

Abstrakt:

Giardia intestinalis je anaerobní jednobuněčný patogen, původce nemoci známé jako giardióza. Doposud máme pouze omezené informace o regulaci genové exprese u tohoto organismu, výjimkou jsou informace o pravděpodobném přepínání exprese povrchových antigenů. V předkládané práci jsme se zaměřili na možnou úlohu 3' nepřekládaných oblastí (3'UTR) mRNA, které zprostředkovávají stabilitu i lokalizaci mRNA transkriptů. K sledování a objasnění úloh 3' UTR využíváme RNA vazebné proteiny rodiny PUF, které se podílejí na kontrole transkriptů jejich represí, aktivací nebo degradací. Tyto výhradně eukaryotické proteiny jsou vysoce konzervované. Každý z proteinů obsahuje v C-koncové oblasti konzervativní doménu, která specificky váže 3'UTR v mRNA.

Podařilo se nám identifikovat pět různých PUF proteinů v genomu *G. intestinalis* (GiPUF), prokázat jejich přirozenou expresi v trofozoitech *G. intestinalis* a lokalizovat všech pět GiPUF proteinů v cytoplasmě. GiPUF 2, GiPUF3 a GiPUF5 navíc vykazují afinitu k povrchu ER. V proteinových sekvencích jsme identifikovali C-koncovou vazebnou doménu u všech GiPUF proteinů. Nejvíce konzervovaný GiPUF4 obsahuje 8 vazebných míst, navíc téměř identických s vazebnými místy lidského PUF proteinu PUM1, kvasinkového PUF3p, FBF1 *C. elegans*, PUM *D. melanogaster* a PUF1 *P. falciparum*, což svědčí o blízké evoluční příbuznosti. Z tohoto důvodu jsme se v dalších studiích zaměřili pouze na GiPUF4. Cytoplasmatickou lokalizaci tohoto proteinu jsme potvrdili buněčnou frakcionací kultury *G. intestinalis* s HA tagovaným GiPUF4 proteinem. Bioinformatickou analýzou jsme specifikovali vazebný motiv GiPUF4 proteinu a určili 19 mRNA, které mohou být vázány GiPUF4 proteinem. Strukturní 3D model proteinu spolu s vazebnou RNA nám potvrdil vazebný motiv, ale i strukturní příbuznost proteinu. Ten, stejně jako většina PUF proteinů, tvoří v terciární struktuře srpkovitou strukturu, do jejíhož vnitřního záhybu se váže 3'UTR příslušné mRNA. Konkrétní mRNA partneři GiPUF4 proteinu budou identifikovány nativní izolací GiPUF4 proteinu spolu s navázanými mRNA.

Jediným doposud známým mechanismem regulace genové exprese u *G. intestinalis* je vliv 3'UTR VSP genů na míru jejich exprese. Tento vliv jsme potvrdili pomocí pokusů s proteinem Sec20, které dále ukazují na ovlivnění lokalizace proteinů nejen informacemi obsaženými v samotných molekulách (cílové sekvence apod.), ale také mírou exprese proteinu.