

Posudek na diplomovou práci Vojtěcha Žárského

IMPORT PROTEINŮ DO MITOCHONDRÍÍ A PEROXISOMŮ PARAZITICKÝCH PRVOKŮ

Diplomová práce Vojtěcha Žárského je poměrně útlý dokument (59 stran), který ovšem obsahuje tři velmi zajímavé příběhy. Společný jmenovatel těchto tří témat je poměrně široký a obecný - import proteinů do organel prvoků. Odtud pochází také název práce. Práce je psána anglicky. I když se mi doneslo, jak moc na poslední chvíli práce vznikala, musím přiznat, že jsem to na textu nepoznal, snad až na zmíněnou stručnost. Mohla to sice způsobit angličtina, ve které se mi gramatické a slohové nedostatky odhalují obtížněji, ale nemohu než konstatovat, že po formální stránce mohu textu vytknout jen občasné používání zkrácených forem záporu u sloves (don't, aren't), které do takového textu nepatří, a psaní taxonů vyšších než rod kurzívou (Metamonada, Kinetoplastida, Excavata), což se u prvoků nedělá.

Každé ze tří témat je poměrně zásadní: první doklady o existenci peroxisomů u anaerobů, první stopa po přenašeči proteinů přes vnitřní membránu mitosomu giardie a významná korekce poněkud unáhleného a příliš skandálního závěru Pusnik a kol. (2011) ohledně proteinového přenašeče přes vnější membránu trypanosom. Rozpracování prvních dvou pravděpodobně povede k významným objevům a to poslední téma dokonce již vyvrcholilo korespondencí publikovanou v Current Biology s dvouciferným impakt faktorem.

Literární přehled seznamuje čtenáře s importem proteinů do mitochondrií a peroxisomů a poté s organismy, kterých se práce týká. Je stručný, ale nevidím v něm žádné mezery a opomenutí. Mám k této části několik dotazů a poznámek:

1. Strana 9. Jakou citací nebo citacemi by autor doložil tvrzení „Organisms with MRO have a high frequency of lateral gene transfers of metabolism-related genes from anaerobic bacteria.”
2. Strana 14. Do věty „ [In *Archamoebae*] There are free-living genera like *Mastigamoeba* and *Pelomyxa* and parasitic genera *Entamoeba* and *Endolimax*.“ By slovo *like* patřilo i před *Entamoeba*, protože se nejedná o úplný výčet parazitických rodů archamoéb. Které další by mohly být jmenovány?
3. Strana 15. „*Mastigamoeba balamuthi* is a free-living protozoan found in the anoxic mud and fresh waters.“ Nepatřilo by tam spíše „anoxic mud in fresh water“?

Co se týče metodiky, je zřejmé a všichni to víme, že hlavní parketa Vojtěcha Žárského je bioinformatika. Je proto chválné, že se odvážil, nebo byl donucen, přistoupit i k laboratornímu stolu a získat experimentální doklady pro některé své hypotézy. V popisu metod mě zarazilo, že Vojta dělil DNA výhradně na 10% agarózových gelech. To je rozhodně příliš koncentrované a jedná se jistě o chybu.

K výsledkům mám následující komentáře:

4. U obrázku 9. Jak si autor vysvětluje přítomnost dlouhé N-terminální části genu pro Pex16 u mastigamoebí i entamoebí, která není homologní s Pex16 doménou jako C-terminální část.
5. U obrázku 10. Zle z přítomnosti dvou WD40 domén vedle sebe na nekompletním genu usuzovat, že se jedná o Pex7. Pokud se nemýlím, repetice WD40 domén se vyskytují také v mnoha jiných proteinech?
6. Na straně 34. se píše: „We further searched for typical peroxisomal enzymes and metabolite transporters“. Jakou sadu proteinů při tomto hledání používal autor jako „query“. O několik stránek dříve totiž poznamenává, že peroxisomální enzymy nejsou dobré markery, protože složení peroxisomů velmi varíruje i mezi blízkými skupinami. Které proteiny tedy hledal a proč? Pokoušel se detekovat proteiny na základě signálních sekvencí?
7. Obrázek 13 (western blot). Jak je možné, že se v LGF frakci signál vyskytuje ve třech pružích, kdežto v celkovém lyzátu ve dvou? Obsahuje LGF frakce také endoplasmatické retikulum?
8. Obrázek 16 (kolokalizace Tim44 a Cpn60). Vypadá to krásně, ale nemají mitosomy v buňce giardie poněkud nezvyklé rozložení?

Diskuse je věcná, ale místy až příliš stručná a navozuje několik otázek:

9. Jaké molekulární markery endoplasmatického retikula byly u entamoebí nalezeny? Jsou známy proteiny se signálními sekvencemi do endoplasmatického retikula u entamoebí? Jsou známy komponenty transportní mašinerie do ER u entamoebí?
10. Jak je to ER u mastigamoebí? Pozoroval někdo ER u tohoto prvoka? Našli jste v genomu kromě homologu ERAD fungujícím v předpokládaném peroxisómu také skutečný ERAD z endoplasmatického retikula?
11. Na straně 47 konstatuješ, že Pusnik a kol. tvrdí, že ATOM obsahuje POTRA typ aminoterminální domény typickou pro proteiny Omp85 rodiny. Podle Vašeho modelování tam však nic takového není. Protože je to důležité, ale v textu to dále nerozvádíš, nelze se nezeptat, kde tedy udělali dámy a pánové Pusnik a kol. chybu, že tam tuto doménu našli?

Přílohou diplomové práce je publikovaná korespondence z Current Biology. Škoda, že jsem si nemohl dočíst reakci Pusnik a kol. na vaši korespondenci, protože v práci další stránky chybí a v místě, kde píšete tento posudek nemám ke Current Biology přístup. Předpokládám, že Pusnik a kol. nepřichází s žádnými převratnými argumenty ohledně původu ATOMu a zůstávám tak na Vaší straně.

Na závěr tohoto posudku musím konstatovat, že diplomová práce Vojtěcha Žárského splňuje požadavky kladené na tento typ prací a doporučuji ji k obhajobě.

Vladimír Hampel