 5.1.2 Lokalizace feritinu

Po úspěšném zaklonování genu pro feritin do bakterií *E.coli* a jeho následné expresi jsme vypurifikovali daný protein a vytvořili protilátky v potkanovi. Tyto protilátky jsme poté použili na zjištění lokalizace proteinu jednak ve frakcích *N. gruberi* pomocí western blotu (viz obrázek č. 9), a také pomocí imunofluorescenční mikroskopie ve fixovaných buňkách (viz obrázek č. 10). Na western blotové analýze je možné vidět jeho jasná lokalizace ve frakci obohacené o mitochondrie, nicméně je také vidět i náznak signálu v cytosolu. Po přesvědčivé

kolokalizaci s mitochondriemi pomocí imunofluorescenční mikroskopie usuzujeme, že signál na western blotu v cytosolu může být způsobený uvolněním obsahu z části mitochondrií během frakcionace.



**Obrázek č. 9:** (A) Lokalizace feritinu ve frakcích *N. gruberi* pomocí western blotové analýzy. Frakcionací buněk jsme získali lyzát (L), cytosolickou frakci (C) a pelet obohacený o mitochondrie (P). Vzorky z jednotlivých frakcí jsme posléze inkubovali s protilátkou proti feritinu. Blot byl vyvolán chemiluminiscenčně. Poměrné zastoupení proteinů v jednotlivých frakcích bylo vyrovnáno pomocí SDS PAGE obarvené v Coomassie Brilliant Blue.



**Obrázek č. 10:** Kolokalizace feritinu v buňkách *N. gruberi* s mitochondriemi pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Feritin jsme lokalizovali pomocí GFP, mitochondrie pomocí MitoTracker®, pro překryv jsme využili i značení jádra pomocí DAPI. Zvětšení 1 000x.

### 5.1.3 Mitochondriální targetovací sekvence proteinu feritin

Po prokázání lokalizace, Mgr. Jan Mach štěpil protein pomocí rekombinantní kvasinkové MPP (Mitochondrial Processing Peptidase, laskavě poskytnul Dr. Janata, ÚMG). Reakce probíhala 30 min při 37 °C v příslušném reakčním pufru. Štěpený produkt byl analyzován na SDS PAGE a následně přebloťován na PVDF membránu. N-konec proteinu byl sekvenován pomocí Edmanova odbourávání (provedeno na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR). Díky tomuto experimentu jsme zjistili targetovací sekvenci proteinu. S kratší formou proteinu (bez pre-sekvence) jsme nadále pracovali pro získání nativní formy proteinu, a to z důvodu obav, že po exprimování proteinu

s pre-sekvencí nebude protein schopný poskládat se do funkčního celku.

Srovnání pre-sekvence určené pomocí MitoProt II. – v1.101 predikčního programu a empiricky získanou pre-sekvencí určenou štěpením MPP. Targetovací sekvence je vyznačená podtržením:

MitoProt II.

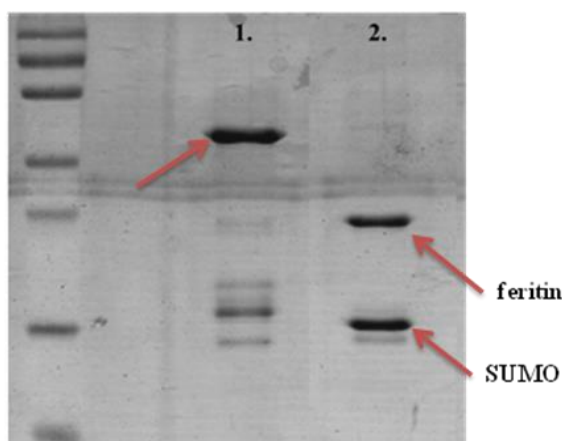
MINNTRRILTOLTTKSIRNTHHTTNFFSSTTSLR  
SFHSQSFQLDNSNPTLNKIRYNYTVECEKLVN  
EQINHELNASYFYTALATYFAQPTIALPGVAS  
YFHNQASEERTHAQSLINYQNSRGGKVKFTVIN  
APPEFADVFDSSDSTGQLHMATKGFELAIETE  
RMVYDKISHLYHRAEQQKDFALTGYLQRLID  
EQVESLKEQLTLLTKSKRVVNDYWFDQLLSS  
EVAANNSSSNSSSASQ

MPP

MINNTRRILTOLTTKSIRNTHHTTNFFSSTTSL  
RSFHSQSFQLDNSNPTLNKIRYNYTVECEKLV  
NEQINHELNASYFYTALATYFAQPTIALPGVAS  
YFHNQASEERTHAQSLINYQNSRGGKVKFTVI  
NAPPEFADVFDSSDSTGQLHMATKGFELAIET  
ERMVYDKISHLYHRAEQQKDFALTGYLQRLI  
DEQVESLKEQLTLLTKSKRVVNDYWFDQLLSS  
SEVAANNSSSNSSSASQ

#### 5.1.4 Purifikace nativní formy feritinu

Pro důkaz, že je feritin *N. gruberi* schopný vázat železo, jsme potřebovali získat jeho nativní formu bez případných přidaných histidinových zbytků, tzv. tagů, které by mohly bránit správnému složení podjednotek do funkčního celku. Po úspěšném zaklonování do bakterií přes vektor pETM11-SUMO3GFP, jeho expresi a následnou purifikaci, jsme vzniklý protein převedli do SUMO pufru a inkubovali se SUMO proteázou. Tím jsme získali nativní formu feritinu bez tagů. Tato metoda funguje díky vzniku fúzního proteinu během klonování do modifikovaného pET vektoru. Fúzní protein zahrnuje feritin a SUMO (small ubiquitin-related modifier), který patří mezi ubiquitiny a je velmi specificky rozpoznáván SUMO proteázou. Výsledkem štěpení touto proteázou je protein bez tagů a SUMO s navázanými tagy. Výsledek tohoto procesu jsme analyzovali na SDS PAGE gelu (obrázek č. 11.)



**Obrázek č. 11:** Analýza purifikace feritinu před a po štěpení SUMO proteázou. Číslo 1. – před štěpením: šipka označuje feritin s navázaným SUMO (molekulová hmotnost je ~37 kDa). Číslo 2. – po štěpení: feritin (~21 kDa) a odštěpený SUMO protein (~16 kDa).

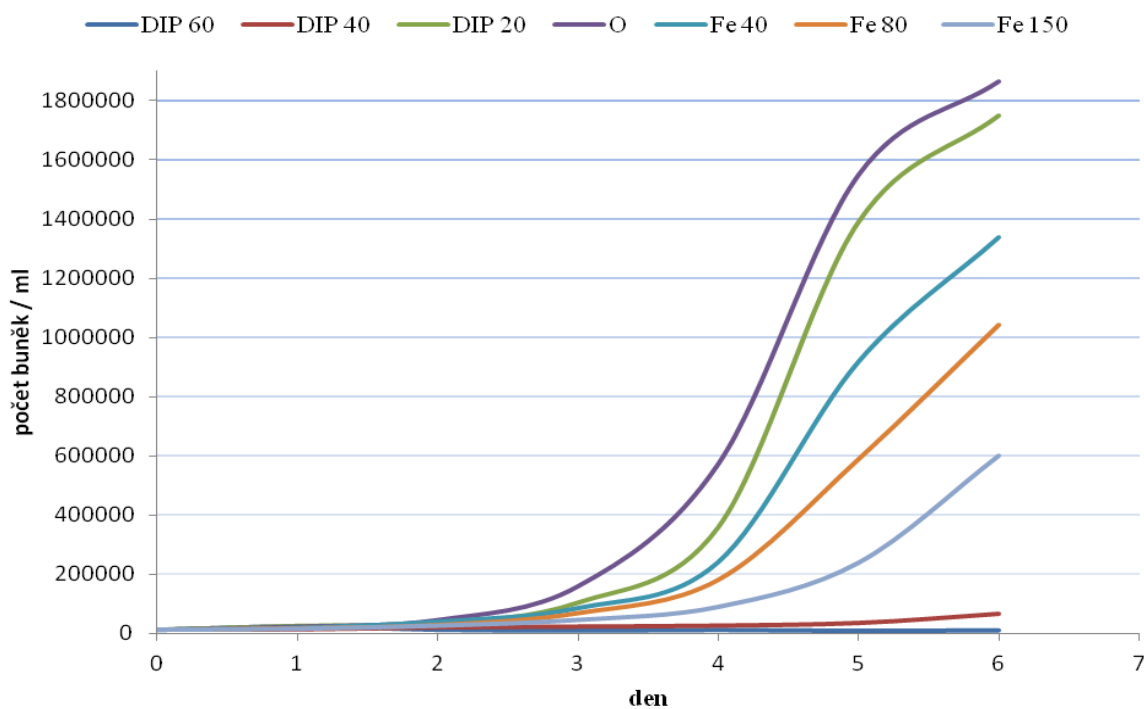
Takto vypořifikovaný feritin jsme pouřili v experimentech s radioaktivně značeným Źelezem ( $^{55}\text{Fe}$ ), které prováděl RNDr. Róbert řuřák, Ph.D. Protein byl inkubován s  $^{55}\text{Fe}$  a následně analyzován na nativní elektroforéze, která díky tomu, ře nepouřivá denaturační činidla, zachová aktivní konformaci proteinů. Na tomto gelu však nebylo vidět značené ionty Źeleza. Z těchto výsledků tedy nebylo možné prokázat schopnost vazby iontů Źeleza v molekule feritinu.

