

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Vladimíra Najdová

Úloha nepřekládaných oblastí mRNA v *Giardia intestinalis*

The role of untranslated mRNA regions in *Giardia intestinalis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2013

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 15.8.2013

Vladimíra Najdová

Poděkování

Mé největší poděkování patří mému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z laboratoře a Mgr. Mariánovi Novotnému, Ph.D. za pomoc s bioinformatickými studiemi. V neposlední řadě děkuji své přítelkyni a rodině za podporu v průběhu celého studia.

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.

Klíčová slova: 3' nepřekládané oblasti, RNA vazebné proteiny, lokalizace proteinů

Abstract:

Giardia intestinalis is an anaerobic protozoan pathogen, agent of the disease known as giardiasis. The regulation of gene expression during giardia cell- and life-cycle has been poorly studied so far, with the exception of variable surface proteins, which constitute the immunoprotective coat of the cell. In this diploma thesis, we focus on the possible role of the 3' untranslated region (3'UTR) of mRNA that mediate stability and localization of mRNA transcripts. We use RNA binding proteins of PUF family, which control the function of the target transcripts by their repression, activation or sequestration, to monitor and verify the role of 3'UTRs. These only eukaryotic proteins are highly evolutionarily conserved. Each of them contain highly conserved C-terminal domain, which specifically binds to 3'UTR of mRNAs.

We have identified five different PUF proteins in the genome of *G. intestinalis* (GiPUF), confirmed their expression in *G. intestinalis* trophozoites and located all five proteins in the cytoplasm. GiPUF2, GiPUF3 and GiPUF5 show an additional affinity to the surface of the endoplasmic reticulum. We have identified the C-terminal binding domain in protein sequences of all GiPUF. The most conserved GiPUF4 contain eight binding sites, nearly identical to the binding site of human Pum1 protein, yeast PUF3p, FBF1 of *C. elegans*, PUM in *D. melanogaster* and PUF1 in *P. falciparum*, which suggest a close evolutionary relationship. For this reason we focus other studies only on GiPUF4. Cytoplasm localization of this protein was confirmed by cell fractionation of giardia cells containing HA-tagged GiPUF4 protein. Using bioinformatics 19 theoretical cognate mRNAs of GiPUF4 protein were. 3D structural model of the protein with the binding of RNA confirmed the presence of the binding motif and overall structural similarity of the protein, which like most PUF proteins form the tertiary structure of crescent shape, in which inner fold binds 3'UTR of mRNA. Specific mRNA partners of GiPUF4 protein will be identified by the native isolation of GiPUF4 protein the bound mRNA.

The effect of 3'UTR VSP genes at the level of their expression is the only previously known mechanism of gene regulation in *G. intestinalis*. This effect was confirmed by experiments with the Sec20 protein. Moreover, the results indicate that, the localization of proteins may depend not only the information contained in the actual molecules (target sequence, etc.), but also on the rate of the protein expression.

Key words: 3' untranslated region, RNA binding proteins, protein localization

Seznam použitých zkratk

3'UTR	-	3' nepřekládaná oblast
5'UTR	-	5' nepřekládaná oblast
BC	-	Buněčný cyklus
cDNA	-	Complementary DNA
dsRNA	-	Dvouřetězcová molekula RNA
ER	-	Endoplasmatické retikulum
gDNA	-	Genomová DNA
GIago	-	Protein Argonaut v <i>G. intestinalis</i>
GIDcr	-	Nukleáza Dicer v <i>G. intestinalis</i>
GiPUF	-	PUF protein v <i>G. intestinalis</i>
ORF	-	Open reading frame, otevřený čtecí rámec
PBS	-	phosphate buffer saline, fosfátový pufr
PCR	-	Polymerase Chain Reaction, Polymerázová řetězová reakce
PH-D	-	Pumilio homology domain
PUF	-	RNA vazebný protein rodiny
TbPUF	-	PUF protein i <i>Trypanosoma brucei</i>
TLCK	-	N-Tosyl-L-lysine Chloromethylketon; inhibitor proteáz
VSP	-	Variant Surface Protein, povrchový protein <i>G. intestinalis</i>

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	10
3. Literární přehled	11
3.1 Regulace genové exprese u <i>Giardia intestinalis</i>	11
3.2 Povrchové proteiny.....	12
3.3 RNA vazebné proteiny – PUF proteiny	18
3.3.1 Pumilio homology domain	18
3.3.2 Funkce a význam PUF proteinů	20
4. Materiál a metody	26
4.1 Bioinformatické studie.....	26
4.2 Použité organismy a média.....	26
4.2.1 <i>Giardia intestinalis</i>	26
4.2.2 <i>Escherichia coli</i>	26
4.3 Amplifikace a klonování genů	27
4.3.1 Amplifikace genů.....	27
4.3.2 Klonování genů.....	28
4.3.3 Použité plazmidy	29
4.4 Transfekce a kultivace trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	30
4.5 Příprava preparátů.....	32
4.6 Frakcionace (příprava high speed peletu)	35
4.7 Příprava cDNA <i>G. intestinalis</i>	36
4.8 Nativní izolace HA-tagem značeného proteinu pomocí Dynabeads	33
4.8.1 Příprava Dynabeads s protilátkou	33
4.8.2 Izolace proteinu.....	33
5. Výsledky	35
5.1 Analýzy PUF proteinů u <i>G. intestinalis</i>	35
5.2 Exprese PUF proteinů v <i>G. intestinalis</i>	38
5.3 Lokalizace GiPUF proteinů	39
5.3.1 Lokalizace nepřímou imunofluorescencí	39

5.3.2 Ověření exprese proteinů	41
5.4 GiPUF4 protein.....	42
5.4.1 Lokalizace GiPUF4 proteinu.....	42
5.4.2 Predikce mRNA vázaných GiPUF4 proteinem <i>G. intestinalis</i>	44
5.4.3 Strukturní model GiPUF4 proteinu	46
5.4.4 Nativní izolace GiPUF4 proteinu	47
5.5 Vliv 3'UTR z VSP na míru genové exprese	48
6. Diskuze.....	51
6.1 GiPUF proteiny v <i>G. intestinalis</i>	51
6.1.1 Lokalizace a exprese GiPUF proteinů	51
6.1.2 GiPUF4 protein	53
6.2 3'UTR VSP proteinu.....	56
7. Závěr	57
8. Seznam použité literatury.....	58

1. Úvod

Ribonukleové kyseliny (RNA) zajišťují nejen přenos genetické informace kódované v DNA v podobě molekul mediátorové RNA (messenger RNA, mRNA), ale jsou také důležitým regulačním nástrojem. Příkladem jsou ribozomální RNA (rRNA), složky ribozomů podílející se na translaci, nebo transferové RNA (tRNA) sloužící jako přenašeče aminokyselin. Další z důležitých molekul jsou malé nepřekládané RNA např. microRNA (miRNA) a jejich prekurzory small nucleolus RNA (snoRNA), short interfering RNA (siRNA) a mnoho dalších. Tyto molekuly se podílejí na regulaci buněčné exprese na úrovni mRNA (RNA interference), ale také na úrovni inhibice translace.

Eukaryotické molekuly mRNA jsou tvořeny kódující oblastí, která je komplementární k tzv. otevřenému čtecímu rámci (open reading frame, ORF) určitého genu a přenáší informaci o aminokyselinovém složení vznikajícího proteinu. Kódující oblast je na obou svých koncích obklopena úseky nepřekládané RNA (untranslated regions, UTR). Úseky před kódující oblastí se nazývají 5' konce (5'UTR) a obsahují informace pro nasedání translační mašinerie, ale také ko-translační modifikaci v podobě 7- metylguanositového zbytku tzv. 5'-čepičky. Úseky za kódující oblastí, které se označují jako 3' konce (3'UTR) jsou post-transkripčně modifikovány přidáváním až stovek adenylových zbytků tzv. polyA konce. Tato modifikace spolu s 5'čepičkou rozhoduje o stabilitě molekuly, přítomnost obou modifikací je také určující signál pro transport z jádra do cytoplasmy, kde dochází k překladu mRNA na protein. UTR mají často také regulační funkci. Ve své práci jsem se zaměřila na regulační úlohu 3'UTR mRNA u *G. intestinalis*.

Přestože nepřekládané oblasti v genomu *G. intestinalis* jsou velmi krátké, byla objevena regulační funkce 3'UTR při expresi genů pro povrchové proteiny (VSP) *G. intestinalis* (Li et al., 2012). U *G. intestinalis* bylo identifikováno celkem 25 snoRNA, z toho 5 molekul jsou prekurzory miRNA interagující s 3'UTR většiny mRNA pro VSP. Informace obsažená v 3'UTR VSP pravděpodobně rozhoduje o míře exprese a určuje, který z genů bude přepsán a který ne (Li et al., 2012). Rozhodli jsme se toto ověřit

v jednoduchém pokusu, kdy jsme ke genu pro Sec20 z *G. intestinalis* (protein z endoplasmatického retikula – ER) zaklonovali 3'UTR oblast pro vybraný VSP.

V 3'UTR se často vyskytují vazebné motivy pro RNA vazebné proteiny. V genomu *G. intestinalis* se nám podařilo identifikovat pět predikovaných genů pro RNA vazebné proteiny patřící do malé rodiny PUF proteinů. Rozhodli jsme se ověřit expresi, lokalizaci a funkci těchto proteinů v trofozoitech *G. intestinalis*.

Charakterizace a bližší objasnění funkce RNA vazebných proteinů nám poskytne nejen obecné informace o interakci proteinů a RNA, ale také může odhalit základní mechanismy regulace genové exprese u *G. intestinalis*. Pochopení specifiity a obecně vazby RNA k proteinům nám může poskytnout vhodný genetický nástroj pro manipulaci s RNA.

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat vazebné motivy v nepřekládaných úsecích mRNA a vybrané RNA vazebné proteiny v *G. intestinalis*.

Praktické cíle:

1. Charakterizovat a lokalizovat RNA vazebné proteiny v *G. intestinalis*.
2. Vytipovat geny, které jsou vázány RNA vazebným proteinem GiPUF4.
3. Nativně izolovat RNA vazebné proteiny spolu s jejich RNA vazebnými partnery.
4. Ověřit vliv 3' nepřekládaných oblastí na expresi proteinů.

3. Literární přehled

3.1 Regulace genové exprese u *Giardia intestinalis*

Prvok *G. intestinalis* patří do skupiny Excavata, podskupiny Metamonada, čeledi Diplomonadida, je původcem celosvětově rozšířeného průjmového onemocnění lidí i zvířat - giardiózy. V rámci životního cyklu *G. intestinalis* lze sledovat dvě základní životní stádia – trofozoity a cysty. Nákaza probíhá perorálně pozřením tekutin či potravy kontaminované infekčními cystami, které excystují v trávicím traktu v oblasti duodena a jejunu. Další z možností nákazy mezi lidmi je fekálně-orální přenos. Vzniklí trofozoiti se vyskytují ve střevě volně nebo přichyceni k endotelu střeva pomocí přísavného disku. Do tkání invazivně nevnikají. Trofozoiti se živí osmoticky střevní tráveninou a způsobují symptomy nemoci – flatulence, nauzea a především opakované průjmy vedoucí k celkovému oslabení organismu a nedostatku vitamínů rozpustných v tucích v důsledku poruchy resorpce tuků. V případě nákazy dospělého člověka není giardióza život ohrožující, někdy dokonce může probíhat bez symptomů. Nákaza dětí přináší vyšší riziko spojené například s poruchami růstu a celkovou podvýživou. Infekční cysty sloužící k nákaze dalšího hostitele odcházejí z těla spolu se stolicí v nepravidelných intervalech (Adam, 2001). Jedná se o parazita s velmi redukovaným genomem i obsahem buněčných organel. *G. intestinalis* postrádá golgiho aparát, obsahuje redukovaný sekretorický systém a vysoce redukované mitochondrie – tzv. mitosomy (Ankarklev et al., 2010).

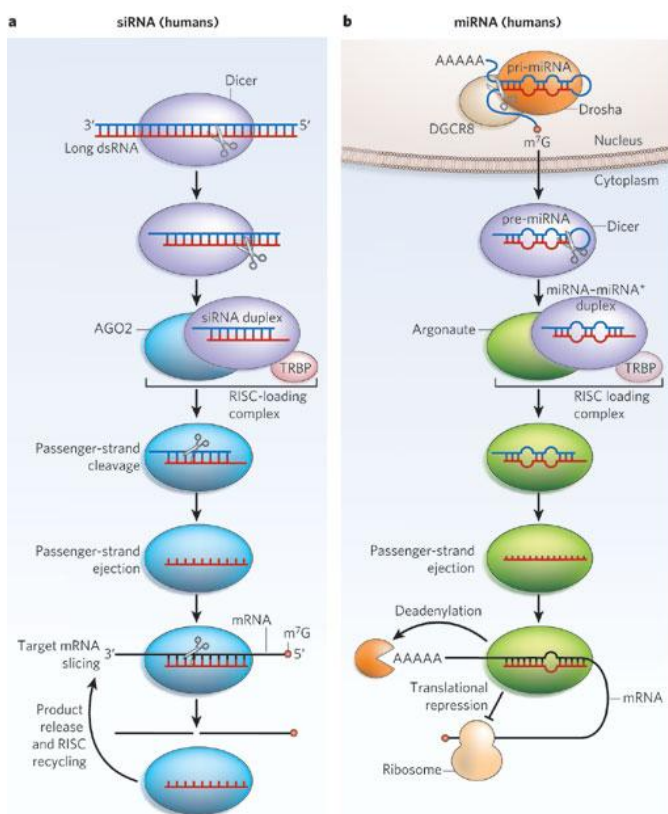
Genom tohoto prvoka je velice kompaktní. Geny jsou uspořádány těsně u sebe a často v jednosměrné orientaci, což znesnadňuje lokalizaci nepřekládaných oblastí (McArthur et al., 2000). Na rozdíl od většiny eukaryot, 5'oblasti u *G. intestinalis* jsou extrémně zkrácené, v průměru jsou rozsahu 1-6 bází (Yu et al., 1998; Yee et al., 2000). Nepřekládané oblasti většiny eukaryot jsou post-translačně modifikované. Modifikace 5' konce metyl-guanosinovou čepičkou nebyla u *G. intestinalis* potvrzena (Yu and Wang, 1996). Kompaktnost genomu odráží i fakt, že byl dosud identifikován pouze jeden intron (Nixon et al., 2002).

3.2 Povrchové proteiny

Pro únik před imunitním systémem hostitele jsou trofozoiti *G. intestinalis* vybaveni povrchovými antigeny – tzv. VSP (Variant Surface Protein). První celková sekvence VSP byla popsána roku 1990 (Gillin et al., 1990a). Do současnosti bylo experimentálně identifikováno celkem šest VSP proteinů (Yang and Adam, 1995; Lujan et al., 1995; Gillin et al., 1990b; Adam et al., 1988; Nash et al., 1990; Nash et al., 2001). Společným znakem všech VSP je vysoký obsah cysteinu (12 %) často se vyskytující v motivu CxxC (Morrison et al., 2007). Každý ze šesti experimentálně potvrzených VSP proteinů obsahuje v C-konci sekvence konzervovaný CRGKA motiv. N-konce sekvencí nevykazují žádné známky homologie (Adam, 2001). V genomu *G. intestinalis* bylo nalezeno přibližně 220 genů pro VSP. Na povrchu buňky je však vystavena vždy pouze jedna varianta VSP, k jejíž obměně dochází v průměru jednou za 6 až 13 generací. (Nash, 1997; Adam, 2001). Díky této obměně povrchu je giardia schopná unikat imunitní reakci ve střevě hostitele. Přestože na povrchu *G. intestinalis* je vystaven vždy pouze jeden VSP, transkriptů VSP genů je v buňce přítomno více (Faghiri and Widmer, 2011). Pro vysvětlení mechanismu regulace exprese povrchových proteinů *G. intestinalis* byly zformulovány dvě hypotézy. První z nich vysvětluje regulaci VSP na úrovni translace prostřednictvím micro-RNA (mi-RNA) (Saraiya and Wang, 2008), druhá na úrovni post-transkripčního umlčování genů (Prucca and Lujan, 2009).

Obecně u eukaryot jsou mi-RNA krátké úseky nekódující RNA. V jádře vznikají přepisem RNA-polymerázou II dlouhé prekurzory tzv. small nucleolar RNA (snoRNA), někdy také nazývané long primery miRNA (pri-miRNA) (Cai et al., 2004). Jaderná nukleáza typu III Drosha štěpí tyto prekurzory na menší molekuly (přibližně 70 páru bází) tzv. pre-miRNA, které jsou transportovány přes jadernou membránu pomocí přenašeče Exportinu 5 (Lee et al., 2003; Lund et al., 2004). Cytoplasmatická RNása Dicer zachycuje a štěpí pre-miRNA na konečné mi-RNA o přibližné délce 22 párů bází (Bernstein et al., 2001). Sense řetězec miRNA je navázán Argonautem a zainkorporován do riboproteinového komplexu RISK (RNA induced silencing komplex), antisense řetězec miRNA je degradován RNásou Dicer. RISK komplex je obecně složen z Argonautu,

Dicerua proteinu vázajícího dvojřetězcové RNA. Navázaná miRNA slouží jako předloha pro RISK komplex k zachycení komplementární sekvence v 3'UTR mRNA. Zachycená molekula mRNA je určena k degradaci, deadenylaci nebo inhibici její translace (Obrázek 1). Po degradaci mRNA se RISK komplex rozpadá na jednotlivé podjednotky a jednořetězcová siRNA je uvolněna do cytoplasmy (Meister et al., 2004). Shrnutí v (Jinek and Doudna, 2009; Wilson and Doudna, 2013).



Obrázek 1: Genová regulace pomocí RNA

a, regulace pomocí siRNA (short interfering RNA): Prekurzorem siRNA jsou dlouhé dvojřetězcové RNA virového původu či z mobilních elementů v genomu. Regulace funguje na úrovni sestřihu molekul mRNA komplementárních k siRNA. Na rozpoznání, vazbě a sestřihu se podílí RISK.

b, regulace pomocí miRNA (micro RNA): Prekurzorem miRNA jsou jaderné RNA (snoRNA), sestřihány v jádře pomocí nukleázy Drosha, exportovány Exportinem 5 a v cytoplasmě rozštěpeny na miRNA pomocí endonukleázy Dicer, která je součástí RISK. Sense řetězec je zapojen do RISK komplexu k rozpoznávání vazebných míst v mRNA, ty se často nacházejí v 3'UTR. Samotná regulace exprese je pravděpodobně provedena deadenylací 3' konce mRNA, degradací mRNA a inhibicí translace.

