

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Hostitelská specifita parazitů rodu *Cryptosporidium*

Mgr. Lenka Tůmová

**České Budějovice
2024**

Autoreferát disertační práce

Doktorand:	Mgr. Lenka Tůmová
Studijní program:	Zootechnika
Studijní obor:	Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat
Název práce:	Hostitelská specifita parazitů rodu <i>Cryptosporidium</i>
Školitel:	prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Oponenti:	doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D. RNDr. Jana Ježková, PhD. doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Datum a místo konání obhajoby disertační práce bude upřesněno na úřední desce studijního oddělení Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

GAJU 017/2020/Z – Hostitelská specifita: komparativní genomika a transkriptomika žaludečních kryptosporidií savců. (2020–2021; řešitelka).

GAJU 009/2022/Z – *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I: skrytá hrozba? (2022; řešitelka).

GAJU 051/2023/Z – Činěily jako významný a přehlížený zdroj parazitů s vysokým zoonotickým potenciálem. (2023; řešitelka).

GAJU 005/2022/Z - One Health: genetic, environmental and technological factors affecting animal production, food quality and safety, and animal and human health. (2022–2024; studentka - členka týmu).

GAČR 18-12364S - Bird derived *Cryptosporidium*: Filling knowledge gaps within unjustifiably marginalized group of hosts. (2022–2024; členka řešitelského týmu).

GAČR 21-23773S - Žaludeční kryptosporidie savců: Poodhalení tajemství jejich adaptace na hostitele a genové regulace během infekce. (2021–2024, členka řešitelského týmu).

Anotace

Rod *Cryptosporidium* zahrnuje jednobuněčné epicelulární parazity, kteří způsobují kryptosporidiózu, infekční onemocnění postihující široké spektrum hostitelů, včetně lidí, zvířat a ptáků. Parazité tohoto rodu jsou charakterizováni složitým vývojovým cyklem a svou schopností přežít v různých prostředích díky odolným oocystám. Kryptosporidie se vyznačují značnou hostitelskou a tkáňovou specifitou, což komplikuje diagnostiku a kontrolu jejich šíření.

Tato disertační práce se zaměřuje na komplexní studium hostitelské specifity parazitů rodu *Cryptosporidium*. Literární přehled pokrývá fylogenezi a taxonomii rodu *Cryptosporidium*, vývojový cyklus včetně jednotlivých fází, jako jsou excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie, a také interakci parazita s hostitelem. Dále popisuje tkáňovou a hostitelskou specifitu, věkovou specifitu a molekulární charakteristiku kryptosporidií, včetně charakteristiky genomu, faktorů virulence a transkriptomických analýz. V metodické části jsou podrobně popsány metody a veškerý materiál použitý v experimentální části práce tak, aby byly postupy opakovatelné. S ohledem na velké množství získaných dat a výstupů byly kapitoly výsledky a diskuse pro lepší orientaci v problematice spojeny. Tato část disertační práce se věnuje studiu tkáňové a hostitelské specifity u druhů *Cryptosporidium mortiferum* a *Cryptosporidium ornithophilus*, které byly vybrány pro jejich odlišné adaptační strategie vůči různým hostitelům a tkáním. Dále byla provedena genomická a transkriptomická analýza druhu *Cryptosporidium proliferans*, který se vyznačuje variabilitou v patogenezi v porovnání s ostatními druhy. Tento žaludeční druh poskytl vhodný model pro hlubší pochopení molekulárních a genetických základů hostitelské specifity v rámci rodu *Cryptosporidium*. Výsledky této práce rozšiřují komplexní pohled na hostitelskou specifitu rodu *Cryptosporidium* a přinášejí cenné poznatky pro další výzkum v této oblasti.

Klíčová slova: paraziti; *Cryptosporidium*; hostitelská specifita; tkáňová specifita; vývojový cyklus; *in vivo*; sekvenování; transkriptom; anotace genomu; metabolické dráhy

Anotace

The genus *Cryptosporidium* comprises unicellular, epicellular parasites that cause cryptosporidiosis, an infectious disease that affects a wide range of hosts, including humans, animals and birds. The parasites of this genus are characterised by their complex developmental cycle and their ability to survive in a variety of environments due to their resistant oocysts. Cryptosporidia are characterised by considerable host and tissue specificity, which complicates the diagnosis and control of their spread.

This thesis focuses on a comprehensive study of the host specificity of parasites of the genus *Cryptosporidium*. The literature review covers the phylogeny and taxonomy of the genus *Cryptosporidium*, the developmental cycle including the different stages such as excystation, merogony, gametogony and sporogony and the parasite-host interaction. In addition, the tissue and host specificity, age specificity and molecular characterisation of *Cryptosporidium* are described, including the characterisation of the genome, virulence factors and transcriptomic analyses. In the methods section, all materials and methods used in the experimental part of the work are described in detail so that the procedures are reproducible. In view of the large amount of data and results, the chapters Results and Discussion have been summarised for a better understanding of the research question and for orientation. This part of the thesis focusses on the investigation of tissue and host specificity of two species, *Cryptosporidium mortiferum* and *Cryptosporidium ornithophilus*, which were selected based on their different adaptation strategies to different hosts and tissues. In addition, genome and transcriptome analyses were performed for *Cryptosporidium proliferans*, a species characterised by its variability in pathogenesis compared to other species. This gastric species provided a suitable model for a deeper understanding of the molecular and genetic basis of host specificity within the genus *Cryptosporidium*. The results of this work expand the comprehensive view of host specificity in the genus *Cryptosporidium* and provide valuable insights for further research.

Keywords: parasite; *Cryptosporidium*; host specificity; tissue specificity; life cycle; *in vivo*; sequencing; transcriptome; genome annotation; metabolic pathways

1. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce je komplexní analýza hostitelské a tkáňové specifity rodu *Cryptosporidium*, jak z biologického, tak molekulárního pohledu. Tohoto cíle bude dosaženo následujícími dílčími kroky.

Dílčí cíle:

- Porovnat hostitelskou a tkáňovou specifitu vybraných druhů kryptosporidií. Budou vybrány druhy, které vykazují jak úzkou hostitelskou specifitu a liší se hostitelským spektrem, tak tkáňovou specifitu.
- Získat a porovnat celogenomové sekvence (WGS) vybraných druhů kryptosporidií. V tomto dílčím cíli bude provedena sekvenace a anotace genomu *Cryptosporidium proliferans*, který vykazuje variabilitu v patogenезi v porovnání s ostatními druhy.
- Vytipovat klíčové geny a metabolické dráhy, které přispívají k schopnosti kryptosporidií infikovat specifické hostitele a tkáně.
- Studovat transkriptom myši infikovaných druhem *C. proliferans* a odhalit geny aktivované během infekce, což přispěje k lepšímu pochopení interakcí mezi parazitem a hostitelem.

2. SHRUTÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE

Všechny dosažené výsledky (obrázky a tabulky), použitý materiál a metody je možno nalézt v disertační práci a publikacích v ní přiložených.

2.1 Tkáňová a hostitelská specifita druhu *Cryptosporidium ornithophilus*

2.1.1 Morfologie a morfometrie oocyst

V rámci studia biologických vlastností druhu *C. ornithophilus* byla popsána morfologie a morfometrie oocyst získaných z přirozeně a experimentálně infikovaných hostitelů (100 oocyst od každého izolátu). Byla změřena délka a šířka oocyst zobrazených pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) při zvětšení 1000× (tabulka 7). Jako kontrola byl použit vzorek obsahující oocysty *C. parvum* získané z přirozeně infikovaného holštýnského telete. Oocysty byly vizualizovány pomocí různých barvicích a značících metod (obrázek 7).

Vizualizované oocysty v nátěrech vzorku trusu vykazovaly znaky barvení charakteristické pro kryptosporidie. V souladu s předešlými studiemi, byly fixované oocysty *C. ornithophilus* detekovatelné pomocí FITC konjugované protilátky proti stěně oocyst kryptosporidií vyvinuté původně pro druh *C. parvum* (obrázek 7). Měřením velikosti oocyst nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi oocystami získanými z přirozeně infikovaných pštrosů a experimentálně infikovaných kuřat ($T^2=2,249703$; $df_1=2$; $df_2=97$; $p=0,1109$), hus ($T^2=0,96185$; $df_1=2$; $df_2=97$; $p=0,3858$) a korel ($T^2=2,221246$; $df_1=2$; $df_2=97$; $p=0,1139$). Statistická analýza prokázala, že oocysty *C. ornithophilus* jsou větší než oocysty *C. avium* ($T^2=32,522$; $df_1=2$; $df_2=140$; $p<0,0001$) a *C. parvum* ($T^2=147,32$; $df_1=2$; $df_2=78$, $p<0,0001$) a menší než *C. proventriculi* ($T^2=161,04$; $df_1=2$; $df_2=90$; $p<0,0001$) a *C. galli* ($T^2=35,522$; $df_1=2$; $df_2=78$; $p=0,0001$).