### **5.1.5 Růstové experimenty**

Vliv nadbytku či nedostatku Źeleza na růst parazitických protist je z mnoha experimentů velmi dobře znám (viz kapitola 2.1). V našem projektu jsme chtěli prostudovat vliv různých koncentrací iontů Źeleza na růst naeglerií, abychom viděli, jak jsou tyto organismy flexibilní, či které koncentrace jsou pro ně již toxické.

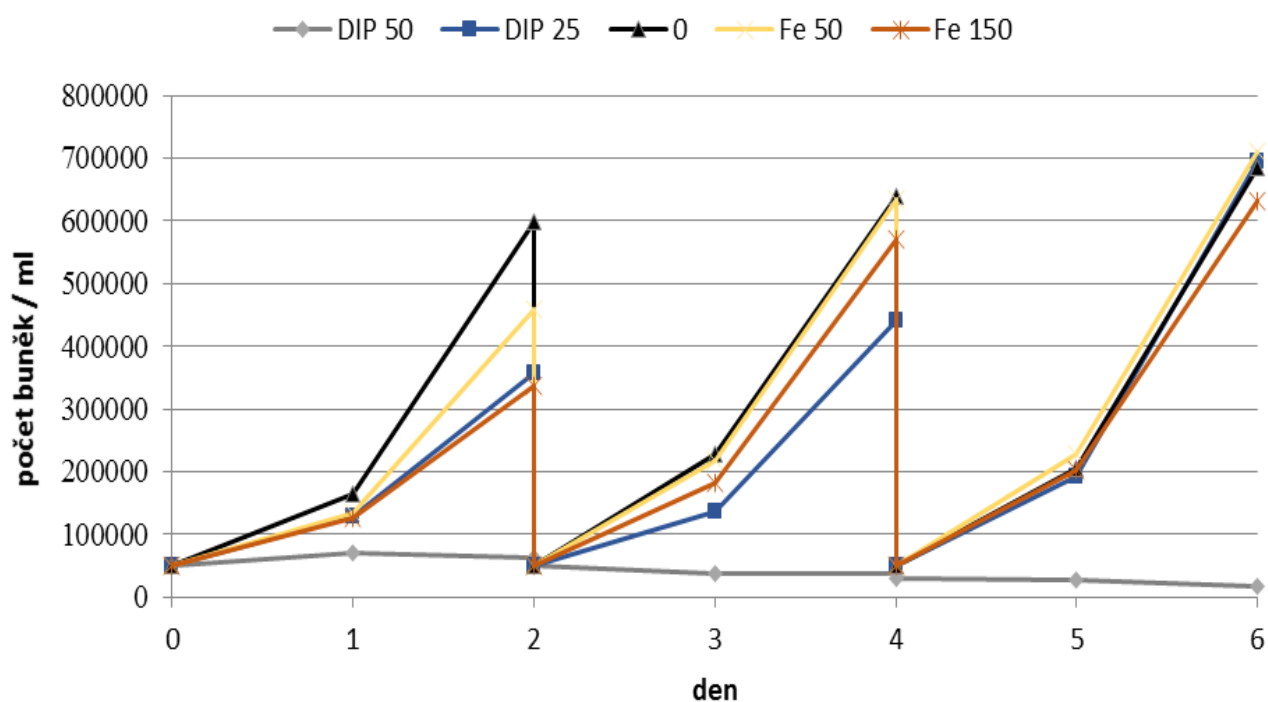
Na počátku našeho experimentu jsme potřebovali stanovit růstový profil. V pilotním experimentu jsme vyzkouřeli tři různé koncentrace Źeleza (Fe 40 $\mu\text{M}$ , 80 $\mu\text{M}$  a 150 $\mu\text{M}$ ) a chelatoru Źeleza 2-2' dipyridylu (DIP 60 $\mu\text{M}$ , 40 $\mu\text{M}$  a 20 $\mu\text{M}$ ). Z grafu č. 1 je zřejmé, ře prvotní inokulum (11 630 buněk) je příliš malé. Buňky potřebují až 3 dny v klidové fázi, než se dostanou do exponenciální fáze, a než jsou na grafu pozorovatelné rozdíly v jejich růstu. Pro následující experimenty jsme zvolili inokulum o 50 000 buňkách a 2 dny jako časový interval, kdy se buňky stále ještě nachází v exponenciální fázi. Dále jsme vybírali koncentrace Źeleza a chelatoru tak, aby to pro buňky nebylo letální (vyjma jedné koncentrace DIP pro důkaz letálního účinku nedostatku Źeleza v médiu). Jako optimální byly vybrány koncentrace chelatoru 25 $\mu\text{M}$  a 50 $\mu\text{M}$  a koncentrace Źeleza 50 $\mu\text{M}$  a 150 $\mu\text{M}$ .

**Graf č. 1: Pilotní experiment zkoumající potřebnou velikost inokula a dobu dosažení exponenciální fáze.** Pro srovnání vlivu koncentrací železa v médiu na růst naeglerií jsme stanovili tyto podmínky - koncentrace železa – 40  $\mu\text{M}$  (Fe 40), 80  $\mu\text{M}$  (Fe 80), 150  $\mu\text{M}$  (Fe 150) a koncentrace chelatoru – 20  $\mu\text{M}$  (DIP 20), 40  $\mu\text{M}$  (DIP 40), 60  $\mu\text{M}$  (DIP 60).



Pro zjištění vztahu mezi nadbytkem a nedostatkem železa jsme přistoupili k růstovým experimentům. Zjištění, která z tohoto experimentu vyplývají, poukazují na adaptabilitu buněk *N. gruberi* vůči stresu způsobeného oběma faktory, viz graf č. 2. Buňky reagují na vysokou koncentraci železa (Fe 150 a Fe 50) nejprve výrazným pozdržením růstu (den 2) oproti buňkám pěstovaným v čistém médiu (0). Během následujících 4 dní jsou buňky schopny růst vyrovnat. U buněk s vysokou koncentrací přidaného chelatoru (DIP 50) vidíme, že neprosívají vůbec. Tato koncentrace je pro ně již toxická. U kultury s nižší koncentrací chelatoru (DIP 25) také zaznamenáváme nejprve sníženou rychlost růstu (den 2). Po další kultivaci je tento trend ale opět zmírněn a buňky dorůstají kontrolní kulturu (0).

**Graf č. 2: Reprezentativní graf růstového experimentu zkoumající vliv koncentrace železa a přidaného chelatoru na růst buněk *N. gruberi*.** Buňky byly pěstovány ve vysokých koncentracích železa – 50  $\mu\text{M}$  (Fe 50) a 150  $\mu\text{M}$  (Fe 150) a v podmínkách přidaného chelatačního činidla 2-2' dipyridylu o koncentraci 25  $\mu\text{M}$  (DIP 25) a 50  $\mu\text{M}$  (DIP 50). Graf byl sestaven z měření kultur pěstovaných v tripletech uvedených podmínek.