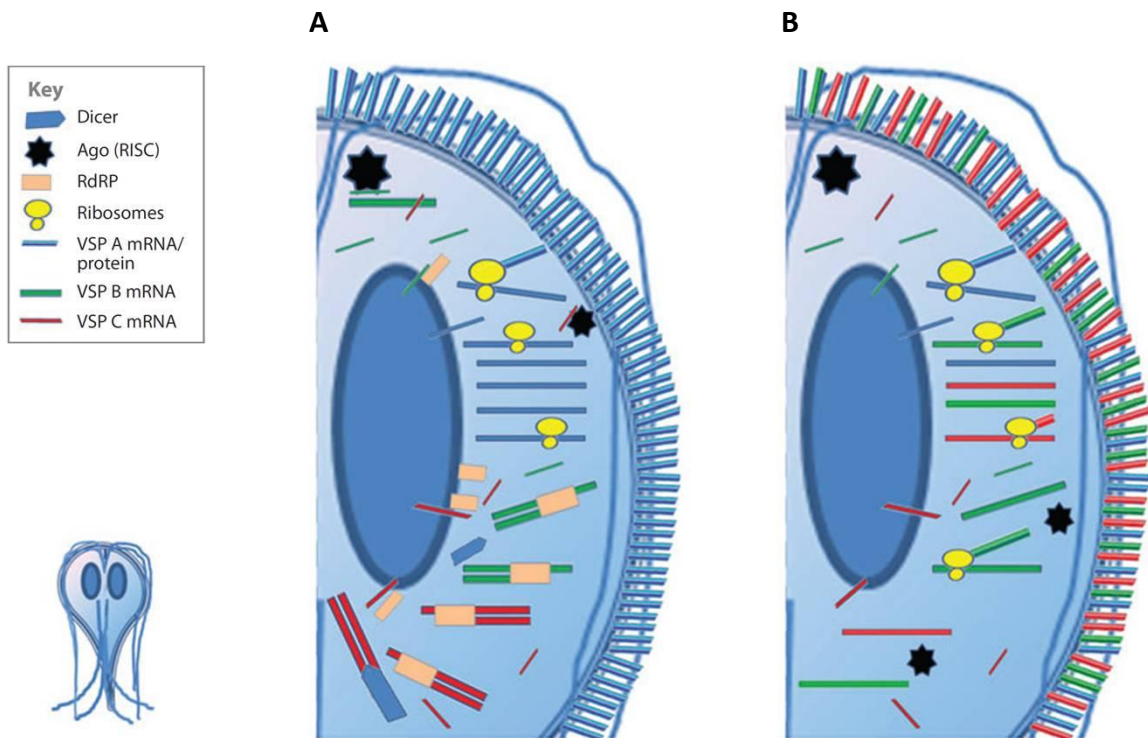
AGO – Argonaut zahrnující však celý RISK komplex
Převzato a upraveno dle (Jinek and Doudna, 2009)

V *G. intestinalis* byly identifikovány homology Diceru (GIDcr) a Argonautu (GIAgo) (Saraiya and Wang, 2008). Homology pro další složky umlčovací dráhy (Drosha, Exportin 5) nebyly v *G. intestinalis* nalezeny. Pro GIDcr byla vyřešena 3D struktura a určeny velikosti naštěpených miRNA v průměru od 25 do 27 nukleotidů (Macrae et al., 2006). Bylo prokázáno, že GIAgo je nezbytný k represi translace (Saraiya and Wang, 2008). Funkční mašinerie RNA interference však nebyla dosud u *G. intestinalis* potvrzena.

Doposud bylo identifikováno 25 teoretických molekul snoRNA v *G. intestinalis* (Niu et al., 1994; Yang et al., 2005). Pět z těchto molekul snoRNA bylo prokázáno jako prekurzory pro miRNA: GlsR17 pro pre-miR2, GlsR16 pro pre-miR3, GlsR2 pro pre-miR5, GIR1 pro pre-miR6 a GlsR8 pro pre-miR10 (Saraiya and Wang, 2008; Li et al., 2011). Velikosti molekul miR2 a miR3 (26 nukleotidů) odpovídají velikosti produktů GIDcr. Vazebné motivy pro miR6 byly identifikovány v 3'UTR u 44 genů pro VSP, na rozdíl od vazebných pro miR10, které byly nalezeny u 159 genů pro VSP. Vazebná místa pro obě miRNA byla nalezena u 33 VSP genů (Obrázek 2). Imunoprecipitací pomocí HA-tagu značeného GIAgo byly izolovány miR6 a miR10, což svědčí o jejich interakci s GIAgo (Li et al., 2012). Tyto poznatky nasvědčují regulaci VSP pomocí miRNA na úrovni inhibice translace.

komplementární vlákna k molekulám RNA, tím dát vzniknout dsRNA, která je substrátem pro RISK komplex (Dykxhoorn et al., 2003). Také ale může vázat uvolněnou jednořetězcovou siRNA z RISK komplexu, dosyntetizovat komplementární vlákno a tak znovuvytvořit siRNA, která může sloužit znovu jako templát pro RISK komplex a vede tedy k amplifikaci umlčovací dráhy (Obrázek 3) (Zhang and Ruvkun, 2012).

Identifikace GIago, GIDcr, RdRP a molekul mRNA pro různé geny VSP ve více homologiích nasvědčují možné regulaci VSP prostřednictvím mechanismu podobného RNA interferenci. Jak již bylo zmíněno, *G. intestinalis* má na svém povrchu vystaven pouze jeden typ VSP proteinu, přestože v cytoplasmě byly identifikovány mRNA i pro ostatní VSP geny. Identifikace molekul siRNA komplementárních k sekvencím genů pro VSP, které nejsou exprimovány na povrchu parazita, inspirovala Dr. Lujana a jeho kolegy k zajímavému *in vitro* pokusu. Postupně k extraktu cytoplasmy *G. intestinalis* přidávali jeden, dva nebo tři různé transkripty VSP genů připravené *in vitro*. Pokud byl přidán jeden VSP transkript, degradace mRNA se neprojevila. V případě přidání dvou či tří VSP transkriptů byly detekovány siRNA, vzniklé jako produkty Diceru. Navíc pokud byl v cytoplasmatickém extraktu přítomen pouze jeden VSP transkript a byly přidány mRNA genů jiných než pro VSP, degradace mRNA nebyla detekována (Prucca and Lujan, 2009). Toto svědčí, že regulace VSP genů post-transkripčním umlčováním je genově specifická (Prucca et al., 2008). Nejzajímavější zjištění přinesl knock-down jednotlivých jednotek RNA interference. Při knock-downu RdRP nebo GIago bylo na povrchu trofozoitů *G. intestinalis* vystaveno více VSP proteinů, což potvrzuje účast těchto proteinů na regulaci exprese a přepínání VSP proteinů na povrchu buňky (Prucca and Lujan, 2009).



Obrázek 3: Schéma mechanismu regulace antigenní variace u *G. intestinalis*

A, Naznačení mechanismu regulace antigenní variace post-transkripčního umlčování genů

B, Narušení regulace VSP knock-downem RdRP, které má za následek expresi více VSP proteinů na povrchu *G. intestinalis* najednou

Převzato a upraveno (Prucca et al., 2011)

3.3 RNA vazebné proteiny – PUF proteiny

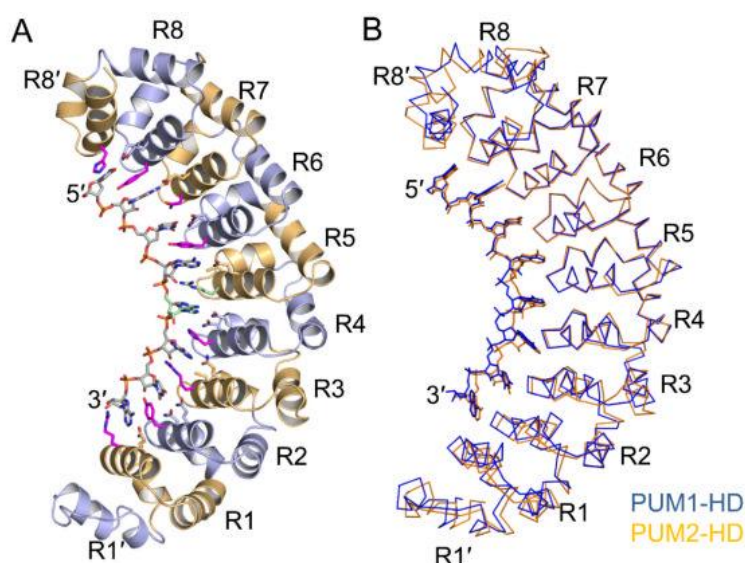
Buněčná regulace je složitý a komplexní proces, při kterém proteiny vázající DNA a RNA hrají významnou roli. U eukaryot se vyskytují stovky druhů RNA a DNA vázajících proteinů. Pro vazbu těchto proteinů je určující vazebný motiv v sekvenci nukleové kyseliny, často se nacházející v oblasti nepřekládaného úseku. Nepřekládané oblasti genů a vazba proteinů hraje úlohu nejen při určení stability samotné molekuly, ale také při regulaci replikace DNA, transkripce, translace a opravách chyb v sekvencích nukleových kyselin (Lunde et al., 2007).

RNA vazebné proteiny rodiny PUF byly pojmenovány po prvně objevených proteinech této malé rodiny – Pumilio protein z *Drosophila melanogaster* a FBF (Fem-3 binding factor) z *Caenorhabditis elegans* (Wharton and Struhl, 1991; Murata and Wharton, 1995; Zhang et al., 1997). PUF proteiny specificky rozpoznávají a váží sekvence v 3' UTR mRNA. Nejznámější rolí těchto proteinů byla pouze post-transkripční represe (Goldstrohm et al., 2006a). Studie však prokázaly u některých organismů podíl PUF proteinů na stabilitě mRNA molekul, regulaci transkripce a translace (Wang et al., 2002) , ale také vliv na cílení mRNA molekul v rámci buňky do jejich místa určení (Saint-Georges et al., 2008; Eliyahu et al., 2010). PUF proteiny byly nalezeny pouze u eukaryot, u bakterií nebyl doposud žádný homolog prokázán.

3.3.1 Pumilio homology domain

Všechny PUF proteiny obsahují v C-koncové sekvenci tzv. Pumilio Homology domain (PH-D) (Zamore et al., 1997). Jedná se o úsek sekvence obsahující osm repetit o průměrné délce 36 aminokyselin, kde každá repetice v sekundární struktuře tvoří jeden alfa helix. Těchto osm helixů tvoří v terciární struktuře typický srpkovitý útvar, do jehož vnitřní strany jsou vázány 3' UTR mRNA (Obrázek 4). Tři aminokyselinové zbytky každého z helixů zprostředkovávají specifickou vazbu k ribonukleotidu v 3'UTR mRNA (Wang et al., 2002; Edwards et al., 2001). Byl nalezen vazebný kód, který definuje vazebná místa proteinu a určuje, který nukleotid bude vázán. Pokud v rámci jedné repetice bude

dvanáctá aminokyselina serin a šestnáctá kyselina glutamová, bude tato repetice v rámci 3'UTR vázat guanin. Obdobně je to pro adenin (cystein/serin, glutamin) a uracil (asparagin, glutamin). Aminokyselina v pozici třináct je zodpovědná za tzv. stacking interakce (Cheong and Hall, 2006; Wang et al., 2002). Přirozený vazebný motiv pro cytosin nebyl dosud identifikován. Přesto se podařilo pomocí náhodné mutagenese vytvořit „umělé“ PUF proteiny schopné této vazby. V pěti experimentálně získaných sekvencích vázajících cytosin se ve dvanáctém aminokyselinovém zbytku vyskytovaly malé aminokyseliny nebo aminokyseliny s nukleofilním postraním řetězcem (glycin, alanin, serin, treonin nebo cystein). V pozici šestnácté aminokyseliny byl vždy arginin (Filipovska et al., 2011).



Obrázek 4: Krystalická struktura lidských PUM1-HD a PUM2-HD s navázanou *p38α* NREa RNA.

A, Stuhlé zobrazení vazebné Pumilio domény lidského PUM2 s navázaným úsekem RNA (UGUAAAUA) molekuly *p38α* NREa. Jednotlivé repetice tvořící alfa helixy jsou zvýrazněny modře a oranžově. V molekule RNA jsou barevně rozlišeny jednotlivé atomy (šedá-uhlík, červená-kyslík, modrá-dusík, oranžová-fosfor).

B, Model složený ze struktur PUM1-HD:*p38α* NREa (modře) and PUM2-HD:*p38α* NREa (oranžová) Převzato a upraveno podle (Lu and Hall, 2011).

3.3.2 Funkce a význam PUF proteinů

PUF proteiny samy o sobě nemají žádné katalytické či enzymatické funkce, ale byla prokázána interakce s jinými proteiny či proteinovými komplexy. Slouží tedy k zprostředkování vazby mezi mRNA a dalšími proteiny. Obecně se PUF proteiny účastní regulace proliferace a diferenciací buněk, regulace oogeneze, spermatogeneze, biogeneze organel a regulace růstu, morfogeneze a funkce nervových buněk. Jejich účinek v regulaci genové exprese je ve většině případů represivní (Tabulka 1). Najdou se však případy, kdy PUF proteiny svou vazbou na mRNA mají aktivační funkci nebo dokonce mohou pomáhat cílit mRNA na jejich místo určení. Hlavní funkcí PUF proteinů je vazba a regulace mRNA, není tedy překvapením, že většina PUF proteinů je lokalizována v cytoplasmě (Ariz et al., 2009; Morris et al., 2008). Výjimkou je např. PUF6 protein z kvasinky *S. cerevisiae*, který je lokalizován v cytoplasmě ale i v jadérku, nebo PUF7 z *T. brucei*, který je výhradně v jadérku (Schumann et al., 2013)

Organismus	PUF protein	mRNA	P	F-ce mRNA
Člověk	Pum1	Cyklin B1	R	Cyklin, BC
		Cyklin E2	?	Cyklin, BC
Cks2		R	Cyklin-dependentní kináza, BC	
SLBP		R	Histon vázající protein, BC	
SDAD1		?	Transport ribozomální podjednotky do cytoplasmy	
VEGF-A		?	Růstový faktor žilního endotelu	
MET		?	Receptor růstového faktoru hepatocytů	
Pum2	CCH1	R	Voltage gated sodium channel, nervová soustava	
	eIF4E	R	Iničiační faktor translace, nervová soustava	
<i>S. cerevisiae</i>	PUF1	HXK1	R	Hexokináza, metabolismus
		TIF1	R	eIF4A, iničiační faktor translace
	PUF2	neznámý	-	-
	PUF3	COX17	R,L	Cytochrom c oxidázová aktivita; mitochondrie
		COX23	R,L	Cytochrom c oxidázová aktivita; mitochondrie
		BSC1	L	Mitochondriální AAA ATPáza
	PUF4	HO	R	Endonukleáza, mating type switching
Jaderné Pr.		R	Faktor biogeneze ribozomů; ribozomální podjednotka	
PUF5	HO	R	Endonukleáze; mating type switching	
	TEC1	R	Transkripční faktor, růst pseudohyř	
	STE7	R	MAP kináza, růst pseudohyř	
	CIN8	R	Kinesinový motor; skládání mitotického tělíska	
	DHH1	R	RNA helikáza; decapping	
	PEX17	L	Biogeneze peroxisomů	
PUF6	ASH1	R	Represor translace, mating type switching	
<i>C. elegans</i>	FBF	Fbf-1	R	PUF protein
		fbf-2	R	PUF protein
		fog-1	R	RNA-binding protein; spermatogeneze
		fem-3	R	Aktivátor ubiquitin ligázy; spermatogeneze
		lip-1	R	MAP kináza
		gld-1	R,A	RNA-binding protein; vstup do meiózy
		egl-4	A	Kináza
<i>D. melanogaster</i>	Pum	Hunchback	R	Transkripční faktor
		biocid	R	Transkripční faktor
		Cyklin B	R	Cyklin
		Para	R	Translační iničiační faktor; nervová soustava
		eIF4E	R	Voltage-gated sodium channel; nervová soustava

Tabulka 1: Přehled PUF proteinů u vybraných modelových organismů a člověka

U každého organismu jsou vypsané dosud objevené PUF proteiny tak, jak byly pojmenovány v původních studiích. U každého proteinu je výčet mRNA, které daný protein váže (mRNA) a funkce proteinu, která mRNA kóduje (F-ce mRNA). Sloupec (P) zachycuje vliv působení PUF v proteinu v regulaci genové exprese: (R) represivní účinek, (A) aktivační účinek, (L) lokalizace mRNA, (?) dosud nebylo objasněno. Převzato a upraveno (Quenault et al., 2011)

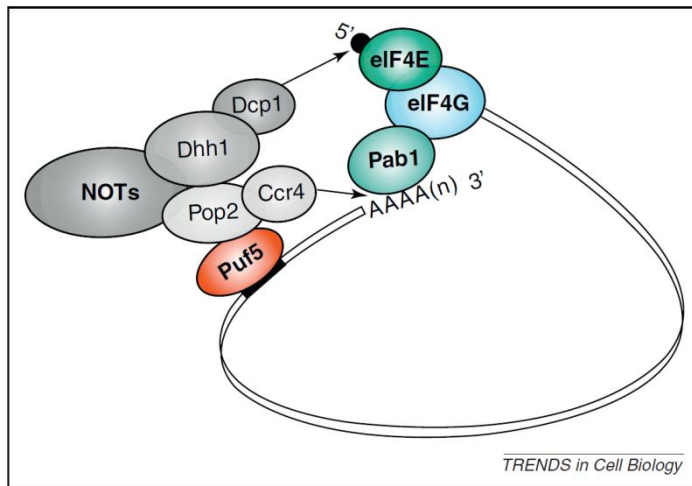
- **Represe mRNA pomocí PUF proteinů**

Represivní funkce PUF proteinů jsou rozdílné u různých organismů a také v závislosti na interagujících partnerech. Mezi společné mechanismy represe pomocí PUF proteinů patří působení na 5'čepičku, které způsobuje inhibici translace. Druhý obecný mechanismus je interakce s deadenylačním komplexem, navedení jej na 3'UTR ve které je PUF navázán a způsobení degradace mRNA odstraněním polyA konce.

