

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program
Parazitologie

Petr Jedelský

Proteomická analýza organel parazitických protist
Organelle proteomics of parasitic protists

Disertační práce

Vedoucí práce:
Prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 08. 2016

Prohlášení podle čl. 23 odst. 4 Pravidel pro organizaci výuky Přírodovědecké fakulty:

Jedelský P. L., Doležal P., Rada P., Pyrih J., Šmíd O., Hrdý I., Šedinová M., Marcinčíková M., Voleman L., Perry A., Campo Beltran N., Lithgow T. & Tachezy J. The Minimal Proteome in the Reduced Mitochondrion of the Parasitic Protist *Giardia intestinalis*. PLoS ONE, 2011, vol. 6. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0017285

Rada P., Doležal P., **Jedelský P. L.**, Bursac D., Perry A., Šedinová M., Smíšková K., Novotný M., Campo Beltran N., Hrdý I., Lithgow T. & Tachezy J. The Core Components of Organelle Biogenesis and Membrane Transport in the Hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. PLoS ONE, 2011, vol. 6. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0024428

Campo Beltran N., Horváthová L., **Jedelský P. L.**, Šedinová M., Rada P., Marcinčíková M., Hrdý I. & Tachezy J. Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. PLoS ONE, 2013, vol. 8. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0065148

Jako korespondující autor předložených publikací konstatuji, že měl Petr Jedelský zásadní roli při návrhu a provedení proteomických experimentů a při vyhodnocování proteomických dat.

prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Financování

Tato práce vznikla díky finanční podpoře Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (grant č. 178/2006 B BIO), Grantové agentury České republiky (granty č. 204/09/H084, 204/06/0947, P305/10/0651) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekty MSM0021620858, LC07032).

OBSAH

Abstrakt	11
Abstract	12
Úvod	13
Proteomika	14
Metody diferenciální proteomiky	16
Metody proteomické analýzy subcelulárních frakcí a organel	16
Přehled aplikací proteomických přístupů pro studium organel parazitických protist	17
Excavata	17
Chromalveolata	18
Amoebozoa	20
Diskuse	21
Seznam citované literatury	25
Cíle vlastní práce	32
Závěr	33
Seznam příloh	35

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 následné 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 redukcí 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.

Abstract

Advances in DNA sequencing led to a technological breakthrough, that allowed analysis of complete genomes including those of parasitic protists *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*. These organisms are studied not only for their clinical importance, but also from the evolutionary point of view for their adaptation to anaerobic environment. Genome sequencing and annotations of predicted proteins alone did not bring detail view into functioning of their mitochondrion related organelles - in *G. intestinalis* mitosomes, not-participating in energetic metabolism, in *T. vaginalis* hydrogenosomes, producing molecular hydrogen and ATP by means of substrate phosphorylation. Traditional methods based on a fractionation by ultracentrifuging in density gradient and subsequent biochemical and enzymological analyzes were extended by one- and two-dimensional electrophoresis with subsequent identification of proteins by mass spectrometry.

Methods of multidimensional separation of peptides produced by specific proteolysis of a complex mixture and subsequent tandem mass spectrometry were used to identify subproteome of respective organelle.

Isobaric reagents iTRAQ were used in mitosomal proteome of *G. intestinalis* analysis to probe distribution of respective proteins in two gradient ultracentrifugation fractions most enriched with mitosomes. This approach allowed reduction of numbers of candidate proteins for further bioinformatic and localising experiments. Mitosomal localization of twenty proteins was confirmed.

Hydrogenosomal membrane proteins from *T. vaginalis* were purified by Triton X-114 phase separation. SDS-PAGE and in-gel digestion was followed by LC-MALDI. Information on proteins that do not have number of copies comparable to metabolic enzymes and that cannot be easily separated by conventional isoelectric focusing was gained. Proteins engaged in organelle biogenesis and membrane transport were identified by this approach.

Relative quantitation with tagging by iTRAQ reagent was used to study hydrogenosomal protein expression in trichomonads cultivated in iron restricted conditions. 179 proteins were identified, of which 58 were strongly influenced by availability of iron.

Úvod

Studium parazitických protist má v České republice dlouhou tradici. Z objevů podstatných pro tuto disertační práci je nezbytné vyzdvihnout práci Apoleny a Jiřího Čerkasovových, kteří spolu s dalšími spolupracovníky v sedmdesátých letech přispěli zásadními experimenty k charakterizaci metabolismu *Tritrichomonas foetus* (Čerkasovová & Čerkasov 1974, Čerkasovová et al. 1976), a významnou měrou se podíleli na charakterizaci elektrondenzní organely, která díky své produkci vodíku získala pojmenování hydrogenosom (Müller 1973, Lindmark & Müller 1973).

U eukaryot žijících za anaerobních podmínek, jako jsou např. trichomonády nebo *Giardia*, došlo, v důsledku adaptace na jiný způsob metabolismu, než je aerobní glykolýza, kromě redukce mitochondriálních metabolických drah a mitochondriálního genomu i k morfologickým změnám organel, které zastřely jejich mitochondriální původ, který byl prokázán na základě genomových dat. Müller et al. (2012) biochemické a evoluční aspekty anaerobního metabolismu u eukaryot a vlastnosti organel mitochondriálního původu shrnují v rozsáhlém přehledovém článku. Müller et al. (2012) rozlišují pět tříd mitochondrií a organel mitochondriálního původu. Tabulka I. shrnuje obvyklé charakteristiky jednotlivých tříd a tabulka II. uvádí přehled jednotlivých typů organel mitochondriálního původu u superskupin.

Tabulka I. Rozdělení organel mitochondriálního původu do tříd podle funkční charakteristiky. Symbol plus označuje přítomnost a minus nepřítomnost metabolických drah či DNA. Podle Müller et al. (2012).

Třída	Popis	O ₂	H ₂	DNA	ATP
I	aerobní mitochondrie, O ₂ jako jediný terminální akceptor elektronů	+	-	+	+
II	anaerobní mitochondrie, neprodukují H ₂ , mohou používat jiný terminální akceptor elektronů než O ₂	+	-	+	+
III	mitochondrie produkující H ₂ , obsahují dýchací řetězec	-	+	+	+
IV	hydrogenosomy, neobsahují dýchací řetězec	-	+	-	+
V	mitosomy, neprodukují ATP	-	-	-	-

Tabulka II. Přítomnost různých typů organel mitochondriálního původu u zástupců jednotlivých superskupin. Podle Müller et al. (2012).