Doposud bylo popsáno pět ptačích druhů v rámci rodu *Cryptosporidium* (*C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis* a *C. proventriculi*), vzájemně se lišících hostitelským spektrem, morfometrií oocyst, preferovanými místy infekce v hostiteli a průběhem infekce. Průměrná velikost oocyst studovaného druhu *C. ornithophilus* ($6,1 \times 5,1 \mu\text{m}$) je srovnatelná s těmi, které Santos et al. (2005) a Meireles et al. (2006) uvádějí jako *Cryptosporidium* avian genotyp II ($6,0 \times 4,8 \mu\text{m}$) a také jsou tyto oocysty morfometricky nerozeznatelné od oocyst *C. baileyi* ($6,3 \times 4,6 \mu\text{m}$) (Current et al. 1986) a *C. avium* ($6,3 \times 4,9 \mu\text{m}$) (Holubová et al. 2016). V porovnání s *C. proventriculi* ($8,4 \times 6,7 \mu\text{m}$) (Holubová et al. 2019) a *C. galli* ($8,3 \times 6,3 \mu\text{m}$) (Ryan et al. 2003) jsou oocysty *C. ornithophilus* výrazně menší, ale oproti *C. meleagridis* ($5,0 \times 4,3 \mu\text{m}$) (Slavin 1955) jsou větší.

Přestože byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ve velikosti oocyst jednotlivých druhů, z diagnostického hlediska není možné tyto výsledky využít a používat velikost oocyst jako diagnostický znak (Slavin 1955; Ryan et al. 2003; Holubová et al. 2019).

2.1.2 Tkáňová specifita

Pomocí molekulárních, histologických a SEM analýz gastrointestinálního traktu ptáků infikovaných *C. ornithophilus* byla zjištěna přítomnost vývojových stádií kryptosporidií pouze ve slepém a tlustém střevě kuřat a hus. Intenzita infekce byla nízká, na každém ktku bylo pozorováno pouze několik vývojových stádií (obrázky 8 a 9). U korel nebyla prokázána přítomnost vývojových stádií, nicméně specifická DNA byla detekována, a to výhradně v kaudální části ilea. Molekulární analýzy prokázaly 100% shodu izolátu použitého k inokulaci s DNA získaných z infikovaných tkání.

Bylo prokázáno, že *C. ornithophilus* infikuje výhradně slepé a tlusté střevo a Fabriciovu burzu, podobně jako *C. baileyi*, u kterého však dochází k vývoji i v dalších částech střeva a plicích. Tkáňová specifita *C. ornithophilus* se částečně překrývá i s *C. avium*, jehož vývoj probíhá v ileu a slepém střevě (Holubová et al. 2016). Navíc oocysty těchto tří druhů mají podobnou velikost (Current et al. 1986; Santos et al. 2005; Holubová et al. 2016), což významně ztěžuje jejich rozlišení a bez použití molekulárních metod není možné tyto infekce odlišit.

Kromě *C. ornithophilus*, *C. baileyi* a *C. avium* může být v tlustém střevě lokalizován vývojový cyklus druhu *C. meleagridis* (Pavlásek 1994; Akiyoshi et al. 2003), který lze však snadno od výše zmíněné trojce druhů odlišit podle velikosti oocyst. Na rozdíl od *C. baileyi* a *C. avium* nebyla infekce *C. ornithophilus* zaznamenána v extraintestinálních tkáních a sliznicích, což jej činí „výjimečným“ mezi ptačími druhy kryptosporidií (Lindsay et al. 1986; Lindsay a Blagburn 1990; Curtiss et al. 2015; Holubová et al. 2016). Nicméně je nutné poznamenat, že není možné generalizovat výsledky získané z několika prací na všechny druhy kryptosporidií. Je pravděpodobné, že i u dalších genotypů ptačích kryptosporidií se nevyskytuje infekce s lokalizací mimo zažívací trakt.

2.1.3 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita je jednou z důležitých biologických charakteristik nezbytných pro popis druhu. Spektrum hostitelů bylo stanoveno pomocí terénních studií (nejsou předmětem této práce a dále se jimi nebudu zabývat) a experimentálních infekcí laboratorních zvířat. Konkrétní druhy a počet experimentálně inokulovaných laboratorních zvířat jsou uvedeny v tabulce 6.

Oocysty *C. ornithophilus* nebyly infekční pro 7denní a 8týdenní myši kmenů BALB/c a SCID, které byly vnímavé k infekci oocystami *C. parvum* (kontrolní skupina). U všech ptačích

modelových hostitelů, kuřat, hus a korel, byla vyvolána infekce oocystami *C. ornithophilus*. Oocysty a/nebo specifická DNA *C. ornithophilus* byly u hus, kuřat a korel poprvé detekovány po 4 DPI, 7 DPI, respektive 8 DPI (obrázek 10). Infekce dosahovala intenzity 2 000 až 16 000 OPG (oocyst na gram trusu) u kuřat a korel, zatímco u hus se pohybovala od 1 000 do 8 000 OPG (obrázek 10). U žádného experimentálně infikovaného ptačího jedince se neprojevil klinické příznaky kryptosporidie a nebyl v důsledku infekce *C. ornithophilus* zaznamenán žádný úhyn, což odpovídá dříve publikovaným údajům Ng et al. (2006) a Meireles et al. (2006), kteří ve svých studiích nezaznamenali žádné zjevné klinické příznaky ani úhyn ptáků způsobený *C. ornithophilus*.

Ačkoli *C. ornithophilus* byl nejčastěji hlášen u pštrosů, záznamy o přirozených a experimentálních infekcích u papoušků, kuřat a hus naznačují široké hostitelské spektrum, což je v souladu i s naším pozorováním (Ng et al. 2006; Nakamura et al. 2009; Sevá et al. 2011; Iijima et al. 2018). Pozorovaná prepatentní perioda *C. ornithophilus* (4–8 DPI) je podobná jako u *C. meleagridis*, *C. baileyi* a *C. proventriculi* (Lindsay et al. 1988; Rhee et al. 1991; Hornok et al. 1998; Tůmová et al. 2002; Holubová et al. 2019).

2.1.4 Vývojový cyklus

Vývojová stádia *C. ornithophilus* byla vizualizována pomocí nátěrů barvených metodou podle Wrighta a tyto preparáty byly následně použity pro morfometrii vývojových stádií (tabulka 8). Uvolnění sporozoiti byli obarveni pomocí karbolfuchsinu. Nátěry byly zhotoveny ze sliznice tlustého střeva. Tkáň vhodná pro studium vývojového cyklu byla vybrána na základě výsledků PCR, skenovací elektronové mikroskopie a histologických řezů.

Většina pozorovaných vývojových stádií (mimo stádium zygoty a oocysty) byla obalena charakteristickým parazitoforním vakem, který se jevil jako neobarvený prostor kolem stádií (obrázek 11). Bylo detekováno velké množství oocyst, přičemž většina nebyla obarvena a sporozoiti nebyli vizuálně detekovatelní. Bohužel nebylo možné rozlišit tenkostěnné a tlustostěnné oocysty. Volní sporozoiti nebyli pozorováni, ale na obrázku 11b je přiložena ilustrační mikrofotografie sporozoitů po excystaci oocyst. Nejčastěji pozorovaným stádiem byli jednojaderní trofozoiti (obrázek 11c), kteří vykazovali velkou morfometrickou variabilitu (tabulka 8). Často byli pozorováni meronti I. typu (obrázek 11d) obsahující 8 merozoitů, zatímco meronti II. typu (obrázek 11e) obsahující 4 merozoity a volní merozoiti (obrázek 11f) byli zaznamenáni jen sporadicky. Mikrogamonti (obrázek 11g) se vyskytovali v nátěrech jen zřídka, ale makrogamonti (obrázek 11h), pro které je typický pěnovitý vzhled způsobený velkým množstvím amylopektinových granulí, byli pozorováni velmi často. Zygoty (obrázek 11i) byly od nebarvených oocyst (obrázek 11a) odlišitelné svým slabým zbarvením.

Druh *C. ornithophilus* prodělává podobný životní cyklus jako dříve popsané druhy rodu *Cryptosporidium*, avšak na rozdíl od *C. baileyi* nebyla pozorována přítomnost merogonie III. typu (Current et al. 1986; Melicherová et al. 2014; Tandel et al. 2019; Dhal et al. 2022). Obdobně jako v dříve publikovaných *in vivo* studiích nebyly zaznamenány důkazy o přítomnosti extracelulárních stádií, které byly popsány v bezbuněčných kulturách (Hijawi et al. 2001, 2002, 2010; Borowski et al. 2010). Stejně jako v předchozích výzkumech nebylo možné rozlišit tenkostěnné a tlustostěnné oocysty (Melicherová et al. 2014; Kváč et al. 2016). Otázkou ovšem zůstává, jestli se vůbec tyto dva typy oocyst u tohoto druhu vyskytují.