První popsána represe vlivem PUF proteinu bylo právě odstranění polyA konce mRNA u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Až později byl princip represe u tohoto PUF proteinu rozšířen o inhibiční působení také na 5'UTR mRNA. Kvasinkový PUF5 se váže na specifickou sekvenci do 3'UTR mRNA. Zároveň však obsahuje vazebné místo pro Pop2 protein, který je součástí deadenylačního komplexu Ccr4p-Pop2p-Not, který odbourává polyA konec molekuly mRNA. S deadenylačním komplexem interagují tzv. decapping faktory (Dhh1 a Dcp1), které odstraňují z 5'UTR metylguanositovou čepičku. Protein Dhh1 navíc působí jako inhibitor translace. Vznik smyčky, v rámci které jsou oba konce molekuly mRNA blízko u sebe, umožňuje odbourání translačních modifikací na obou nepřekládaných koncích mRNA vlivem vazby PUF5 proteinu (Obrázek 5). Interakce kvasinkového PUF5 proteinu s Pop2 proteinem reguluje stabilitu mRNA odbouráním polyA konce, ale také zprostředkovává inhibici translace dané mRNA odstraněním 5'čepičky a vazbou inhibitoru translace (Goldstrohm et al., 2006b; Collier and Parker, 2005). V principu téměř identicky probíhá inhibice tzv. *hunchback* mRNA vázané Pumilio proteinem v *D. melanogaster*, který opět interaguje s deadenylačním komplexem způsobujícím deadenylaci, ale také s inhibitorem iniciace translace d4Ehp (Wreden et al., 1997; Cho et al., 2006).

Interakce s podjednotkou Pop2p deadenylačního komplexu Ccr4p-Pop2p-NOT byla popsána také například u lidského PUM1 (Goldstrohm et al., 2006b), Pumilio proteinu z *D. melanogaster* (Kadyrova et al., 2007) a FBF proteinu z *C. elegans*.

Důkazem, že vazebný motiv PUF proteinů je konzervovaný u eukaryot, svědčí pokus, kdy po vložení FBF proteinu do kvasinky *S. cerevisiae*, dokázal tento protein interagovat s kvasinkovým deadenylačním proteinem (Chritton and Wickens, 2010).



Obrázek 5: Schéma represivního účinku PUF5 proteinu z *S. cerevisiae*
Převzato a upraveno (Quenault et al., 2011)

- **Aktivace mRNA pomocí PUF proteinů**

Pozitivní regulace mRNA molekul vlivem PUF proteinů byla objevena teprve nedávno a mechanismus jejího působení není ještě zcela objasněn. Jedním z příkladů je již zmiňovaný FBF protein v *C. elegans*, který váže mRNA genu *gld-1*. Vazbou k podjednotce deadenylačního komplexu aktivuje deadenylaci, potažmo degradaci mRNA. Navíc také tento protein interaguje s cytoplasmickou polyA polymerázou GLD-2/GLD-3. Ta je zodpovědná za post-transkripční přidávání adenylových zbytků ke 3'konci molekuly mRNA, čímž vzniká polyA konec stabilizující molekulu mRNA. FBF protein svou vazbou do 3'UTR genu je pravděpodobně zprostředkovatelem vazby GLD-2/GLD-3 polyA polymerázy k mRNA, která má být adenylována. Nejspíše také slouží jako aktivátor pro polymerázu (Suh et al., 2009).

Další ze zástupců aktivátorů je PUF9 v *Trypanosoma brucei* (TbPUF9). Nejvíce produktů mRNA vázaných TbPUF9 proteinem se podílejí na zrání a oddělení (segregaci) kinetoplastů po rozdělení buněk. Hladina produktů mRNA vázaných TbPUF9 se v průběhu BC mění. Nejvíce produktů bylo detekováno v S fázi BC. Příkladem vazebných mRNA TbPUF9 proteinu jsou LIGKA (Kinetoplast DNA ligase alfa), PNT1 a PNT2, které byly izolovány afinitní purifikací TAP-tagovaným TbPUF9. LIGKA ligáza a PNT1 se obecně účastní regulace kinetoplastové DNA. Konkrétní funkce PNT2 proteinu nebyla dosud

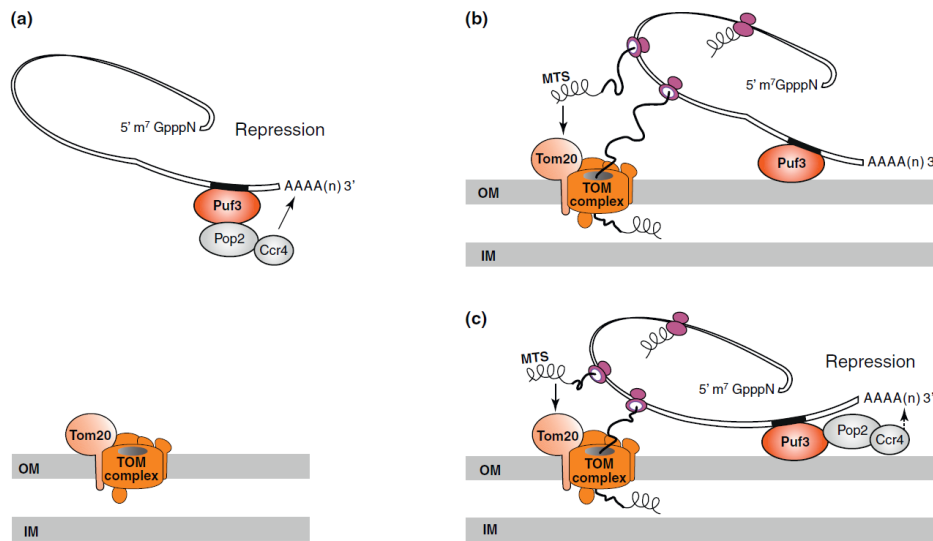
objasněna, vyskytuje se v průběhu G1 fáze v jádře a v průběhu mitózy je přesunut do dělicího vřeténka. Pokud byla spuštěna RNA interference pro TbPUF9, buňky zastavily buněčný cyklus v G2/M fázi. Navíc mRNA vazebné molekuly pro TbPUF9 byly destabilizovány, což prokazuje, že TbPUF9 stabilizuje mRNA. Avšak, bodová mutace ve vazebném motivu PUF9 proteinu vedla ke stabilizaci mRNA. Pravděpodobným vysvětlením je, že PUF9 kompetuje o vazebné místo v 3'UTR s dosud neidentifikovaným inhibítorem. Vzhledem ke stabilizaci mRNA po mutaci v motivu, není vyloučeno, že tím inhibítorem může být jiný PUF protein (Archer et al., 2009).

- **Lokalizace mRNA**

Cílení mRNA vázaných PUF proteiny je novinkou posledních pár let a jeho mechanismy jsou objasněny velmi málo a jen u několika známých PUF proteinů. Prozatím asi nejvíce prozkoumaný mechanismus cílení mRNA účinkem PUF proteinu je u kvasinkového PUF3 proteinu.

Kvasinkový PUF3 protein váže mRNA, které kódují mitochondriální proteiny (Gerber et al., 2004a). Pravděpodobně se v kvasince vyskytují dva typy PUF3 proteinu. První typ je lokalizován volně v cytoplasmě a působí na navázané mRNA represivně – inhibicí translace a deadenylací 3'UTR opět interakcí s deadenylačním komplexem Ccr4p-Pop2p-NOT (Lee et al., 2010; Jackson, Jr. et al., 2004). Druhý PUF3 interaguje s proteiny vnější membrány mitochondrie a aktivně reguluje vázané mRNA. Více pravděpodobný se však ukazuje mechanismus, kdy je potlačen inhibiční vliv PUF3 proteinu vlivem vazby na proteiny vnější membrány mitochondrie (Garcia-Rodriguez et al., 2007) Transport proteinů do mitochondrie začíná ko-translačním navázáním sekvence na ribozomu nově vznikajícího proteinu komplexem TOM (translocase of outer mitochondrial membrane). Za rozpoznání a vazbu sekvence cílené do mitochondrie je zodpovědný transmembránový protein Tom20 (část komplexu TOM). Právě s tímto receptorem a s dalším proteinem z vnější membrány mitochondrie – Mdm12 (Berger et al., 1997), interaguje PUF3 protein (Saint-Georges et al., 2008). PUF3 protein svou vazbou k mRNA, jejíž produkt je cílen do mitochondrie, pomáhá stabilizovat tuto molekulu pro

ko-translační transport do mitochondrie. Alternativní teorie zastává názor, že PUF3 protein může zároveň také částečně inhibovat translaci mRNA, které váže, čímž zajistí vyvážení rychlosti translace mRNA a transportu vznikajícího proteinu do mitochondrie (Obrázek 6) (Garcia-Rodriguez et al., 2007).



Obrázek 6: Alternativní model pro lokalizaci mRNA do mitochondrie vlivem PUF3 proteinu.

a, Inhibiční vliv PUF3 proteinu na mRNA bez vazby na TOM20 ve vnější membráně mitochondrie

b, Stabilizace mRNA kotranslačně transportované do mitochondrie zprostředkovaná PUF3 proteinem

c, alternativní model ko-translačního transportu proteinu do mitosomu stabilizovaný PUF3 proteinem, ale zároveň inhibovaná translace pro udržení rovnováhy mezi překladem a transportem.

Převzato a upraveno (Quenault et al., 2011).

4. Materiál a metody

4.1 Bioinformatické studie

- Veškeré geny byly vyhledávány v genomu *G. intestinalis* v databázi GiardiaDB (www.giardadb.org).
- Potvrzení GiPUF proteinů a jejich vazebných domén bylo provedeno programem BLAST-Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990).
- Vazebný motiv GiPUF4 proteinu byl určen ručním vyhledáním z alignmentů.
- K vytvoření vazebného motivu GiPUF4 byl použit online program MEME-Multiple Em for Motif Elicitation (Bailey and Elkan, 1994).
- K vyhledání genů obsahujících vazebné místo pro GiPUF4 protein byl použit online program MAST-Motif Alignment & Search Tool (Bailey and Gribskov, 1998)
- Veškeré 3' nepřekládané oblasti z genomu *G. intestinalis* byly získány z online databáze GiardiaDB (www.giardadb.org).
- K tvorbě alignmentů byl použit program BioEdit s implementovaným ClustalW (Hall, 1999; Larkin et al., 2007).

4.2 Použité organismy a média

4.2.1 *Giardia intestinalis*

Ve všech pokusech byli použiti trofozoiti *G. intestinalis* kmene WB (ATCC 30957), jejichž axenická kultura byla kultivována při 37 °C v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s přidaným 10% hovězím sérem (Gibco). Po transfekci byly buňky kultivovány se selekčním antibiotikem – puromycinem (PAA laboratories) o koncentraci 54 µg/ml.

4.2.2 *Escherichia coli*

K namnožení námi vytvořených plazmidů byly využity bakterie *E. coli* kmene XL-1 blue. Transformace buněk byla provedena teplotním šokem (42 °C, 30 sekund). Buňky byly kultivovány v LB médiu při teplotě 37°C se selekčním antibiotikem – ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml.

4.3 Amplifikace a klonování genů

4.3.1 Amplifikace genů

Pro amplifikaci genů byla použita metoda PCR (Polymerase Chain Reaction). Jako templátová DNA posloužila genomová DNA získaná z axenických kultur *G. intestinalis* pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Jednotlivé primery byly navrženy ze sekvencí získaných z genomu *G. intestinalis* (Tabulka 2).

Tabulka 2. Přehled použitých primerů

GL50803_14117 (GiPUF1)		Restrikční místo
Forward	<i>TGCACATATGTCTGTTGATCTCCCG</i>	<i>NdeI</i>
Reverse	<i>CATGCCTGCAGGGCCTTTCTGCGCCTTCTA</i>	SbfIRnoSTOP-1báze

GL50803_17262 (GiPUF2)		Restrikční místo
Forward	<i>CTGACATATGTTCCACCGATAGTCCA</i>	<i>NdeI</i>
Reverse	<i>CTAGCTGCAGACAGAAAAAGGGAAGTGC</i>	PstIRnoSTOP

GL50803_17590 (GiPUF3)		Restrikční místo
Forward	<i>CATGCATATGGTGCTGCAACTAATG</i>	<i>NdeI</i>
Reverse	<i>CATGCCTGCAGGATAGCGTCCGAGCAGCCC</i>	SbfIRnoSTOP-1báze

GL50803_17325 (GiPUF4)		Restrikční místo
Forward	<i>CATGATTAATACACTTTTACCGAAGCAT</i>	<i>Asel</i>
Reverse	<i>CATGCCTGCAGGCTGGATTGTGTGAATTT</i>	SbfI(-1báze)

GL50803_4548 (GiPUF5)		Restrikční místo
Forward	<i>AGGCTGAAAATTAACATATGAGGCATATGGACGATGCCGA</i>	<i>NdeI</i>
Reverse	<i>AACATCGTATGGTACTGCAGTGCACAGAAAACCCACGAGC</i>	<i>PstI</i>

GL50803_137618 (3'UTR VSP)		Restrikční místo
-----------------------------------	--	------------------

Forward	CATG GGGCC CTAGGATGTACACTTAGGTAGT	Apal
rEVERSE	CTAG GGGAT CCCAAACCCGGGGGCCAGCGTAT	BamHI

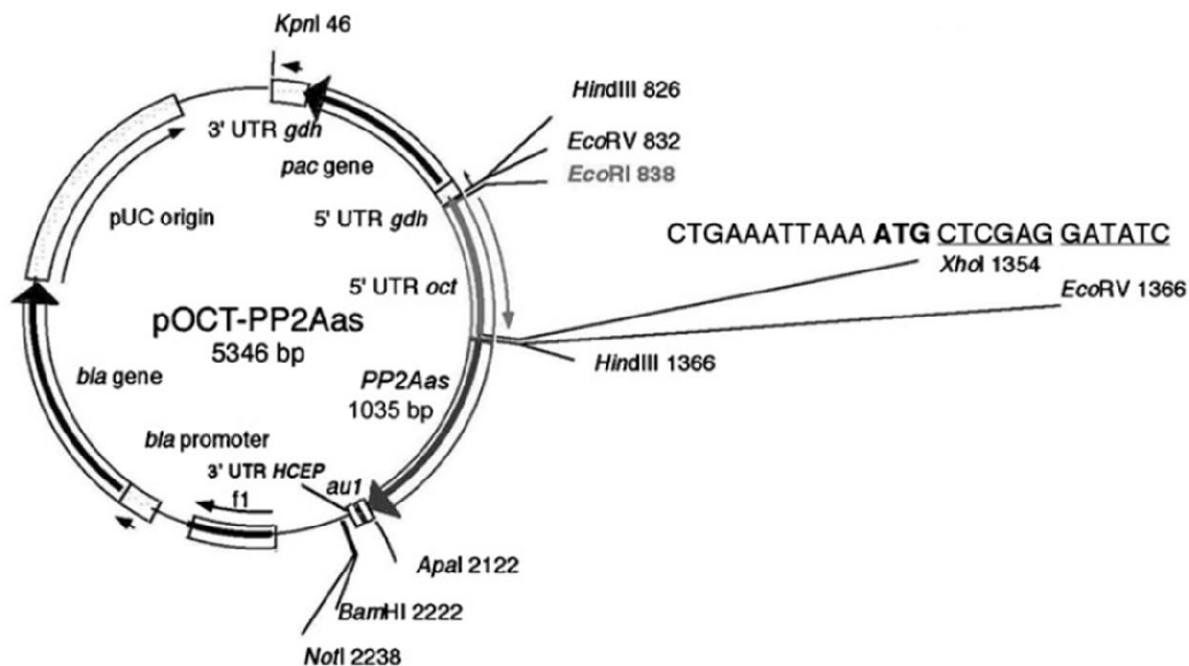
4.3.2 Klonování genů

Pozitivita produktů PCR byla ověřena v 1% agarózovém gelu horizontální gelovou elektroforézou. Ke zviditelnění jednotlivých bandů bylo do gelu přidáno barvivo 25 Syber Safe (Invitrogen). Pro získání DNA z gelu byl použit Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche). Jednotlivé fragmenty i plazmid byly štěpeny příslušnými restrikčními endonukleázami v odpovídajícím pufru přes noc nebo v pufru Fast Digest (Fermentas) 30 min při teplotě 37 °C. Rozštěpené fragmenty byly přečištěny dle návodu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) a Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche). Plazmidy a jednotlivé geny byly namíchány do ligační reakce s T4 DNA ligázou (Fermentas) dle uvedeného protokolu. Vyjímkou byl gen GL50803_4548 (GiPUF5), který pro přítomnost restrikčních míst ve svém čtecím rámci musel být klonován pomocí in fusion kitu (GENEART® kit, Invitrogen). Připravené produkty byly tepelným šokem (42 °C, 30s) transfekovány do bakterií *E. coli* a rozetřeny na připravené agarové plotny.

Narostlé bakteriální kolonie byly resuspendovány v 10 µl vody. Část (5 µl) byla rozrušena střídáním teplot (tzv. crack) a následně posloužila jako templát pro kontrolní PCR k ověření úspěšného zaklonování DNA do plazmidu. Pozitivní kolonie (5 µl) byly nasazeny do 10 ml LB média, kultivovány přes noc při 37 °C a pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) z nich byl izolován plazmid. Produkt byl ověřen kontrolní restrikcí a sekvenací. Pozitivní klony byly nasazeny do 100 ml LB média s příslušným selekčním antibiotikem. Po dvanácti hodinách z nich byl izolován plazmid pomocí kitu Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Koncentrace DNA vzorků byla změřena na přístroji NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer.

4.3.3 Použité plazmidy

Pro expresi proteinů v *G. intestinalis* byl použit plazmid pOCT-HA, který byl získán modifikací plazmidu pOCT-PP2Aas (Obrázek 7) (Lauwaet et al., 2007). Původní velice silný promotor genu *oct* byl ponechán, na C-konec byl navíc vložen dvojitý hemaglutininový tag (HA-tag). Tento plazmid mi poskytl Mgr. Luboš Voleman.



Obrázek 7. Plazmid pOCT-PP2Aas s naznačenými restričními místy. Převzato z (Lauwaet et al., 2007).

Promotor *oct* (ornitin-karbamoyl transferáza) byl zaklonován do 5' konce plasmidu přes restriční místa EcoRV a NdeI, která byla vytvořena namísto původních XhoI a HindIII. Při klonování genů pro GiPUF proteiny byla v 3' konci ponechána 3' oblast highly conserved eukaryotic protein (HCEP). Při pokusech s VSP, byl do místa HCEP zaklonována 3' UTR VSP přes restriční místa Apal a BamHI.