Superskupina	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V
Opithokonta	+	+		+	
Amoebozoa	+			+	+
Chromalveolata		+	+		+
Excavata	+	+		+	+
Rhizaria					
Archaeplastida		+			

Tato práce se zabývá studiem proteomů organel typů IV a V, a to zejména u modelových organismů *Trichomonas vaginalis* (hydrogenosom, typ IV) a *Giardia intestinalis* (mitosom, typ V), navazuje na tradiční techniky založené na subcelulární frakcionaci ultracentrifugací a charakterizaci morfologie izolovaných organel pomocí transmisní elektronové mikroskopie, western blottu a enzymatické detekce, které rozšiřuje o využití vícerozměrných elektroforetických a chromatografických separačních metod s následnou detekcí a identifikací proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Nezbytným předpokladem pro tuto práci bylo dokončení sekvenování genomů *Trichomonas vaginalis* (Carlton et al., 2007) a *Giardia intestinalis* (Morrison et al., 2007).

Proteomika

Analýza proteinů a jejich směsí prožila během dvacátého století bouřlivý vývoj. Samotnému vzniku proteomiky předcházely významné objevy týkající se struktury proteinů, ale také rozvoj separačních metod, zejména elektroforetických a chromatografických. Zlatým standardem se stala elektroforéza v denaturujícím prostředí dodecylsiranu sodného s diskontinuálním uspořádáním a tris-glycinovým pufrem podle Laemmliho (1970). Vysokého rozlišení se nejlépe dá dosáhnout kombinací ortgonálních metod, které v praxi nejčastěji představuje předřazení isoelektrické fokusace. Ta byla zpočátku prováděna s využitím pH gradientu formovaného v elektrickém poli pomocí směsi amfolytů, později gradientu imobilizovaného v akrylamidovém gelu tvořeného vhodnými deriváty akrylamidu s disociovatelnými funkčními skupinami. Vysokého rozlišení a vysoké citlivosti dosáhl O'Farrel (1975) s použitím radiodetekce. Postupem času se vyvinuly metody barvení proteinů a práce s takovou kvantitou, která umožňuje identifikaci proteinů (shrnuto v review Westermeier & Görg 2011).

Identifikace proteinů na základě sekvenční informace a ne pouze fyzikálně chemických vlastností (např. pI, relativní molekulová hmotnost) odvozených z pohyblivosti při elektroforetické či chromatografické separaci, popř. antigenních vlastností nebo enzymové aktivity, byla technologicky dlouho limitována na možnost N-terminálního sekvencování metodou Edmanova odbourávání, která je časově a finančně náročná. Automatické sekvenátory měly délku cyklu přibližně hodinu na jednu identifikovanou aminokyselinu a s přibývajícím počtem cyklů kvalita signálu rapidně klesala.

Rozvoj metod hmotnostní spektrometrie s ionizací bombardováním těžkými atomy sliboval možnost zrychlení tohoto procesu, neboť umožnilo identifikaci proteinů na základě hmotnosti peptidů vzniklých při specifické proteolýze studovaného proteinu (Henzel et al. 2003), ale skutečný technologický zlom přineslo zpřístupnění techniky ionizace označované jako MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionization, Karas et al. 1987, Tanaka et al. 1987) a ionizační techniky nazvané elektrosprej (Fenn et al. 1989)¹. Rapidní vývoj a dostupnost přístrojového vybavení umožnily naplnit ambici charakterizovat proteinový komplement DNA, který začal být označován jako proteom (Wilkins et al. 1996), a jehož studiem se zabývá specifické vědecké odvětví nazývané proteomika.

Proteomika využívá řadu specifických termínů:

Bottom-up proteomika - označuje přístup k analýze proteinu, při němž se generují proteolytické štěpy, které se dále charakterizují. Tento přístup nevyžaduje složitou instrumentaci, avšak přichází o velkou část informace např. o posttranslačních modifikacích či o přítomnosti směsi proteoforem či degradačních produktů.

Top-down proteomika - přístup, při němž se intaktní protein analyzuje v hmotnostním spektrometru typu iontové pasti a teprve při této analýze se provádí fragmentace.

Shot-gun proteomika - používá se pro takové analýzy, u nichž se komplexní směs proteinů štěpí proteasou, vzniklé peptidy se separují (obvykle vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií - HPLC) a jejich identita se určuje hmotnostní spektrometrií. Představitelem této rodiny technik je např. MudPIT (Washburn et al. 2001, Wolters et al. 2001).

Diferenciální proteomika - proteomika zaměřená na zjišťování rozdílů v kvantitě a přítomnosti proteinů.

¹ Objev těchto ionizačních technik byl oceněn Nobelovou cenou za chemii, již v roce 2002 obdrželi John Bennett Fenn (1917-2010) a Koichi Tanaka (*1959).

Metody diferenciální proteomiky

Základním postupem pro diferenciální proteomickou analýzu je provedení série dvourozměrných elektroforéz a následné analýzy obrazu vedoucí k odstranění artefaktů, kterými jsou jednotlivé gely zatíženy, a následně k porovnání rozdílů v přítomnosti, poloze a intenzitě jednotlivých skvrn. Specifickým přístupem je metoda DIGE, při níž se porovnávají vzorky chemicky nejprve modifikují kovalentním navázáním fluoroforů na molekuly analyzovaných proteinů a následně se smísí a separace se provádí se směsí. Používané fluorofory neovlivňují mobilitu proteinů, ale liší se ve spektrálních vlastnostech. Zastoupení konkrétní varianty proteinu ve směsi je dáno poměrem signálů použitých fluoroforů.

Diferenciální proteomická analýza se dá provádět i s tzv. shot-gun přístupem. Při vhodně použité metodice spojení HPLC a hmotnostní spektrometrie je možné kvantifikaci jednotlivých peptidů provádět i bez značení. S ionizací MALDI takový postup nejde použít a musí se kvantifikace provádět pomocí vhodného značení. Značení stabilními izotopy je možné provádět metabolicky inkorporací aminokyselin se zastoupením těžkých izotopů uhlíku a dusíku (SILAC), nebo proteiny či spíše peptidy modifikovat až následně, tedy postupovat podobně jako u diferenciální gelové elektroforézy DIGE. Průkopnická práce byla prováděna se značením ICAT, které využívalo rozdílné sondy, které se lišily zastoupením izotopů vodíku ^1H a ^2D , později se začaly používat sondy značené stabilním izotopem uhlíku ^{13}C (Hansen et al. 2003). Ve všech těchto jmenovaných případech se různě značené varianty chovají při separačních krocích obdobně, avšak jsou odlišeny hmotnostním spektrometrem a z intenzity signálů lze dovodit vzájemný poměr složek. Tyto přístupy jsou omezeny na dvě či tři možné varianty sondy. Čtyři nebo dokonce osm paralelních vzorků je možno analyzovat pomocí isobarických značek iTRAQ, přičemž signály odlišně označených peptidů v primárním hmotnostním spektru splývají a udržují tím vysoký odstup signálu od šumu, a samotnou kvantitativní informaci dávají až ve spektru fragmentů (Ross et al. 2004).