Naměřené hodnoty (počet buněk/ml) jsme v tomto pokusu, který probíhal třikrát nezávisle na sobě v tripletech uvedených podmínek, vyjádřili v procentuálním nárůstu buněk vzhledem ke kontrole. Nárůst počtu buněk v kontrolní kultuře (0) oproti předchozímu dnu vyjadřuje 100% nárůst buněk. Nárůst počtu buněk ostatních kultur pěstovaných s přidaným železem a chelátorem jsme v jednotlivých dnech měření vztáhli k nárůstu v kontrolní kultuře (0) z toho samého dne. Data jsme zprůměrovali a uvedli v tabulce č. 1. Procentuální hodnoty dokumentují trend sníženého růstu buněk v médiu s železem a chelátorem v počátcích kultivace. Tak jak je to znázorněno i na předchozím grafu, je i z dat v tabulce č. 1 patrné, že při pokračování v kultivaci buňky dorůstají kontrolu. Například u kultury s vysokou koncentrací železa (Fe 150) způsobil prvotní stres snížený nárůst zhruba o 38 % (nárůst činil 62 % ( $\pm 4$  %)), druhý den byl nárůst dokonce menší o téměř polovinu (46,1 % ( $\pm 3,5$  %)). Postupné adaptování vedlo až k nárůstu okolo 82,4 % ve srovnání s kontrolní kulturou. Chelatační látka v kultuře DIP 25 z počátku způsobuje také snížený nárůst, 86 % ( $\pm 12,2$  %)

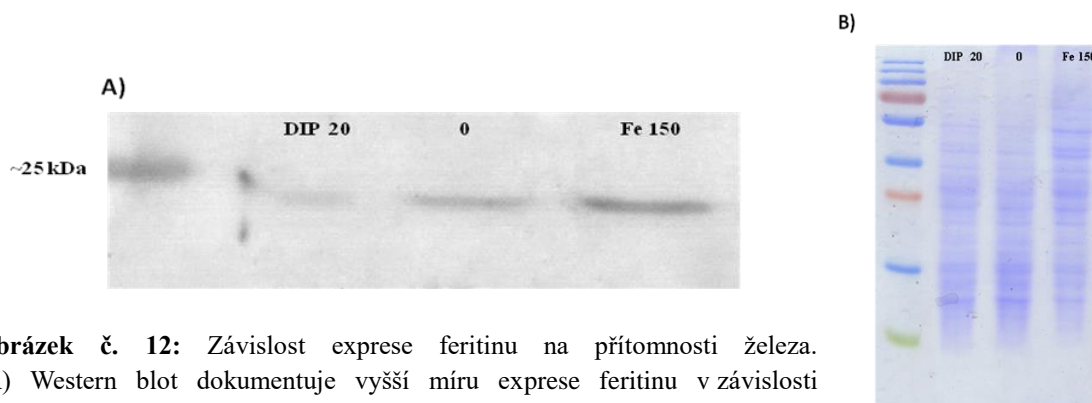
vzhledem ke kontrole. Po delší kultivaci tato kultura kontrolu však zcela dorostla (108,7 % ( $\pm 4,4$  %)). Z dat také vyplývá, že 50 $\mu$ M koncentrace chelatoru je pro buňky letální. Po dvou dnech kultivace již buňky (DIP 50) nepřibývají.

**Tabulka č. 2: Nárůst buněk v jednotlivých dnech vyjádřený v procentech vzhledem k nárůstu kontrolní kultury (100 %).** Přerušovaná čára vyznačuje přeočkování buněk. V závorce je uvedena průměrná odchylka.

den	DIP 50	DIP 25	Fe 50	Fe 150
1	26,4 % ( $\pm 7,9$ %)	86 % ( $\pm 12,2$ %)	79,4 % ( $\pm 5,9$ %)	62 % ( $\pm 4$ %)
2	1,5 % ( $\pm 3,1$ %)	77,6 % ( $\pm 16,8$ %)	78,6 % ( $\pm 5,2$ %)	46,1 % ( $\pm 3,5$ %)
3	-0,5 % ( $\pm 6,3$ %)	73,1 % ( $\pm 15,8$ %)	85,8 % ( $\pm 11,9$ %)	69,1 % ( $\pm 9,8$ %)
4	-2,4 % ( $\pm 2,1$ %)	86,8 % ( $\pm 8,8$ %)	90,1 % ( $\pm 7,2$ %)	73,3 % ( $\pm 20,3$ %)
5	2,6 % ( $\pm 9,2$ %)	100,4 % ( $\pm 5,7$ %)	109,8 % ( $\pm 3,4$ %)	95,6 % ( $\pm 1,8$ %)
6	-4,4 % ( $\pm 2,3$ %)	108,7 % ( $\pm 4,4$ %)	97,6 % ( $\pm 6,3$ %)	82,4 % ( $\pm 4,4$ %)

### 5.1.6 Exprese feritinu v závislosti na podmínkách růstu

V návaznosti na zjištění z růstových experimentů jsme přistoupili ke zkoumání vztahu dostupnosti železa a exprese feritinu. Naše pozornost směřovala k otázce, zda existuje vztah mezi jeho expresí a stresovými podmínkami, ať už nadbytkem či nedostatkem. Buňky z těchto experimentů jsme po prvním přeočkování (den 2, viz graf č. 2) sklídili a pomocí western blotové analýzy jsme sledovali, jak feritin exprimují. Jak je vidět z obrázku č. 12, existuje zde jasná korelace. Buňky pěstované s nadbytkem železa vykazovaly vyšší míru exprese feritinu. Naopak s nedostatkem železa byla exprese podstatně nižší, což odpovídá obecným principům regulace závislé na železe, jak bylo popsáno v kapitole 2.3.



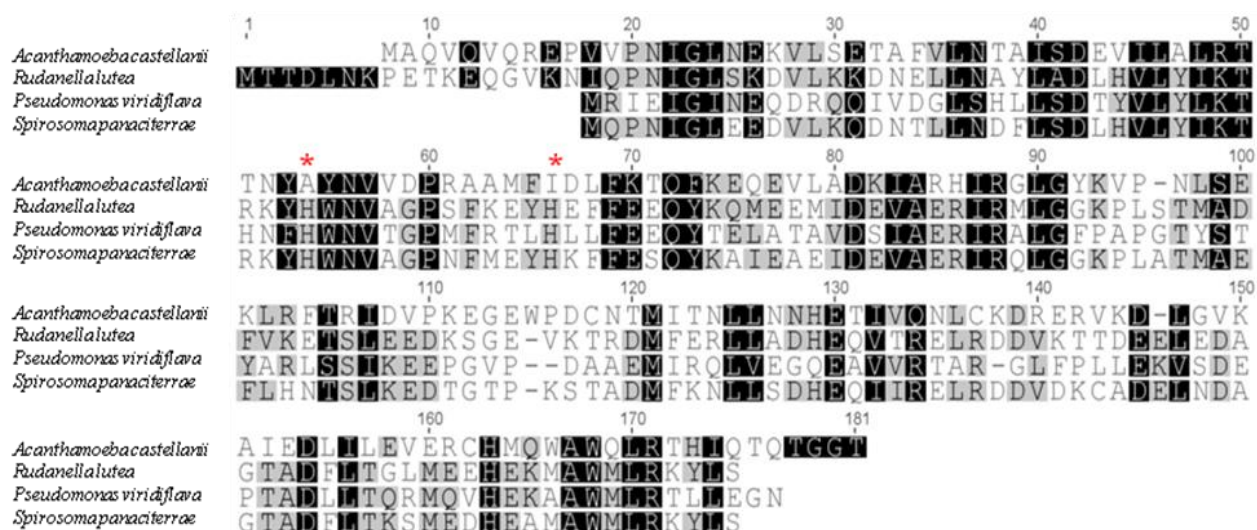
**Obrázek č. 12:** Závislost exprese feritinu na přítomnosti železa. (A) Western blot dokumentuje vyšší míru exprese feritinu v závislosti na vysoké koncentraci železa v médiu (Fe 150) oproti buňkám pěstovaným ve standardním médiu (0). Výrazně nižší exprese je poté u buněk se sníženým obsahem železa v médiu (DIP 20).

(B) Snímek proteinového profilu lyzátu buněk *N. gruberi* vyrovnaných na 30  $\mu$ g proteinu ve vzorku.

## 5.2 Acanthamoeba castellanii

### 5.2.1 Bioinformatická analýza Dps

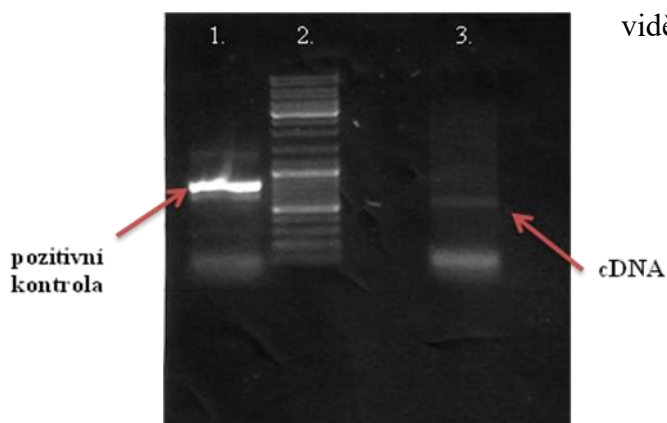
Sekvence genu pro Dps v *A. castellanii* byla identifikována na základě databáze KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Sekvenční podobnost skutečně řadí tento protein mezi Dps proteiny, což dokazuje následující alignment na obrázku č. 13. Zajímavostí je, že histidinové aminokyseliny zapojené do vazby kovů (podle Castruita, M. *et al.* 2006) v naší sekvenci nejsou. Funkci tohoto proteinu *A. castellanii* tak není možné z tohoto alignmentu předpovídat.