4.4 Transfekce a kultivace trofozoitů *G. intestinalis*

- Transfekce trofozoitů byla provedena dle následujícího protokolu:
 - vylít médium i s mrtvými buňkami, do zkumavky přilít ledový sterilní PBS
 - chladit 5 minut na ledu případně v mrazáku
 - kultivační lahvi silně zatřást, aby se buňky pustily stěn
 - stočit ve falkonách 10 minut při 4°C a otáčkách 1000 x g
 - odsát supernatant a k peletu přidat sterilní médium TYI-S-33
 - stočit za stejných podmínek
 - pelet resuspendovat v malém množství sterilního média TYI-S-33
 - spočítat buňky a doředit na koncentraci $3,33 \times 10^7$ buněk/ml
 - buněčnou suspenzi protáhnout přes G23 jehlu
 - převést 300 μ l buněčné suspenze do 0,4cm-gap elektroporační kyvety a dát na led
 - přidat 50 μ g plasmidu a promýchat špičkou pipetmanu
 - inkubovat 15 minut na ledu
 - elektroporovat protokolem:
 - exponenciálním: 350V, 1500 μ F, 750 Ω
 - time constant: 350 V, 175 ms
 - dát kyvetu zpátky na led a inkubovat 15 minut
 - přenést roztok z kyvety do 7 ml zkumavky s médiem TYI-S-33
 - po 24 hodinám vyměnit médium za nové a přidat 6 μ g/ml antibiotika
 - médium měnit po 24 hodinách po dobu 4 dnů
 - po dobu jednoho až dvou týdnů měnit médium po 48 hodinách
 - po dvou až třech týdnech je stabilně rostoucí kultura připravena k dalším pokusům

- Kultivace *G. intestinalis*

Axenické kultury *G. intestinalis* byly pěstovány ve zkumavkách o objemu 7 ml nebo 14 ml, při teplotě 37 °C ve stojácích v poloze ležmo. V průměru jednou za dva až tři dny, kdy byly kultury dostatečně narostlé, byly přeočkovány. Ze zkumavek se skleněnou pasturovou pipetou byl odsán ze dna kal mrtvých buněk a zkumavka byla inkubována na ledu po dobu 15 minut, aby se buňky pustily stěn. Následně bylo opět skleněnou pasturovou pipetou odebráno malé množství z narostlé kultury a sterilně přeneseno do zkumavky s novým TYI-S-33 médiem. Nakonec bylo přidáno selekční antibiotikum.

Pokud nebyly kultury dostatečně narostlé, pouze se obměnilo médium v té samé zkumavce a opětovně bylo přidáno selekční antibiotikum.

4.5 Příprava preparátů

Všechny preparáty byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81 s využitím programu Cell[^]R imaging. Fotky byly pořízeny digitální kamerou Hamamatsu Orca-AG.

- Fixace preparátů metanol-acetonem

Kultury narostlé na fixaci byly nejprve 20 minut na ledu, aby se trofozoiti pustili stěn, následně byly pomocí injekční stříkačky přeneseny do anaerobní komůrky a inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C. Buňky přichycené na sklíčka byly fixovány ledovým metanolem po dobu 5 minut a projasňovány 5 minut v ledovém acetonu. Předpřipravené preparáty se nechaly zaschnout a uložily do lednice nebo se rovnou inkubovaly s protilátkami.

Veškerá práce s preparáty a jejich inkubace byla prováděna ve vlhké komůrce dle následujícího protokolu:

- zafixované buňky na sklíčku hodinu blokovat v blokovacím roztoku
- hodinu inkubovat s primárními protilátkami rozpuštěnými v blokovacím roztoku
- třikrát promývat 10 minut v PBS
- třicet minut až jednu hodinu inkubovat se sekundární protilátkou rozpuštěnou v blokovacím roztoku
- třikrát promýt v PBS
- montovat pomocí VectaShield s DAPI (Vector laboratories)

Složení blokovacího roztoku:

0,25 % želatina (Sigma)

0,25 % BSA (Bovine Serum Albumin, hovězí sérový albumin) (Sigma)

0,05 % Tween[®]20 (Sigma)

- Fixace preparátů formaldehydem

K buňkám do zkumavky byl přidán formaldehyd ve výsledné koncentraci 1%. Po 30 minutách fixace při 37 °C byly buňky stočeny 5 minut při 900 × g. Supernatant byl odstraněn a pelet rozpuštěn v příslušném objemu pufru PEM (150μl buněk na sklíčko). Na krycí sklíčka bylo nanášeno 10μl polylysinu a vzájemným třením dvou krycích sklíček o sebe byl rozmazán až do „barvy duhy“. Takto připravená sklíčka byla uložena na dna šestijamkové destičky, stranou s polylysinem vzhůru. Pasterovou pipetou byl nanášen vzorek rozpuštěný v PEM pufru. Buňky se nechaly 15 minut přisednout.

Přebytek buněk byl odsán a byl přidán 1 ml 0,1% tritonu TX-100 v 1×PEM pufru. Buňky se nechaly 15 minut permeabilizovat. Následně byly třikrát promyty PEM pufrům, vždy po dobu 30 s, a blokovány v 0,5 ml roztoku PEMBALG po dobu 30 minut. Po blokování byla sklíčka inkubována s primární protilátkou rozpuštěnou v roztoku PEMBALG přes noc. Druhý den byla třikrát promyta pufrům PEM v časových intervalech 5, 10 a 15 minut. Se sekundární protilátkou rozpuštěnou v roztoku PEMBALG byla inkubována 1 hodinu a následně opět třikrát promyta po časových úsecích 5, 10 a 15 minut. Sklíčko bylo montováno balzámem VectaShield s DAPI (Vector laboratories). Přehled použitých protilátek shrnut v tabulkách 3 a 4.

Složení roztoků:

2×PEM pufr:

30,2 g PIPES (200 mM)

2 ml z 0,5 M roztoku EGTA (etylen glykol tetraoctová kyselina) (2mM)

100μl z 1M roztoku MgSO₄ (0,2mM)

do 500 ml dH₂O

pH 6,9

Roztok musí být sterilní (vyklávan)

PEMBALG:

200 ml 1×PEM pufru

2 g BSA (1%)

0,2 g NaN₃ (0,1%)

3,6 g lysinu (100 mM)

1 g želatiny (0,5%), (Sigma)

10% formaldehyd:

2,5 g paraformaldehydu (trimer formaldehydu)

25 ml dH₂O

100 µl 5M KOH

Vložit na 5 minut do horké lázně (90 °C)

Použité protilátky:**Tabulka 3. Primární protilátky**

Protilátka	Zvíře	Ředění	Firma
anti-HA tag	Krysa	1:1000	Roche
anti-Tom40	Králík	1:1000	Vlastní produkce
anti-KDEL	Myš	1:1000	Abcam
anti-PeptX	Králík	1:2000	Vlastní produkce
anti-Sec20	Králík	1:1000	Vlastní produkce

Tabulka 4. Sekundární protilátky

Protilátka	Konjugována s	Ředění	Firma
anti-kryší	Alexa®fluor 488	1:1000	Invitrogen
anti-králičí	Alexa®fluor 594	1:1000	Invitrogen
anti-myší	Alexa®fluor 594	1:1000	Invitrogen

4.6 Frakcionace (příprava high speed peletu)

Narostlá kultura buněk byla stočena 10 minut při 4 °C na 1000 × g. Pelet byl resuspendován v 5 ml ST pufru a znovu stočen. Poté byl pelet znovu resuspendován do 5 ml ST pufru. Byly přidány inhibitory proteáz TLCK (N-Tosyl-L-lysin Chlorometylketon) o koncentraci 50 µg/ml a Leupeptin o koncentraci 10 µg/ml a následně byly buňky sonikovány 1 minutu při amplitudě 40 a dobou pulzu 1 sekunda. Sonikace byla opakována, dokud nebyly buňky zcela lyzovány. To bylo průběžně kontrolováno mikroskopicky odběrem malého množství suspenze. V této fázi bylo odebráno 0,5 ml lyzátu pro následnou analýzu. Zbytek suspenze byl stočen na centrifuze po dobu 20 minut, při teplotě 4 °C, při otáčkách 1000 × g. Získaný lyzát byl centrifugován při otáčkách 180 000 × g, teplotě 4 °C, po dobu 30 minut. Výsledný supernatant odpovídal cytoplasmatické frakci. Pelet obsahující buněčné organely jako např. endoplasmatické retikulum a mitosomy (high speed pellet) byl rozpuštěn v 0,5 ml ST pufru s přidávanými inhibitory proteáz. K alikvotu každé frakce byl přidán vzorkový pufr pro SDS-page a vzorky byly inkubovány 5 minut při teplotě 95 °C. Zbylé části frakcí byly zamrazeny v -80 °C.

Pozitivita denaturovaných frakcí byla ověřena rozdělením proteinů v 10 % SDS PAGE gelu vertikální gelovou elektroforézou, následným „přebílením“ na nitrocelulosovou membránu a imunoznačením.

Složení ST pufru:

Chemikálie	Molarita	Navážka	Navážka (g)	Navážka (g)
Sacharosa	250 mM	8,56 g	42,8 g	128,4 g
Tris	10 mM	0,121 g	0,605 g	1,21 g
KCl	0,5 mM	3,73 g	18,65 g	55,95 g
dH ₂ O		Na 100 ml	Na 500 ml	Na 1 500 ml

4.7 Příprava cDNA *G. intestinalis*

Zkumavka s narostlou kulturou *G. intestinalis* kmene WB byla dána 20 minut na led, aby se buňky pustily stěn. Stočením 15 minut na 1 200 × g byly buňky koncentrovány a připraveny na izolaci celkové RNA pomocí kitu NucleoSpin RNAII (Clontech) dle přiloženého návodu.

Zbytková kontaminace gDNA byla z celkové RNA odstraněna pomocí přidání DNásy I (Fermentas). Do zkumavky ošetřené proti ribonukleázám byla namíchána reakční směs do celkového objemu 20 µl: 15 µl celkové RNA (koncentrace 1 µg/ µl)

2 µl reakčního pufru

1 µl DNásy I

2 µl RNA vody

Namíchaná směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Během působení enzymu byly rozštěpeny všechny molekuly genomové DNA, které v celkové RNA zůstaly jako zbytková kontaminace. Pro ukončení reakce byl do reakční směsi přidán 1 µl 0,5 M EDTA a roztok inkubován po dobu 10 minut při teplotě 65 °C.

Příprava cDNA byla proveden dle kitu SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). Do zkumavky ošetřené proti ribonukleázám byla namíchána reakční směs do celkového objemu 40 µl: 20 µl očištěné RNA

2 µl oligo dT primerů

2 µl 10 mM směsi nukleotidů (dATP, DTP, dCTP a dTTP)

16 µl dH₂O

Směs byla inkubována 5 minut při teplotě 65 °C a poté 1 minutu na ledu. Směs byla lehce stočena a bylo k ní přidáno: 4 µl 5 × First-Strand pufru

1 µl 0,1 M DTT

1 µl inhibitoru RNás (RNasin)

1 µl Super Script II Reverzní transkriptázy (200 U/ µl)

Vzorek byl lehce promíchán pipetmanem a inkubován 60 minut při teplotě 50 °C. Reakce byla inaktivována inkubací v 70 °C po dobu 15 minut.

Složení 10 × reakčního pufru:

100 mM Tris-HCl (pH 7,5 při 25 °C)

25 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

Složení 5 × First-Strand pufru:

250 mM Tris-HCl (pH 8,3 při pokojové teplotě)

375 mM KCl₂

15 mM MgCl₂

4.8 Nativní izolace HA-tagem značeného proteinu pomocí

Dynabeads

4.8.1 Příprava Dynabeads s protilátkou

Na jednu izolaci proteinu bylo zapotřebí 5 mg Dynabeads (Invitrogen). Navazování myší monoklonální anti-HA tag protilátky na Dynabeads bylo prováděno podle přiloženého protokolu Dynabeads Coupling Kit (Invitrogen). Namísto inkubace kuliček s protilátkou přes noc v 37 °C, byly inkubovány hodinu při pokojové teplotě a následně 32-48 hodin při teplotě 4 °C.

4.8.2 Izolace proteinu

Narostlá kultura *G. intestinalis* byla stočena 10 minut, na 1000 × g, při 4 °C. Pelet byl resuspendován v ST pufru a buňky byly znovu stočeny. Stočené buňky byly resuspendovány v pufru B. Buňky byly rozbity skleněnými kuličkami s použitím přístroje MiniBeadBeater Bead Homogenizer. Dle přiloženého návodu byly zvoleny otáčky 4 800 ×g, opakovaně třikrát po dobu jedné minuty. Po dostatečném rozbití buněk, které bylo kontrolováno mikroskopicky, byl lyzát stočen na 2 680 × g, po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Takto byly odstraněny neporušené buňky, bičíky, jádra a zůstala nám především cytoplazma a organely.

Z peletu rozpuštěného v pufru B jsme odebrali 20 µl jako pozitivní kontrolu. Koncentrace proteinu byla změřena pomocí kitu Biorad Assay Kit dle přiloženého návodu. Vzorek byl naředěn v pufru B na výslednou koncentraci 1,5 mg/ml a smíchán s Dynabeads s navázanou anti-HA tag protilátkou. Hodinu byl inkubován při pokojové teplotě, poté přes noc při teplotě 4 °C za stálého promíchávání.

Použitím magnetu byly Dynabeads odděleny od roztoku obsahujícího cytoplasmu a buněčné organely a 200 µl tohoto roztoku bylo odebráno jako tzv. flow-through (FT). Uvolněné kuličky byly resuspendovány v 1 ml pufru C a čtyřikrát promyty puftrem C. Protein byl z kuliček uvolněn přidáním 20 µl 0,2 M glycinu o pH 2,6 a inkubací 5 minut na ledu. V průběhu eluce bylo se vzorkem třikrát promícháno. Roztok s vyizolovaným

proteinem (P4) byl přenesen do čisté zkumavky a neutralizován přidáním Tris acetátu o pH 7,4. Zbylé Dynabeads byly promyty 1 ml pufr C a zbytek proteinu byl z kuliček uvolněn přidáním 20 μ l vzorkového pufru pro SDS-PAGE a inkubováním 7 minut při teplotě 95 °C (K).

Alikvoty postupně odebíraných vzorků (A0, FT, P4 a K) byly detekovány na přítomnost proteinu pomocí western blotu.

Použité roztoky:

Pufř A:

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

140 mM KCl

1,8 mM MgCl₂

0,1 % Nonidet P-40

Pufř B: do pufru A přidat:

0,5 mM DTT (dithiothreitol)

2 μ l/ml leupeptin (50 μ l/ml)

2 μ l/ml TLCK (10 μ l/ml)

Pufř C:

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

140 mM KCl

1,8 mM MgCl₂

0,5 mM DTT (dithiothreitol)

0,01 % Nonidet P-40

Pufř A, B a C byly převzaty a upraveny dle (Gerber et al., 2004b).

5. Výsledky

5.1 Analýzy PUF proteinů u *G. intestinalis*

V genomu *G. intestinalis* bylo pomocí programu BLAST (Altschul et al., 1990) nalezeno pět RNA vazebných proteinů z rodiny Pumilio. Dva byly automaticky anotované jako Pumilio, tři jako hypotetické proteiny. Pro přehlednější práci byly jednotlivé geny pojmenovány GiPUF1 až GiPUF5 (Tabulka4).

Tabulka 4: Přehled GiPUF proteinů nalezených v genomu *G. intestinalis*

Jméno genu	Číslo genu	Produkt	Velikost (Da)
GiPUF 1	GL50803_14117	Hypotetický	80357
GiPUF 2	GL50803_17262	Hypotetický	55584
GiPUF 3	GL50803_17590	Hypotetický	68177
GiPUF 4	GL50803_17325	Pumilio protein	72508
GiPUF 5	GL50803_4548	Pumilio protein	75403

Pomocí metody BLAST byly u všech pěti GiPUF proteinů na C-konci proteinové sekvence nalezeny vazebné domény - Pumilio Homology domain (PH-D), jejichž přítomnost je základním znakem PUF proteinů (Obrázek 8). V rámci každé domény se vyskytuje osm repetic. Jedna repetice tvoří v sekundární struktuře α -helix, který specificky váže ribonukleotid v 3'UTR v mRNA. Pokud tedy má PUF protein kompletní PH-D, tvoří dohromady osm α -helixů, které rozpoznávají a váží osm bází v 3'UTR v mRNA. V sekvenci GiPUF1 proteinu jsme identifikovali dvě vazebná místa, v GiPUF2 a GiPUF5 proteinech čtyři, GiPUF3 obsahuje pět vazebných míst a GiPUF4 protein osm (Obrázek 9). Je možné, že nejen GiPUF4, ale ostatní GiPUF proteiny obsahují více vazebných míst, které zatím jen neumíme predikovat. V sekvenci GiPUF2 proteinu jsme navíc identifikovali teoretické vazebné místo pro cytosin, pokud ho uznáme jako funkční, obsahuje GiPUF2 protein celkem pět vazebných míst. Tyto domény jsou vysoce konzervované napříč celou eukaryotickou říší (Valley et al., 2012). Zejména množství isoform u jednotlivých

organismů neumožňuje provedení zevrubné fylogenetické analýzy, proto v této práci byly proteiny porovnávány v alignmentech a to pouze jejich C-koncové sekvence. Takto byly identifikovány od různých organismů sdílející téměř identické vazebné motivy avšak s rozdílnou funkcí a vazebnými mRNA partnery.

A

```

MTLLPKHSLCVMNVQGSRRKDGDSVVWQGYDPGPQVWCERQTPILPPGLTRQNGAFLGDGRINQCEELEAIPRIGVS
CDGELQFNDSARLTPIEQTPHTFKLATPPFCYNSVPYSSPMIQSSGVDYSEPHQPAHVQRDPIPCGANGVLPALPY
PVDTNNGFTPLCTNPPLHPALISYIPIATPTS YEAPHLSPILSPPAPMALDITYKFPSEVFPYMQDTPVHAPHVLPYSLD
ADTDRTSCCSSPIFGMQSPVPTRSATCSVDLSQTTTPQRITTMRPCPLSFTLTHSALS DTHNSTTTVFSNEPIAPQPDLP

TNDYERK/LVLSFKKEPTGCKILQQLADFPDKSRYLLDVFAEYSTPS/LMESLLIHPSGNYCFQKIIESSDASQRLR

ILLLIQD/SLFDICQNLHGTRSIQKLFERVSSDEEKAIIAQQLGAGD/RIIKLIVDINGNHCVQRCIETFAPKDCTFI

YDQIIR/ELVLVGTQHGGCCIIQRCLDLCEAQRVQIVTAIKN/HVMELIVDRFGNYVFGYSLEKANNGLCLISADD

LIRPILG/HEGSLVNQKFSHAVEKCLKYGSRRMRTLITENLMASS/SFLSSAMDKFGNYVVQKAFIGATDEQKRITIS

QRVLT/SPEVLNCSYSRHLVQMCEKFANSHKSR

```

B



Obrázek 8: Schématické zobrazení *Pumilio* homology domain GiPUF4

A, Aminokyselinová sekvence GiPUF4 s barevně označenými repeticemi, vazebnými místy (žlutá) s aminokyselinami zodpovědnými za vazbu ribonukleotidu (červeně) v C-koncové části.