Nezbarvená oblast obklopující vývojová stádia, která odpovídá parazitofornímu vaku, je v souladu s výsledky Melicherová et al. (2014). Pozorované malé množství čtyřjaderných merontů II. typu koresponduje s výsledky *in vitro* studie English et al. (2022), kdy rovněž zaznamenali obdobné množství těchto stádií a zároveň formulovali teorii, že meronti II. typu nejsou nezbytní pro tvorbu mikrogamontů a makrogamontů, jak se dříve předpokládalo. V souladu se stejnou studií je také pozorovaný poměr mikrogamontů a makrogamontů, kdy mikrogamonti byli nalezeni jen ojediněle (English et al. 2022).

2.2 Tkáňová a hostitelská specifita druhu *Cryptosporidium mortiferum*

2.2.1 Morfologie a morfometrie oocyst

Byla změřena velikost oocyst *C. mortiferum* (dříve známo jako *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I) z přirozeně a experimentálně infikovaných hostitelů (100 oocyst od každého izolátu) zobrazených pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC) při zvětšení 1 000× (tabulka 9). Jako kontrola velikosti byl použit vzorek obsahující oocysty *C. parvum* získané z přirozeně infikovaného telete. Oocysty vizualizované pomocí různých barvicích a značicích metod jsou uvedené na obrázku 12.

Vizualizované oocysty *C. mortiferum* v nátěrech vzorku trusu vykazovaly typické znaky barvení charakteristické pro kryptosporidie a fixované oocysty *C. mortiferum* byly navíc detekovatelné pomocí FITC konjugované protilátky proti stěně oocyst kryptosporidií vyvinuté původně pro druh *C. parvum* (obrázek 12). Velikost oocyst *C. mortiferum*, získaných z přirozeně infikovaného člověka se statisticky nelišila od oocyst získaných z experimentálně infikovaných myší, frettek a veverek (tabulka 9).

Oocysty *C. mortiferum* měřily $5,64 \times 5,37 \mu\text{m}$, což je podobná velikost jako u dříve publikovaného izolátu *Cryptosporidium* sp. chipmunk genotyp I ($5,8 \times 5,4 \mu\text{m}$) nalezeného u veverek obecných v Itálii (Kváč et al. 2013a). Oocysty tohoto druhu jsou o něco větší než oocysty *C. sciurinum* ($5,54 \times 5,22 \mu\text{m}$), *C. ubiquitum* ($5,04 \times 4,66 \mu\text{m}$) a *C. parvum* ($5,2 \times 4,9 \mu\text{m}$) ($T^2=320,42$; $df_1=2$; $df_2=69,00$; $p<0.001$), které byly rovněž zjištěny u veverek (Fayer et al.

2010; Prediger et al. 2017, 2021). Rozdíly ve velikosti oocyst jsou však tak malé, že je nelze použít k diferenciální diagnostice mezi druhy *Cryptosporidium* pomocí rutinní mikroskopie.

2.2.2 Tkáňová specifita

Tkáňová specifita *C. mortiferum* byla studována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a histologických řezů barvených pomocí Periodic-Acid-Shiff (PAS) a hematoxylin-eosinu (HE).

Molekulární, histologické, SEM a TEM analýzy prokázaly přítomnost specifické DNA *C. mortiferum* a jeho vývojových stádií výhradně ve slepém střevě všech vnímavých hostitelů zahrnutých do této studie. U SCID myši a veverek obecných se infekce navíc rozšířila i do proximální části tlustého střeva. Vývojová stadia pokrývala téměř celý epiteliální povrch (obr. 13 a 14), což zdůrazňuje rozsah a závažnost infekce. Vzhledem k tomu, že toto je vůbec první popis tkáňové lokalizace *C. mortiferum*, nelze naše výsledky srovnávat s jinými autory.

Většina druhů střevních kryptosporidií, u nichž byla popsána tkáňová specifita, parazituje v tenkém střevě, např. *C. parvum*, *C. myocastoris*, *C. scrofarum*, *C. hominis*, *C. tyzzeri*, *C. ryanae* a *C. ditrichi* (Tyzzer 1912; Morgan-Ryan et al. 2002; Fayer et al. 2008; Ren et al. 2012; Kváč et al. 2013b; Čondlová et al. 2018; Ježková et al. 2021a). Pouze malá část druhů parazituje v tlustém střevě nebo u ptáků ve Fabriciově burze, např. *C. suis* nebo *C. baileyi* (Current et al. 1986; Ryan et al. 2004). Vývoj *C. mortiferum* probíhá výhradně ve slepém střevě a přední části tlustého střeva. Je to první druh kryptosporidie u savců, který preferuje tuto část střeva. Podobná lokalizace již byla popsána u *C. avium* a *C. ornithophilus* (kapitola 4.1.2) parazitujících u ptáků (Holubová et al. 2016, 2020).

2.2.3 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita byla stanovena pomocí experimentálních infekcí laboratorních zvířat. Konkrétní druhy a počet experimentálně inokulovaných laboratorních zvířat včetně velikosti použité infekční dávky jsou uvedeny v tabulce 6 (kapitola 3.10).

U kuřat a morčat experimentálně inokulovaných *C. mortiferum* nebyla zaznamenána infekce, a to jak detekce oocyst, tak ani DNA v trusu. Oproti tomu veverky obecné, veverky popelavé, pískomilové, fretky a všechny použité kmeny myši byly vnímavé k infekci *C. mortiferum* (obrázek 15). U dospělých myši kmene BALB/c a C57BL/6 nebyla infekce mikroskopicky detekovatelná, ale molekulární analýzy odhalily opakovanou přítomnost DNA *C. mortiferum* ve vzorcích trusu počínaje 4–5 DPI (obrázek 15b). Naopak imunokompromitované myši kmene CD4^{-/-} a CD8^{-/-} vylučovaly mikroskopicky detekovatelné oocysty o intenzitě 2 000–6 000 OPG (obrázek 15a) počínaje shodně s výše uvedenými kmeny, a to 4–5 DPI. U pískomilů byla infekce odhalena výhradně pomocí PCR, přičemž prepatentní

doba byla 11–12 DPI. DNA *C. mortiferum* byla poté detekována přerušovaně až do 24 DPI, což naznačuje skrytou povahu infekce, kterou není snadné zachytit běžnými mikroskopickými metodami. Fretky začaly vylučovat oocysty 4 DPI a intenzita infekce se pohybovala v rozmezí 2 000–20 000 OPG. Mezi 10–14 DPI došlo u fretek k spontánnímu uzdravení. U SCID myši byla prepatentní doba 9–10 DPI a zvířata vylučovala velké množství oocyst (10 000–150 000 OPG), aniž by se během experimentu (30 DPI) spontánně uzdravila. Prepatentní doba u veverek popelavých (7–8 DPI) byla téměř o polovinu kratší v porovnání s veverkami obecnými (11–12 DPI). Veverky popelavé vylučovaly oocysty nepravidelně, s intenzitou infekce 2 000–30 000 OPG. Naproti tomu veverky obecné vykazovaly mnohem vyšší intenzitu infekce, která se pohybovala mezi 10 000–1 500 000 OPG. Jedna z veverek popelavých vykazovala během 7–8 DPI mírnou apatii, projevující se sníženým zájmem o okolí a potravu. V této době měl navíc její trus kašovitou konzistenci. Zajímavé je, že všechny veverky popelavé se z infekce samouzdravily do 9 dnů od počátku vylučování oocyst. Veverky obecné začaly již od 10. dne po infekci rychle ztrácet kondici a přestávaly přijímat potravu. Většinu času se skrývaly, byly apatické a nereagovaly na vnější podněty, jako je krmení, napájení nebo manipulace. Veverky, u kterých se objevily závažné klinické příznaky, byly z etických důvodů humánně usmrčeny.

Infekce *C. mortiferum* u veverek popelavých se v experimentálních podmínkách projevuje většinou asymptomaticky, doprovázená mírnou infekcí, která vede k přirozenému uzdravení. Tento průběh infekce je v souladu se zjištěním Prediger et al. (2017), kteří zaznamenali nízkou intenzitu infekce u přirozeně infikovaných veverek stejného druhu. Oproti tomu infekce u veverek obecných je výrazně závažnější. Podobně jako Bujila et al. (2021), jsme také zaznamenali masivní průběh infekce *C. mortiferum* u veverek obecných, které se projevovaly těžkými klinickými příznaky kryptosporidie a úhynem. Infikované veverky ztrácejí pohyblivost, zájem o potravu a většinu času tráví v úkrytech, což z nich činí obtížné cíle pro odchyt pomocí živých pastí, které se používají v terénním výzkumu. Je tedy pravděpodobné, že při terénních studiích je možné odchytit pouze malé procento jedinců nakažených *C. mortiferum*, a to zejména v raných fázích infekce. Tato skutečnost je jedním z vysvětlení, proč je *C. mortiferum* u veverek obecných zjišťován v nízké prevalenci, ačkoli je pro ně vysoce patogenní.

