

Abstrakt

Giardia intestinalis je kosmopolitní jednobuněčný organismus způsobující průjmy. Kromě klinického významu, jsou tyto dvoujaderní prvoci zajímaví také z hlediska postavení v rámci eukaryot. Jsou evolučně vzdáleni obvyklým modelovým organismům a dokonale přizpůsobeni parazitickému způsobu života. Jejich genom je poměrně malý, obsahuje velice málo nekódujících oblastí a mnohé z genů známých u jiných organismů u giardií chybí, tyto vlastnosti z nich dělají atraktivní model pro studium schopnosti buňky fungovat s minimální výbavou. Předkládaná práce přináší nová dílčí zjištění o různých úrovních udržování chromozomové stability u tohoto parazita.

Jednou z nich je způsob ochrany konců chromozomů, tzv. telomer. Podařilo se nám lokalizovat telomery na koncích chromozomů v různých fázích buněčného cyklu a zpřesnit jejich přibližnou délku na 0,5 až 2,5 kb. Prokázali jsme existenci aktivního enzymu telomerázy odpovědného za přidávání telomerických repetitivních sekvencí na konce chromozomů, ačkoliv se jedná o enzym strukturně odlišný od jiných eukaryot. Tyto poznatky ukazují, že giardie, stejně jako většina eukaryot, vyvinula konzervativní způsob, jak zamezit zkracování telomer.

Popisujeme také účinek léku pro léčbu giardiózy, metronidazolu, na DNA a buněčný cyklus citlivých a rezistentních buněčných linií giardií. Metronidazol způsobuje fosforylaci histonu H2A v jádrech a naštípání DNA. Subletální koncentrace prodlužuje replikaci, na rozdíl od letální dávky, která vede k rychlé ztrátě schopnosti buněk přilnout k povrchu přičemž buněčný cyklus není ovlivněn. Tato pozorování ukazují, že prvotní reakcí buněk na letální koncentraci metronidazolu není poškození DNA, ale spíše okamžité vzájemné působení mezi metronidazolem a nejbližšími biomolekulami v místě, kde dochází k tvorbě cytotoxické formy metronidazolu. U rezistentních linií je přibližně 40% buněk pozitivní na přítomnost fosforylované formy H2A histonu, což ukazuje, že v těchto buňkách je neustále přítomna poškozená DNA, která by mohla přispívat ke zrychlené mutagenezi a tedy také vzniku přirozené rezistence.

Je známo, že chromozomy giardií kondenzují. Popsali jsme celkovou morfologii chromosomů, stupně kondenzace a rozchod chromozomů v průběhu mitózy u tohoto parazita. Proces kondenzace chromozomů u giardií probíhá obdobně jako u jiných eukaryot, zvláštností

oproti jiným organismům je způsob rozchodu chromozomů. U giardií se chromozomy neuspořádávají do ekvatoriální roviny, naopak dochází k průběžnému přesunu chromozomů k pólům vřeténka, což způsobuje opožďování přestupu chromatid do dceřiných buněk a mohlo by být vysvětlením pro aneuploidii, která je u tohoto parazita popisována. Na molekulární úrovni giardii chybí některé geny kódující proteiny kohesinového a kondenzinového komplexu, které mají roli v kondenzaci chromozomů a separaci chromozomů v mitóze. Nám se podařilo nalézt pravděpodobné členy rodiny kleisinů, kteří by mohli mít roli v tvorbě kondenzinového komplexu.

Konečně, studovali jsme vliv inhibitoru afidikolinu na DNA a buněčný cyklus giardií. Tato látka je využívána pro synchronizaci buněk giardií a vede k zastavení buněčného cyklu na rozhraní G1 a S fáze. Prokázali jsme, že afidikolin způsobuje fosforylaci histonu H2A, měl by proto být použit v minimálních koncentracích, po co nejkratší dobu a s vědomím, že u buněk je aktivována odpověď na poškození DNA.