B, Schématické rozložení PH-D složené z osmi repetic (osmi vazebných míst) v rámci GiPUF4 proteinu.

GiPUF4 v *G. intestinalis* obsahuje téměř totožná vazebná místa jako lidský PUM1 a kvasinkový PUF3 protein, které byly doposud nejvíce prozkoumávány. Ve vazebných pozicích dvanácté a šestnácté aminokyseliny se GiPUF4 od lidského PUM1 proteinu liší pouze v záměně dvanácté aminokyseliny ve třetí repetici. Teoretický vazebný motiv v 3' UTR vázaných mRNA pro GiPUF4 tedy je UGUAUA/UUA.

Přirozený vazebný motiv pro cytosin se dosud nepodařilo identifikovat u žádného z PUF proteinů. Vytvořením syntetických proteinů byla identifikována kombinace aminokyselinových zbytků schopných této vazby (Filipovska et al., 2011). Analýzou GiPUF proteinů jsme identifikovali u GiPUF2 v rámci teoretického vazebného motivu místo pro cytosin. V případě experimentálního ověření by se jednalo o první známý přirozený PUF

protein schopný této vazby. Při bližším zkoumání jsme zjištěné teoretické místo pro cytosin identifikovali i u dalších, zejména jednobuněčných eukaryot (Obrázek 10).

```

PUM1: GMSDVMPSGRSRLLEDFRNRYPNLQREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFG
PUF4: LVLSFKKEPTGCKILQYQLAD-FPDKSRYLLDVFIAEYST-----SLMESLLIHPSGNYCFQKIIIESS
PUF1: SCSVIFEHDYSKLIQSLFRGLCRAATFVSKTLKESSEENVAQND-----NQNKNAMDVISPELVASFKAQ
PUF2: NIVSMYTTKQGSKNLQSLLSAHGKAAVQAAILPHLPHLIP-----CMFHIYGNHILQAMINQA
PUF3: RVSVSTRRGEFPEVSSKDAEAKKAEMLQAGPRAAIAYMRENE-----KHIEVLMMSPCGNHLLQALVKLS
PUF5: RAKLLMNNQHSIWLQSLLDLDPDEQFLYFCYIEPDCMAYCYHR-----QANHVQKVISILESKAFVSR

PUM1: SLEQKLALAEIRIGH--VLSLALQ-MYGCRTVQKALEFIPSDQQ-VINEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIIECVQPQSLQF---II
PUF4: DASQRLRILLIQLQDS--LFDICQN-LHGTRSIQKLFERVSSDEEKAIQAQQLGAGDRIIKLIVDINGNHCVQRCIETFAPKDCF---IY
PUF1: RTFIDAIIELEADKRFIRALLLPQPLTGPFSLEFSFSTNSKYMFKALATTFADKSHVTPEFKQQRREEHQORREKLAKEQFFGTQYKXK
PUF2: RQVQGPILYNLGDPRIILVQACIN-TYASWVVRITLTK-----EGQIDPAVLSQVIENFATICNNTCGNYVIQHLLLENK--KCPKS---II
PUF3: PDVVGSIILNSTTYNEDIFRMIKGGKSCWVLQAFIS---CGYVHDKTFEDLLIKHHEEIAKSEYGNFVLQRAIECPQFQFFDT---LS
PUF5: HRETANRISATILKDPDFLALSDQMGCRIVQKLF--LLIDEGELINIRSVLLEKVFVLCNNQWANFCIQGLIKNKRLIHSSIRKEVV

PUM1: DAFKQVVFALSTHPYGCRTVIQRILEHCLPDQTLPI---LEELHQ-HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRP----EDKSKIVAEIRGNVL
PUF4: DQIIRELVLVGTHQHGCCIQRCLDLCSEAQRVQI---VTAIKN-HVMELIVDRFGNYVFQYSLEKANNGLCGLISADDLIRPLGHEG
PUF1: EAGTITHAGVWQTGKGIIVISWFNMGNDIVNMAAESLIDYSFPDQDAFKLIMHPAGCDVYQACLGSVYVAP---WYKIKLNNLKPVID
PUF2: QQLINDAPELVFGKYSRHLEKLIKENVLKPNFLPFISKVALTR-YLPTILESKYGSYVIEKAILKVQ-----IHGMIDTVTT
PUF3: EHLLESFQSIGCKYGSHVAECLIKTLSARSKLDAAY-WLFTQP-YFYGLIIDQHGCFVVEKIAEVATG-----EVKTC
PUF5: EQLTRNAIFCTHKFGSHVIEKFLECCVTKERIDFSMS--LFMNP-NFPNLMDDSYGNFIVQKMLHQKES-----KTDA

PUM1: VLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYANVYVQKVIDVAEPQQRKIVMHKIRPHIAT
PUF4: SLVNQKFSHAVEKCLKYGSRMRITLITENLMAS-----SSFLSSAMDKFQNYVYQKAFIGATDEQKRTISQRVLTSPVEV
PUF1: KLARNKLGCLVLTALFDATLSDTDGIPADVIEASRIVLASEIDVRAASAFHGRQLCAYMKLDEFQRSGEDWSRTLQRR
PUF2: ILRICKYIQKSSKHYKNILDGSTVIVCETAGCVGNALCSFFQTSRQAFDMDKIKTMLESIESVNRSFIE--VPQYEE
PUF3: CLRIVKYVISLFAFGSQPHEAAELLGITQGITPNLVENINSILYSVKLRCR-TINKSFESMVPMSQKDLHAFKDRNISV
PUF5: RLATLRETGRLCYLKRHNFKQSIKN-----IMCYLSKSLKGLKLEPLCPDKVLDI

```

Obrázek 9: Alignment vazebných domén GiPUF proteinů a lidského PUM1 proteinu.

R1-R8 jsou naznačeny jednotlivé repetice (zeleně), shodná vazebná místa (žlutě) obsahují vyznačené aminokyseliny (červeně) vázající báze v nepřekládané oblasti mRNA. Alignment ukazuje vysokou homologii PUF proteinů v rámci druhu, ale také mimodruhovou podobnost – shodné domény s lidským PUM1 proteinem.

Ve třetí repetici GiPUF2 proteinu jsme lokalizovali teoretický vazebný motiv pro cytosin (tyrkysová).

```

Sc_JSN1      KSLNHKGTSDTQNFQGPL-----P-----EPLSGREFDPPKREL--KSIDSNAF---
Tb_Puf9     -CA-----GR---VVELACPDGSMMLINALSS-----QD-----AALVDTMVRE-
Tb_Puf_hyp3 -IV-----GE---LPRAACGAGNLLVSVLRL-----HH-----VEMTRTVVDE-

LmjF_PUF5   -LVPQFN-IIAMDQHGSHVATLIEY-----ISTPQMEALVPYI--D-----LHVIRQ
Tb_Puf_hyp3 -FRPVLP-AVALDSNGSHVVALVEF-----IPTGLMATLVPHF--T-----PSLVRD
LmjF_PUF9a   -LCPRLR-DVAVDVHGSHVATLVEA-----CTAEQTDALIGAM--H-----ASVVLN

Puf2g      QQVGP--ILYNLLGD-----PRILVQACI-NTY--ASWVVT-L
Sc_JSN1     FPWQ--FIFESI-----IANFWVIVQ-NRY--GRAVA-C
Sc_Puf2     FPWNS--FIFESV-----LSHFWTIVQ-NRY--GRAVA-C

CAEEL_Puf4  NCGQLASN--E-----F-----ANYVVRHVIKCDDAEITIVDI---

Tb_Puf11    NYVVRKMLNHITALAV-----GEQKAMESEREEIRIIGQYFSILAQNSEQL

```

Obrázek 10: Teoretická vazebná místa pro cytosin

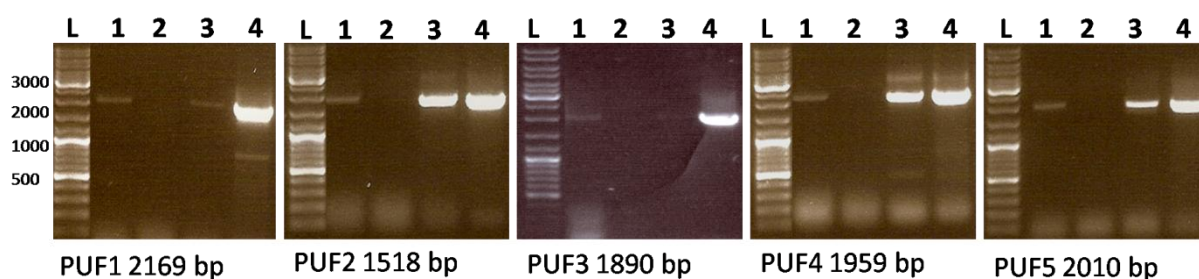
Na základě bioinformatické analýzy se nám podařilo identifikovat teoretický vazebný motiv pro cytosin nejen u GiPUF2, ale také u dalších eukaryot.

CAEEL – *C. elegans*, Lmj. – *Leishmania major*, Sc. – *S. cerevisce*, Tb. – *Trypanosoma brucei*

5.2 Exprese PUF proteinů v *G. intestinalis*

Abychom měli jistotu, že některý z potencionálních GiPUF proteinů není pseudogen, ověřili jsme přirozenou expresi GiPUF proteinů v trofozoitech *G. intestinalis* PCR metodou. Pro každý GiPUF protein byly namíchány čtyři reakční směsi s následujícími templáty: celková RNA, celková RNA inkubovaná s DNásou I, cDNA a genomová DNA.

Slabé bandy ve vzorcích číslo jedna s celkovou RNA zachycují slabou kontaminaci zbytkové genomové DNA (gDNA). Této kontaminace byla RNA zbavena inkubací s DNásou I, proto již ve vzorcích číslo dvě nevidíme žádný band. Pro získání cDNA *G. intestinalis* byly použity oligoT primery (specifické pro mRNA), získaná cDNA tedy odráží aktuálně a přirozeně exprimované geny. Síla bandů, lišící se u jednotlivých GiPUF proteinů, odráží míru exprese každého z nich. Vzorky číslo 4, kde byla jako templát použita genomová DNA slouží pouze jako metodická kontrola (Obrázek 11).



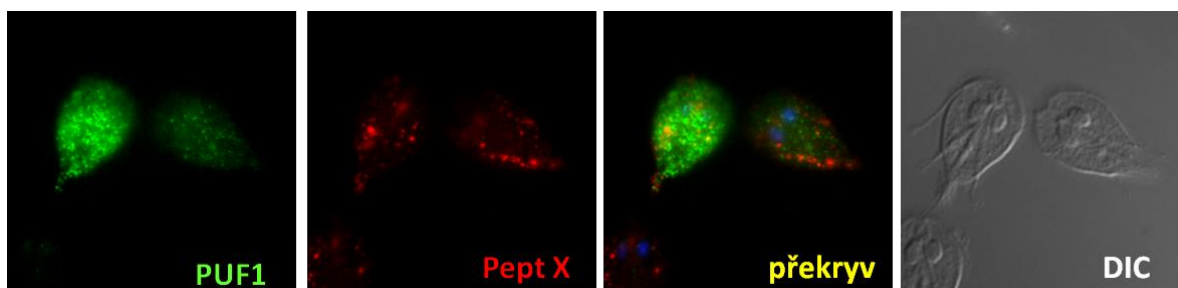
Obrázek 11: Jednotlivé amplifikované geny GiPUF proteinů detekované horizontální gelovou elektroforézou

(L) Gene Ruler Mix (Fermentas), (1) celková RNA, (2) celková RNA inkubovaná s DNásou I, (3) cDNA, (4) gDNA

5.3 Lokalizace GiPUF proteinů

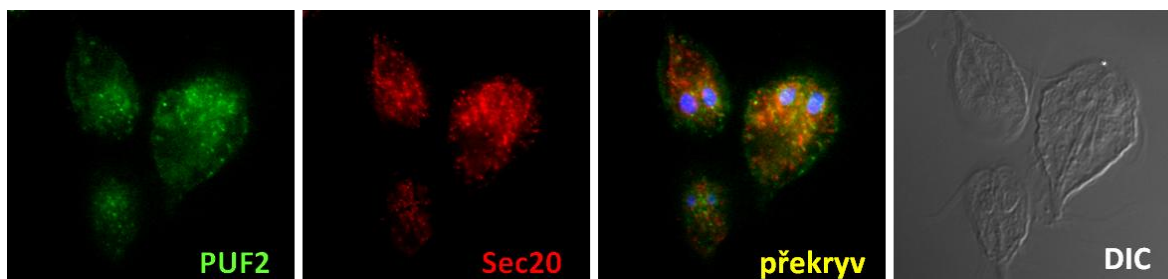
5.3.1 Lokalizace nepřímou imunofluorescencí

Většina známých PUF proteinů je lokalizována především v cytoplasmě, méně častěji v jádře a výjimečně také v jadérku. Pro ověření lokalizace GiPUF proteinů byl každý z proteinů označen HA-tagem a lokalizován nepřímou imunofluorescencí v trofozoitech *G. intestinalis* (Obrázky 12-16). GiPUF1, GiPUF2, GiPUF3 a GiPUF5 proteiny byly fixovány metanol-acetonovou fixací. Pro cytoplasmatickou lokalizaci je však vhodnější fixace formaldehydem. Tato metoda byla zvolena pro GiPUF4 poté, co byla předběžně určena jeho cytoplasmatická lokalizace a také proto, že jsme se rozhodli pro další pokusy a studie pracovat pouze s tímto proteinem.



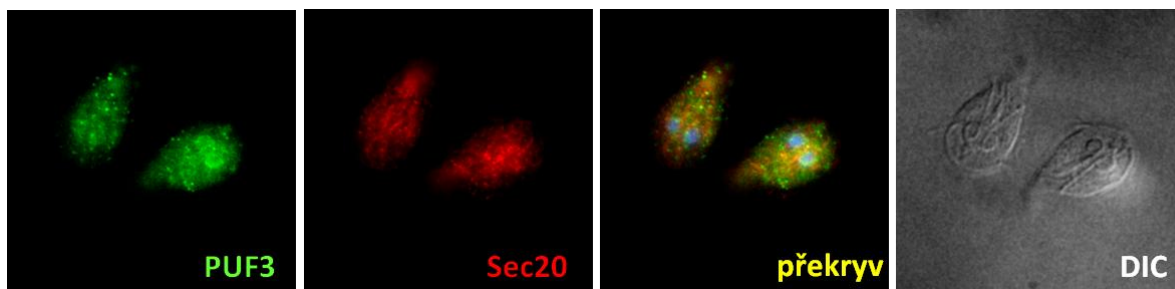
Obrázek 12: Lokalizace HA-tagovaného GiPUF1 proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence.

Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-Peptx protilátka značící mitosomy. Absence kolokalizace signálů a rozložení zeleného signálu naznačuje cytoplasmatickou lokalizaci. Pro bližší určení bohužel nemáme k dispozici cytoplasmatický marker.

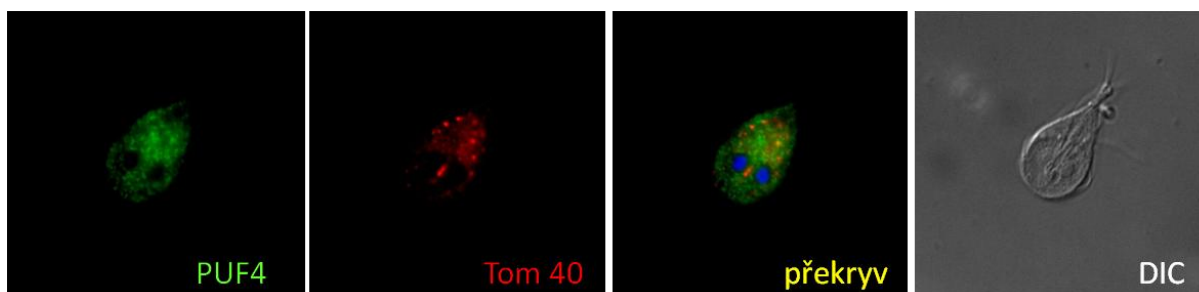


Obrázek 13: Lokalizace HA-tagovaného GiPUF2 proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence.

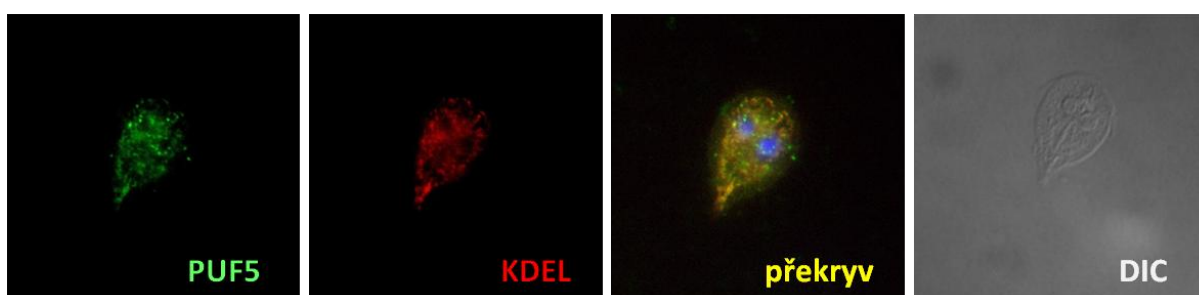
Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-Sec20 protilátka značící ER. Zelený signál naznačuje předpokládanou cytoplasmatickou lokalizaci, avšak překryv naznačuje lokalizaci v ER či na jeho povrchu.



Obrázek 14: Lokalizace HA-tagovaného GiPUF3 proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence. Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-Sec20 protilátka značící ER. Signál pro HA-tag ukazuje cytoplasmatickou lokalizaci, překryv naznačuje možnou lokalizaci v ER či na jeho povrchu.