Tato práce jednoznačně prokázala, že patogenita *C. mortiferum* se liší v závislosti na druhu hostitele, přičemž průběh infekce je silně ovlivněn jak zmíněným druhem hostitele, tak imunitním stavem hostitele. Obdobná variabilita byla popsána i u druhů *C. parvum* a *C. proliferans*, u kterých bylo provedeno velké množství terénních a experimentálních sledování. U imunokompetentních laboratorních myši infikovaných *C. mortiferum* probíhala infekce bez jakýchkoli příznaků, což naznačuje efektivní potlačení infekce jejich imunitním

systémem bez viditelných projevů. V souladu s předchozími studiemi zkoumajícími imunitní odpověď hostitele na infekci kryptosporidiiemi vykazovaly myši s nedostatkem CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů delší průběh infekce než imunokompetentní jedinci (Jalovecká et al. 2010; Kváč et al. 2011). Absence CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů se však neukázala jako kritická a zvířata s tímto nedostatkem se z infekce zotavila. Stejně jako u infekcí *C. parvum*, *C. proliferans* a *C. tyzzeri* nedošlo u SCID myši infikovaných *C. mortiferum* k samouzdravení (Jalovecká et al. 2010; Kváč et al. 2013c, 2016).

Bylo zjištěno, že prepatentní doba *C. mortiferum* se u různých druhů/kmenů hostitelů liší. Zatímco fretky a myši, s výjimkou SCID myši, začaly vylučovat oocysty/specifickou DNA *C. mortiferum* 4–5 DPI, u veverek, SCID myši a pískomilů byla prepatentní doba delší, a to 7–14 DPI. Podobný rozdíl v délce prepatentní doby v závislosti na druhu hostitele byl pozorován také u *C. proliferans* (Kváč et al. 2016). Intenzita infekce *C. mortiferum* se rovněž lišila v závislosti na druhu a imunitním stavu hostitele. Podobné rozdíly byly pozorovány i u dalších druhů kryptosporidií, např. u *C. alticolis* a *C. microti* infikujících různé druhy hrabošů, *C. apodemi* a *C. ditrichi* parazitujících u *Apodemus* spp. a *C. proliferans* infikujícího různé hlodavce nebo *C. ornithophilus* infikujícího husy, kohouty a kuřata (Kváč et al. 2016; Čondlová et al. 2018; Horčíčková et al. 2019; Holubová et al. 2020).

2.3.4 Vývojový cyklus

Vývojová stádia *C. mortiferum* byla vizualizována a následně identifikována pomocí nátěrů barvených metodou podle Wrighta (obrázek 16) a tyto preparáty byly následně použity pro morfometrii vývojových stádií (tabulka 10). Mimo barvení podle Wrighta byla vývojová stádia identifikována pomocí SEM (obrázek 13) a TEM (obrázek 17). Uvolnění sporozoiti byli obarveni pomocí karbolfuchsinu (obrázek 16b). Pro studium vývojového cyklu bylo použito slepé střevo experimentálně infikovaných SCID myši. Tato tkáň byla vybrána na základě výsledků PCR, skenovací elektronové mikroskopie a histologických řezů.

Identifikace vývojových stádií pomocí SEM byla téměř nemožná, jelikož většina vývojových stádií byla pokryta parazitoforními vaky, a tudíž bylo možné s jistotou rozpoznat pouze vývojová stádia s prasklými parazitoforními vaky. Byly pozorovány pouze meronti I. typu s neúplně oddělenými nebo plně vyvinutými merozoity a také volně invadující zoiti (obrázek 13b-f). Pomocí analýzy TEM a metody barvení podle Wrighta bylo možné určit všechna vývojová stádia. V seškrabech sliznice obarvených podle Wrighta zůstaly parazitoforní vaky obklopující stádia neobarvené a jádra byla zbarvena do růžova (obrázek 16). Jednojaderní trofozoiti, neboli přechodná vegetativní stádia, byli nejčastěji pozorovanými stádii a jejich velikost byla velmi variabilní (tabulka 10, obrázek 16c, d). Dalšími nejčastěji pozorovanými

stádiu byli meronti I. typu s osmi jádry, které se následně stávají součástí tvořících se merozoitů (obrázek 16e, f). Oproti tomu meronti II. typu byly pozorovány zřídka a tato stadia se vyznačovala čtyřmi jádry, z nichž vzniknou čtyři merozoiti (obrázek 16g, h). Mikrogamonti byli pozorováni vzácně, ale byli snadno rozpoznatelní podle 16 jader, které dávají vznik 16 mikrogametám (obrázek 16i, j). Makrogamonti byli vyplněny četnými oválnými amylopektinovými granulemi, jež dodávali tomuto stádiu pěnovitý vzhled, díky čemuž bylo možné tato stadia snadno identifikovat (obrázek 16k). Zmíněná pěnovitá struktura byla pozorována také u zygot, ale byla méně výrazná ve srovnání se stádiem makrogamonta (obrázek 16l). Zygoty a oocysty nebyly chráněny parazitoforním vakem. V porovnání se zygotou byly oocysty nezbarvené a bez výrazných struktur (obrázek 16a). Nebylo možné rozlišit tenkostěnné a tlustostěnné oocysty.

Při TEM analýze byla u většiny vývojových stádií dobře rozpoznatelná tzv. feeder organela (obrázek 17). Raní trofozoiti byli oválného tvaru a postupně se stávali kulatějšími (obrázek 17b, c). Meronti I. a II. typu se lišili počtem vyvíjejících se merozoitů, kdy meront I. typu obsahoval 8 merozoitů a meront II. typu pouze 4 (obrázek 17d-g). TEM analýza potvrdila přítomnost amylopektinových granul nejen u makrogamontů, ale i u zygot (obrázek 17k, l). Zygoty se od makrogamontů odlišovaly menším množstvím amylopektinových granul, a především přítomností tvořící se stěny budoucích oocyst (obrázek 17l). V porovnání s metodou barvení podle Wrighta byli uvnitř oocyst viditelní čtyři sporozoiti obklopující reziduální tělísko vytvořené z amylopektinových granul (obrázek 17a).

Pozorovaný životní cyklus *C. mortiferum* se neliší od dříve popsáných druhů rodu *Cryptosporidium*. V souladu se studiemi, které zkoumaly životní cyklus *in vivo*, nebyly potvrzeny žádné důkazy o výskytu extracelulárních vývojových stádií popsáných v bezbuněčných kulturách (Hijjawi et al. 2001, 2002, 2010; Borowski et al. 2010). Podobně jako v předchozích studiích se nám nepodařilo rozlišit tenkostěnné a tlustostěnné oocysty, pokud se u tohoto druhu vyskytují (Melicherová et al. 2014; Kváč et al. 2016; Holubová et al. 2020). Ve shodě se studiemi Holubová et al. (2019, 2020) byla většina pozorovaných vývojových stádií vizualizovaných barvením podle Wrighta obklopena parazitoforním vakem, který se jevil jako nezbarvená aureola. Ve shodě s uvedenými autory byli i nejčastěji detekováni jednojaderní trofozoiti a osmijaderní merozoiti, zatímco čtyřjaderní merozoiti byli pomocí Wrightova barvení a TEM nalezeni jen zřídka. Toto zaznamenané malé množství čtyřjaderních merontů II. typu koresponduje s výsledky analýzy vývojového cyklu *C. ornithophilus* (podkapitola 4.1.4) a také s výsledky *in vitro* studie English et al. (2022), kdy rovněž zaznamenali obdobné množství těchto stádií a zároveň formulovali teorii, že meronti II. typu nejsou nezbytné pro tvorbu mikrogamontů a makrogamontů, jak se dříve předpokládalo. V souladu se stejnou studií

je také pozorovaný poměr mikrogamontů a makrogamontů, kdy mikrogamonti byli nalezeni zřídka (English et al. 2022). Analýza pomocí SEM prokázala významné prodloužení mikrovillů hostitelských buněk v těsné blízkosti parazitujících vývojových stádií *C. mortiferum*, což se shoduje i s pozorováním v *in vitro* podmínkách, kdy Borowski et al. (2010) a Edwards (2012) podobné prodloužení mikrovillů zaznamenali u buněk infikovaných *C. parvum*. Zmíněná elongace mikrovillů byla rovněž navíc zachycena u nutrií infikovaných *C. myocastoris* (Ježková et al. 2021a), SCID myši infikovaných *C. parvum* (Umemiya et al. 2005) a potkanů infikovaných *C. occultus* (Kvác et al. 2018).