**Obrázek č. 13:** Alignment čtyř vybraných Dps proteinů poukazuje na sekvenční podobnost Dps z *Acanthamoeba castellanii* s vybranými sekvencemi zástupců prokaryot, konkrétně aerobní bakterie *Rudanella lutea*, parazit rostlin *Pseudomonas viridiflava* a půdní bakterie *Spirosoma panaciterrae*. V alignmentu jsou hvězdičkou vyznačeny histidinové aminokyseliny, které se zapojují do vazby kovů (podle Castruita, M. *et al.* 2006).

### 5.2.2 Izolace cDNA genu pro Dps *A. castellanii*

Vzhledem k výskytu dvou intronů v genu *A. castellanii* pro Dps jsme přistoupili k izolaci RNA a jejímu přepisu do cDNA. Na snímcích z analýzy horizontální elektroforézy je



vidět přepsaná cDNA genu pro Dps (obrázek č. 14).

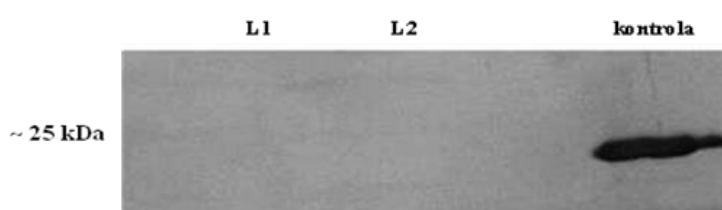
**Obrázek č. 14:** Snímek horizontální elektroforézy analyzující výsledek přepisu izolované RNA do cDNA. 1. gDNA *A. castellanii* – pozitivní kontrola; 2. marker molekulových hmotností Gene Ruler Mix (Fermentas); 3. cDNA

Signál pozitivní kontroly má o něco vyšší molekulovou hmotnost vzhledem k obsaženým

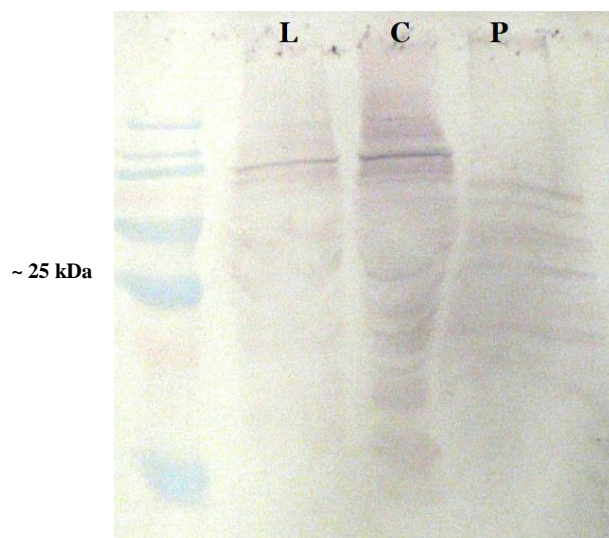


### 5.2.3 Protilátky a navození stresových podmínek

Po úspěšném zaklonování genu a jeho expresi v bakteriích *E.coli*, jsme daný protein vypurifikovali a vytvořili protilátky v potkanovi. Lyzát acanthamoeb jsme poté testovali pomocí western blotu na přítomnost proteinu. Nými vytvořené protilátky velmi dobře reagovaly s purifikovaným proteinem (pozitivní kontrola). Bohužel, jak je vidět na obrázku č. 15, v lyzátu z dvou nezávislých kultur *A. castellanii* se nám nepodařilo detekovat Dps protein. Stejný výsledek jsme získali i po frakcionaci acanthamoeb, viz obrázek č. 16, která měla obohatit analyzovaný vzorek o studovaný protein.



**Obrázek č. 15:** Western blot testující přítomnost Dps proteinu v lyzátu *A. castellanii*. Byly použity dvě nezávisle na sobě narostlé kultury k získání lyzátu (L1 a L2). Jako pozitivní kontrola sloužila frakce získaná během purifikace proteinu. Je patrné, že v lyzátu daný protein není detekovatelný. Jak je vidno na pozitivní kontrole, protilátky fungovaly dobře.



**Obrázek č. 16:** Imunoblotová analýza frakcí *A. castellanii*. Protein Dps (predikovaná velikost ~20 kDa) není na blotu patrný.

L – lyzát buněk, C – cytosol, P – pelet obohacený o mitochondrie

Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo detekovat Dps protein v lyzátu, ani ve frakcích acanthamoeb, přistoupili jsme ke změně podmínek kultivace. Inspirovali jsme se experimentem Woyda-Ploszczyca a kolektivu (2011), který sleduje vliv oxidativního stresu po přidání  $H_2O_2$  na růst a bioenergetické dráhy jejich mitochondrií. Domnívali jsme se, že oxidativní stres by mohl indukovat expresi tohoto proteinu. Naše buňky jsme přes noc kultivovali v 1,4mM  $H_2O_2$  a druhý den sklidili. Jednotlivé frakce jsme poté testovali na přítomnost Dps proteinu pomocí imunoblotu. Améby oxidativní stres nesnášely příliš dobře a většina z nich vytvořila cysty. Výsledek western blotu zde neuvádím, jelikož byl negativní.

## 6 Diskuze

Železo je prvek nepostradatelný v metabolických drahách aerobních i anaerobních organismů. V popředí našeho zájmu byla jednobuněčná parazitická protista, u kterých je již velmi dobře známo, že železo zde funguje jako faktor virulence. Mnoho experimentu dokazuje, jak působí nadbytek a nedostatek železa na růst těchto parazitů (např. Pollack, S. *et al.* 1987; Malafaia, G. *et al.* 2011; Kulda, J. *et al.* 1999). Především pro tyto důvody je studium procesů spjatých s utilizací železa důležité. U zástupců améb, *Naegleria gruberi* a *Acanthamoeba castellanii*, není k dispozici mnoho empirických dat souvisejících s touto problematikou, a to i přesto, že existují kompletní informace o jejich genomu (Fritz-Laylin, L. K. *et al.* 2010; Clarke, M. *et al.* 2013). My jsme u naeglerie využili dat z genomové databáze pro identifikování sekvence genu pro feritin, významný protein skladující železo, který se běžně vyskytuje v cytosolu. Naše experimenty vedly k úspěšnému zaklonování tohoto genu do bakterií a následné expresi. Po vytvoření protilátek v potkanovi jsme lokalizovali feritin v buňkách naeglerií pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Jak naznačovaly predikční programy, lokalizovali jsme protein v mitochondriích. V analýze sekvence feritinu *N. gruberi* pomocí alignmentu byla vidět také konzervovaná místa feroxidázové aktivity (podle Long, J. C. *et al.* 2008).

Vzhledem k tomu, že jsou ionty železa ve vyšších koncentracích toxické a zapojují se do reakcí generujících reaktivní kyslíkové molekuly (Fenton, H. 1894) musí být koncentrace iontů železa v buňkách regulována. V eukaryotických buňkách jsou mitochondrie hlavním místem utilizace iontů železa. Nachází se zde mnoho proteinů, v jejichž struktuře se železo vyskytuje. Ty jsou součástí nejenom dýchacího řetězce, citrátového cyklu anebo biosyntézy amino kyselin a vitamínů, ale také zde probíhá syntéza hemu a železo-sírných center (Ponka, P. *et al.* 1997; Lill, R. *et al.* 2000). Jeho detoxifikace a udržování zásob pro potřebné procesy je tak v těchto organelách důležitá. Koncentrace cytosolického železa je nejčastěji regulována jeho ukládáním do molekul feritinu, proto je zajímavé, že jsme neidentifikovali cytosolickou formu feritinu v buňkách *N. gruberi*. Cytosolický, ani mitochondriální feritin obvykle nenalezneme u jiných jednobuněčných parazitických protist; nemají ho buňky trypanosom, entamoeb, giardií ani trichomonád. Parazitické organismy bývají druhotně odvozené, ztrácí některé dráhy či molekuly, jelikož se vyskytují v prostředí bohaté na živiny od svého hostitele. Koncentrace dostupného železa je ale u savčích buněk přísně regulována (Kehl-Fie, T. E. *et al.* 2010), proto bychom předpokládali, že budou i parazitické buňky schopny ionty železa skladovat pro případ jejich nedostatku v prostředí. U patogenních bakterií jsou feritin

či bakterioferitin běžně k nalezení (Brooks, B. W. *et al.* 1991; Andrews, S. C. *et al.* 1998). V kvasinkách tyto proteinové struktury nenalezneme. Skladování železa u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* probíhá díky expresi specifických transportérů CCC1 na membránách vakuol, ve kterých jsou následně ionty železa uloženy (Li, L. *et al.* 2001). Zajímavé je skladování železa u *Trichomonas foetus*. V experimentech se radionuklidem železem ( $^{59}\text{Fe}$ ) byly naměřeny jeho vysoké koncentrace v cytosolu, a to i přes to, že feritin identifikován nebyl (Suchan, P. *et al.* 2003). Co se tedy děje se železem v cytosolu v buňkách naeglerií a jiných protist je zatím neznámé.