Obrázek 15: Lokalizace HA-tagovaného GiPUF4 proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence. Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-Tom40 protilátka značící mitosomy. Z překryvu obou signálů je zřetelná odlišná lokalizace obou proteinů. Distribuce signálu GiPUF4 proteinu je typická pro cytoplasmatickou lokalizaci. Pro ověření bohužel nemáme cytoplasmatický marker.

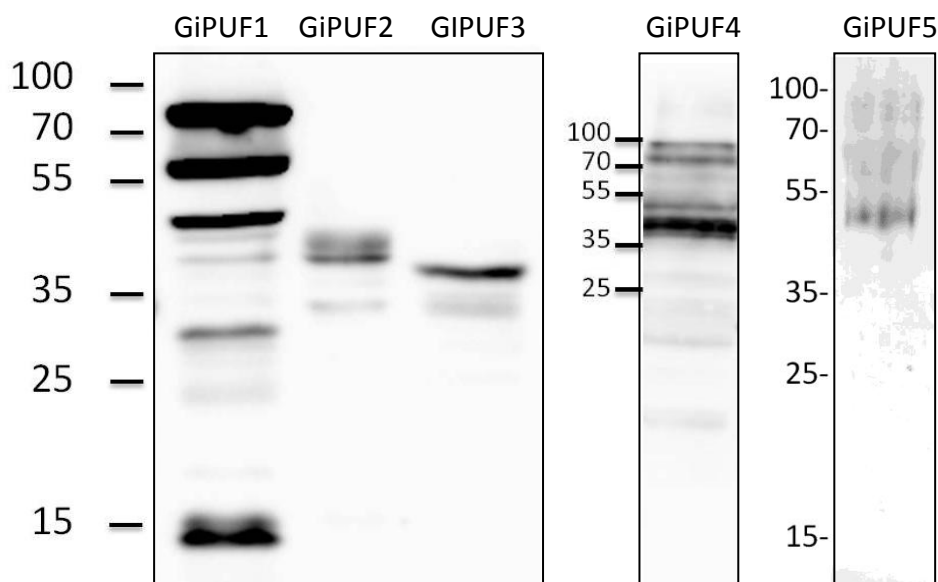


Obrázek16: Lokalizace HA-tagovaného GiPUF5 proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence. Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-KDEL protilátka značící ER. Výrazná kolokalizace značí přítomnost GiPUF5 proteinu v ER s částečným signálem v cytoplasmě.

5.3.2 Ověření exprese proteinů

Práce s kulturami *G. intestinalis* obsahující HA-tagované GiPUF proteiny byla komplikovaná z hlediska udržení stabilní exprese tagovaných proteinů v buňce. Kultury *G. intestinalis* přestaly HA-tagované proteiny exprimovat v průměru po dvou až třech týdnech od ustanovení stabilně exprimující kultury. Z tohoto důvodu byly buněčné kultury testovány na expresi GiPUF proteinů před každým pokusem. Stejně tak kultury použité k přípravě preparátů byly detekovány na přítomnost GiPUF proteinů značených HA-tagem pomocí western blotu (Obrázek 17).

GiPUF1 tvoří na western bloku mnohonásobné bandy. Největší band odpovídá velikostně GiPUF1 proteinu (80 KDa), ostatní bandy pravděpodobně zachycují částečně degradovaný GiPUF1 protein. Bandy pro GiPUF2 (55 KDa) i GiPUF3 (68 KDa) velikostně neodpovídají, oba proteiny byly pravděpodobně zachyceny částečně degradovány nebo se jedná o produkty alternativní translace. GiPUF4 protein také tvoří více bandů. Největší dvojband odpovídá velikosti GiPUF4 (72 KDa), menší bandy jsou opět zachycené zřejmě degradované proteiny.



Obrázek 17: Ověření exprese GiPUF proteinů značených HA-tagem

Pro každý z GiPUF proteinů byl použit celkový lyzát kultury *G. intestinalis* exprimující konkrétní GiPUF protein značený HA-tagem. Proteiny obsažené v lyzátu byly rozděleny SDS PAGE vertikální elektroforézou a přítomnost tagovaného proteinu byla detekována anti-HA protilátkou na western blotu.

5.4 GiPUF4 protein

Bioinformatickými analýzami jsme zjistili blízkou příbuznost GiPUF4 proteinu *G. intestinalis* s dalšími eukaryotickými PUF proteiny. Nejdůležitější je výrazná homologie s lidským PUF proteinem PUM1, se kterým GiPUF4 sdílí sedm shodných vazebných míst z celkových osmi. GiPUF4 také sdílí homologii vazebných domén s kvasinkovým PUF3 proteinem, který váže a cílí mRNA mitochondriálních genů na povrch mitochondrie a navíc také interaguje s receptorem Tom20 proteinem, který je součástí transportního komplexu vnější membrány mitochondrie. U *G. intestinalis* nebyla doposud objasněna žádná bližší funkce GiPUF proteinů, proto jsme si pro počáteční studie vybrali potenciálně nejzajímavější z GiPUF proteinů - GiPUF4.

Naším zájmem je lokalizace GiPUF4 proteinu, charakterizace jeho vazebného motivu a vázaných mRNA molekul.

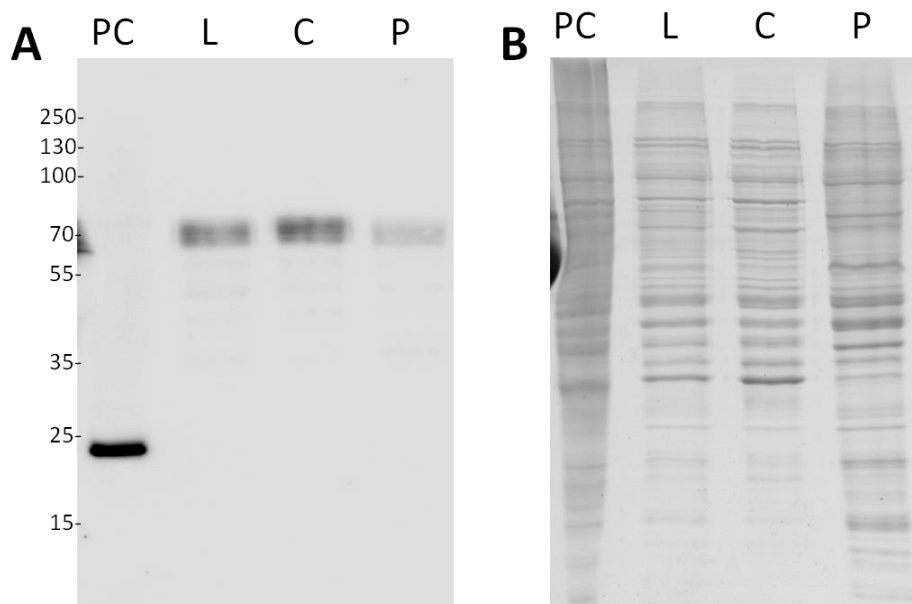
5.4.1 Lokalizace GiPUF4 proteinu

Lokalizace GiPUF4 proteinu byla pomocí nepřímé imunofluorescence určena jako cytoplasmatická. Pro upřesnění a potvrzení lokalizace GiPUF4 proteinu byla zvolena prokazatelnější metoda buněčná frakcionace. Narostlá kultura *G. intestinalis* exprimující GiPUF4 protein značený HA-tagem byla opakovaným stáčením rozdělena na dvě frakce – frakce obsahující cytoplasmu (C) a frakce obsahující pelet (P). Pro kontrolu byla ponechána část celkového lyzátu (L) (viz kapitola 4.6). Pro metodickou kontrolu byl použit lyzát *G. intestinalis* exprimující Sec20-HA tag (PC).

Pro objektivní posouzení množství proteinu v jednotlivých frakcích, muselo být množství proteinů vyváжено. Toho bylo dosaženo rozdělením každého ze vzorků pomocí SDS-PAGE gelu, zviditelnění proteinu obarvením Coomassie Brilliant Blue a na základě síly bandů ustanoveno vhodné množství každé frakce.

Pozitivita celkového lyzátu prokazuje, že protein GiPUF4 byl v dané kultuře exprimován. Pozitivní frakce obsahující cytoplasmu potvrzuje většinovou lokalizaci GiPUF4 proteinu v cytoplasmě. Částečná pozitivita peletu může být způsobena afinitou proteinu

k organelám (např. ER) nebo částečnou kontaminací frakce. Pozitivní kontrola (Sec20) byla na fotce ponechána záměrně, jelikož vyvrací metodickou chybu a prokazuje vlastnost GiPUF4 proteinu tvořit nejasné bandy na western blotu (Obrázek 18).



Obrázek 18: A. Western blot analýzy jednotlivých buněčných frakcí *G. intestinalis* pomocí anti-HA protilátky

Jednotlivé frakce *G. intestinalis* exprimující GiPUF4-HA tag protein, který byl detekován pomocí anti-HA protilátky na western blotu.

B. SDS-PAGE gel s jednotlivými frakcemi obarvený Coomassie Brilliant Blue

SDS-PAGE gel s jednotlivými frakcemi zachycuje vyvážené množství nanášených vzorků, které je nezbytné pro správné posouzení rozdílů exprese proteinu mezi jednotlivými frakcemi ve vyhodnocení western blotu.

(PC) pozitivní kontrola, (L) lyzát, (C) cytoplasma, (P) pelet

5.4.2 Predikce mRNA vázaných GiPUF4 proteinem *G. intestinalis*

Na základě vazebného kódu PUF proteinů a podobnosti vazebných domén s lidským PUM1, byl predikován teoretický vazebný motiv tohoto proteinu. Lidský PUM1 váže sekvenci UGUAUAUA (Galgano et al., 2008; Lu and Hall, 2011), GiPUF4 má jedinou záměnu ve vazebném místě v repetici tři, konkrétně ve dvanácté aminokyselině má treonin místo cysteinu. Teoretický vazebný motiv GiPUF4 proteinu *G. intestinalis* je proto UGUAUA/UUA. Pomocí online programu MEME byla z vazebného motivu vytvořena reverzní sekvence odpovídající úsekům DNA (Obrázek 19). S využitím online programu MAST byla tato sekvence identifikována u 19 genů, tedy devatenácti teoretických mRNA, které mohou být vázány GiPUF4 proteinem. Hlavním kritériem pro vytvoření databáze všech 3'UTR z genomu *G. intestinalis*, byly nepřekládané oblasti omezeny jen na délku 50 bází od STOP kodonu. Pozice teoretického vazebného motivu pro GiPUF4 je vyjádřena u každého z genů v tabulce 5.



Obrázek 19: DNA motiv reverzní vazebnému motivu pro GiPUF4

Na základě predikce vazebného motivu pro GiPUF4 jsme vytvořili reverzní motiv odpovídající svým uspořádáním DNA sekvenci genů příslušným mRNA. Tento teoretický motiv jsme vytvořili v online programu MEME a použili ho k vyhledání potencionálních genů, jejichž mRNA je vázána GiPUF4 proteinem, pomocí programu MAST.

Číslo genu	Pozice v 3'UTR	Anotace	Počet aminokyselin
GL50803_23630	39-46	Hypotetický protein	359
GL50803_89285	14-21	Hypotetický protein	413
GL50803_16454	6-13	Protein kináza	720
GL50803_34179	37-44	Hypotetický protein	1431
GL50803_14487	37-44	Hypotetický protein	933
GL50803_115159	4-11	Hypotetický protein	644
GL50803_97219	12-19	Fibrillar-like pre-rRNA processing protein	327
GL50803_6188	42-49	Hypotetický protein	69
GL50803_17249	11-18	Coiled-coil protein	1675
GL50803_10855	3-10	Protein 21.1	451
GL50803_7573	22-29	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A reduktáza	751
GL50803_15461	6-13	Hypotetický protein	223
GL50803_16773	16-23	Hypotetický protein	847
GL50803_21321	8-15	High cysteine membrane protein Group 5	675
GL50803_14615	4-11	Hypotetický protein	805
GL50803_16716	8-15	High cysteine membrane protein Group 5	674
GL50803_18713	26-33	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	107
GL50803_33279	28-35	Variant surface protein	748
GL50803_100283	37-44	Hypotetický protein	76

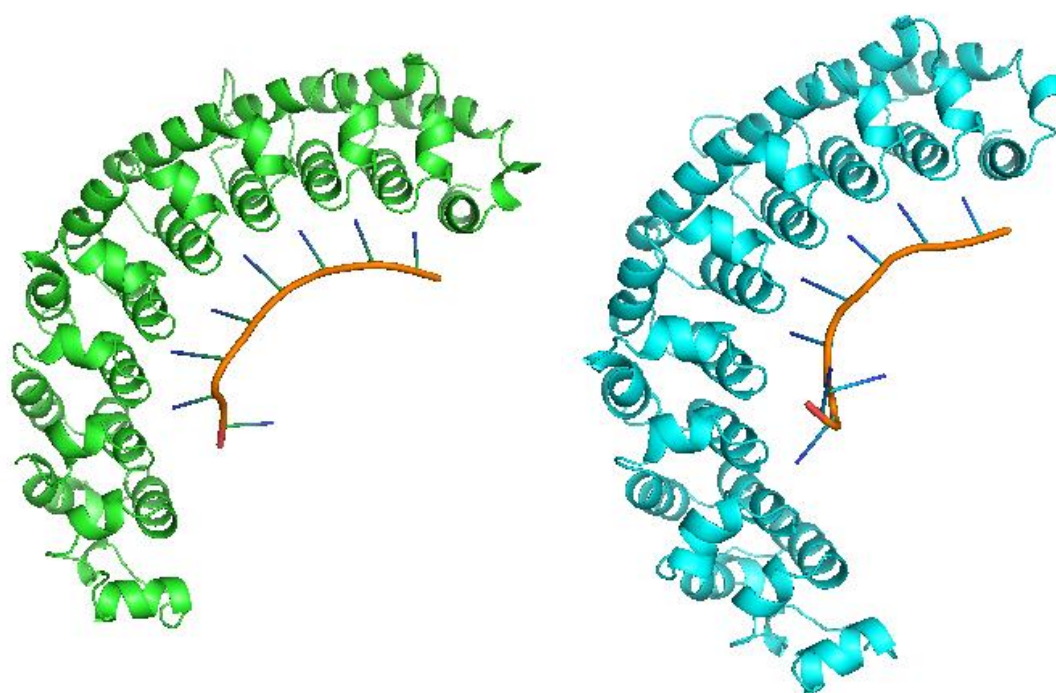
Tabulka 5: Teoretické geny vázané GiPUF4 proteinem.

Pomocí programu MAST se nám podařilo v databázi všech 3'UTR z genomu *G. intestinalis* určit 19 genů, jejichž mRNA je potencionálně vázána GiPUF4 proteinem.

Některé z těchto genů jsou úspěšně anotovány, u některých je tato informace doplněna na základě vyhledávání v programu BLAST. Přesto o deseti genech nemáme žádné podrobnější informace. Pozice v rámci 3'UTR pravděpodobně může hrát roli ve vazbě, proto tato data byla zahrnuta do tabulky, stejně jako počet aminokyselin proteinů daných genů.

5.4.3 Strukturní model GiPUF4 proteinu

Ve spolupráci s Mgr. Mariánem Novotným, Ph.D. byl navržen 3D strukturní model GiPUF4 proteinu *G. intestinalis*. Tento model ukázal nejen strukturní podobnost s ostatními PUF proteiny, ale také nás ujistil v rozložení vazebných domén. Model byl navržen jako proteinová struktura i s navázanými mRNA partnery vázajícími se na vnitřní stranu srpkovité struktury (Obrázek 20). Tento model je jednou z možností, jak více porozumět interakcím mezi RNA a PUF proteiny.



Obrázek 20: Strukturní model GiPUF4 proteinu

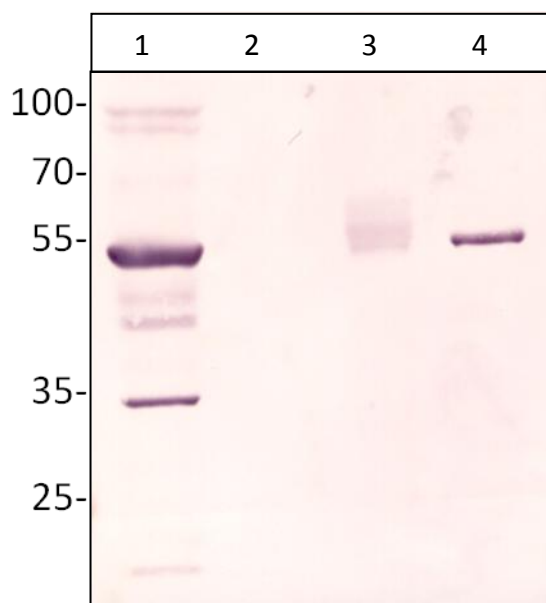
Strukturní model GiPUF4 proteinu s navázanými vazebnými motivy. Motiv1 : UGUAUAUA (zelený), Motiv 2: UGUAUUUA (modrý)

5.4.4 Nativní izolace GiPUF4 proteinu

GiPUF4 protein jsme si pro další pokusy a analýzy vybrali nejen z důvodu podobnosti vazebných domén s PUF proteiny dalších eukaryotických organismů, ale také proto, že jako jediný GiPUF protein v *G. intestinalis* obsahuje v PH-D osm jasně identifikovatelných vazebných domén. U ostatních GiPUF proteinů jsme předpověděli pouze dvě nebo čtyři domény, což by při izolaci mohla být nedostatečná vazebná síla pro zachycení mRNA.

Pro nativní izolaci proteinu jsme použili kuličky Dynabeads s navázanou anti-HA protilátkou, které měly zachytit HA-tagovaný GiPUF4 (viz kapitola 4.8). Získané frakce byly detekovány na western blotu použitím anti-HA protilátky (Obrázek 21). Pozitivita celkového lyzátu (1) prokazuje, že použitá kultura buněk sice exprimovala HA-tagovaný GiPUF4, ale dominantní band o velikosti 55 kDa zřejmě reprezentuje nekompletní formu proteinu vzniklou jeho degradací nebo alternativní translací. Ve sloupci číslo dva měl být nejsilnější signál značící uvolněný protein, tato frakce však byla negativní. Slabá pozitivita frakce získané uvařením kuliček (3) prokazuje, že GiPUF4 protein byl na kuličky vázán s nízkou afinitou. Pozitivita tzv. flow-trought vzorku (4) neboli vzorku, který se nenavázal na matrici Dynabeads, prokazuje, že většina GiPUF4 proteinu zůstala v nanášeném roztoku.