2.3 Genová analýza *Cryptosporidium proliferans*

2.3.1 Struktura a uspořádání genomu *Cryptosporidium proliferans*

Genom žaludečního druhu *C. proliferans* byl sekvenován pomocí kombinace krátkých čtení s vysokým pokrytím generovaných platformou Illumina a dlouhých čtení s nízkým pokrytím generovaných technologií Oxford Nanopore MinION. Následně byl pomocí hybrid assembleru Unicycler sestaven genom *C. proliferans* (viz modrý řádek na obrázku 18) o velikosti 9 154 Mb, složený z 90 kontigů a s N50 o velikosti 0,543 Mb. Kombinace výsledků genových predikcí z PASA a AUGUSTUS vedla k identifikaci 4 126 protein kódujících genů. Všechny dostupné údaje naznačují, že genom *C. proliferans* je téměř kompletní. Případné chybějící oblasti jsou pravděpodobně oblasti obtížně obnovitelné, jako jsou repetitivní sekvence telomer a centromer. Srovnávací analýza genomů odhalila vysokou úroveň syntenie mezi izoláty *C. tyzzeri* UGA55, *C. parvum* IOWA-ATCC a *C. hominis* UdeA01 (obrázek 19). Genom *C. proliferans* vykazuje vyšší míru syntenie s *C. muris* než s *C. andersoni*. Na obrázku 19 je patrné, že syntetické bloky mezi *C. proliferans* a *C. andersoni* jsou méně konzervované a je zde patrné větší přeskupení ve srovnání s *C. proliferans* a *C. muris*. Pokud jde o střevní druhy, *C. proliferans* má největší míru syntenie s druhem *C. hominis*.

Jedním z nedostatků v genomickém výzkumu rodu *Cryptosporidium* je, že většina dostupných genomických dat byla získána pomocí platformy Illumina, která produkuje krátká čtení. I když tato metoda poskytuje vysokou přesnost, je bohužel obtížné na jejím základě sestavit kompletní genom (Abrahamsen et al. 2004; Xu et al. 2004, 2019; Li et al. 2021). Teprve nedávná genomická studie z roku 2022 využila kombinace více sekvenačních přístupů (kombinace dlouhých čtení Pacific Biosciences a krátkých čtení DNA a RNA Illumina) a hybridního sestavení genomu. Tento kombinovaný přístup výrazně zlepšil kvalitu sestavení genomu v klíčových ukazatelích, jako je souvislost, úplnost a spolehlivost, a vytvořil vysoce kvalitní referenční genom *C. parvum* IOWA-ATCC (Baptista et al. 2022). Díky použití různých sekvenačních technik, zahrnujících krátká DNA a RNA čtení z platformy Illumina a dlouhá

DNA čtení získaná pomocí technologie Oxford Nanopore MinION, byl v této práci získán vysoce kvalitní a téměř kompletní genom žaludečního druhu *C. proliferans*. Velikost a kompletnost (BUSCO skóre) (obrázek 18) genomu je v souladu s genomy ostatních druhů rodu *Cryptosporidium* (Abrahamsen et al. 2004; Xu et al. 2004; Ifeonu et al. 2016; Sateriale et al. 2019; Xu et al. 2019, 2020; Li et al. 2021; Huang et al. 2023). Relativně nízký stanovený obsah GC u *C. proliferans* (28,39 %) je podobný jako u žaludečních druhů *C. andersoni* (28,47 %) a *C. muris* (28,48 %), ale oproti střevním druhům je tento obsah přibližně o 2–4 % nižší. V genomu *C. proliferans* bylo predikováno 4 126 genů kódujících proteiny, což je dosud nejvyšší počet, který byl v rámci rodu *Cryptosporidium* identifikován (Abrahamsen et al. 2004; Xu et al. 2004; Ifeonu et al. 2016; Xu et al. 2019, 2020; Li et al. 2021; Baptista et al. 2022). Pozorovaná vysoká míra syntenie mezi střevními druhy *C. parvum*, *C. hominis* a *C. tyzzeri* odpovídá výsledkům dřívějších studií (Xu et al. 2004; Fan et al. 2019; Nader et al. 2019; Baptista et al. 2022, 2023). Vyšší míra syntenie *C. proliferans* s *C. muris* je v souladu s výsledky fylogenetických analýz, kdy byla zaznamenána větší genetická podobnost na některých lokusech, jako jsou *SSU*, *COWP*, *TRAP-C1* a *HSP70* (Kváč et al. 2016). Není proto překvapující, že druh *C. proliferans* byl dlouhou dobu mylně považován za druh *C. muris* (Jalovecká et al. 2010; Melicherová et al. 2014; Kváč et al. 2016). Menší míra syntenie mezi *C. proliferans* a *C. andersoni* naznačuje, že tyto dva druhy prošly v průběhu evoluce více genetickými změnami nebo přeskupeními.

2.3.2 Srovnávací genomické analýzy vybraných zástupců rodu *Cryptosporidium*

Do srovnávacích genomických analýz byly kromě druhu *C. proliferans* zahrnuty izoláty, jejichž genomická data jsou volně přístupná ve veřejné online databázi Crypto.db, konkrétně *C. ryanae* 45019, *C. ubiquitum* 39726, *C. mortiferum*, *C. meleagridis* UKMEL, *C. tyzzeri* UGA55, *C. parvum* IOWA-ATCC, *C. hominis* UdeA01, *C. muris* RN66 a *C. andersoni* 30847. Genomická data izolátu *C. bovis* 45015 nebyly v době zpracování srovnávacích analýz ještě k dispozici, a proto tento izolát není do analýz zahrnut.

2.3.3 Analýza metabolických drah

Pro analýzu metabolismu nejen *C. proliferans*, ale i dalších druhů kryptosporidií použitých v této práci byla využita online databáze KEGG. Tato databáze umožnila identifikovat a charakterizovat metabolické dráhy přítomné u *C. proliferans* a následně porovnat kompletnost těchto drah s těmi, které jsou přítomné u ostatních druhů kryptosporidií. Na základě výsledků analýzy metabolických drah byla sestavena tzv. heatmapa, která je uvedena na obrázku 20.

Žaludeční druhy/izoláty mají v porovnání se střevními druhy/izoláty rozsáhlejší metabolické schopnosti, přičemž nejvýznamnější změny byly pozorovány v úplnosti mimo jiné u drah patřících k metabolismu aminokyselin, metabolismu sacharidů a metabolismu nukleotidů. Nejvýznamnějším rozdílem mezi střevními a žaludečními druhy je přítomnost kompletnějšího citrátového cyklu u žaludečních druhů (M00009, M00010 a M00011 na obrázku 20), zatímco střevní druhy mají pouze částečně funkční dráhu odpovědnou za oxidaci druhého uhlíku (M00011; přeměna 2-oxoglutarátu na oxaloacetát). Žaludeční druhy mají plně funkční dráhu odpovědnou za oxidaci prvního uhlíku (M00010, přeměna oxaloacetátu na 2-oxoglutarát, který může být dále přeměněn na sukcinyl-CoA), přičemž střevní druhy tuto dráhu zcela postrádají. Výjimku mezi střevními druhy představuje *C. ryanae*, jenž úplně postrádá dráhy citrátového cyklu. Oproti žaludečním druhům mají střevní druhy dráhu biosyntézy GABA (M00135) s pouze dvěma chybějícími bloky (je přítomna pouze diamin N-acetyltransferáza), zatímco tato dráha u žaludečních izolátů a dvou střevních, *C. mortiferum* a *C. ryanae* zcela chybí. Je zajímavé, že dva žaludeční druhy *C. muris* a *C. andersoni* sdílí kompletní dráhu biosyntézy UDP-GlcNAc (M00892), zatímco přítomnost této nekompletní dráhy u žaludečního druhu *C. proliferans* je shodná se střevními druhy. Dráha zodpovědná za biosyntézu guaninových ribonukleotidů (M00050; přeměna IMP na GDP a GTP) je kompletní pouze u dvou střevních druhů (*C. parvum* a *C. tyzzeri*) a ostatním jak střevním, tak žaludečním druhům chybí GMP syntáza. Žaludečním druhům a *C. ryanae* chybí navíc i IMP dehydrogenáza. Žaludeční druh *C. muris* se nejen od ostatních žaludečních druhů, ale i od ostatních střevních druhů odlišuje kompletností drah pro biosyntézu koenzymu A (M00914 a M00120). Pouze u *C. muris* se vyskytuje pantethein-fosfát adenyltransferáza, která je nezbytná pro biosyntézu koenzymu A.

Obecně byla největší redukce v metabolických drahách zaznamenána u druhu *C. ryanae*, kde byla odhalena absence 19 modulů, což je například o 8 víc než u *C. parvum* a o 16 víc než u *C. proliferans*. Také byla zaznamenána přítomnost enzymů, které jsou specifické pro analyzované žaludeční druhy, a to konkrétně enzymy zapojené do metabolismu sacharidů (isocitrát dehydrogenáza, citrát syntáza, akonitát hydratáza) energetického metabolismu (fosfoenolpyruvát karboxyláza, fumarát hydratáza I. třídy) a metabolismu lipidů (3-dehydrofingalin reduktáza). *Cryptosporidium mortiferum* jako jediný disponuje geranyl difosfát syntázou, enzymem s klíčovou rolí v biosyntéze terpenoidů.

