

Diplomová práce Markéty Petřů “Eukaryotické proteiny v patogenní bakterii *Legionella pneumophila*”

Oponentský posudek

Předkládaná práce si klade za cíl charakterizovat efektorový protein *LpSNARE*, jehož gen se patrně dostal do patogena *Legionella pneumophila* z eukaryotického hostitele. Zkoumaný unikátní protein byl nedávno objeven v laboratoři, kde autorka pracuje, a jeho role ve virulenci bakterie je zatím neprozkoumaná. Konkrétní cíle práce jsou:

- Zavést do laboratoře práci se savčími buňkami a metodiku jejich transfekce.
- Exprimovat a lokalizovat *LpSNARE* v buňce kvasinky a v savčí buňce, s ohledem na schopnost legionely infikovat lidský makrofág.
- Vysledovat případné defekty ve fenotypu modelových organismů produkujících *LpSNARE*.
- Zjistit topologii *LpSNARE*.
- Posledním cílem práce bylo využití technik tkáňových kultur pro expresi dalšího efektoru LncP s následnou analýzou indukovaného fenotypu.

Práce má 80 stran a má klasické členění; obsahuje český a anglický abstrakt, klíčová slova a na konci práce seznam zkratk.

V literárním přehledu se autorka postupně věnuje způsobu, jakým *Legionella* přežívá v eukaryotických buňkách a popisuje membránové oddíly, které při tom bakterie využívá. Dále se dozvídáme o uměle připravených mutantních kmenech, objevu transportního systému bakterie (Dot/Icm) a významu jejich jednotlivých komponent. Autorka se zde podrobně věnuje proteinu DotA. Následně jsou probírány různé substráty transportního systému Dot/Icm, které nesou určité charakteristické rysy, jako Ankyrinové repetice, U-box motiv, Coiled-coil motiv a pozornost je věnována rodině proteinů MCF (Mitochondrial Carrier Family). V další části literárního přehledu je popisován vesikulární transport eukaryotické buňky, zejména role proteinů Rab. Zvláštní pozornost je věnována fúzím membránových váčku. Dále jsou popsány příklady efektorových proteinů ovlivňujících transport v hostitelské buňce (DrrA, LepB, LidA). Literární přehled je psán poměrně srozumitelně, ale vzhledem ke značnému tématickému záběru klade na čtenáře velké nároky. Bylo by možná vhodné pro lepší vysvětlení některých témat použít grafická schémata (např. životní cyklus bakterie *Legionella*, vesikulární transport, působení efektorových proteinů). V této části práce se každopádně projevuje velký teoretický základ autorky, a patrně všechny důležité údaje jsou řádně citovány.

Kapitola Použité metody a materiál vysvětluje značné množství experimentálních přístupů, které jsou většinou velmi podrobně vysvětleny. Na začátku se dozvídáme o programech používaných při bioinformatické práci, dále jsou podrobně popsána a kultivační média a práce s jednotlivými organismy (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, buňky HeLa). Autorka nepracovala přímo s bakterií *Legionella*, tyto pokusy byly prováděny ve spolupracující laboratoři v Austrálii. Dále jsou popsány používané plazmidy, postup při amplifikaci genů a klonování, seznam primerů, transformace bakterií a kvasinek, transfekce HeLa buněk a indukce exprese proteinu *LpSNARE*. Dozvídáme se o metodách selekce linií nesoucích plazmidy. Dále je vysvětlen postup produkce a purifikace *LpSNARE* pro následnou přípravu séra, metody fluorescenčního značení buněčných kompartmentů a imunofluorescence. Za nedostatek pokládám, že není podrobně popsáno, jak byly získány mikroskopické snímky (objektiv, imerze, apod). Další použité metody zahrnují frakcionaci jednotlivých buněčných typů, indukci exprese, imunizaci, růstové testy (u organismů exprimujících *LpSNARE*), invertázový test. Při měření luciferázové aktivity není podrobně popsán použitý přístroj.

Výsledková část je poměrně rozsáhlá, ačkoli je napsána velmi stručně. Vždy je uveden důvod prováděného experimentu a následně předvedeny výsledky. Uvítal bych, kdyby slovní popis experimentu vždy předcházela obrázkům. Provedené pokusy jednoznačně směřují k získání odpovědí na otázky stanovené v úvodu práce.