Metody proteomické analýzy subcelulárních frakcí a organel

Analýza subcelulárních komponent obvykle vychází z frakcionace pomocí diferenciální a gradientové centrifugace. Dále typicky následuje buď dvourozměrná elektroforéza a identifikace proteinů pomocí digesce v gelu a peptidového mapování či tandemové hmotnostní spektrometrie, nebo přístup bez gelu pomocí shot-gun proteomiky: digesce v roztoku, separace peptidů pomocí HPLC a identifikace (např. přístup MudPIT). Tematiku blíže rozebírají review Huber et al. (2003), Gatto et al. (2010), Duclos & Desjardins (2011) či Drissi et al. (2013). Při vysoké (předpokládané) čistotě lze zvolit možnost vyhodnotit jedinou čistou frakci. Prakticky však o čistotě frakce není snadné rozhodnout bez detailní analýzy ostatních frakcí, např. je možné subtrahovat podмноžinu proteinů nalezených při analýze frakce s menším stupněm načištění studované organely.

Diferenciální proteomiku s přístupem shot-gun lze využít k analýze několika subcelulárních frakcí s odlišným zastoupením různých organel, přičemž získaná data se podrobí jednak statistickému zpracování s analýzou principiální komponenty, jednak se porovnájí s distribucí známých markerů jednotlivých organel. Princip spočívá v tom, že proteiny vázané na konkrétní organelu jsou separovány společně, tudíž je jejich výskyt obdobný. Tímto způsobem lze usuzovat na lokalizaci proteinů, které dosud nebyly zkoumány (Dunkley et al. 2004, Dunkley et al. 2006, Sadowski et al. 2006, Trotter et al. 2010, Nikolovski et al. 2012). Vyhodnocení subcelulární lokalizace je možné provádět pomocí specializovaných softwarových nástrojů (Gatto et al. 2014).

Přehled aplikací proteomických přístupů pro studium organel parazitických protist

Excavata

De Jesus et al. (2007) publikovali analýzu solubilních proteinů *Trichomonas vaginalis* pomocí dvoudimenzionální elektroforézy s využitím rozsahu isoelektrické fokusace s rozmezím pH od 4 do 7. Pomocí peptidového mapování a tandemové hmotnostní spektrometrie určili identitu 116 skvrn, v nichž bylo zastoupeno 67 unikátních proteinů. Autoři v článku poukazují na specifické metabolické dráhy lokalizované v hydrogenosomu, avšak studie identifikovala jen minimum hydrogenosomálních proteinů.

Lauwaet et al. (2011) k proteomické analýze basálních tělísek *G. intestinalis* využili frakcionaci buněk ultracentrifugací v hustotním gradientu a k analýze vybraných frakcí použili metodiku označovanou jako MudPIT (Wolters et al. 2001). Pomocí této metodiky identifikovali ve třech nezávislých experimentech celkem 21266 peptidů a 363 proteinů, které byly zastoupeny alespoň dvěma peptidy. Pouze 38 proteinů z tohoto počtu bylo homologních s proteiny lokalizovanými v bazálních tělískách *Chlamydomonas* a *Tetrahymena* nebo v lidských centrosomech.

Hagen et al. (2011) se zaměřili na analýzu proteinů ventrálního disku a laterálního hřebenu *G. intestinalis* získaných po rozpuštění buněčných membrán detergentem Triton X-100 a narušení mikrotubulů taxolem. U proteinů identifikovaných hmotnostní spektrometrií ověřovali lokalizaci *in vivo* a našli 18 nových proteinů asociovaných s diskem.

Zákoucká (2014) se zabývala optimalizací techniky pro studium substrátů mitochondriální procesující peptidasy (MPP) v hydrogenosomech *T. vaginalis*. Proteiny izolované z hydrogenosomální frakce jsou modifikovány činidlem, které maskuje všechny primární aminoskupiny. Následně se provede specifická proteolýza např. trypsinem. Nově vzniklé aminoskupiny se modifikují činidlem, které na ně připojí značku s biotinem, díky níž

mohou být ze směsi odstraněny pomocí afinitní chromatografie. Eluát obsahuje peptidy, které představovaly původní N-konce izolovaných peptidů. Při analýze hydrogenosomální frakce bylo identifikováno 88 proteinů.

Wampfler et al. (2014) u *G. intestinalis* analyzovali periferní váčky (PV) a váčky specifické pro encystaci (ESV), které se účastní sekrece materiálu při encystaci. Pro separaci periferních váček použili třídění pomocí průtokové cytometrie. Pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovali 1059 předpokládaných kontaminant, které našli v obou izolovaných frakcích, a také 72 proteinů specifických pro frakci ESV a 82 pro frakci PV.

Martincová et al. 2015 provedli analýzu mitosomálního proteomu *Giardia intestinalis*, resp. membránových proteinových komplexů, které získali afinitní purifikací po *in vivo* biotinylování proteinů a chemickém zesíťování. Výsledkem této práce bylo deset nově nalezených mitosomálních proteinů.

Chromalveolata

Kawase et al. (2007) provedli pomocí dvoudimenzionální elektroforézy analýzu proteinů sekretovaných *Toxoplasma gondii* při exocytóze závislé na vápníku vyvolané arteficiálním ionoforem. Vedle známých mikronemálních proteinů autoři identifikovali nové sekretované proteiny dosud známé u plasmodia.

Di Girolamo et al. (2008) se zabývali analýzou proteinů obsažených v membránách rezistentních k detergentům u erytrocytů nakažených *Plasmodium berghei*. Po lyzi krvinek byly membrány extrahovány detergentem Triton X-100 a separovány ultracentrifugací v sacharosovém hustotním gradientu. Následně byly proteiny separovány dvourozměrnou elektroforézou. Kromě erytrocytárních proteinů byla identifikována i řada proteinů, jimiž plasmodium modifikuje membránu erytrocytu.

Lamarque et al. (2008) identifikovali 116 proteinů ve frakci obohacené o potravní vakuoly *Plasmodium falciparum*. Mezi nalezenými proteiny byly již známé proteiny potravní vakuly, ale také proteiny účastnící se vesikulárního transportu a rovněž povrchové proteiny. Autoři identifikovali 32 dosud hypotetických proteinů.

Lal et al. (2009) analyzovali mikronemální proteiny ookinet *Plasmodium berghei*. Materiál získaný centrifugací v sacharosovém hustotním gradientu analyzovali jednak pomocí gelové elektroforézy, jejíž pomocí identifikovali abundantní proteiny, jednak pomocí multidimenzionální technologie identifikace proteinů MudPIT, což umožnilo identifikaci 345 proteinů.