Přechod zástupců kmene Apikomplexa od fotosyntetických nebo predátorských způsobů života k parazitismu je provázen evoluční redukcí genomu a ztrátou metabolických funkcí a rod *Cryptosporidium* představuje extrémní případ této reduktivní evoluce, který zahrnuje ztrátu mitochondriálního genomu i mnoha klíčových metabolických drah (Liu et al. 2016).

Srovnávací analýza metabolických drah zástupců rodu *Cryptosporidium* odhalila jak konzervované, tak variabilní prvky jejich metabolismu a identifikovala významné rozdíly v metabolických procesech jednotlivých druhů, které pravděpodobně odrážejí jejich adaptace na specifické hostitelské prostředí. Z výsledků analýzy, které jsou znázorněné ve formě tzv. heatmapy na obrázku 20, je zřetelné rozdělení kryptosporidií do dvou samostatných linií – žaludeční a střevní, které se liší ve svých metabolických schopnostech a strategiích, přičemž žaludeční druhy vykazují podstatně širší metabolické schopnosti.

V této práci zaznamenané rozšířené metabolické schopnosti žaludečních druhů ve srovnání se střevními druhy, které byly pozorovány již dříve (Xu et al. 2004; Li et al. 2021), odhalují, že střevní druhy jsou více závislé na příjmu aminokyselin, sacharidů a nukleotidů z hostitelských buněk. Výsledky metabolické analýzy také naznačují, a zároveň jsou v souladu s pozorováním Xu et al. (2019a), že různé druhy rodu *Cryptosporidium* vykazují variabilitu v syntéze guaninových ribonukleotidů, která je ovlivněna přítomností/absencí enzymů IMP dehydrogenázy a GMP syntázy, které hrají důležitou roli v regulaci buněčného růstu a množení (Jayaram et al. 1999; Hedstrom 2009; Wang et al. 2021). Druhy *C. parvum* a *C. tyzzeri*, které mají kompletní dráhy biosyntézy guaninových ribonukleotidů nejsou tolik závislé na přísunu těchto molekul z hostitelských buněk, a mohou si je syntetizovat interně. Naopak, ostatní druhy, které postrádají klíčové enzymy jako GMP syntázu a IMP dehydrogenázu, jsou více závislé na hostitelském přísunu guaninových ribonukleotidů. Tento rozdíl by mohl být způsoben nejen metabolickými schopnostmi jednotlivých druhů, ale také specifickými podmínkami hostitelského prostředí. Například žaludek (*C. muris*, *C. andersoni* a *C. proliferans*) a slepé střevo (*C. mortiferum*) mohou poskytovat dostatek guaninových ribonukleotidů, což teoreticky může umožnit některým druhům zjednodušit jejich vlastní biosyntézu a přizpůsobit se tak odlišným podmínkám.

Jak již bylo naznačeno, obecně se předpokládá, že *Cryptosporidium* spp., jako jedna z primárních větví Apicomplexa, ztratily během reduktivní evoluce řadu metabolických drah, včetně řady mitochondriálních energetických procesů, jako je TCA cyklus a elektronový transportní řetězec založený na cytochromech (Abrahamsen et al. 2004; Xu et al. 2004; Seeber et al. 2008). Nedávné studie však odhalily, že *C. muris* a *C. andersoni* mají všechny enzymy potřebné pro TCA cyklus a tradiční dýchací řetězec (Mogi a Kita 2010; Liu et al. 2016). Podle očekávání bylo potvrzeno, že se nejen žaludeční druhy *C. muris* a *C. andersoni*, ale také *C. proliferans* více spoléhají na TCA cyklus jako na svůj energetický zdroj a střevní druhy nemají schopnost plně provádět TCA cyklus, což naznačuje, že jejich metabolismus je výrazně omezený nebo závislý na alternativních metabolických cestách pro získávání energie. Enzymy isocitrát dehydrogenáza, citrát syntáza, akonitát hydratáza a fumarát hydratáza mají klíčovou

roli v TCA cyklu, a proto jejich potvrzená přítomnost pouze u žaludečních druhů podtrhuje skutečnost, že střevní druhy se musí spoléhat na anaerobní metabolismus (Mogi a Kita 2010; Liu et al. 2016; Xu et al. 2019).

Díky analýze metabolických drah jsme zjistili, že střevní druh *C. ryanae* vykazuje výrazně zjednodušený metabolismus ve srovnání s ostatními druhy kryptosporidií. Tento nález je v souladu se závěry studie Xu et al. (2020), kteří rovněž dokumentovali, že *C. ryanae* má nejnižší genový obsah v rámci rodu *Cryptosporidium* (obrázek 18). Xu et al. (2020) dále uvádí, že ztráta enzymů zapojených do metabolických drah vede k dalšímu snížení kapacity biosyntézy a produkce energie. Tento zjednodušený metabolismus naznačuje, že *C. ryanae* může být při získávání živin více závislý na specifických hostitelích. Předchozí výzkumy rovněž ukázaly, že elektronový transportní řetězec se postupně snižuje u různých druhů *Cryptosporidium* (Liu et al. 2016). Tento trend může být spojen s adaptacemi na specifické hostitelské prostředí a s variabilitou virulence mezi jednotlivými druhy. Naše výsledky tak doplňují a potvrzují teorie o adaptacích *C. ryanae* na specifické hostitele a o jeho přizpůsobení různým podmínkám v rámci jeho životního cyklu.

Zajímavým pozorováním ve studovaných druzích *Cryptosporidium* je rozdíl v dráze biosyntézy UDP-GlcNAc mezi žaludečními a střevními druhy. Zatímco u žaludečních druhů *C. muris* a *C. andersoni* byla identifikována kompletní dráha biosyntézy UDP-GlcNAc (M00892), u *C. proliferans*, který také parazituje v žaludku svých hostitelů, je tato dráha nekompletní, což je shodné se střevními druhy. UDP-GlcNAc je důležitý pro syntézu buněčných stěn bakterií a tvorbu oligosacharidů u eukaryot (Milewski et al. 2006; Rodríguez-Díaz et al. 2012). Kompletní dráha biosyntézy UDP-GlcNAc u *C. muris* a *C. andersoni* naznačuje, že tyto druhy mohou syntetizovat specifické polysacharidy, které by mohly zvýšit stabilitu a odolnost jejich oocyst. Naopak nekompletní dráha u *C. proliferans* a střevních druhů může odrážet jejich odlišné metabolické potřeby, což ovlivňuje jejich schopnost přežít a interagovat s hostitelským organismem.

Na základě provedené srovnávací analýzy metabolismu vybraných druhů *Cryptosporidium* lze konstatovat, že odlišnosti v metabolických drahách odhalují nejen klíčové rozdíly a podobnosti, ale také poskytují hlubší pohled do jejich evolučních adaptací a patogeneze.

2.3.4 Analýza virulenčních faktorů

V této kapitole jsou prezentovány výsledky srovnávací analýzy virulenčních faktorů u různých druhů rodu *Cryptosporidium*. Na základě dostupných publikovaných studií byly vytypovány klíčové virulenční faktory (tabulka 11), zahrnující proteiny související s invazí a apikálním komplexem, a následně byla stanovena jejich přítomnost/absence v genomických datových

souborech analyzovaných druhů rodu *Cryptosporidium*, přičemž zvláštní pozornost byla věnována druhu *C. proliferans*.

Celkově bylo identifikováno 14 virulenních faktorů, u nichž byla zjištěna variabilita v přítomnosti nebo absenci mezi různými druhy rodu *Cryptosporidium*. Jmenovitě se jedná o následující proteiny: AC4, AC5, AC7, AC8, RON 10, IMC15, MIC13, CP47, GP900, GP40/15/60, P23, CP2, MEDLE a mucinový glykoprotein.

Glykoprotein GP900 byl nalezen u všech druhů *Cryptosporidium*, kromě *C. andersoni*. Proteiny CP47 a IMC15 se vyskytovaly u všech střevních izolátů s výjimkou *C. ryanae*, zatímco protein P23 byl přítomen u všech střevních izolátů a také u *C. proliferans*. Proteiny GP40/15/60 a CP2 byly identifikovány výhradně u střevních druhů. Z žaludečních druhů pouze *C. andersoni* postrádá RON10. AC5 a AC7 byly nalezeny u *C. ubiquitum*, přičemž AC7 byl navíc identifikován i u *C. mortiferum*. Naopak, AC4 chybí u *C. muris*, *C. hominis* a *C. ryanae*. AC8 byl přítomen u všech žaludečních druhů, ale také u střevních druhů *C. ryanae* a *C. ubiquitum*. MIC13 byl nalezen pouze u *C. mortiferum* a *C. meleagridis*. Přítomnost MEDLE byla prokázána výhradně u *C. parvum* a *C. tyzzeri*. Glykoprotein mucinového typu chybí u všech žaludečních druhů, stejně jako u *C. hominis* a *C. meleagridis*.