*Naegleria gruberi* je intenzivně studována z hlediska evoluce eukaryot. Recentní analýzy naznačují, že by mohla mít blízko k poslednímu společnému předku eukaryot (Koonin, E. V. 2010). Recentní studie odkrývající genom naeglerie podporuje tuto hypotézu analýzou jejích genů (Fritz-Laylin, L. K. *et al.* 2010). Ukazuje se také, že *N. gruberi* je metabolicky velmi flexibilní prvok, jehož mitochondrie je schopna jak aerobní respirace, tak i pro anaerobní organismy typických drah vedoucích k produkci vodíku. Dokazuje to *in silico* predikce přítomnosti genu pro enzym [Fe-Fe]-hydrogenázu (Fritz-Laylin, L. K. *et al.* 2010), která je příznačná pro anaerobní a mikroaerofilní organismy. Aktivita a lokalizace tohoto enzymu byla experimentálně prokázána výlučně v cytosolu buněk *N. gruberi*. (Tsaousis, A. D. *et al.* 2014). Stejně jako samotný enzym, byly v cytosolu buněk prokázány i maturázy, které jsou nezbytné pro správné poskládání hydrogenáz. S produkcí vodíku za pomoci hydrogenázy mohou být spojené vyšší nároky na dostupnost a detoxifikaci železa, jelikož aktivní místo [Fe-Fe]-hydrogenáz je složeno z [4Fe-4S] klastrů (Peters, J. W. *et al.* 1998). Domníváme se, že přítomnost feritinu v mitochondriích *Naegleria gruberi* může být spjata právě se schopností produkce vodíku. I přes fakt, že se hydrogenáza naeglerie nachází v cytosolu, jsou všeobecně biosyntetické dráhy železo-sírných center u aerobů v mitochondrii (Lill, R. *et al.* 2000). Je možné, že nároky na železo spojené s přítomností hydrogenáz, jejichž aktivita byla v buňkách naeglerií zaznamenána i za aerobní kultivace (Tsaousis, A. D. *et al.* 2014), vedla k zachování feritinů v mitochondriích.

V následných experimentech jsme se přesvědčili, že exprese feritinu je závislá na železe. Sledovali jsme to pomocí růstových experimentů, kde jsme kultivovali naeglerie v různých podmínkách. Některé kultury byly vystaveny stresu nadbytku železa v médiu. Tyto kultury vykazovaly na počátku menší rychlost růstu. Nicméně po několika dnech došlo k snížení rozdílů. Na opačném pólu byly kultury, kde bylo železo z média deprivováno pomocí chelatační látky. Kultury s vysokou koncentrací chelatoru, a tedy s nízkou koncentrací

volných atomů železa, neprosplávaly vůbec, což logicky koreluje s obecnou představou, že železo je esenciálním prvkem. Kultura vystavená nižším koncentracím chelatoru také nejprve rostla pomaleji. Rozdíl byl však opět po několika dnech kultivace vyrovnán. Co se ale lišilo byla exprese feritinů. Regulační mechanismus exprese feritinů probíhá posttranskripčně přes konzervované strukturní motivy IRE v mRNA feritinů (Caughman, S. W. *et al.* 1988) a je přímo vázána na koncentraci intracelulárního železa (Drysdale, J. W. *et al.* 1966). V našem experimentu se toto potvrdilo. Vyšší hladiny železa stimulovaly buňky k expresi většího množství feritinu a opačně. Zde jsme tedy prokázali závislost exprese feritinu *N. gruberi* na přítomnosti iontů železa.

V čem jsme ale neuspěli, byl *in vitro* důkaz, že tento feritin je schopen vázat ionty železa. Pro tyto účely jsme purifikovali nativní formu feritinu *N. gruberi*. Experimenty s radioaktivním železem ( $^{55}\text{Fe}$ ) neprokázaly navázání iontů železa v jeho struktuře. Feritin je protein o komplexní struktuře čítající 24 podjednotek, který je schopen se spontánně poskládat (Zhang, Y. *et al.* 2011). Nicméně, některé biologické systémy potřebují molekuly typu chaperonu k poskládání proteinu, či k jeho správné funkci. Navíc u feritinu byly v *in vitro* experimentech studovány molekuly PCBP1, které jsou běžným RNA-vázajícím proteinem v savčích buňkách, a které velmi výrazně zvyšovaly inkorporaci iontů železa do molekuly (Shi, H. *et al.* 2008). V našem případě se tedy domníváme, že u feritinu *Naegleria gruberi* nejsme schopni navodit podmínky buďto pro jeho spontánní poskládání, anebo zde chybí molekuly, které by dopomohly inkorporaci železa do jádra feritinu.

U dalšího zkoumaného prvoka, *Acanthamoeba castellanii*, jsme studovali Dps protein patřící mezi feritiny, který přesto, že se liší ve struktuře a funkci, je schopen stále vázat a oxidovat železo (Zhao, G. *et al.* 2002). Jedná se o protein známý u bakterií jako „DNA-binding protein from starved cells“, který nejenom že skladuje železo, ale také váže DNA a mechanicky jí chrání před poškozením (Martinez, A. *et al.* 1997). Vzhledem k tomu, že v sekvenci *A. castellanii* pro Dps chybí histidinové zbytky potřebné pro vazbu kovů (podle Castruita, M. *et al.* 2006), můžeme o konkrétní funkci tohoto proteinu zatím pouze spekulovat. Zajímavostí je, že *Acanthamoeba* může sloužit jako rezervoár některých bakterií, které se množí uvnitř její buňky (Rowbotham, T. J. *et al.* 1980). Velké množství cizí DNA tak mohou tyto améby získávat pomocí laterárního genového transferu (LGT) z bakterií. Dokazuje to i studie genomu *A. castellanii*, kde bylo identifikováno 450 genů vzniklých LGT (Clarke, M. *et al.* 2013). Proto je možné, že Dps protein, který jsme v buňkách *acanthamoeb*y identifikovali, získala tato améba právě díky LGT.

V našich experimentech se nám podařilo izolovat RNA acanthamoebly a následně zaklonovat cDNA příslušného genu pro Dps do bakterií a tento protein úspěšně exprimovat. Po vytvoření protilátek jsme se potýkali s problémy s identifikací proteinu na western blotu. Vyzkoušeli jsme frakcionaci buněk, což by mělo v případě velmi nízké exprese proteinu vést k obohacení analyzovaného vzorku o studovaný protein. Ani v tomto případě jsme neviděli signál na western blotu. Domnívali jsme se, že je protein pravděpodobně exprimován pouze za stresových podmínek, kdy by mohl fungovat jako mechanická a detoxifikační ochrana proti kyslíkovým radikálům. Pro navození stresových podmínek pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jsme se inspirovali z literatury koncentrací (1,4 mM), která nebyla pro buňky létální, ale pouze vedla ke snížení jejich růstu (Woyda-Ploszczyca, A. *et al* 2011). Nicméně ani po této úvaze jsme nebyli schopni detekovat signál proteinu Dps na western blotu. Je tedy možné, že je ho v buňce exprimováno jen velmi malé množství nutné k jeho správné funkci, což momentálně nejsme schopni detekovat námi dostupnými metodami, anebo je protein *in vivo* exprimován pouze v námi neznámých stresových podmínkách.

## 7 Závěr

Experimentální část této práce se zabývala proteiny skladující ionty železa u protist rodu *Naegleria gruberi* a *Acanthamoeba castellanii*. U prvního zmíněného jsme byli úspěšní s identifikováním feritinu, který je u nefotosyntetizujících protist neobvyklý. Překvapivě jsme ho lokalizovali v mitochondriích a vznesly možnou hypotézu jeho atypické lokalizace. I přes to, že jsme přímo nepotvrdili jeho schopnost vazby iontů železa, podařilo se nám prokázat, že jeho exprese je závislá na dostupnosti železa. Pravděpodobně je tak jeho funkce spjatá s metabolismem tohoto kovu. V genomu acanthamoebly jsme sice identifikovali gen pro Dps protein a exprimovali ho, nicméně se nám nepodařilo objasnit jeho lokalizaci, regulaci jeho exprese či jeho funkci v buňkách. Jak vyplývá z rešerše poznatků o procesech spojených s příjmem a utilizací železa, je u obou zástupců velmi mnoho prostoru pro získávání nových experimentálních dat.