Brotherton et al. (2012) se u *Leishmania infantum* zaměřili na studium transmembránových proteinů a proteinů s velikostí více než 100 kDa, které většinou

dvoudimenzionální gelová elektroforéza nepostihne. Výsledkem je identifikace 194 proteinů s alespoň jednou transmembránovou doménou a 171 proteinů o velikosti větší než 100 kDa u promastigotního stádia a 66 proteinů s alespoň jednou transmembránovou doménou a 154 proteinů o velikosti nad 100 kDa u amastigotního stádia žijícího v savcích.

Philipp et al. (2012) pro analýzu membránových proteinů erytrocytů nakažených *Plasmodium falciparum* zvolili dvoudimenzionální elektroforézu s použitím kationických detergentů v první dimenzi a klasické SDS elektroforézy v druhé dimenzi. Tímto způsobem získali lepší obrázek o erytrocytárních i plasmodiových proteinech.

Oehring et al. (2012) se zabývali jaderným proteomem *P. falciparum*. Jádra získaná centrifugací po hypotonické lyzi buněk dále extrahovali pufrý o různé iontové síle a detergenty. Celkově pomocí shot-gun techniky MudPIT identifikovali 1518 proteinů, práce detailně popisuje jejich zastoupení v různých vývojových stádiích.

Lindner et al. (2013) se zabývali analýzou povrchových proteinů sporozoitů *P. falciparum* a *P. yoelii* izolovaných ze slinných žláz vektora. Povrchové proteiny sporozoitů autoři analyzovali na základě biotinylace dostupných funkčních skupin na intaktních sporozoittech. Celkový proteom byl analyzován kombinací SDS-PAGE a LC-MS. Pro *P. falciparum* bylo identifikováno 1991 proteinů a pro *P. yoelii* 1876. Mezi povrchovými proteiny byly identifikovány takové, které se účastní funkce glideosomu, buněčné signalizace a apikální sekrece.

Lynn et al. 2013 prováděli diferenciální proteomickou analýzu membránových proteinů promastigotního a amastigotního stádia *Leishmania mexicana* a *L. infantum* získaných ultracentrifugací v hustotním gradientu. Autoři identifikovali proteiny, jejichž zastoupení se výrazně liší v závislosti na životním stádiu.

Santarém et al. 2013 a Braga et al. 2015 využili proteomický přístup ke zmapování tzv. exoproteomu, tedy exkretovaných proteinů, u *Leishmania infantum*. Braga et al. 2015 ze supernatantu po šestihodinové kultivaci izolovali proteiny a identifikovali 102 proteinů.

Jamdhade et al. 2015 analyzovali glykosomální frakci získanou z promastigotů *Leishmania donovani* a identifikovali 1355 proteinů, z nichž 566 představuje hypotetické proteiny bez známé funkce.

Membránové proteiny *Leishmania donovani* získané karbonátovou extrakcí analyzovali Kumar et al. 2015. Pomocí dvourozměrné elektroforézy se podařilo rozdělit 95 stop, z nichž se 72 podařilo identifikovat hmotnostní spektrometrií.

Suárez-Cortes et al. (2016) studovali proteom osmiofilních tělísek gametocytů *P. falciparum* na základě subtrakce dat získaných analýzou buněčné linie, která v důsledku mutace není schopna osmiofilní tělíska vůbec vytvořit, v porovnání s normální buněčnou linií. U čtyř identifikovaných kandidátů byla ověřena lokalizace v osmiofilních těliscích.

Amoebozoa

Leitsch et al. 2006 na gelech z dvourozměrné elektroforézy porovnali proteom *Entamoeba histolitica* a *E. dispar* s cílem vyhledat faktory způsobující zásadní rozdíl v patogenicitě. Srovnáním gelů ukázali, že rozdíl v proteinovém profilu je enormní a podporuje klasifikaci studovaných organismů jako oddělených biologických druhů.

Mi-ichi et al. (2009) izolovali z *E. histolytica* frakci bohatou na mitosomy pomocí centrifugace v diskontinuálním gradientu. Následná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovala 95 proteinů s potenciální lokalizací v mitosomu.

Biller et al. (2014) se zaměřili na studium povrchových proteinů *E. histolytica* pomocí biotinylace. Proteiny izolované afinitní chromatografií byly rozděleny SDS-PAGE a po digesci v gelu byly získané peptidy analyzovány LC-MS. Autoři identifikovali 693 potenciálních povrchových proteinů, z nichž více než čtvrtina měla predikovanou transmembránovou doménu či jiný signál.

Perdomo et al. 2015 uvádí poznatky z analýzy membránových komponent *E. histolitica*. I přes prezicní postup se nepodařilo pomocí manitolového a sacharosového gradientu subcelulární komponenty rozdělit na více než tři frakce a získat čisté frakce organel. Analýzou endomembránové frakce dosáhli identifikace 1531 proteinů, včetně stanovení kvantity.

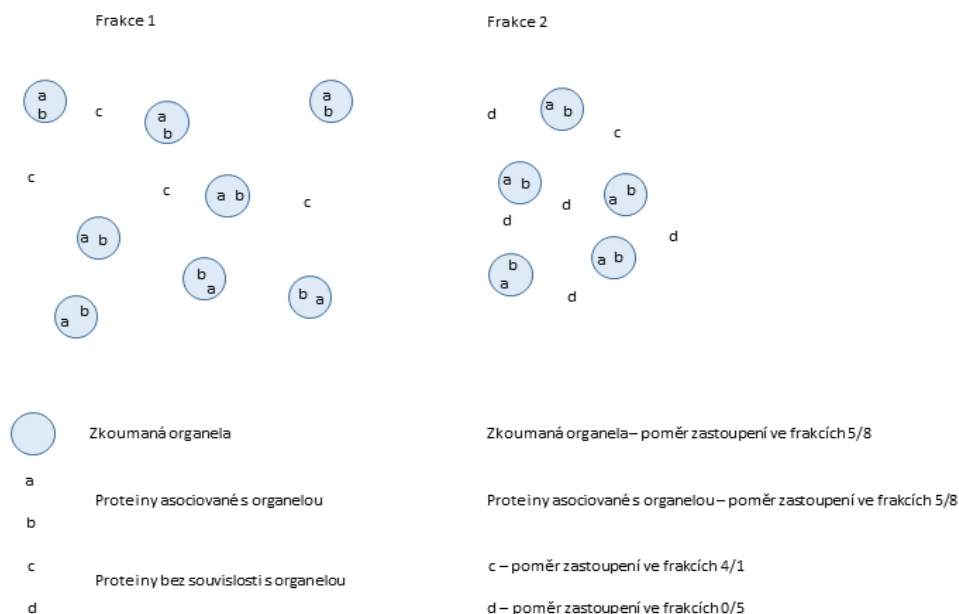
Diskuse

Naše publikované články představují výběr z úspěšných experimentů a dokončených studií. V širším rozsahu byly prováděny experimenty nejen na organismech *T. vaginalis*, *G. intestinalis*, které jsou prezentovány v publikacích, ale také na dalších organismech: *Mastigamoeba balamuthi* ve spolupráci s Evou Nývltovou (nepublikovaná data), *Cryptosporidium parvum* ve spolupráci s laboratoří Dr. Putignani, Řím (data publikována v databázi CryptoDB, <http://cryptodb.org/cryptodb/>), *Trachipleistophora hominis* ve spolupráci s laboratoří prof. Embley, Newcastle (nepublikovaná data).