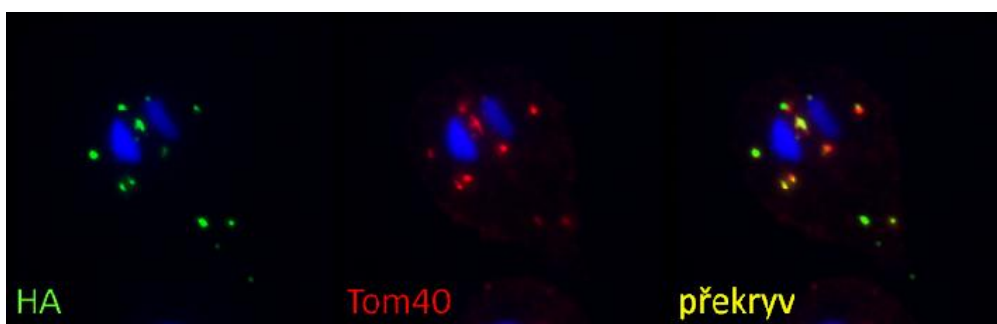
Obrázek 21: Frakce PUF4 proteinu detekované na western blotu pomocí anti-HA protilátky,
(1) celkový lyzát
(2) uvolněný protein
(3) uvařené kuličky
(4) flow-trought



5.5 Vliv 3'UTR z VSP na míru genové exprese

Regulace VSP proteinů *G. intestinalis* je řízena informací v jejich 3'UTR. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli otestovat vliv těchto oblastí na míru exprese proteinů jednoduchým pokusem. Zároveň jsme tímto pokusem testovali předchozí výsledky týkající se Sec20 *G. intestinalis* (Luboš Voleman, diplomová práce). Z práce Mgr. Volemana vyplynulo, že zatímco je přirozený Sec20 zcela lokalizován v endoplasmatickém retikulu *G. intestinalis*, při jeho overexpresi dochází k jeho výhradní mitosomální distribuci.

Porovnali jsme míru exprese dvou různých konstruktů: HA-tagovaného genu pro Sec20 z *G. intestinalis* s přirozenou 3'UTR oblastí HCEP (conserved eukaryotic protein) (Obrázek 23) a HA-tagovaného genu pro Sec20 z *G. intestinalis* ale s 3'UTR oblastí z genu pro VSP-8 (Obrázek 22). Předpokládané místo lokalizace Sec20 proteinu *G. intestinalis* při overexpresi je v mitosomu (Luboš Voleman, diplomová práce), což také potvrzuje lokalizace detekovaná na preparátu pomocí fluorescenční mikroskopie. Sec20 protein s 3'UTR VSP je lokalizován zcela mimo mitosomy (Obrázek 23), nejspíše v ER.

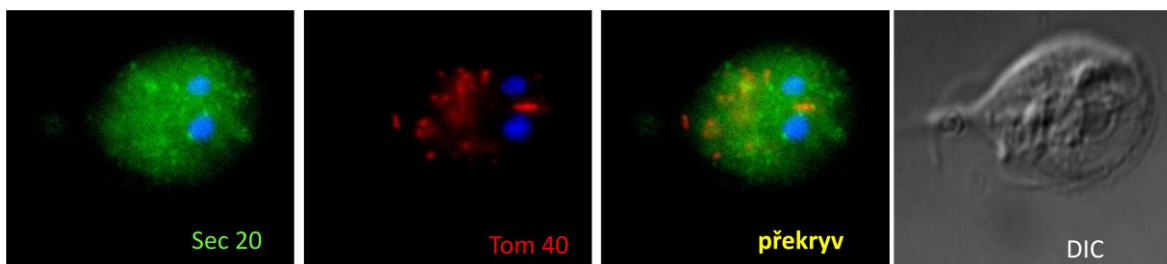


Obrázek 22: Lokalizace HA-tagovaného Sec20 proteinu s přirozenou 3'UTR.

Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-Tom40 značící mitosomy.

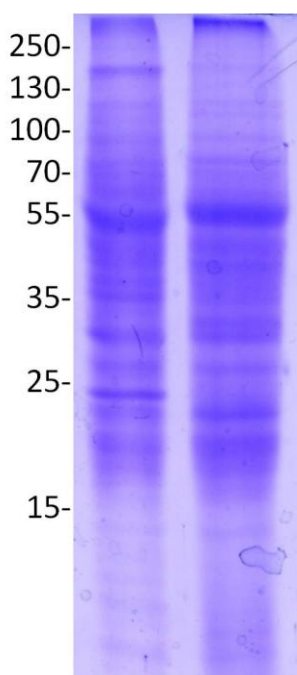
Z kolokalizace obou signálů je patrná lokalizace overexprimovaného Sec20 proteinu výhradně v mitosomech.

Obrázek mi poskytl Mgr. Luboš Voleman (Diplomová práce Mrg. Volemana)

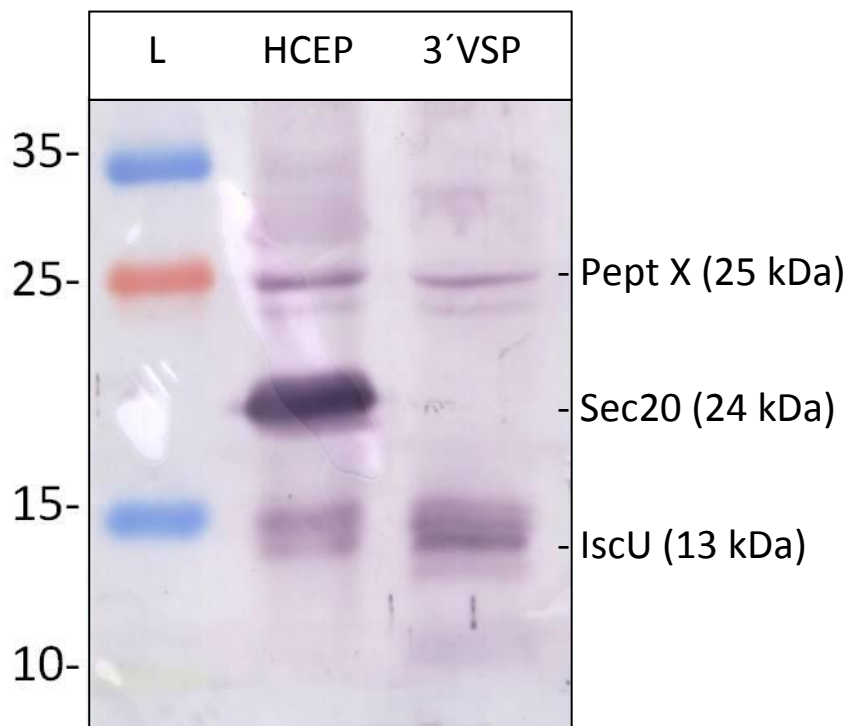


Obrázek 23: Lokalizace HA-tagovaného Sec20 proteinu se zaklonovanou 3'UTR VSP-8 genu
 Zeleně značená anti-HA protilátka, červeně anti-Tom40 značící mitosomy.
 Nekolokalizující signály ukazují lokalizaci Sec20-3'UTR VSP mimo mitosomy. Zelený signál
 naznačuje pravděpodobnou lokalizaci do ER.

Pro posouzení rozdílu exprese jednotlivých konstruktů jsme zvolili detekci anti-HA protilátkami lyzátů na western blotu. Jako kontrola pro porovnání vyvážení jednotlivých frakcí (Obrázek 24) byly zvoleny IscU (11 kDa) a PeptX (25 kDa), oba lokalizované v mitosomech *G. intestinalis*. Tyto výsledky ukazují, že 3'UTR oblast má dramatický efekt na sílu episomální exprese v *G. intestinalis* (Obrázek 25). V případě Sec20 míra exprese zřejmě rozhoduje o jeho buněčné lokalizaci.



Obrázek 24: SDS-PAGE gel lyzátů Sec20-HCEP a Sec20-3'UTR VSP obarvený Commassie Brilliant Blue
 K objektivnímu posouzení rozdílu exprese Sec20-HCEP a Sec20-3'UTR VSP na western blotu muselo být předem vyváženo množství v jednotlivých lyzátech.



Obrázek 25: Porovnání exprese genů Sec20-HCEP a Sec20-3'UTR VSP

Lyzáty trofozoitů *G. intestinalis* s konstrukty Sec20-HCEP a Sec20-3'UTR VSP detekovány anti-HA protilátkou na western blotu. Proteiny PeptX a IscU jsou přirozeně exprimovány, byly detekovány protilátkami jako kontrola vyváženosti jednotlivých lyzátů a pro posouzení rozdílu exprese Sec20-HCEP a Sec20-3'UTR VSP, který je na blotu markantní.

6. Diskuze

6.1 GiPUF proteiny v *G. intestinalis*

Eukaryotické proteiny z rodiny PUF jsou charakteristické přítomností RNA-vazebné domény na C-konci proteinové sekvence – tzv. Pumilio Homology Domain (PH-D). Touto doménou specificky váží sekvence v 3'UTR mRNA a podílejí se na jejich regulaci. Zpravidla se jedná o represí zprostředkovanou deadenylací či inhibicí translace (Houshmandi and Olivas, 2005; Zamore et al., 1997). Nedávno však byla nalezena i úloha PUF proteinu v aktivaci molekul mRNA (Kaye et al., 2009). Většina PUF proteinů interaguje s proteinovými složkami deadenylačních komplexů, komplexů odbourávajících 5'čepičku nebo s inhibitory iniciace translace (Cho et al., 2006; Wreden et al., 1997). 5'UTR *G. intestinalis* jsou extrémně krátké a dosud nebyla identifikována ko-translační modifikace v podobě 5'čepičky (Yu and Wang, 1996). Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na 3'UTR.

Vzhledem k faktu, že genové exprese u *G. intestinalis* zůstává stále z velké části neobjasněna, rozhodli jsme se identifikovat a charakterizovat přítomné GiPUF proteiny a jimi rozpoznávané mRNA.

6.1.1 Lokalizace a exprese GiPUF proteinů

Identifikovali jsme celkem pět potencionálních GiPUF proteinů v genomu *G. intestinalis*. Z proteinových sekvencí jednotlivých GiPUF proteinů jsme určili počet teoretických vazebných míst v PH-D u jednotlivých proteinů. GiPUF4 protein obsahuje osm vazebných míst, GiPUF3 pět, GiPUF2 a GiPUF5 po čtyřech a GiPUF1 pouze dvě vazebná místa. Nabízí se otázka, zdali podle vazebného motivu získaného z primární struktury proteinu a bioinformatických analýz lze určit schopnost proteinu vázat mRNA? Pokud budeme vycházet z principu vazebných míst aminokyselin v pozicích 12 a 16, těžko uvažovat, že by vazebné místo pro čtyři ribonukleotidy či pouze dva, bylo dostatečně specifické pro rozpoznání a vazbu konkrétní mRNA molekuly. Vezmeme-li však v úvahu sekundární

a terciární struktury proteinů a fakt, že vazebný motiv může být definován složitěji než dvěma aminokyselinami, může mít všech pět nalezených GiPUF proteinů vazebnou funkci.

Na základě poznatků o možném vazebném místě pro cytosin získaném *in vitro* (Filipovska et al., 2011) se nám podařilo tento vazebný motiv identifikovat ve třetí repetici GiPUF2 proteinu. V alignmentu z vybraných eukaryotických organismů jsme tento motiv také lokalizovali v sekvencích PUF proteinů *C. elegans*, *L. major*, *S. cerevisiae* a *T. brucei*. Je tedy pravděpodobné, že vazebný motiv pro cytosin se v přírodě bude vyskytovat, ale detekce na základě sekundární struktury bude obtížná. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli v budoucnu pokračovat s pokusy a analýzami přednostně nejen s GiPUF4, ale také GiPUF2. Už se nám podařilo navrhnout první teoretický vazebný motiv tohoto proteinu (GGUcUaUC) a vytvořit první strukturní model. S jistotou se však vazebná místa dají určit pouze nativní izolací GiPUF proteinů s navázanými mRNA.

Vzhledem k tomu, že GiPUF proteiny byly identifikovány na základě znalosti sekvence genomu *G. intestinalis*, museli jsme vyvrátit, že se nejedná pouze o pseudogeny. Toho jsme docílili pomocí PCR metody, kdy jsme jako templát použili cDNA izolovanou z trofozoitů *G. intestinalis*. Tato metoda nám nastínila přibližné míry exprese. Nejedná se však o metodu kvantitativní, tou by byla Real-time PCR. Podle míry zachycené exprese genů pro GiPUF2, GiPUF4 a GiPUF5 lze usoudit, že všechny tři proteiny jsou v trofozoitech přirozeně exprimované. Pro GiPUF1 jsme zjistili velmi slabou expresi a navíc vzhledem k malému počtu vazebných domén by se dalo spekulovat, zdali se opravdu jedná o funkční protein z PUF rodiny. Pro GiPUF3 protein musela být detekce přirozené exprese prováděna opakovaně, jelikož i GiPUF3 protein vykazuje velmi slabou míru exprese. Celkově lze říci, že všechny potencionální GiPUF proteiny v trofozoitech *G. intestinalis* jsou přirozeně exprimovány. Žádný z GiPUF proteinů tedy není pseudogen.

Při práci s GiPUF proteiny jsme se potýkali s celou řadou potíží. V prvních krocích bylo nutné optimalizovat PCR reakce k namnožení jednotlivých genů. Tato základní metoda musela být optimalizována pro každý z genů za jiných podmínek i při jiných programech. Nejzávažnější problémem však byla rychlá ztráta exprese HA-tagovaných GiPUF proteinů v kulturách *G. intestinalis*, které si

však udrželi potřebnou antibiotikovou rezistenci. Bylo zapotřebí často a opakovaně transformovat nové prvoky. Ztráta exprese z vektoru není pro jiné produkty tak častá a pravděpodobně je způsobena reakcí na vyvolaný fenotyp.

Vzhledem k tomu, že většina dosud identifikovaných PUF proteinů je lokalizována v cytoplasmě (Ariz et al., 2009; Morris et al., 2008), předpokládali jsme stejnou lokalizaci i pro GiPUF proteiny v *G. intestinalis*. Pomocí nepřímé imunofluorescence jsme potvrdili, že tomu tak opravdu je u většiny studovaných proteinů. Bohužel nemáme v současnosti vhodný cytoplasmatický marker, museli jsme se proto spokojit pouze se signálem pro GiPUF proteiny spolu s markery pro odlišné buněčné kompartmenty. Proteiny GiPUF1 a GiPUF4 jsou lokalizovány v cytoplasmě. GiPUF2 a GiPUF3 vykazují lokalizaci v ER či na jeho povrchu, ale také částečnou lokalizaci v cytoplasmě. GiPUF5 protein je částečně lokalizován také v cytoplasmě, ale dominantní signál naznačuje lokalizaci spíše v ER či na jeho povrchu. Pokud vezmeme v úvahu hlavní funkci PUF proteinů, vázat mRNA, není tato lokalizace nijak výjimečná. Vzhledem k tomu, že žádný z doposud známých PUF proteinů nebyl lokalizován uvnitř ER, přikláníme se k teorii, že tyto tři PUF proteiny interagují s povrchem ER.

Proteiny GiPUF1, GiPUF2, GiPUF3 a GiPUF5 byly při přípravě preparátů fixovány metanol-acetonovou fixací, avšak cytoplasmatické proteiny jsou lépe viditelné při formaldehydové fixaci. Ta byla použita pro přípravu preparátu s GiPUF4 proteinem. Pro ostatní proteiny budeme dodělovat preparáty fixované formaldehydem a také chceme potvrdit jejich lokalizaci buněčnou frakcionací.

6.1.2 GiPUF4 protein

Pomocí nepřímé fluorescence jsme lokalizovali GiPUF4 protein také v cytoplasmě trofozoitů *G. intestinalis*. U tohoto proteinu jsme navíc ověřili lokalizaci pomocí buněčné frakcionace. Pozitivita celkového lyzátu svědčí o tom, že kultura trofozoitů *G. intestinalis* v danou chvíli exprimovala GiPUF4-HA tag protein. Signál detekovaný v cytoplasmatické fázi potvrdil lokalizaci v cytoplasmě. Slabý band jsme detekovali

také ve vzorku s buněčným peletem obsahujícím buněčné organely. Slabou pozitivitu tohoto vzorku vysvětlujeme pravděpodobnou afinitou proteinu k některé z buněčných organel. Druhou možností positivity peletu je slabá kontaminace cytoplasmatickou fází, neboli že nedošlo k čistému oddělení fází.

GiPUF4 protein obsahuje ve své PH-D celkem sedm vazebných míst shodných s vazebnými místy lidského PUM1 proteinu. Liší se pouze záměnou dvanácté aminokyseliny ve třetí repetici, konkrétně obsahuje místo cysteinu treonin. Po konzultaci s Mrg. Mariánem Novotným, Ph.D. jsme dospěli k závěru, že teoretický vazebný motiv pro GiPUF4 protein je UGUUAU/UUA. V šesté pozici jsme zvolili možnost vazby adeninu i uracilu. Vyšli jsme z obecných charakteristik vazebných motivů, ale také z 3D struktury GiPUF4 proteinu. Na základě toho teoretického motivu jsme v genomu *G. intestinalis* identifikovali 19 genů, které ve své 3'UTR obsahují tento motiv. Při tvorbě databáze 3'UTR jsme museli vzít v úvahu kompaktnost genomu *G. intestinalis* a proto jsme pro 3'UTR zvolili délku 50 bází. Přesto se o některých zjištěných genech musí uvažovat s velkou opatrností, především o těch, které mají teoretické vazebné místo v rozmezí 40-50 bází za STOP kodonem, poněvadž by se již mohlo jednat o kódující oblast následného genu. Žádný z identifikovaných genů (jeho mRNA) nebyl doposud zjištěn jako substrát pro PUF protein i ostatních eukaryot, což může potvrzovat známý fakt, že PUF proteiny u různých eukaryot rozeznávají nepříbuzné mRNA. Navíc, vzhledem k tomu, že deset z celkových devatenácti genů jsou hypotetické, nedá se určit ani pravděpodobnost, který z genů by mohl být opravdovým mRNA partnerem GiPUF4 proteinu nebo zdali identifikované geny mají nějakou metabolickou souvislost.