## 8 Seznam použité literatury

- Ali, V., Y. Shigeta, U. Tokumoto, Y. Takahashi, and T. Nozaki. 2004. An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J Biol Chem* **279**:16863-16874.
- Alonso, P., and E. Zubiaur. 1985. Phagocytic activity of three *Naegleria* strains in the presence of erythrocytes of various types. *J Protozool* **32**:661-664.
- Anderson, I. J., R. F. Watkins, J. Samuelson, D. F. Spencer, W. H. Majoros, M. W. Gray, and B. J. Loftus. 2005. Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist* **156**:203-214.
- Andrews, S. C. 1998. Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* **40**:281-351.
- Andrews, S. C., J. M. Smith, S. J. Yewdall, J. R. Guest, and P. M. Harrison. 1991. Bacterioferritins and ferritins are distantly related in evolution. Conservation of ferroxidase-centre residues. *FEBS Lett* **293**:164-168.
- Aranes, J. M., A. F. Francisco, P. M. de Abreu Vieira, M. Silva, M. S. Araújo, A. T. de Carvalho, M. L. Pedrosa, C. M. Carneiro, W. L. Tafuri, O. A. Martins-Filho, and S. M. Elói-Santos. 2011. Trypanosoma cruzi: desferrioxamine decreases mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. *Exp Parasitol* **128**:401-408.
- Arosio, P., T. G. Adelman, and J. W. Drysdale. 1978. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J Biol Chem* **253**:4451-4458.
- Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P. S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D. M. Sipe, and J. Kaplan. 1994. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**:403-410.
- Baker, E. 1994. Structure and reactivity of transferrins. *Advances in inorganic chemistry* **41**:389-464.
- Barker, J., and M. R. Brown. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140** ( Pt 6):1253-1259.
- Batista, E. J., L. F. de Menezes Feitosa, and W. de Souza. 2000. The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* **86**:881-890.
- Bauminger, E. R., P. M. Harrison, D. Hechel, I. Nowik, and A. Treffry. 1991a. Iron (III) can be transferred between ferritin molecules. *Proc Biol Sci* **244**:211-217.
- Bauminger, E. R., P. M. Harrison, D. Hechel, I. Nowik, and A. Treffry. 1991b. Mössbauer spectroscopic investigation of structure-function relations in ferritins. *Biochim Biophys Acta* **1118**:48-58.
- Bera, T., N. Nandi, D. Sudhakar, M. A. Akbar, A. Sen, and P. Das. 2006. Preliminary evidence on existence of transplasma membrane electron transport in *Entamoeba histolytica* trophozoites: a key mechanism for maintaining optimal redox balance. *J Bioenerg Biomembr* **38**:299-308.
- Bradley, S. G., D. M. Toney, Y. Zhang, and F. Marciano-Cabral. 1996. Dependence of growth, metabolic expression, and pathogenicity of *Naegleria fowleri* on exogenous porphyrins. *J Parasitol* **82**:763-768.
- Brooks, B. W., N. M. Young, D. C. Watson, R. H. Robertson, E. A. Sugden, K. H. Nielsen, and S. A. Becker. 1991. Mycobacterium paratuberculosis antigen D: characterization and evidence that it is a bacterioferritin. *J Clin Microbiol* **29**:1652-1658.
- Bulen, W. A., J. R. LeComte, and S. Lough. 1973. A hemoprotein from azotobacter containing non-heme iron: isolation and crystallization. *Biochem Biophys Res Commun* **54**:1274-1281.

- Butt, C. G. 1966.** Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* **274**:1473-1476.
- Cabantchik, Z. I., S. Moody-Haupt, and V. R. Gordeuk. 1999.** Iron chelators as anti-infectives; malaria as a paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**:289-298.
- Carvalho, S., T. Cruz, N. Santarém, H. Castro, V. Costa, and A. M. Tomás. 2009.** Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Trop* **109**:131-135.
- Castruita, M., M. Saito, P. C. Schottel, L. A. Elmegreen, S. Myneni, E. I. Stiefel, and F. M. Morel. 2006.** Overexpression and characterization of an iron storage and DNA-binding Dps protein from *Trichodesmium erythraeum*. *Appl Environ Microbiol* **72**:2918-2924.
- Caughman, S. W., M. W. Hentze, T. A. Rouault, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1988.** The iron-responsive element is the single element responsible for iron-dependent translational regulation of ferritin biosynthesis. Evidence for function as the binding site for a translational repressor. *J Biol Chem* **263**:19048-19052.
- Ceci, P., A. Ilari, E. Falvo, and E. Chiancone. 2003.** The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage: x-ray crystal structure, iron binding, and hydroxyl-radical scavenging properties. *J Biol Chem* **278**:20319-20326.
- Chasteen, N. D., and P. M. Harrison. 1999.** Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* **126**:182-194.
- Chaudhuri, M., W. Ajayi, S. Temple, and G. C. Hill. 1995.** Identification and partial purification of a stage-specific 33 kDa mitochondrial protein as the alternative oxidase of the *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream trypomastigotes. *J Eukaryot Microbiol* **42**:467-472.
- Cirillo, J. D., S. L. Cirillo, L. Yan, L. E. Bermudez, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999.** Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **67**:4427-4434.
- Clarke, M., A. J. Lohan, B. Liu, I. Lagkouvardos, S. Roy, N. Zafar, C. Bertelli, C. Schilde, A. Kianianmomeni, T. R. Bürglin, C. Frech, B. Turcotte, K. O. Kopec, J. M. Synnott, C. Choo, I. Paponov, A. Finkler, C. S. Heng Tan, A. P. Hutchins, T. Weinmeier, T. Rattei, J. S. Chu, G. Gimenez, M. Irimia, D. J. Rigden, D. A. Fitzpatrick, J. Lorenzo-Morales, A. Bateman, C. H. Chiu, P. Tang, P. Hegemann, H. Fromm, D. Raoult, G. Greub, D. Miranda-Saavedra, N. Chen, P. Nash, M. L. Ginger, M. Horn, P. Schaap, L. Caler, and B. J. Loftus. 2013.** Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* **14**:R11.
- Connor, J. R., S. L. Menzies, S. M. St Martin, and E. J. Mufson. 1990.** Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* **27**:595-611.
- Corsi, B., A. Cozzi, P. Arosio, J. Drysdale, P. Santambrogio, A. Campanella, G. Biasiotto, A. Albertini, and S. Levi. 2002.** Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem* **277**:22430-22437.
- Crichton, R., and J. R. Boelaert. 2001.** *Inorganic biochemistry of iron metabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences*. John Wiley & Sons.
- Criscuolo, A., and S. Grimaldo. 2010.** BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* **10**:210.
- Crouch, M. L., M. Castor, J. E. Karlinsey, T. Kalhorn, and F. C. Fang. 2008.** Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **67**:971-983.



- Cruz-Castañeda, A., M. López-Casamichana, and J. J. Olivares-Trejo. 2011.** Entamoeba histolytica secretes two haem-binding proteins to scavenge haem. *Biochem J* **434**:105-111.
- Dancis, A., D. G. Roman, G. J. Anderson, A. G. Hinnebusch, and R. D. Klausner. 1992.** Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3869-3873.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2011.** ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **27**:1164-1165.
- De Domenico, I., D. M. Ward, and J. Kaplan. 2009.** Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood* **114**:4546-4551.
- Donovan, A., C. A. Lima, J. L. Pinkus, G. S. Pinkus, L. I. Zon, S. Robine, and N. C. Andrews. 2005.** The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* **1**:191-200.
- Drysdale, J. W., and H. N. Munro. 1966.** Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat liver. *J Biol Chem* **241**:3630-3637.
- Dzitko, K., B. Dziadek, J. Dziadek, and H. Długońska. 2007.** Toxoplasma gondii: inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. *Pol J Microbiol* **56**:25-32.
- Edgar, R. C. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**:1792-1797.
- Elthon, T. E., and L. McIntosh. 1987.** Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8399-8403.
- Espinosa-Cantellano, M., and A. Martínez-Palomo. 2000.** Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* **13**:318-331.
- Fenton, H. 1894.** LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **65**:899-910.
- Ferrer, P., A. K. Tripathi, M. A. Clark, C. C. Hand, H. Y. Rienhoff, and D. J. Sullivan. 2012.** Antimalarial iron chelator, FBS0701, shows asexual and gametocyte *Plasmodium falciparum* activity and single oral dose cure in a murine malaria model. *PLoS One* **7**:e37171.
- Fritz-Laylin, L. K., M. L. Ginger, C. Walsh, S. C. Dawson, and C. Fulton. 2011.** The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Res Microbiol* **162**:607-618.
- Fritz-Laylin, L. K., S. E. Prochnik, M. L. Ginger, J. B. Dacks, M. L. Carpenter, M. C. Field, A. Kuo, A. Paredez, J. Chapman, J. Pham, S. Shu, R. Neupane, M. Cipriano, J. Mancuso, H. Tu, A. Salamov, E. Lindquist, H. Shapiro, S. Lucas, I. V. Grigoriev, W. Z. Cande, C. Fulton, D. S. Rokhsar, and S. C. Dawson. 2010.** The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**:631-642.
- FULTON, C. 1970.** Amebo-flagellates as Research Partners." T/oe Laboratory Biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. *Methods in cell biology* **4**:341.
- Fulton, C. 1974.** Axenic cultivation of *Naegleria gruberi*. Requirement for methionine. *Exp Cell Res* **88**:365-370.
- Fulton, C., C. Webster, and J. S. Wu. 1984.** Chemically defined media for cultivation of *Naegleria gruberi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:2406-2410.

