

## Abstrakt

Rozvoj technologií pro sekvencování DNA přinesl technologický zlom, díky němuž bylo možné provést analýzu kompletních genomů, včetně parazitických protist *Trichomonas vaginalis* a *Giardia intestinalis*, které jsou tradičně studovány nejen z důvodu jejich klinického významu, ale rovněž z evolučního úhlu pohledu pro jejich adaptaci na anaerobní způsob metabolismu. Samotné dokončení sekvencování genomu a anotace predikovaných proteinových sekvencí nepřineslo detailní vhled do fungování organel odvozených od mitochondrie, jimiž jsou v případě *G. intestinalis* mitosomy, které se nepodílejí na energetickém metabolismu, a v případě *T. vaginalis* hydrogenosomy, které produkují molekulární vodík a produkují ATP substrátovou fosforylací. Tradiční metody výzkumu těchto organel založené na frakcionaci pomocí ultracentrifugace v hustotním gradientu a následné biochemické a enzymologické analýzy byly doplněny o metody jedno- a dvoudimenzionální elektroforézy s následnou identifikací proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

V této práci byly použity metody vícedimenzionální separace peptidových fragmentů vytvořených specifickou proteolýzou komplexní směsi a následně tandemové hmotnostní spektrometrie k identifikaci subproteomu příslušné organely.

Pro analýzu mitosomálního proteomu *G. intestinalis* bylo využito značení isobarickými sondami iTRAQ, které umožnilo pro identifikované proteiny určit jejich distribuci ve dvou frakcích získaných gradientovou ultracentrifugací, jež měly největší obohacení o mitosomy. Tento přístup umožnil redukci počtu kandidátních proteinů pro bližší bioinformatické a lokalizační experimenty, které potvrdily mitosomální lokalizaci u dvaceti proteinů.

Při analýze membránového subproteomu hydrogenosomu *T. vaginalis* byly hydrofobní membránové proteiny pomocí detergentu Triton X-114 odděleny od hydrofilních, separovány SDS-PAGE a následně podrobeny štěpení v gelu. Tímto přístupem se podařilo získat informace o proteinech, které nedosahují počtu kopií srovnatelných s enzymy energetického metabolismu převládajícími ve vzorcích, a které díky své hydrofobní povaze nemohou být separovány obvyklou dvoudimenzionální elektroforézou s využitím isoelektrické fokusace. Zvolený přístup umožnil identifikaci proteinů účastnících se biogeneze organely a membránového transportu.

Studium změn v proteomu hydrogenosomů trichomonád kultivovaných za podmínek s omezenou dostupností železa bylo provedeno pomocí relativní kvantifikace proteinů na základě značení peptidů isobarickými značkami iTRAQ. Identifikováno bylo 179 proteinů, z nichž bylo 58 silně ovlivněných dostupností železa.