Cryptosporidium spp. se od sebe vzájemně liší hostitelskou a tkáňovou specifikou, což je pravděpodobně ovlivněno jejich schopností přichycení a invaze do hostitelských buněk, a právě v těchto kritických okamžicích v jejich vývojovém cyklu se spoléhají na tzv. virulenní faktory. V rámci srovnávací analýzy byly identifikovány virulenní faktory vyskytující se výhradně u střevních druhů, a to IMC15, CP47, GP40/15/60, CP2, glycoprotein mucinového typu. Toto pozorování je v souladu Liu et al. (2016), kteří zaznamenali absenci těchto proteinů u *C. andersoni*. Uvedené zjištění není zcela nečekané, protože rozdílné prostředí žaludku a střeva naznačuje, že tyto dvě odlišné linie kryptosporidií budou mít specifické proteiny, které jim umožní přizpůsobit se danému prostředí žaludku a střeva. Přesto je překvapivé, že zatímco u střevních druhů byly identifikovány specifické virulenní faktory, u žaludečních druhů zatím nebyly identifikovány specifické faktory virulence. Malou výjimku představuje RON10, který se ovšem vyskytoval pouze u *C. proliferans* a *C. muris* a nikoliv u *C. andersoni*. Obecně je tento protein u kmene Apikomplexa spojován s invází, kdy jeho hlavní role spočívá v tvorbě tzv. pohyblivé spojky (moving junction), což je struktura, která se tvoří během invaze a slouží jako kotva, která umožňuje parazitovi pevně se přichytit k povrchu buňky, zatímco se vtažuje dovnitř (Lamarque et al. 2012). Avšak vzhledem k tomu, že kryptosporidie netvoří tuto pohyblivou spojku a nepronikají do hostitelské cytoplazmy (Borowski et al. 2008; Valigurová et al. 2008), je stále nejasné, jakou přesnou funkci tento protein plní právě u *C. proliferans* a *C. muris*. Je možné, že tento protein přispívá pouze k pevnějšímu přichycení invazních stádií. Z

pohledu parazita je prostředí tenkého střeva bezesporu náročnější kvůli silnější vrstvě hlenu, vyšší koncentraci různých trávicích enzymů a přítomnosti aktivních imunitních buněk (Peterson a Artis 2014; Shi et al. 2017; Paone a Cani 2020). Žaludek, na druhé straně, představuje především výzvu kvůli svému extrémně kyselému prostředí a proteolytickým enzymům, jako je pepsin (Wu et al. 2014; Hunt et al. 2015). Výše zmíněné proteiny specifické pro střevní druhy jsou primárně spojovány s invazí a adhezí (O'Hara et al. 2004; O'Connor et al. 2007; Bouzid et al. 2013; Liu et al. 2016), a je tedy pravděpodobné, že střevní druhy čelí náročnějšímu prostředí při své invazi, kterému se museli přizpůsobit. S invazí jsou ovšem spojovány i proteiny ze skupiny TRAP, ale jejich úloha při určování hostitelské specifity je pravděpodobně omezená, protože ve studii Liu et al. (2016) nebyla pozorována variabilita v jejich přítomnosti mezi jednotlivými druhy kryptosporidií, což odpovídá i našemu pozorování.

Proteiny ze skupiny MEDLE, které jsme identifikovali pouze u druhů *C. parvum* a *C. tyzzeri*, jsou často považovány za důležité virulenční faktory spojené s hostitelskou specifitou, jejichž absence by mohla být příčinou užšího hostitelského spektra (Liu et al. 2016; Li et al. 2017; Fei et al. 2018; Su et al. 2019; Xu et al. 2019, 2020; Li et al. 2021). Předpokládá se, že tato skupina proteinů souvisí s invazí v počátečních fázích infekce a použití polyklonálních protilátek proti CPMEDLE-1 při *in vitro* experimentu vedlo dokonce ke snížení infekce až o 40% (Fei et al. 2018). Tým Fei et al. (2018) rovněž navrhl hypotézu, že proteiny ze skupiny MEDLE hrají klíčovou roli v imunitním úniku, což kryptosporidiím umožňuje úspěšně se skrýt před obrannými mechanismy hostitele. Je zajímavé, že protein P23, který vyvolává protilátkové odpovědi u zvířecích hostitelů (Bouzid et al. 2013; Liu et al. 2016), byl mimo všechny střevní druhy zaznamenán také u *C. proliferans* jako u jediného z žaludečních druhů. Je známo, že střevo disponuje velkým množstvím imunitních buněk a protilátek a střevní druhy, tak musí čelit intenzivnímu imunitní tlaku. Přítomnost P23 vybízí k myšlence, že tento protein může být parazitem využíván k cílené stimulaci protilátek, čímž by mohl odvést pozornost imunitního systému od jiných kritických míst. Otázkou ale zůstává, proč je P23 přítomen i u žaludečního druhu *C. proliferans*. Může to být kvůli rozdílům v hostitelském spektru nebo odlišným patogenickým mechanismům, které tento druh potřebuje pro efektivní invazi a přežití v jiných podmínkách?

2.3.5 Vliv infekce kryptosporidiemi na genovou expresi hostitele

Tato kapitola se zaměřuje na analýzu diferenciální genové exprese hostitele infikovaného parazity rodu *Cryptosporidium*. Pro analýzu transkriptomu byly SCID myši (*Mus musculus*) infikovány oocystami *Cryptosporidium proliferans* v infekční dávce 1×10^6 oocyst na 200 μ l dH₂O. Transkriptom žaludku myši byl analyzován 30 dní po infekci (DPI). Získaná

transkriptomická data byla namapována na genom myši domácí (*Mus musculus*), který byl stažen z veřejně dostupné databáze GeneBank. Jako kontrolní skupina byly použity SCID myši, kterým byla podána pouze dH₂O o stejném objemu jako infekční dávka. Transkriptom žaludku byl poté analyzován po uplynutí 30 dnů.

Výsledky analýzy diferenciální genové exprese (obrázky 21–23) odhalily specifické změny v expresi genů, které souvisejí s imunitní odpovědí a patogenezí během infekce. Podle očekávání byla nejvyšší míra exprese zaznamenaná u genů zapojených do biologických procesů spojených s imunitní odpovědí, zažíváním hostitele, interspecifickými reakcemi mezi organismy a obrannými reakcemi na biotické stimuly (obrázky 21 a 22). Kromě toho byly pozorovány zvýšené úrovně exprese genů spojených s regulací apoptózy. Naopak útlum v genové expresi byl zjištěn u procesů regulace diferenciace epiteliálních buněk, buněčné odpovědi na cytokinové podněty a humorální imunitní odpovědi. Z grafu na obrázku 22 je patrná významná regulace genů zapojených do metabolických procesů a obnovy tkání.

Identifikované změny ve výše uvedených biologických procesech jsou úzce spojeny s regulací specifických genů, které vykazují odlišnou expresi v reakci na infekci kryptosporidii (obrázek 23). V souvislosti se zaživacím systémem hostitele byla zaznamenaná změna exprese genů souvisejících s regenerací epitelu (*Sox9*, *Tff3*), metabolismem lipidů (*Fabp1*, *Fabp2*, *Acat2*, *Apoa1*) a ochranou sliznice (*Muc2*, *Ezr*). Také byla pozorována zvýšená exprese genů, které mají významnou roli v imunitní odpovědi. Mezi tyto geny patří *Reg3g*, *Reg3b*, *Reg1*, *Cxcl9*, *Tgtp1*, *Zbp1*, *Ubd* a *Nfkbia*. Infekce kryptosporidii vedla také ke snížení exprese těchto genů: *Top2b*, *Ctr9*, *Matr3*, *Pabpc1*, *Pabpm1*, *Rnf187* a *Tomm70a*.