Východiskem pro proteomické analýzy mitosomů *G. intestinalis* byla metodika přípravy subcelulárních frakcí obohacených o mitosomy vypracovaná Dr. Petrem Radou (Rada 2011). Při prvotních analýzách frakce považované na základě western blottu i snímků z transmisní elektronové mikroskopie za vysoce čistou, byla výsledkem analýzy identifikace několika stovek proteinů, s vysokým zastoupením proteinů, u kterých je známa funkce i lokalizace (např. různé varianty Giardinu). Naděje vzbuzovaly stovky proteinů, u kterých v dané době nebyla známa funkce a byly v GiardiaDB anotovány jako unknown protein. Při bližším pohledu na data bylo zřejmé, že se v nich sice mohou vyskytovat zcela neznámé mitosomální proteiny, ale jejich ověřování by nebylo technicky možné vzhledem k velkému počtu potenciálních kandidátů. Problematiku chybných identifikací shrnuje review Drissi et al. 2013. Pro nalezení alternativní cesty byla inspirací práce Gilchrist et al. 2006 prezentovaná na konferenci HUPO 2007 v Soulu. S ohledem na dostupné technické možnosti nemohla být zvolena metoda počítání peptidů, která není vhodná pro platformu MALDI-TOF/TOF. Pro dostupné technické vybavení byla vhodná varianta kvantifikace založená na značení peptidových frakcí, přičemž byla zvolena varianta značení peptidů reagensy iTRAQ po štěpení proteinů získaných z diferenciální a gradientové ultracentrifugace a následné využití isoelektrické fokusace v gelu s imobilizovaným gradientem pH a následně LC-MALDI-TOF/TOF. Obdobný postup byl použit v pracích Dunkley et al. 2004, Dunkley et al. 2006, Sadowski et al. 2006, Tan et al. 2009 a je označován jako LOPIT.

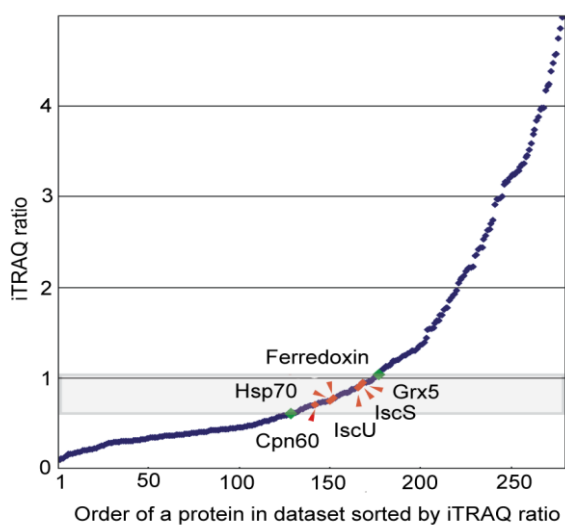
V našem experimentu šlo pouze o analýzu mitosomů, proto bylo vhodné použít pouze dvě frakce s největším signálem mitosomálního markeru podle western blottu. Doplnění další frakce by vedlo ke zředění mitosomálních proteinů a zvýšení počtu různých kontaminantů. Za použití pouhých dvou frakcí odpadá statistická analýza principální komponenty a situace se zjednodušuje na srovnání rozdělovacích koeficientů zjištěných pro jednotlivé proteiny. Obrázek č. 1 znázorňuje definici rozdělovacího koeficientu v tomto experimentu a demonstruje, že proteiny vyskytující se v rámci kompartmentu (který zůstane v průběhu separace zachován), budou mít podobnou hodnotu rozdělovacího koeficientu.

Samotná podobnost rozdělovacího koeficientu však není důkazem kolokalizace, a to ani v případě, že je podobný koeficient zjištěn nezávislým měřením.



Obr. 1 Znárodnění distribuce proteinů asociovaných se zkoumanou organelou a proteinů nezávislých na organele.

Obrázek č. 2 ukazuje distribuci rozdělovacích koeficientů proteinů identifikovaných ve frakcích bohatých na mitosomy v rámci jednoho proteomického experimentu. Je z něj dobře patrné, že související proteiny mají v rámci experimentální chyby velmi podobnou distribuci ve frakcích.



Obr. 2 Distribuce rozdělovacích koeficientů proteinů identifikovaných ve frakcích bohatých na mitosomy. Modře - jednotlivé proteiny, červeně - známé mitosomální proteiny, zeleně - ohraničení arbitrárního rozsahu koeficientů kandidátních proteinů. Převzato z Jedelský et al. (2011).

Do analýzy jsme tedy zahrnuli pouze dvě frakce s nejvyšším obohacením o mitosomy, vybrané na základě western blottingu s protilátkou proti známému mitosomálnímu markeru IscU. Pro relativní kvantifikaci proteinů jsme použili metodu značení peptidů pomocí isobarických značek iTRAQ, které byly jedinou vhodnou variantou vzhledem k dostupné instrumentaci pro hmotnostní spektrometrii. Aplikací postupu obdobného technice LOPIT na mitosomální frakce se podařilo identifikovat 638 proteinů, mezi nimi jsme našli známé mitosomální markery (Cpn60, Hsp70, Ferredoxin, IscU, IscS a Grx5) a od jejich relativního zastoupení jsme odvodili interval, ve kterém je smysluplné detailně studovat proteiny pro další bioinformatické analýzy celkově v počtu 139. Mitosomální lokalizace byla prokázána pomocí fluorescenční mikroskopie u 20 proteinů ze 44 vytipovaných kandidátů (Jedelský et al. 2011). Detailní diskuse biologické relevance je obsažena v pracích Rada (2011) a Pyrih (2014).

