

Oponentský posudek na diplomovou práci

Bc. Eliška Pácalová (2023): Identifikace bazolaterálních lokalizačních motivů urátového transportéru GLUT9 s využitím funkčních studií

Ve své diplomové práci se autorka zaměřila na urátový transportér GLUT9. Posuzovala vliv varianty p.V114L a tří vytipovaných lokalizačních motivů na schopnost transportu urátu a na membránovou lokalizaci. Zaměřila se i na vliv složení inkubačních pufrů na směr transportu urátu.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Protein GLUT9 hraje klíčovou roli v reabsorpci kyseliny močové v ledvinách. Na rozdíl od jiných urátových transportérů se vyskytuje ve dvou izoformách. Jedna je lokalizovaná na apikální membráně a druhá na bazolaterální membráně. Diplomová práce Bc. Elišky Pácalové přispěla k hlubšímu porozumění problematice lokalizace izoform GLUT9, a také k objasnění dopadů vybrané jednonukleotidové záměny a delecí na transport urátu. Závěry diplomové práce jsou ze široka diskutovány a jsou podepřeny velkým množstvím dat, což ukazuje, že autorka odvedla v laboratoři mnoho práce a pečlivě vyhodnocovala jednotlivé experimenty.

Formální kvalita

Formální požadavky na diplomovou práci byly dodrženy. Práce obsahuje kvalitní obrázky, přehledné grafy a tabulky.

Jazyk

Celkově má práce velmi dobrou jazykovou úroveň. Vyskytují se pouze drobné gramatické chyby, jako je používání slova „standartní“ místo „standardní“, či chybění mezer před procenty. Také se někdy opakuje to samé slovo v jedné větě.

Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce

Teoretický úvod

Tato část je velmi zdařile sepsaná, podrobně je popsán protein GLUT9 i lokalizační motivy. Autorka jednoznačně prokázala hlubokou znalost této problematiky. Nechybí ani podkapitoly o kyselině močové a jejím významu. Text dobře doplňují obrázky.

Cíle

Autorka jednoznačně stanovila tři cíle diplomové práce.

Materiál a přístroje

V tabulkách je pečlivě a přehledně vypsáno vše, co bylo pro experimenty potřeba.

Metody

Metody jsou sepsány velmi podrobně a mají logickou strukturu. Nejedná se o pouhý souhrn protokolů, každá podkapitola je vhodně uvedena vysvětlujícím komentářem. Kapitulu o mutagenезi dobře doplňují ilustrační elektroforeogramy.

Výsledky

Jedná se o nejrozsáhlejší kapitolu diplomové práce, ve které jsou výsledky shrnuty přehledně v tabulkách a grafech. Velmi dobře působí i obrázky z mikroskopu.

Diskuze

Autorka velmi podrobně diskutuje výsledky u každého ze tří cílů diplomové práce. Odkazuje se na velké množství literatury, z čehož je patrné, že o vlastních výsledcích kriticky přemýšlí a že má v této problematice značný přehled. Na začátku kapitoly autorka diskutuje také o zvolených metodách.

Závěr

Autorka v této části zdařile shrnuje výsledky diplomové práce.

Díličí připomínky k práci

Pokud jde o zkoumanou alelickou variantu, tak by bylo dobré se držet zavedené HGVS nomenklatury. Varianta V114L by se tedy měla psát jako p.V114L (nebo ještě lépe jako p.Val114Leu), jelikož se jedná o proteinovou sekvenci.

V práci není uvedeno, k jaké záměně v případě p.V114L došlo v kódující sekvenci – z referenční sekvence vyplývá, že se mohlo jednat buď o c.340G>T, nebo c.340G>C.

Na začátku je vysvětleno, že GLUT9L je „dlouhá“ a GLUT9S je „krátká“ varianta proteinu. Těchto zkratk by bylo dobré se držet a nepoužívat různé popisy, jako „dlouhá varianta GLUT9“, či „u L (dlouhé) i S (krátké) varianty“.

Používáním zkratk GLUT9S V114L/V85L či V85L/V114L se autorka zřejmě snažila ukázat, že se jedná o tu samou variantu, jenže to může být trochu matoucí. Vhodnější by bylo pouze „GLUT9S p.V85L“.

V abstraktu je uvedeno, že u lokalizačních motivů byl zjištěn vliv na přenos urátu – bylo by dobré uvést, o jaký vliv šlo.

Není mi úplně jasná věta ze strany 17, že „Jednobodové záměny s vysokým vlivem na hladinu kyseliny močové jsou nejčastěji lokalizovány na intronu 4 a 6 původního genu SLC2A9.“

Na začátku kapitoly 4 Metody by bylo dobré vysvětlit, co jsou u primerů zkratky F a R – vysvětlení je až v kapitole 4.4.2.

V kapitole Metody zřejmě vypadl obrázek číslo 8.

V kapitole 5 Výsledky jsou pasáže, které by se spíš hodily do kapitol Teoretický úvod a Metody. Jednoznačně do Metod patří kapitola 5.1 Výběr lokalizačních motivů k oligonukleotidem řízené mutagenezi.

V tabulkách 25, 27, 29 a 31 („Výsledky funkčních studií aktivity ¹⁴C značeného urátu pro...“) by v levém sloupci mělo být upřesněno, že v případě GLUT9L a GLUT9S byl testován wild type protein. Navíc by měla být u GLUT9S uváděna varianta p.V85L (místo V114L v tabulce 25 a V114L/V85L v tabulce 27).

Poněkud zavádějící je věta v Diskuzi na straně 78, že „U pacientů s touto vzácnou variantou dosud nebyly nalezeny jiné mutace ve známých urátových transportérech vedoucí ke snížení transportní funkce těchto transportérů.“ V diplomové práci nejsou podrobnosti o pacientovi s variantou p.V114L, na které by se dalo odkázat. Navíc tato varianta zatím není v databázi Ensembl, ani není publikovaná v literatuře.

V oddílu Literatura není úplně sjednocené formátování. Někdy jsou uvedeni všichni autoři a jindy pouze první autor.

V Závěru by pro přehlednost bylo možná lepší grafické rozdělení do tří částí, jako je to v kapitole Cíle diplomové práce.

Autorka v Závěru píše o signifikantním snížení transportní funkce, avšak v tomto shrnutí chybí konkrétní čísla a p-hodnoty.

Otázky do diskuze

Na stejné pozici jako p.V114L se nachází varianta p.V114M (rs1398065085, c.340G>A). Jaký vliv na transportní funkci proteinu byste u této varianty teoreticky očekávala?

Byly již detekovány nějaké delece či nesynonymní varianty v oblastech vytipovaných motivů 12LGL14, 33LL34 a 84YIKA87? Je z literatury známo něco o jejich vlivu na transport urátu, případně jaký dopad byste u jednonukleotidových záměn v těchto oblastech očekávala?

Lokalizace izoforem GLUT9 v proximálních tubulech ledvin je dobře prozkoumaná. Je však něco známo o lokalizaci GLUT9 v epitelálních buňkách choroidního plexu?

V Praze dne 18. 5. 2023

MVDr. Kateřina Pavelcová, Ph.D.