- Girelli, D., R. Corrocher, L. Bisceglia, O. Olivieri, L. De Franceschi, L. Zelante, and P. Gasparini. 1995.** Molecular basis for the recently described hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a mutation in the iron-responsive element of ferritin L-subunit gene (the "Verona mutation"). *Blood* **86**:4050-4053.
- González-Chávez, S. A., S. Arévalo-Gallegos, and Q. Rascón-Cruz. 2009.** Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* **33**:301.e301-308.
- Grant, R. A., D. J. Filman, S. E. Finkel, R. Kolter, and J. M. Hogle. 1998.** The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol* **5**:294-303.
- Guindon, S., and O. Gascuel. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**:696-704.
- Harrison, P. M., and P. Arosio. 1996.** The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* **1275**:161-203.
- Heggie, T. W. 2010.** Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis* **8**:201-206.
- Hempstead, P. D., S. J. Yewdall, A. R. Fernie, D. M. Lawson, P. J. Artymiuk, D. W. Rice, G. C. Ford, and P. M. Harrison. 1997.** Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J Mol Biol* **268**:424-448.
- Hernández-Cuevas, N. A., C. Weber, C. C. Hon, and N. Guillen. 2014.** Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *PLoS One* **9**:e107102.
- Hider, R. C., and X. Kong. 2010.** Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports* **27**:637-657.
- Huynh, C., D. L. Sacks, and N. W. Andrews. 2006.** A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J Exp Med* **203**:2363-2375.
- Ikadai, H., T. Tanaka, N. Shibahara, H. Tanaka, A. Matsuu, N. Kudo, K. Shimazaki, I. Igarashi, and T. Oyamada. 2005.** Inhibitory effect of lactoferrin on in vitro growth of *Babesia caballi*. *Am J Trop Med Hyg* **73**:710-712.
- Jones, M. S., and O. T. Jones. 1969.** The structural organization of haem synthesis in rat liver mitochondria. *Biochem J* **113**:507-514.
- Kakhlon, O., and Z. I. Cabantchik. 2002.** The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* **33**:1037-1046.
- Keel, S. B., R. T. Doty, Z. Yang, J. G. Quigley, J. Chen, S. Knoblauch, P. D. Kingsley, I. De Domenico, M. B. Vaughn, J. Kaplan, J. Palis, and J. L. Abkowitz. 2008.** A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* **319**:825-828.
- Kehl-Fie, T. E., and E. P. Skaar. 2010.** Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* **14**:218-224.
- Kern, A., F. S. Hartner, M. Freigassner, J. Spielhofer, C. Rumpf, L. Leitner, K.-U. Fröhlich, and A. Glieder. 2007.** *Pichia pastoris* 'just in time' alternative respiration. *Microbiology* **153**:1250-1260.
- Khan, N. A. 2006.** Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* **30**:564-595.
- King, C. A., and T. M. Preston. 1977.** Studies of anionic sites on the cell surface of the amoeba *Naegleria gruberi* using cationized ferritin. *J Cell Sci* **28**:133-149.

- Koonin, E. V. 2010.** Preview. The incredible expanding ancestor of eukaryotes. *Cell* **140**:606-608.
- Kulda, J., M. Poislová, P. Suchan, and J. Tachezy. 1999.** Iron enhancement of experimental infection of mice by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* **85**:692-699.
- Kühn, L. C., A. McClelland, and F. H. Ruddle. 1984.** Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell* **37**:95-103.
- Latour, N. G., and R. E. Reeves. 1965.** An iron-requirement for growth of *Entamoeba histolytica* in culture, and the antiamebal activity of 7-iodo-8-hydroxy-quinoline-5-sulfonic acid. *Exp Parasitol* **17**:203-209.
- Lawson, D. M., P. J. Artymiuk, S. J. Yewdall, J. M. Smith, J. C. Livingstone, A. Treffry, A. Luzzago, S. Levi, P. Arosio, and G. Cesareni. 1991.** Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* **349**:541-544.
- Lawson, D. M., A. Treffry, P. J. Artymiuk, P. M. Harrison, S. J. Yewdall, A. Luzzago, G. Cesareni, S. Levi, and P. Arosio. 1989.** Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett* **254**:207-210.
- Lee, J., J. H. Kim, H. J. Sohn, H. J. Yang, B. K. Na, Y. J. Chwae, S. Park, K. Kim, and H. J. Shin. 2014.** Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitol Res* **113**:2765-2776.
- Lee, J., S. J. Park, and T. S. Yong. 2008.** Effect of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *Korean J Parasitol* **46**:37-40.
- Levi, S., B. Corsi, M. Bosisio, R. Invernizzi, A. Volz, D. Sanford, P. Arosio, and J. Drysdale. 2001.** A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* **276**:24437-24440.
- Levi, S., D. Girelli, F. Perrone, M. Pasti, C. Beaumont, R. Corrocher, A. Albertini, and P. Arosio. 1998.** Analysis of ferritins in lymphoblastoid cell lines and in the lens of subjects with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* **91**:4180-4187.
- Levi, S., A. Luzzago, G. Cesareni, A. Cozzi, F. Franceschinelli, A. Albertini, and P. Arosio. 1988.** Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem* **263**:18086-18092.
- Levi, S., S. J. Yewdall, P. M. Harrison, P. Santambrogio, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini, and P. Arosio. 1992.** Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J* **288** ( Pt 2):591-596.
- León-Sicairos, N., F. López-Soto, M. Reyes-López, D. Godínez-Vargas, C. Ordaz-Pichardo, and M. de la Garza. 2006.** Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sIgA and lysozyme. *Clin Med Res* **4**:106-113.
- León-Sicairos, N., M. Reyes-López, A. Canizalez-Román, R. M. Bermúdez-Cruz, J. Serrano-Luna, R. Arroyo, and M. de la Garza. 2005.** Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* **151**:3859-3871.
- Li, L., O. S. Chen, D. McVey Ward, and J. Kaplan. 2001.** CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* **276**:29515-29519.
- Ligtenberg, M. J., W. Bitter, R. Kieft, D. Steverding, H. Janssen, J. Calafat, and P. Borst. 1994.** Reconstitution of a surface transferrin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* **13**:2565-2573.