Tradiční uspořádání dvourozměrné elektroforézy se ukázalo být nevhodným pro analýzu hydrogenosomálních proteinů. Obecně dvourozměrná elektroforéza selhává u proteinů s vysokým pI a u proteinů hydrofobních. U hydrogenosomů navíc situaci komplikuje značný rozdíl v koncentraci jednotlivých proteinů. Při analýze pak většina signálů pochází od majoritních proteinů, dokonce ani omezení výběru známých převládajících peptidů pro tandemová hmotnostní spektra nepřinesla vyřešení problému, neboť silný signál pochází i od různých degradačních produktů a modifikací těchto peptidů. Při experimentech zaměřených na membránové transportní proteiny byla proto zvolena možnost extrahovat hydrofobní proteiny extrakcí a fázovou separací pomocí detergentu Triton X-114. Takto získaná frakce dále byla separována SDS-PAGE a připravena pro LC-MALDI. Výsledný set identifikovaných proteinů byl dále podroben rozsáhlé bioinformatické analýze zaměřené na identifikaci transmembránových domén. 68 potenciálních membránových proteinů bylo takto identifikováno (Rada et al. 2011). Biologickou relevanci těchto výsledků dále diskutuje Rada (2011).

Zavedené protokoly pro kultivaci trichomonád za podmínek s nedostatkem železa použité v transkriptomické analýze (Horváthová et al. 2012) společně s protokoly pro přípravu hydrogenosomů (Rada et al. 2011) byly použity pro přípravu výchozích subcelulárních frakcí bohatých na hydrogenosomy. Peptidy získané specifickou proteolýzou byly označeny reagensy iTRAQ a po separaci isoelektrickou fokusací a HPLC byly podrobeny hmotnostně-spektrometrické analýze. Vzorky z pěti nezávislých biologických experimentů poskytly více než 64 tis. fragmentačních spekter. Celkem bylo identifikováno 631 proteinů. Spektra přiřazená více proteinům nebyla zahrnuta do kvantifikace. Relativní kvantita proteinů byla vypočítána z fragmentačních spekter. Průměrná hodnota pro každý protein byla vypočítána ze všech dostupných iTRAQ párů. Proteiny s průměrnou hodnotou

alespoň ± 2.0 byly považovány za ovlivněné dostupností železa. Kvantifikace byla provedena pro 179 proteinů, z nichž 58 bylo významně ovlivněno dostupností železa. Podmínky s omezenou dostupností železa vedly k relativnímu nárůstu zastoupení u proteinů souvisejících s tvorbou železo-sírných center a naopak k poklesu u proteinů účastnících se metabolismu sacharidů (Campo Beltrán et al. 2013). Biologickou relevanci těchto zjištění dále diskutuje Horváthová (2012).

Diferenciální proteomika hydrogenosomálních proteinů byla dále úspěšně aplikována v případě studia změn proteomu v reakci na selekci metronidazolem při ustanovení částečné rezistence. U řady proteinů bylo zjištěno zvýšení jejich zastoupení u linie rezistentní k metronidazolu více než dvacetinásobně, například u proteinů anotovaných jako hydroxylamin reduktasa TVAG_336320 a TVAG_206500 (Campo Beltrán et al., nepublikované výsledky).

Pro studium proteinů, které jsou po vstupu do hydrogenosomů modifikovány mitochondriální procesující peptidasou, jsem navrhl postup, který je obdobou metodiky navrhované McDonald et al. (2005) pro bottom-up proteomiku pro zjednodušení komplexních směsí. V tomto případě jde o použití specifických chemických modifikací a shot-gun proteomiky k odlišení proteinů vstupujících do hydrogenosomu od proteinů asociovaných zevně, či jen kopurifikujících. Metodika byla pilotně ověřena na malém vzorku a následně optimalizována. Zákoucká (2014) v rámci své diplomové práce při analýze hydrogenosomální frakce identifikovala N-terminální peptidy pocházející z 88 proteinů. Sice u valné většiny N-terminální peptid nese pouze známku odštěpení počátečního methioninu (a ostatně se i s ohledem na známou funkci zjevně jedná o proteiny s hydrogenosomy nesouvisející), ale u řady z nalezených proteinů se jedná o skutečné hydrogenosomální proteiny a zjištěná sekvence odpovídá publikovaným datům. Např. adenylát kinasa UniProt P49983 s peptidem odpovídajícím pozici 10-16 podle otevřeného čtecího rámce je v souladu s publikací Länge et al. (1994). Sukcinyl-CoA ligasa UniProt P53400 s nalezeným peptidem na pozici 10-22 je v souladu se zjištěním Lahti et al. (1994). Mezi identifikovanými proteiny však chybějí abundantní metabolické enzymy. Původní pilotní experiment (Jedelský, nepublikovaná data) prokázal, že dekarboxylující malát dehydrogenasa TVAG_238830 má propeptid o délce 12 aminokyselin, který je odštěpen. Tento výsledek je v souladu s prací Drmota et al. (1996) a byl zjištěn na základě analýzy peptidu, který vznikl štěpením proteasou Asp-N, tedy takovou, která specificky štěpí na N-konci aspartátu. Zákoucká (2014) tento a další peptidy nedetegovala z důvodu proteolýzy trypsinem, který neposkytuje vhodné fragmenty pro měření z důvodu vysokého zastoupení bazických aminokyselin v hydrogenosomálních proteinech.

Seznam citované literatury

Bell AW, Nilsson T, Kearney RE & Bergeron JJ. (2007) The protein microscope: incorporating mass spectrometry into cell biology. *Nat. Methods*.4:783-4.

Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E & Bruchhaus I. (2014) The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Proteomics*. 13:132-44.

Braga MS, Neves LX, Campos JM, Roatt BM, de Oliveira Aguiar Soares RD, Braga SL, de Melo Resende D, Reis AB & Castro-Borges W. (2015) Shotgun proteomics to unravel the complexity of the *Leishmania infantum* exoproteome and the relative abundance of its constituents. *Mol. Biochem. Parasitol.*195:43-53.

Brotherton MC, Racine G, Ouameur AA, Leprohon P, Papadopoulou B & Ouellette M. (2012) Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *J. Proteome Res.* 11:3974-85.

Campo Beltrán N, Horváthová L, Jedelský PL, Šedinová M, Rada P, Marcinčíková M, Hrdý I & Tachezy J. (2013) Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS ONE*. 8:e65148.

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SH, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Daniele Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Rachel Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteu M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu C-L, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik S-B, Logsdon JMJr., Katrin Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu C-H, Lee Y-S, Embley TM, Coombs GH, Mottram GC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM & Johnson PJ (2007) Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. 315: 207-212.

Čerkasovová A & Čerkasov J (1974). Incorporation of ³²P into the microsomal fraction of *Trichomonas foetus*. *Folia Parasitol. (Praha)* 21: 204.

Čerkasovová A, Čerkasov J, Kulda J & Reischig J (1976) Circular DNA and cardiolipin in hydrogenosomes, microbody-lika organelles of trichomonads. *Folia Parasitol. (Praha)* 23: 33-37.