Výsledky analýzy transkriptomu naznačují významné narušení klíčových buněčných a imunitních procesů v reakci na infekci žaludečním druhem *C. proliferans*. Jak už bylo zmíněno, jedním z hlavních pozorovaných procesů je aktivace genů spojených s imunitní odpovědí, a to především v souvislosti s činností cytokinů, zejména interferonu β , což je v souladu s pracemi Lean et al. (2002) a Barakat et al. (2009). Tyto molekuly jsou nezbytné pro přilákání imunitních buněk na místo infekce a pro koordinaci následných imunitních reakcí a jejich zvýšená exprese naznačuje pokus hostitelského organismu o obranu proti parazitovi. Úloha interferonů typu II (INF), IFN- γ , ve vrozené imunitě hostitele proti kryptosporidiím je nezpochybnitelná a byla prokázána a charakterizována již v několika studiích (Lacroix-Lamandé et al. 2002; Lean et al. 2002; Leav et al. 2005; Jalovecká et al. 2010). Naopak, role interferonů typu I (IFN- α/β) v obraně hostitele, zejména *in vivo*, byla zkoumána jen sporadicky, a proto zůstává jejich přesné zapojení v tomto procesu nejasné (Barakat et al. 2009; Beiting 2014). Nicméně, studie

týmu Barakat et al. (2009) ukázala, že expozice buněčných linií interferonům typu I (IFN- α/β) vedla k významné inhibici vývoje kryptosporidií v *in vitro* podmínkách, což naznačuje, že tyto cytokiny mohou hrát důležitou roli ve vrozené imunitní reakci na tuto infekci. Pozorovaná zvýšená exprese genů regulujících apoptózu odráží schopnost kryptosporidií ovlivnit apoptózu hostitelských buněk ve svůj prospěch, která byla popsána již dříve (Ojcius et al. 1999; McCole et al. 2000; Sasahara et al. 2003; Mele et al. 2004; Kolářová a Valigurová 2021). V rané fázi svého vývoje invazní stádía podněcují apoptózu na úkor nekrózy s cílem utlumit zánětlivé reakce hostitele a zvýšit tím svou šanci na přežití (McCole et al. 2000; Sasahara et al. 2003; Mele et al. 2004). Druhý okamžik, kdy je apoptóza hostitelských buněk pro ně opět výhodná, nastává ve chvíli, kdy je vývojové stádium připraveno opustit hostitelskou buňku, a tudíž apoptóza parazitované buňky je pro něj výhodným mechanismem, jak tuto buňku opustit (Ojcius et al. 1999). Snížená exprese genů zodpovědných za regulaci diferenciacie epitelálních buněk může naznačovat, že buňky přeměňují své zdroje na zvládnání stresu způsobeného infekcí, například utlumení růstu a proliferace buněk ve prospěch zaměření se na obranné reakce. Tato utlumená regulace diferenciacie epitelálních buněk spolu se sníženou expresí genů podílejících se na buněčné odpovědi na cytokinové podněty a humorální imunitní odpovědi znamená, že infekce narušila normální vývoj epitelálních buněk, oslabilu reakci buněk na imunitní signály a snížila celkovou imunitní odpověď a kondici organismu.

Infekce kryptosporidiemi ovlivňuje řadu výše zmíněných biologických procesů v zaživacím systému hostitele, což se odráží v komplexních změnách exprese specifických genů. Mezi hlavní oblasti ovlivněné infekcí kryptosporidiemi patří regenerace epitelu, metabolismus lipidů, ochrana sliznice a imunitní odpověď. Geny jako *Sox9* a *Tff3*, které jsou klíčové pro obnovu a ochranu epitelu, vykazují zvýšenou expresi, což naznačuje snahu hostitele opravit a posílit slizniční bariéru po infekci (Bijelić et al. 2017; Bugg a Davis 2024). To odpovídá i detekované zvýšené produkci hlenu při infekci (Kvác et al. 2016). Změny v genech *Fabp1*, *Fabp2*, *Acat2* a *Apoa1* ukazují na adaptace v lipidovém metabolismu, které mohou reflektovat narušený metabolismus v důsledku infekce (Lai et al. 2005; Temel et al. 2007; Rodríguez Sawicki et al. 2017; Su a Peng 2020). Ochrana sliznice je posílena zvýšenou expresí *Muc2* a *Ezr*, které zajišťují strukturu a funkci slizničního povlaku (Ding et al. 2010; Yao et al. 2021). V oblasti imunitní odpovědi se zvyšuje exprese genů kódujících antimikrobiální proteiny (*Reg3g*, *Reg3b*, *Reg1*) a chemokiny (*Cxcl9*), které pomáhají přitahovat imunitní buňky k místu infekce (Tokunaga et al. 2018; Sun et al. 2021). Geny jako *Tgtp1* a *Zbp1* posilují antivirovou obranu a interferonové dráhy (Berkebile et al. 2021; Karki a Kanneganti 2023), zatímco *Ubd* a *Nfkbia* regulují zánětlivou reakci (Zhang et al. 2015b; Chruscinski et al. 2022). Na druhé straně, snížená exprese genů jako *Top2b*, *Ctr9*, *Matr3*, *Pabpc1*, *Pabpm1*, *Rnf187* naznačuje, že infekce

vede k narušení základních buněčných funkcí, jako je regulace DNA, stabilita mRNA a mitochondriální funkce (de Jong et al. 2008; Austin et al. 2018; Nene et al. 2018; Olie et al. 2019; Qi et al. 2022; Yang et al. 2022). Popsaná zvýšená exprese genů souvisejících s regenerací epitelu, metabolismem lipidů a ochranou sliznice naznačuje, že tělo se snaží obnovit a ochránit žaludeční integritu.

Pozorovaná komplexní odpověď hostitele na infekci *C. proliferans* demonstruje, jak hostitelský organismus upravuje své genové expresní profily v reakci na patogenní stresory, aby maximalizoval šance na přežití a obnovu poškozených tkání a je tudíž zřejmé, že hostitelský organismus se aktivně brání infekci kryptosporidii.

4. ZÁVĚRY

Předkládaná disertační práce se zabývala komplexní analýzou hostitelské specifity parazitů rodu *Cryptosporidium*, s cílem porozumět biologickým a molekulárním mechanismům, které řídí jejich schopnost infikovat různé hostitele. Kombinace experimentů zaměřených na tkáňovou a hostitelskou specifitu u druhů *Cryptosporidium mortiferum* a *Cryptosporidium ornithophilus*, genomickou a transkriptomickou analýzu *Cryptosporidium proliferans* byla zvolena s cílem propojit rozdílné úrovně poznání – od konkrétních interakcí na úrovni tkání až po komplexní genetické a molekulární dráhy. Tento holistický přístup umožnil odhalení genetických a molekulárních základů virulence a hostitelské specifity, které jsou relevantní pro celý rod *Cryptosporidium*. Následující část shrnuje hlavní zjištění:

- Druhy *C. ornithophilus* a *C. mortiferum* vykazují úzkou hostitelskou specifitu s odlišnými hostitelským spektrem.
- *Cryptosporidium ornithophilus* a *C. mortiferum* se odlišují v průběhu prepatentní periody, která je ovlivněna hostitelským druhem a jeho imunitním stavem. Zatímco *C. ornithophilus* má relativně stabilní a předvídatelnou prepatentní periodu napříč různými druhy ptáků, *C. mortiferum* vykazuje značnou variabilitu prepatentní periody v závislosti na druhu hostitele a jeho imunitní odpovědi. Tyto rozdíly je důležité zohlednit při diagnostice a kontrole infekcí těmito parazity.
- Přestože druhy *C. ornithophilus* a *C. mortiferum* vykazují shodnou tkáňovou specifitu, odlišují se patogenitou. Zatímco infekce *C. ornithophilus* probíhá většinou bez klinických příznaků, *C. mortiferum* způsobuje asymptomatické až letální infekce v závislosti na druhu hostitele.
- Morfologie a morfometrie vývojových stádií, stejně jako vývojový cyklus *C. ornithophilus* a *C. mortiferum* se od sebe signifikantně neliší a nelze oba druhy od sebe odlišit na základě těchto biologických charakteristik.
- Genom *C. proliferans* se vyznačuje nejvyšším počtem protein kódujících genů v rámci rodu *Cryptosporidium*.
- *Cryptosporidium proliferans* vykazuje největší míru syntenie s *C. muris*, což potvrzuje blízkou genetickou příbuznost těchto druhů.
- Žaludeční druhy kryptosporidií, včetně *C. proliferans*, mají širší metabolické schopnosti, zejména v TCA cyklu, zatímco střevní druhy vykazují větší metabolickou redukci.

- U žaludečních druhů byly identifikovány specifické enzymy, které nejsou přítomny u střevních druhů, což podtrhuje jejich odlišné metabolické adaptace na tkáň hostitele.
- V genomu *C. proliferans*, stejně jako u většiny dostupných genomů kryptosporidií, kromě *C. parvum* a *C. tyzzeri*, byla zjištěna absence genů pro klíčové enzymy potřebné pro syntézu guaninových ribonukleotidů. Tato skutečnost spolu s absencí proteinů ze skupiny MEDLE je považována za možný faktor vysvětlující úzkou hostitelskou specifitu.
- *Cryptosporidium proliferans*, překvapivě sdílí některé faktory virulence se střevními druhy kryptosporidií. Přítomnost těchto faktorů, by mohla vysvětlovat vyšší patogenitu tohoto druhu v porovnání s ostatními žaludečními druhy kryptosporidií savců.
- Hostitelský organismus reaguje na infekci druhem *C. proliferans* zvýšenou aktivitou genů hostitele spojených s imunitní odpovědí a zažíváním spojeným s metabolismem lipidů, které indikují narušení energetické rovnováhy hostitele.
- Obdobně jako u *C. parvum*, byla potvrzena zvýšená regulace genů ovlivňující apoptózu buněk při infekci *C. proliferans*.
- Zaznamenaná zvýšená exprese genů pro regeneraci a ochranu sliznice naznačuje snahu hostitele obnovit žaludeční integritu.