- Lill, R., and G. Kispal. 2000.** Maturation of cellular Fe–S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **25**:352-356.
- Lobreaux, S., S. J. Yewdall, J. F. Briat, and P. M. Harrison. 1992.** Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J* **288 ( Pt 3)**:931-939.
- Long, J. C., F. Sommer, M. D. Allen, S. F. Lu, and S. S. Merchant. 2008.** FER1 and FER2 encoding two ferritin complexes in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts are regulated by iron. *Genetics* **179**:137-147.
- López-Soto, F., A. González-Robles, L. Salazar-Villatoro, N. León-Sicairos, C. Piña-Vázquez, E. P. Salazar, and M. de la Garza. 2009a.** *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int J Parasitol* **39**:417-426.
- López-Soto, F., N. León-Sicairos, M. Reyes-López, J. Serrano-Luna, C. Ordaz-Pichardo, C. Piña-Vázquez, G. Ortiz-Estrada, and M. de la Garza. 2009b.** Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Genet Evol* **9**:1038-1050.
- Mach, J., J. Tachezy, and R. Sutak. 2013.** Efficient iron uptake via a reductive mechanism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Parasitol* **99**:363-364.
- Malafaia, G., L. e. N. Marcon, L. e. F. Pereira, M. L. Pedrosa, and S. A. Rezende. 2011.** Leishmania chagasi: effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. *Exp Parasitol* **127**:719-723.
- Maralikova, B., V. Ali, K. Nakada-Tsukui, T. Nozaki, M. van der Giezen, K. Henze, and J. Tovar. 2010.** Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell Microbiol* **12**:331-342.
- Marciano-Cabral, F., and G. Cabral. 2003.** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* **16**:273-307.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega, and C. R. Sterling. 1997.** Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**:67-85.
- Martinez, A., and R. Kolter. 1997.** Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* **179**:5188-5194.
- Martínez-Castillo, M., G. Ramírez-Rico, J. Serrano-Luna, and M. Shibayama. 2015.** Iron-Binding Protein Degradation by Cysteine Proteases of *Naegleria fowleri*. *Biomed Res Int* **2015**:416712.
- Medentse, A., A. Y. Arinbasarova, N. Smirnova, and V. Akimenko. 2004.** Activation of the alternative oxidase of *Yarrowia lipolytica* by adenosine monophosphate. *Microbiology* **73**:117-123.
- Merschjohann, K., and D. Steverding. 2006.** In vitro growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biol Dis* **5**:3.
- Mühlenhoff, U., J. A. Stadler, N. Richhardt, A. Seubert, T. Eickhorst, R. J. Schweyen, R. Lill, and G. Wiesenberger. 2003.** A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**:40612-40620.
- Newsome, A. L., and W. E. Wilhelm. 1983.** Inhibition of *Naegleria fowleri* by microbial iron-chelating agents: ecological implications. *Appl Environ Microbiol* **45**:665-668.
- Opperdoes, F. R., J. F. De Jonckheere, and A. G. Tielens. 2011.** *Naegleria gruberi* metabolism. *Int J Parasitol* **41**:915-924.

- Page, W. J., E. Kwon, A. S. Cornish, and A. E. Tindale. 2003.** The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catechol siderophore export. *FEMS Microbiol Lett* **228**:211-216.
- Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, and L. C. Seefeldt. 1998.** X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**:1853-1858.
- Pollack, S., R. N. Rossan, D. E. Davidson, and A. Escajadillo. 1987.** Desferrioxamine suppresses *Plasmodium falciparum* in Aotus monkeys. *Proc Soc Exp Biol Med* **184**:162-164.
- Ponka, P. 1997.** Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* **89**:1-25.
- Ramírez-Rico, G., M. Martínez-Castillo, M. de la Garza, M. Shibayama, and J. Serrano-Luna. 2015.** *Acanthamoeba castellanii* Proteases are Capable of Degrading Iron-Binding Proteins as a Possible Mechanism of Pathogenicity. *J Eukaryot Microbiol*.
- Ravdin, J. I., and R. L. Guerrant. 1981.** Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest* **68**:1305-1313.
- Reimann, C., H. M. Patel, L. Serino, M. Barone, C. T. Walsh, and D. Haas. 2001.** Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:813-820.
- Reyes-López, M., J. J. Serrano-Luna, E. Negrete-Abascal, N. León-Sicairos, A. L. Guerrero-Barrera, and M. de la Garza. 2001.** *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp Parasitol* **99**:132-140.
- Rowbotham, T. J. 1980.** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**:1179-1183.
- Ryu, J. S., H. K. Choi, D. Y. Min, S. E. Ha, and M. H. Ahn. 2001.** Effect of iron on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* **87**:457-460.
- Santambrogio, P., S. Levi, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini, and P. Arosio. 1993.** Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J Biol Chem* **268**:12744-12748.
- Serrano-Luna, J. J., E. Negrete, M. Reyes, and M. de la Garza. 1998.** *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp Parasitol* **89**:71-77.
- Shi, H., K. Z. Bencze, T. L. Stemmler, and C. C. Philpott. 2008.** A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* **320**:1207-1210.
- Siedow, J. N., A. L. Umbach, and A. L. Moore. 1995.** The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett* **362**:10-14.
- Sigala, P. A., J. R. Crowley, S. Hsieh, J. P. Henderson, and D. E. Goldberg. 2012.** Direct tests of enzymatic heme degradation by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **287**:37793-37807.
- Smith, J. M., and E. Meerovitch. 1982.** Specificity of iron requirements of *Entamoeba histolytica* in vitro. *Arch Invest Med (Mex)* **13 Suppl 3**:63-69.
- Soteriadou, K., P. Papavassiliou, C. Voyiatzaki, and J. Boelaert. 1995.** Effect of iron chelation on the in-vitro growth of *Leishmania promastigotes*. *J Antimicrob Chemother* **35**:23-29.
- Stevens, P. W., J. B. Dodgson, and J. D. Engel. 1987.** Structure and expression of the chicken ferritin H-subunit gene. *Mol Cell Biol* **7**:1751-1758.

- Steverding, D., Y. D. Stierhof, H. Fuchs, R. Tauber, and P. Overath. 1995.** Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* **131**:1173-1182.
- Suchan, P., D. Vyoral, J. Petrák, R. Sut'ák, D. Rasoloson, E. Nohýnková, P. Dolezal, and J. Tachezy. 2003.** Incorporation of iron into *Tritrichomonas foetus* cell compartments reveals ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology* **149**:1911-1921.
- Sutak, R., C. Chamot, J. Tachezy, J. M. Camadro, and E. Lesuisse. 2004.** Siderophore and haem iron use by *Tritrichomonas foetus*. *Microbiology* **150**:3979-3987.
- Sutak, R., E. Lesuisse, J. Tachezy, and D. R. Richardson. 2008.** Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol* **16**:261-268.
- Tachezy, J., J. Kulda, I. Bahníková, P. Suchan, J. Rázga, and J. Schrével. 1996.** *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Exp Parasitol* **83**:216-228.
- Tachezy, J., P. Suchan, J. Schrével, and J. Kulda. 1998.** The host-protein-independent iron uptake by *Tritrichomonas foetus*. *Exp Parasitol* **90**:155-163.
- Tenhunen, R., H. S. Marver, and R. Schmid. 1968.** The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**:748-755.
- Trissl, D., A. Martínez-Palomo, M. de la Torre, R. de la Hoz, and E. Pérez de Suárez. 1978.** Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp Med* **148**:1137-1143.
- Tsaousis, A. D., E. Nyvltová, R. Sutak, I. Hrady, and J. Tachezy. 2014.** A nonmitochondrial hydrogen production in *Naegleria gruberi*. *Genome Biol Evol* **6**:792-799.
- Veiga-da-Cunha, M., T. Sokolova, F. Opperdoes, and E. Van Schaftingen. 2009.** Evolution of vertebrate glucokinase regulatory protein from a bacterial N-acetylmuramate 6-phosphate etherase. *Biochem J* **423**:323-332.
- Wade, V. J., S. Levi, P. Arosio, A. Treffry, P. M. Harrison, and S. Mann. 1991.** Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in ferritin. *J Mol Biol* **221**:1443-1452.
- Walcourt, A., M. Loyevsky, D. B. Lovejoy, V. R. Gordeuk, and D. R. Richardson. 2004.** Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:401-407.
- Williams, R. J. 1985.** 16th Sir Hans Krebs lecture. The symbiosis of metal and protein functions. *Eur J Biochem* **150**:231-248.
- Wilson, M. E., T. S. Lewis, M. A. Miller, M. L. McCormick, and B. E. Britigan. 2002.** *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. *Exp Parasitol* **100**:196-207.
- Woyda-Ploszczyca, A., A. Koziel, N. Antos-Krzeminska, and W. Jarmuszkiewicz. 2011.** Impact of oxidative stress on *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial bioenergetics depends on cell growth stage. *J Bioenerg Biomembr* **43**:217-225.
- Yariv, J., A. J. Kalb, R. Sperling, E. R. Bauminger, S. G. Cohen, and S. Ofer. 1981.** The composition and the structure of bacterioferritin of *Escherichia coli*. *Biochem J* **197**:171-175.
- Zhang, Y., M. Mikhael, D. Xu, Y. Li, S. Soe-Lin, B. Ning, W. Li, G. Nie, Y. Zhao, and P. Ponka. 2010.** Lysosomal proteolysis is the primary degradation pathway for cytosolic ferritin and cytosolic ferritin degradation is necessary for iron exit. *Antioxid Redox Signal* **13**:999-1009.

**Zhang, Y., and B. P. Orner. 2011.** Self-assembly in the ferritin nano-cage protein superfamily. *Int J Mol Sci* **12**:5406-5421.

**Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone, and N. D. Chasteen. 2002.** Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:27689-27696.