De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Sabóia-Vahia L, González LJ & Barbosa Domont G. (2007) Application of two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *J. Mass Spectrom.*42:1463-73.

De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Soares MJ, Cupolillo E, Fernandes O & Domont GB. (2007) A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics.*7:1961-72.

Di Girolamo F, Raggi C, Birago C, Pizzi E, Lalle M, Picci L, Pace T, Bachi A, de Jong J, Janse CJ, Waters AP, Sargiacomo M & Ponzi M (2008) *Plasmodium* lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and signalling as well as members of the PIR superfamily, potentially implicated in host immune system interactions. *Proteomics.* 8:2500-13.

Drissi R, Dubois ML & Boisvert FM. (2013) Proteomics methods for subcellular proteome analysis. *FEBS J.* 280(22):5626-34.

Drmota T, Proost P, Van Ranst M, Weyda F, Kulda J & Tachezy J. (1996) Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83:221-34.

Duclos S & Desjardins M (2011) Organelle proteomics. *Methods Mol. Biol.*753:117-28.

Dunkley TP1, Watson R, Griffin JL, Dupree P, Lilley KS. (2004) Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT). *Mol. Cell. Proteomics.* 3:1128-34.

Dunkley TP, Hester S, Shadforth IP, Runions J, Weimar T, Hanton SL, Griffin JL, Bessant C, Brandizzi F, Hawes C, Watson RB, Dupree P & Lilley KS. (2006) Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*103:6518-23.

Emery SJ, Lacey E & Haynes PA. (2016) Quantitative proteomics in *Giardia duodenalis*-Achievements and challenges. *Mol. Biochem. Parasitol.* S0166-6851:30091-3.

Emery SJ, van Sluyter S & Haynes PA. (2014) Proteomic analysis in *Giardia duodenalis* yields insights into strain virulence and antigenic variation. *Proteomics.* 14:2523-34.

Faso C, Bischof S & Hehl AB. (2013) The proteome landscape of *Giardia lamblia* encystation. *PLoS One.* 8:e83207.

Gatto L, Vizcaíno JA, Hermjakob H, Huber W, Lilley KS. (2010) Organelle proteomics experimental designs and analysis. *Proteomics.* 10:3957-69.

Gatto L, Breckels LM, Burger T, Nightingale DJ, Groen AJ, Campbell C, Nikolovski N, Mulvey CM, Christoforou A, Ferro M & Lilley KS (2014) A foundation for reliable spatial proteomics data analysis. *Mol. Cell. Proteomics*. 13:1937-52.

Gawryluk RM, Chisholm KA, Pinto DM & Gray MW. (2014) Compositional complexity of the mitochondrial proteome of a unicellular eukaryote (*Acanthamoeba castellanii*, supergroup Amoebozoa) rivals that of animals, fungi, and plants. *J. Proteomics*. 109:400-16.

Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T & Bergeron JJ. (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127:1265-81.

Hagen KD, Hirakawa MP, House SA, Schwartz CL, Pham JK, Cipriano MJ, De La Torre MJ, Sek AC, Du G, Forsythe BM & Dawson SC. (2011) Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1442.

Hansen KC, Schmitt-Ulms G, Chalkley RJ, Hirsch J, Baldwin MA & Burlingame AL (2003) Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable ¹³C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol. Cell. Proteomics*. 2:299-314.

Henzel WJ, Watanabe C & Stults JT (2003) Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14:931-42.

Horváthová, L. Iron-sulfur proteins and the role of iron in the gene expression of *Trichomonas vaginalis*. Praha, 2012. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

Horváthová L, Šafariková L, Basler M, Hrdy I, Campo NB, Shin JW, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Tang P & Tachezy J. (2012) Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol. Evol.* 4:1017-29.

Huber LA, Pfaller K & Vietor I (2003) Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ. Res.* 92:962-8.

Huang KY1, Chien KY, Lin YC, Hsu WM, Fong IK, Huang PJ, Yueh YM, Gan RR, Tang P. (2009) A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 104:927-33.

Jamdhade MD, Pawar H, Chavan S, Sathe G, Umasankar PK, Mahale KN, Dixit T, Madugundu AK, Prasad TS, Gowda H, Pandey A & Patole MS. (2015) Comprehensive proteomics analysis of glycosomes from *Leishmania donovani*. *OMICS*. 19:157-70.

- Jedelský PL, Doležal P, Rada P, Pyrih J, Šmíd O, Hrdý I, Šedinová M, Marcinčíková M, Voleman L, Perry A, Campo Beltrán N, Lithgow T & Tachezy J (2011) The Minimal Proteome in the Reduced Mitochondrion of the Parasitic Protist *Giardia intestinalis*. *PLoS ONE*. 6:e17285.
- Karas M, Bachmann D, Bahr U & Hillenkamp F (1987) Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. 78: 53–68.
- Kawase O, Nishikawa Y, Bannai H, Zhang H, Zhang G, Jin S, Lee EG & Xuan X. (2007) Proteomic analysis of calcium-dependent secretion in *Toxoplasma gondii*. *Proteomics*. 7:3718-25.
- Kumar A, Misra P, Sisodia B, Shasany AK, Sundar S & Dube A (2015) Proteomic analyses of membrane enriched proteins of *Leishmania donovani* Indian clinical isolate by mass spectrometry. *Parasitol. Int.* 64(4):36-42.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lahti CJ, Bradley PJ & Johnson PJ (1994) Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:309-18.
- Lal K, Prieto JH, Bromley E, Sanderson SJ, Yates JR 3rd, Wastling JM, Tomley FM & Sinden RE (2009) Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles; an ookinete microneme proteome. *Proteomics*. 9:1142-51.
- Lamarque M, Tastet C, Poncet J, Demetree E, Jouin P, Vial H & Dubremetz JF (2008) Food vacuole proteome of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proteomics Clin. Appl.* 2:1361-74.
- Länge S, Rozario C & Müller M (1994) Primary structure of the hydrogenosomal adenylate kinase of *Trichomonas vaginalis* and its phylogenetic relationships. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:297-308.
- Lauwaet T, Smith AJ, Reiner DS, Romijn EP, Wong CC, Davids BJ, Shah SA, Yates JR 3rd & Gillin FD. (2011) Mining the *Giardia* genome and proteome for conserved and unique basal body proteins. *Int. J. Parasitol.* 41:1079-92.
- Leitsch D, Wilson I, Paschinger K & Duchêne M (2006) Comparison of the proteome profiles of *Entamoeba histolytica* and its close but non-pathogenic relative *Entamoeba dispar*. *Wien Klin. Wochenschr.* 118: 37.