Jeden z našich hlavních cílů bylo nejprve izolovat příslušné mRNA vázané GiPUF4 proteinem, následně se pokusit o izolaci příslušných mRNA i ostatních GiPUF proteinů. Nativní izolace se nepovedla. Pravděpodobně za to mohlo vysoké pH a nízká osmolarita použitých pufrů, což mělo za následek nestabilní prostředí, které mohlo rozrušit nejen buňky samotné, ale také mohlo negativně ovlivnit stabilitu a strukturu proteinů. Vzhledem k tomu, že původní protokol byl vyvinut pro izolaci PUF proteinů z kvasinek *S. cerevisiae* (Gerber et al., 2004a), bude zapotřebí ho více optimalizovat. První řadě musíme optimalizovat pH a osmolaritu vhodnou pro trofozoity *G. intestinalis*, k čemu

by mohlo pomoci použít jako základ všech roztoků ST pufr. Dalším možným opatřením, jak předejít nežádoucí degradaci proteinu, bude zkrátit dobu rozbíjení buněk na MiniBeadBeater Bead Homogenizer a buňky v průběhu lýz více chladit. Přínosné by také mohlo být zvážit podmínky při vychytávání proteinu kuličkami i při eluaci proteinu. Dalším možným přístupem je i „crosslinkování“ vázaných mRNA s proteinem UV zářením a následná izolace komplexů.

Naše dosavadní výsledky a poznatky nás motivují k bližší charakterizaci GiPUF proteinů a mRNA, které váží. Není to jen z důvodu podhalení mechanismů genové exprese, ale obecná charakterizace interakce protein-RNA může být přínosná v širším smyslu. Hlavní pozornost se tak obrací na PUF proteiny jako na možný nástroj *in vivo* specifického značení mRNA, tj. cílenou mutagenezí PUF proteinu může být vytvořen protein, rozeznávající specifickou sekvenci mRNA, tak jak je tomu v případě zinc finger nukleáz či TALE proteinů v případě DNA (Moscou and Bogdanove, 2009; Boch et al., 2009).

V nejbližší budoucnosti plánujeme optimalizovat nativní izolaci GiPUF4 proteinů, izolovat a popsat mRNA, které váže. Následně takto identifikovat mRNA pro všechny GiPUF proteiny. Optimalizovat určení lokalizace GiPUF proteinů nepřímou imunofluorescencí fixací buněk jak metyl-acetonem, tak i formaldehydovou fixací. Specifikovat lokalizaci všech GiPUF proteinů pomocí buněčné frakcionace.

Hlavními cíli však bude, pokusit se identifikovat GiPUF protein, který by vázal cytosin *in vivo* a ověřit zdali v *G. intestinalis* existuje PUF protein, který váže mRNA s jasnou asociací na některou buněčnou organelu, jak je tomu např. u kvasinkového PUF3 proteinu (Saint-Georges et al., 2008; Jackson, Jr. et al., 2004).

6.2 3'UTR VSP proteinu

Povrchové proteiny *G. intestinalis* jsou pravděpodobně regulovány inhibicí translace zprostředkovanou molekulami miRNA (Li et al., 2012). U *G. intestinalis* bylo identifikováno celkem 25 jaderných molekul snoRNA, které jsou u většiny eukaryot prekurzory pro miRNA. Pět z těchto snoRNA bylo opravdu identifikováno jako prekurzory i pro giardiové miRNA. Vazebné motivy pro miR6 a miR10 byly identifikovány v 3'UTR většiny VSP genů (Li et al., 2012). Jedná se o první podhalený mechanismus genové regulace u tohoto prvoka a z tohoto důvodu se 3'UTR staly předmětem našeho zájmu.

Ověřili jsme vliv 3'UTR z VSP genu číslo GL50803_137618 na genovou expresi proteinu Sec20. Tento gen byl vybrán z důvodu přítomnosti velmi konzervovaného motivu ve své 3'UTR. Na základě tohoto poznatku jsme předpokládali, že by mohl mít nějakou regulační funkci (v průběhu diplomové práce byla tato zkušenost publikována skupinou Dr. Wang (Li et al., 2012)). Eukaryotický Sec20 je přirozeně lokalizován v ER. Z dosud neznámých příčin episomální exprese Sec20 v *G. intestinalis* vyúsťuje v jeho mitosomální lokalizaci (diplomová práce Mgr. Voleman) (Elias et al., 2008; Sweet and Pelham, 1992). Jednou z našich pracovních hypotéz byla možná role 3'UTR v používaném vektoru. Na základě zjištěné role 3'UTR v regulaci exprese VSP jsme testovali možný vliv na expresi a lokalizaci Sec20. Nepřímou imunofluorescencí jsme prokázali snížení exprese Sec20 proteinu, což bylo ověřeno analýzou buněčných lyzátů na western blotu. Sec20 navíc vykazoval výhradní lokalizaci v ER. Je tedy pravděpodobné, že míra exprese může ovlivňovat i cílení proteinů do různých organel.

7. Závěr

Podařilo se nám identifikovat a lokalizovat pět PUF proteinů v trofozoitech *G. intestinalis*. Proteiny GiPUF1 a GiPUF4 jsou lokalizovány v cytoplasmě. Lokalizace proteinů GiPUF2 a GiPUF3 je také částečně v cytoplasmě, ale s jasnou afinitou k ER. GiPUF5 má pravděpodobně lokalizaci v ER a z části v cytoplasmě. U všech GiPUF proteinů se nám bioinformatickou analýzou podařilo identifikovat v C-koncové sekvenci Pumilio Homology Domain obsahující od dvou do osmi vazebných repetit. Jako nejvíce konzervovaný PUF protein se jeví GiPUF4, obsahuje celkem osm vazebných repetit, navíc vysoce homologních k lidskému PUM1 proteinu (Li et al., 2012; Lu and Hall, 2011). Pro GiPUF4 protein se nám podařilo identifikovat celkem 19 teoretických mRNA, která mohou být tímto proteinem vázána. Pro celkovou náročnost, nebyly tyto mRNA potvrzeny nativní izolací. Druhým projektem bylo ověření vlivu 3' nepřekládaných oblastí na expresi proteinů. Zjistili jsme, že 3'UTR VSP genu GL50803_137618 dokáže rapidně snížit míru exprese proteinu, v našem případě SNARE protein z endoplasmatického retikula - Sec20. Tento protein byl vybrán na základě hypotézy, že míra exprese proteinu může ovlivňovat jeho lokalizaci. Sec20 je za fyziologických podmínek lokalizován v ER, při overexpresi v mitosomech. Snížením exprese Sec20 proteinu vlivem 3'UTR VSP byl tento protein cílen výhradně do endoplasmatického retikula.

8. Seznam použité literatury

- Adam,R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447-475.
- Adam,R.D., Aggarwal,A., Lal,A.A., de La Cruz,V.F., McCutchan,T., and Nash,T.E. (1988). Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. J. Exp. Med. 167, 109-118.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Ankarklev,J., Jerlstrom-Hultqvist,J., Ringqvist,E., Troell,K., and Svard,S.G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia species*. Nat. Rev. Microbiol. 8, 413-422.
- Archer,S.K., Luu,V.D., de Queiroz,R.A., Brems,S., and Clayton,C. (2009). *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. PLoS. Pathog. 5, e1000565.
- Ariz,M., Mainpal,R., and Subramaniam,K. (2009). *C. elegans* RNA-binding proteins PUF-8 and MEX-3 function redundantly to promote germline stem cell mitosis. Dev. Biol. 326, 295-304.
- Bailey,T.L. and Elkan,C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 2, 28-36.
- Bailey,T.L. and Gribskov,M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. Bioinformatics. 14, 48-54.
- Berger,K.H., Sogo,L.F., and Yaffe,M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. J. Cell Biol. 136, 545-553.
- Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409, 363-366.
- Boch,J., Scholze,H., Schornack,S., Landgraf,A., Hahn,S., Kay,S., Lahaye,T., Nickstadt,A., and Bonas,U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326, 1509-1512.
- Cai,X., Hagedorn,C.H., and Cullen,B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA. 10, 1957-1966.
- Cheong,C.G. and Hall,T.M. (2006). Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103, 13635-13639.
- Cho,P.F., Gamberi,C., Cho-Park,Y.A., Cho-Park,I.B., Lasko,P., and Sonenberg,N. (2006). Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. Curr. Biol. 16, 2035-2041.
- Chritton,J.J. and Wickens,M. (2010). Translational repression by PUF proteins in vitro. RNA. 16, 1217-1225.

- Coller, J. and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**, 875-886.
- Dyxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 457-467.
- Edwards, T.A., Pyle, S.E., Wharton, R.P., and Aggarwal, A.K. (2001). Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* **105**, 281-289.
- Elias, E.V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T.E., Neiman, A., and Lujan, H.D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **283**, 35996-36010.
- Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A.P., Pines, O., Rapaport, D., and Arava, Y. (2010). Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* **30**, 284-294.
- Faghiri, Z. and Widmer, G. (2011). A comparison of the *Giardia lamblia* trophozoite and cyst transcriptome using microarrays. *BMC. Microbiol.* **11**, 91.
- Filipovska, A., Razif, M.F., Nygard, K.K., and Rackham, O. (2011). A universal code for RNA recognition by PUF proteins. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 425-427.
- Galgano, A., Forrer, M., Jaskiewicz, L., Kanitz, A., Zavolan, M., and Gerber, A.P. (2008). Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLoS. One.* **3**, e3164.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Gay, A.C., and Pon, L.A. (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J. Cell Biol.* **176**, 197-207.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004a). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS. Biol.* **2**, E79.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004b). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS. Biol.* **2**, E79.
- Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S.B., Reiner, D.S., McCaffery, M., So, M., and Guiney, D.G. (1990a). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 4463-4467.
- Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S.B., Reiner, D.S., McCaffery, M., So, M., and Guiney, D.G. (1990b). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 4463-4467.
- Goldstrohm, A.C., Hook, B.A., Seay, D.J., and Wickens, M. (2006a). PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 533-539.
- Goldstrohm, A.C., Hook, B.A., Seay, D.J., and Wickens, M. (2006b). PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 533-539.
- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford University Press [41], 95-98. 1999.

Ref Type: Generic

- Houshmandi,S.S. and Olivas,W.M. (2005). Yeast Puf3 mutants reveal the complexity of Puf-RNA binding and identify a loop required for regulation of mRNA decay. *RNA*. *11*, 1655-1666.
- Jackson,J.S., Jr., Houshmandi,S.S., Lopez,L.F., and Olivas,W.M. (2004). Recruitment of the Puf3 protein to its mRNA target for regulation of mRNA decay in yeast. *RNA*. *10*, 1625-1636.
- Jinek,M. and Doudna,J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* *457*, 405-412.
- Kadyrova,L.Y., Habara,Y., Lee,T.H., and Wharton,R.P. (2007). Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development* *134*, 1519-1527.
- Kaye,J.A., Rose,N.C., Goldsworthy,B., Goga,A., and L'Etoile,N.D. (2009). A 3'UTR pumilio-binding element directs translational activation in olfactory sensory neurons. *Neuron* *61*, 57-70.
- Keister,D.B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *77*, 487-488.
- Larkin,M.A., Blackshields,G., Brown,N.P., Chenna,R., McGettigan,P.A., McWilliam,H., Valentin,F., Wallace,I.M., Wilm,A., Lopez,R., Thompson,J.D., Gibson,T.J., and Higgins,D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. *23*, 2947-2948.
- Lauwaet,T., Davids,B.J., Torres-Escobar,A., Birkeland,S.R., Cipriano,M.J., Preheim,S.P., Palm,D., Svard,S.G., McArthur,A.G., and Gillin,F.D. (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* *152*, 80-89.
- Lee,D., Ohn,T., Chiang,Y.C., Quigley,G., Yao,G., Liu,Y., and Denis,C.L. (2010). PUF3 acceleration of deadenylation in vivo can operate independently of CCR4 activity, possibly involving effects on the PAB1-mRNP structure. *J. Mol. Biol.* *399*, 562-575.
- Lee,Y., Ahn,C., Han,J., Choi,H., Kim,J., Yim,J., Lee,J., Provost,P., Radmark,O., Kim,S., and Kim,V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415-419.
- Li,W., Saraiya,A.A., and Wang,C.C. (2011). Gene regulation in *Giardia lamblia* involves a putative microRNA derived from a small nucleolar RNA. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* *5*, e1338.
- Li,W., Saraiya,A.A., and Wang,C.C. (2012). The profile of snoRNA-derived microRNAs that regulate expression of variant surface proteins in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol.* *14*, 1455-1473.
- Lu,G. and Hall,T.M. (2011). Alternate modes of cognate RNA recognition by human PUMILIO proteins. *Structure*. *19*, 361-367.
- Lujan,H.D., Mowatt,M.R., Wu,J.J., Lu,Y., Lees,A., Chance,M.R., and Nash,T.E. (1995). Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* *270*, 13807-13813.
- Lund,E., Guttinger,S., Calado,A., Dahlberg,J.E., and Kutay,U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95-98.
- Lunde,B.M., Moore,C., and Varani,G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 479-490.

- Macrae,I.J., Zhou,K., Li,F., Repic,A., Brooks,A.N., Cande,W.Z., Adams,P.D., and Doudna,J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- McArthur,A.G., Morrison,H.G., Nixon,J.E., Passamaneck,N.Q., Kim,U., Hinkle,G., Crocker,M.K., Holder,M.E., Farr,R., Reich,C.I., Olsen,G.E., Aley,S.B., Adam,R.D., Gillin,F.D., and Sogin,M.L. (2000). The *Giardia* genome project database. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 271-273.
- Meister,G., Landthaler,M., Patkaniowska,A., Dorsett,Y., Teng,G., and Tuschl,T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185-197.
- Meister,G. and Tuschl,T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Morris,A.R., Mukherjee,N., and Keene,J.D. (2008). Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets. *Mol. Cell Biol.* 28, 4093-4103.
- Morrison,H.G., McArthur,A.G., Gillin,F.D., Aley,S.B., Adam,R.D., Olsen,G.J., Best,A.A., Cande,W.Z., Chen,F., Cipriano,M.J., Davids,B.J., Dawson,S.C., Elmendorf,H.G., Hehl,A.B., Holder,M.E., Huse,S.M., Kim,U.U., Lasek-Nesselquist,E., Manning,G., Nigam,A., Nixon,J.E., Palm,D., Passamaneck,N.E., Prabhu,A., Reich,C.I., Reiner,D.S., Samuelson,J., Svard,S.G., and Sogin,M.L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921-1926.
- Moscou,M.J. and Bogdanove,A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501.
- Murata,Y. and Wharton,R.P. (1995). Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell* 80, 747-756.
- Nash,T.E. (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 352, 1369-1375.
- Nash,T.E., Conrad,J.T., and Merritt,J.W., Jr. (1990). Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 125-132.
- Nash,T.E., Lujan,H.T., Mowatt,M.R., and Conrad,J.T. (2001). Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 69, 1922-1923.
- Niu,X.H., Hartshorne,T., He,X.Y., and Agabian,N. (1994). Characterization of putative small nuclear RNAs from *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 49-57.
- Nixon,J.E., Wang,A., Morrison,H.G., McArthur,A.G., Sogin,M.L., Loftus,B.J., and Samuelson,J. (2002). A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 3701-3705.
- Prucca,C.G. and Lujan,H.D. (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol.* 11, 1706-1715.
- Prucca,C.G., Rivero,F.D., and Lujan,H.D. (2011). Regulation of antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 611-630.

- Prucça,C.G., Slavin,I., Quiroga,R., Elias,E.V., Rivero,F.D., Saura,A., Carranza,P.G., and Lujan,H.D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* **456**, 750-754.
- Quenault,T., Lithgow,T., and Traven,A. (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol.* **21**, 104-112.
- Saint-Georges,Y., Garcia,M., Delaveau,T., Jourden,L., Le,C.S., Lemoine,S., Tanty,V., Devaux,F., and Jacq,C. (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS. One.* **3**, e2293.
- Saraiya,A.A. and Wang,C.C. (2008). snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS. Pathog.* **4**, e1000224.
- Schumann,B.G., Kaser,S., de Araujo,P.R., Schimanski,B., Naguleswaran,A., Knusel,S., Heller,M., and Roditi,I. (2013). Nucleolar proteins regulate stage-specific gene expression and ribosomal RNA maturation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **88**, 827-840.
- Suh,N., Crittenden,S.L., Goldstrohm,A., Hook,B., Thompson,B., Wickens,M., and Kimble,J. (2009). FBF and its dual control of *gld-1* expression in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genetics* **181**, 1249-1260.
- Sweet,D.J. and Pelham,H.R. (1992). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system. *EMBO J.* **11**, 423-432.
- Valley,C.T., Porter,D.F., Qiu,C., Campbell,Z.T., Hall,T.M., and Wickens,M. (2012). Patterns and plasticity in RNA-protein interactions enable recruitment of multiple proteins through a single site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, 6054-6059.
- Wang,X., McLachlan,J., Zamore,P.D., and Hall,T.M. (2002). Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* **110**, 501-512.
- Wharton,R.P. and Struhl,G. (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell* **67**, 955-967.
- Wilson,R.C. and Doudna,J.A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 217-239.
- Wreden,C., Verrotti,A.C., Schisa,J.A., Lieberfarb,M.E., and Strickland,S. (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development* **124**, 3015-3023.
- Yang,C.Y., Zhou,H., Luo,J., and Qu,L.H. (2005). Identification of 20 snoRNA-like RNAs from the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 1224-1231.
- Yang,Y.M. and Adam,R.D. (1995). Analysis of a repeat-containing family of *Giardia lamblia* variant-specific surface protein genes: diversity through gene duplication and divergence. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 439-444.
- Yee,J., Mowatt,M.R., Dennis,P.P., and Nash,T.E. (2000). Transcriptional analysis of the glutamate dehydrogenase gene in the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Identification of a primordial gene promoter. *J. Biol. Chem.* **275**, 11432-11439.

Yu,D.C., Wang,A.L., Botka,C.W., and Wang,C.C. (1998). Protein synthesis in *Giardia lamblia* may involve interaction between a downstream box (DB) in mRNA and an anti-DB in the 16S-like ribosomal RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96, 151-165.

Yu,D.C. and Wang,C.C. (1996). Identification of cis-acting signals in the giardiavirus (GLV) genome required for expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *RNA.* 2, 824-834.

Zamore,P.D., Williamson,J.R., and Lehmann,R. (1997). The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *RNA.* 3, 1421-1433.

Zhang,B., Gallegos,M., Puoti,A., Durkin,E., Fields,S., Kimble,J., and Wickens,M.P. (1997). A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* 390, 477-484.

Zhang,C. and Ruvkun,G. (2012). New insights into siRNA amplification and RNAi. *RNA. Biol.* 9, 1045-1049.