V rozsáhlé Diskusi jsou předchozí (stručně komentované) výsledky podrobně rozebírány a uváděny do souvislostí s literárními údaji.

Celkově má práce velmi dobrou formální úroveň, výborné provedení obrázků, naprosté minimum překlepů. Práce obsahuje velké množství různorodých výsledků, díky kterým byly vytčené cíle práce v naprosté většině splněny. Práci pokládám za nadprůměrnou a doporučuji jí k obhajobě.

Otázky oponenta:

- 1) Jakým způsobem interferuje protein AnkX s transportem váčků závislém na mikrotubulech bez defektu v organizaci mikrotubulární sítě?
- 2) *Pro přeměnu vakuoly v ER svědčí také změna tloušťky a tedy i lipidového složení membrány (Tilney et al., 2001). Zajímalo by mě, jak byly tyto změny v charakteru membrán zjišťovány.*
- 3) *Po namnožení uvnitř vakuoly bakterie zničí hostitelskou buňku a infikuje další buňky. Jaký je mechanismus úniku bakterie? Účastní se toho protein DotA?*
- 4) Autorka našla nejpodobnější proteiny k LpSNARE v organismech, které běžně *Legionella* nenapadá. Mohla se s nimi bakterie nějak v evoluci setkat?

V Janově dne 11.9.2013

Radovan Fišer

Další připomínky oponenta:

Bohužel hned na začátku úvodu se objevuje poněkud nesrozumitelná věta, což čtenáře překvapí.

Pozdější podrobnější morfoloická pozorování ukázala, že hostitelské organely, jak váčky, tak i mitochondrie, které se objevují kolem vakuoly, jsou s ní spojeny tenkými spoji. Tyto spoje jsou pevné a organely neztrácejí kontakt s vakuolou ani během přípravy fagozomálních frakcí (Tilney et al., 2001). O jaké spoje by se mohlo jednat?

Co se týče RalF, za pomoci delečních analýz bylo zjištěno, že pro transport je nezbytný úsek o dvaceti aminokyselinách na C-konci proteinu s esenciální hydrofobní aminokyselinou na -3 pozici od C-konce (jednoduchým porovnáním se ukázalo, že na -3 nebo -4 pozici se vyskytuje hydrofobní aminokyselina i u jiných Dot/Icm substrátů).

...

Kubori et al. vytvořili sekvenční alignment domnělých translokačních signálů Dot/Icm substrátů a identifikovali dva možné sekvenční motivy. Prvním nejvýraznějším znakem je častý výskyt aminokyselin s malým postranním řetězcem (alanin, glycin, serin 14 a threonin) na -5 až -10 pozici; druhým, přítomnost polárních aminokyselin na -2 až -15 pozici (od C-konce).

Jaké jsou to konkrétní sekvence? Čím jsou tak specifické? Z uvedeného popisu se zdá, že by takové sekvence mohlo mít poměrně velké množství proteinů.

Zkoumaný protein je sfúzován s katalytickou doménou toxinu kalmodulin-dependentní adenylát cyklázy, CyaA, vyizolované z Bordetella pertussis. Aktivita CyaA se projeví jen tehdy, pokud je bakterii sekretována do eukaryotické buňky, kde dojde k interakci s kalmodulinem a následně produkci cyklického AMP (cAMP), jehož nárůst se dá detekovat. Spolehlivost metody je dána tím, že bakteriální buňky neobsahují kalmodulin (Sory a Cornelis, 1994).

V jiné části práce se zjišťuje, že buňky (s LpSNARE) zároveň hynou. Patrně zde hrozí artefakt vlivem deplece ATP. Bylo by potřeba vědět, jaká je reálná koncentrace cAMP v buňkách. Čím je [cAMP] v eukaryotech naopak snižována?

A jak je to s hladinou cAMP v samotné bakterii?

Hladina bakteriálního proteinu SidH je patrně regulována ubiquitinací proteinem LubX. Dá se tedy něco říci o fázích infekce, kdy má SidH ještě hrát roli? Víme, kdy už je odbouráván.

A. castellani a D. discoideum.

Bylo by dobré, alespoň při prvním výskytu, uvést celý vědecký název organismu.