- Lindmark DG & Müller M (1973) Hydrogenosome, a Cytoplasmic Organelle of the Anaerobic Flagellate *Tritrichomonas foetus*, and Its Role in Pyruvate Metabolism. *J. Biol. Chem.* 248: 7724-7728.
- Lindner SE1, Swearingen KE, Harupa A, Vaughan AM, Sinnis P, Moritz RL & Kappe SH (2013) Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. *Mol. Cell. Proteomics.*12:1127-43.
- Lynn MA, Marr AK & McMaster WR (2013) Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. *J. Proteomics.* 82:179-92.
- Martincová E, Voleman L, Pyrih J, Žárský V, Vondráčková P, Kolísko M, Tachezy J & Doležal P (2015) Probing the Biology of *Giardia intestinalis* Mitosomes Using In Vivo Enzymatic Tagging. *Mol. Cell Biol.* 35:2864-74.
- McDonald L, Robertson DH, Hurst JL & Beynon RJ (2005) Positional proteomics: selective recovery and analysis of N-terminal proteolytic peptides. *Nat. Methods.* 2:955-7.
- Mi-ichi F, Abu Yousuf M, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:21731-6.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG & Sogin ML (2007) Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 317: 1921-6.
- Müller M (1973) Peroxisomes and hydrogenosomes in protozoa. *J. Histochem. Cytochem.*21: 955-7.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu R-Y, van der Giezen M, Tielens AGM & Martin WF (2012) Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80:444-495
- Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, Miles GP, Stevens TJ, Dunkley TP, Munro S, Lilley KS & Dupree P. (2012) Putative glycosyltransferases and other plant Golgi apparatus proteins are revealed by LOPIT proteomics. *Plant. Physiol.* 160:1037-51.
- Oehring SC, Woodcroft BJ, Moes S, Wetzell J, Dietz O, Pulfer A, Dekiwadia C, Maeser P, Flueck C, Witmer K, Brancucci NM, Niederwieser I, Jenoe P, Ralph SA, Voss TS (2012)

Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol.* 13:R108.

O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-21.

Perdomo D, Aït-Ammar N, Syan S, Sachse M, Jhingan GD & Guillén N. (2015) Cellular and proteomics analysis of the endomembrane system from the unicellular *Entamoeba histolytica*. *J. Proteomics.* 112:125-40.

Philipp S, Jakoby T, Tholey A, Janssen O, Leippe M & Gelhaus C. (2012) Cationic detergents enable the separation of membrane proteins of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by 2D gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 33:1120-8.

Pyrih, J. Iron containing cofactors in anaerobic parasite *Giardia intestinalis*. Praha, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

Rada, P. Reductive Evolution of Mitochondria - Related Organelles in Anaerobic Protist. Praha, 2011. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

Rada P, Doležal P, Jedelský PL, Bursac D, Perry A, Šedinová M, Smíšková K, Novotný M, Campo Beltrán N, Hrdý I, Lithgow T & Tachezy J. (2011) The Core Components of Organelle Biogenesis and Membrane Transport in the Hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE.* 6:e24428.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A & Pappin DJ (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3: 1154–69.

Sadowski PG, Dunkley TP, Shadforth IP, Dupree P, Bessant C, Griffin JL & Lilley KS. (2006) Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins. *Nat. Protoc.* 1:1778-89.

Schneider RE, Brown MT, Shiflett AM, Dyall SD, Hayes RD, Xie Y, Loo JA, Johnson PJ. (2011) The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes. *Int. J. Parasitol.* 41:1421-34.

Stefanic S, Palm D, Svärd SG & Hehl AB. (2006) Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. *J Biol Chem.* 281:7595-604.

Suárez-Cortes P, Sharma V, Bertuccini L, Costa G, Bannerman NL, Sannella AR, Williamson K, Klemba M, Levashina EA, Lasonder E & Alano P. Comparative proteomics and functional analysis reveal a role of *P. falciparum* osmiophilic bodies in malaria parasite transmission. *Mol. Cell. Proteomics*. pii: mcp.M116.060681.

Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T & Matsuo T (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2: 151–3.

Trotter MW, Sadowski PG, Dunkley TP, Groen AJ & Lilley KS (2010) Improved sub-cellular resolution via simultaneous analysis of organelle proteomics data across varied experimental conditions. *Proteomics*. 10(23):4213-9.

Wampfler PB, Tosevski V, Nanni P, Spycher C & Hehl AB. (2014) Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. *PLoS One*. 9:e94089.

Washburn MP, Wolters D & Yates JR (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19: 242–247.

Westermeier R & Görg A (2011) Two-dimensional electrophoresis in proteomics. *Methods Biochem. Anal.* 54:411-39.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF & Williams KL. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13:19-50.

Wolters DA, Washburn MP & Yates JR 3rd. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 73:5683-90.

Zákoucká, E. Proteomická a bioinformatická charakterizace N-terminálních sekvencí proteinů modifikovaných po importu do hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis*. Praha, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

Cíle vlastní práce

Cílem práce bylo adaptovat techniky pro studium subcelulárních frakcí protist

- analyzovat proteom mitosomů *G. intestinalis*
- analyzovat proteom hydrogenosomálních membrán *T. vaginalis*
- analyzovat změny hydrogenosomálního proteomu *T. vaginalis* vyvolané externími podmínkami

Závěr

Giardia intestinalis má minimalistický genom a mitosomy pozbyly funkcí, které jsou typické pro mitochondrii. Postupem založeným na relativní kvantifikaci proteinů ve frakcích získaných gradientovou ultracentrifugací se podařilo identifikovat proteiny s potenciální mitosomální lokalizací. Aplikace tohoto přístupu usnadnila selekci vhodných kandidátů pro detailní ověřování lokalizace dílčích kandidátů

V proteomu hydrogenosomů *Trichomonas vaginalis* převažuje několik metabolických enzymů, které počtem kopií o několik řádů převyšují ostatní proteiny. Tuto limitaci se pro účely analýzy málo abundantních membránových proteinů podařilo eliminovat využitím fázové separace pomocí Tritonu X-144. Pro analýzu hydrofobních proteinů byl zaveden postup, který minimalizuje ztráty při elektroforetické separaci tím, že místo isoelektrické fokusace používá kombinaci SDS-PAGE, proteolýzy separovaných proteinů a kapalinové chromatografie.

Pro diferenciální analýzu hydrogenosomálních proteinů byl zaveden postup založený na značení peptidů pomocí izobarických značek iTRAQ. Metoda byla použita pro analýzu vlivu dostupnosti železa na proteom hydrogenosomu a vlivu ustanovení rezistence k metronidazolu na složení hydrogenosomálního proteomu.

Pro analýzu hydrogenosomálních proteinů modifikovaných mitochondriální procesující peptidasou byl navržen a ověřen postup umožňující shot-gun proteomickou analýzu zaměřenou na peptidy vzniklé po odštěpení propeptidu.

Seznam příloh