Expresí LncP v kvasinkách vykazovala silný negativní efekt na jejich růst.

...

Zjistilo se také, že mutant (Legionella) v LncP se během infekce množí zcela normálně a funkce LncP musí být tedy redundantní (Dolezal et al., 2012).

Při jakých dalších podmínkách by mohl protein LncP třeba hrát důležitou roli? Vzhledem k tomu, že je to práce vaší laboratoře, tak jste o tom určitě přemýšleli. Existují bakteriální proteiny, které u hostitelské buňky po přidání (nebo expresi) nemají žádný detekovatelný efekt. Ale bakterie geny pro ně stále nese.

AMPylační aktivita - je možná vzácně používaný termín, ale u slova "de-ampyluje" by bylo potřeba zachovat velikost písmen.

Na str. 24 se naznačuje, co se děje ve který čas s Legionelou, asi by si to zasloužilo samostatný odstavec.

Kompetentní bakterie TOP10 nebo BL21 s permeabilizovanou membránou...

Jak byla membrána permeabilizována?

Bakterie byly kultivovány při 37 °C v LB médiu (Sigma) str.27

Není popsáno složení a výrobce je možná uveden chybně. Co znamená zkratka? P

Program blastp ... Chybí verze programu, verze databáze (datum).

Obr. 6.2.1 – Domnívám se, že řešit kolokalizace na epifluorescenčním mikroskopu Olympus Cell^R je trochu nešťastné. Pro prokázání nebo vyvrácení kolokalizace (Sec22b a LpSNARE 6.5.2) by bylo potřeba provádět mikroskopická pozorování v lepším rozlišení a následně provést korelační analýzu. Z obrázku se zdá, že část fluorescenčních partikulí kolokalizuje a část ne.

Navrhuji jiné – přehlednější – číslování obrázků. Kvalita obrázků je ojediněle zhoršená nepozorností při snímání.

V obr. 6.2.2a by bylo potřeba vyznačit, kde jsou proužky proteinu LpSNARE (pokud je to známé). Nepo alespoň popsat molekulové hmotnosti markerů.

Čím to je, že obsah tubulinu v membránové frakci je tak vysoký? Autorka se o tom zmiňuje, ale dále nekomentuje. Nebylo by možné lokalizaci LpSNARE-GFP v membránách ověřit zkrátka mikroskopicky in vivo?

Autorka měla problém s falešně pozitivními výsledky invertázového testu. Bylo by možné použít komerční a přitom laciný test (GLU GOD - Erba Lachema)? Jaká je použitelnost Vašeho testu in vitro bez buněk?

Na obr. 6.3.2 je zachycen protein LpSNARE-GFP, detekován po fixaci protilátkou proti GFP. Proč?

Jak je to asi s hladinou exprese LpSNARE v HeLa buňkách v porovnání s infekcí Legionelou?

Při produkci proteinu LpSNARE pro zjištění membránové lokalizace nebylo možno protein získat v dostatečném množství. Dá se to vůbec vzhledem k jeho toxickému působení na HeLa buňky?

Co to znamená, že "*LpSNARE je v bakteriální buňce za denaturujících podmínek rozpustný*"?

Z obrázku 6.4c se zdá, že část zkoumaného proteinu možná odštěpuje GFP (které je patrně sérem rozpoznáváno). Jak by to ovlivnilo další experimenty?

Jak byla měřena hladina cAMP při testu translokace LpSNARE (spolupracující laboratoř, obr. 6.5.1)? V této souvislosti se dále píše, že "*Pro zajištění věrohodnosti experimentu byly použity pozitivní kontroly, buňky infikované divokým kmenem legionel...*" Kdyby se jednalo opravdu o divoký kmen, pak by šlo spíše o negativní kontrolu.

Není jasné, kdo a jak prováděl "Pull-down" experiment (6.5.2).

Zkoušeli jste detekovat případnou acylaci LpSNARE, např. pomocí hmotnostní spektrometrie? Čím by asi měla být acylace in vivo zajišťována? Jak by to bylo v eukaryotické buňce?

V případě hnutí transfekovaných i netransfekovaných buněk ve stejné kultuře - nepomohla by oddálit hnutí (obou populací) častější výměna média?