



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice
telefon: +420 387 775 403
fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344
číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice
www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor: **Bc. Anna Vanclová**
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Název práce: **Membránový proteom plastidu euglenidů**

Oponent: **Mgr. Zoltán Füßy, Ph.D.**
Biologické Centrum AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav, České Budějovice

Autorka se pustila do náročného úkolu probádat transportní mechanismy proteinů přes membrány sekundárního plastidu *Euglena gracilis*. Přes značné vynaložené úsilí a několik využitých přístupů se nepodařilo nalézt jednoznačnou odpověď na ultimátní vytyčený cíl, identifikovat homology proteinů zapojených do protein-transportní mašinerie. Její snaha však byla přetavena do písemné formy, která předčí standard mnoha jiných diplomových prací svou precizností, podrobnou rozvahou nad příčinami dílčích neúspěchů i perspektivou dalšího postupu.

U Euglenophyt nastalo získání plastidu nezávisle na dalších skupinách Eukaryot obsahujících komplexní plastid, pohlcením zelené řasy příbuzné skupině Prasinophyta. Vzhledem k tomu je vědecky velice přínosné zjišťovat, jakými mechanismy dochází k metabolické komunikaci s endosymbiontem, zejména ve srovnání s jinými fotosyntetickými liniemi. Autorka hned zpočátku nastoluje hypotézu, že by tyto mechanismy mohly zahrnovat tradiční systém TOC/TIC známý z plastidů rostlin a zelených řas. Zprvu díky izolaci sekundárního plastidu a přímého sekvenování proteomu pomocí hmotnostní spektrometrie, následně také pomocí sekvenování transkriptomu a bioinformatických predikcí se snaží nalézt proteiny komplexů TOC a TIC, a z důvodu neurčitých výsledků také homology dalších transportních komplexů (např. ERAD/SELMA a SNARE). Ze získaných dat však nelze vyvodit jednoznačné závěry, tudíž autorka navrhuje několik interpretací a vytyčuje do budoucna postupy, které mohou přinést odpověď.

Předkládaná diplomová práce je psána v češtině, je srozumitelná a jasně strukturovaná. Výskyt překlepů a chyb je minimální, některé výrazy („Zanalyzovat“, str.27) jsou pro mne nezvyklé, ale nejspíš nikoli nesprávné.



Práce je členěna na Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a Metody, Výsledky, Diskusi, Závěrečné shrnutí a nakonec seznamy zkratk a použité literatury, dohromady v rozsahu 79 stránek plus kompaktní disk obsahující sekvenční data získaná a analyzovaná v průběhu práce. Úvod na jedné stránce podává rationale projektu; literární přehled popisuje jasně a přehledně vznik, evoluci a strukturu endosymbioticky získaných organel a podává informace o skupině Euglenophyta důležité pro pochopení rámce řešené problematiky; cíle práce jsou jasně stanoveny a zrcadleny odpovídajícím shrnutím v závěrech; materiál a metody podrobně popisuje využití kultivační, izolační, molekulárně-biologické a bioinformatické postupy; výsledky jsou dobře dokumentované, ilustrující vynaložené úsilí o získání pozitivního výsledku, část výsledků je k dispozici na CD přiloženém k práci; diskuse je podrobná a postupně se věnuje problematice metodik (izolace plastidů, získané kontaminace mitochondriálními proteiny, naopak nedostatečná síla detekce homologů transportu proteinů, *in silico* predikce ze sekvencí transkriptomu) a pozorovaných výsledků, předkládá perspektivu pro zdokonalení postupů a implikace na hypotézu transportu proteinů do sekundárních plastidů skupiny Euglenophyta na základě získaných dat. Seznam citované literatury je rozsáhlý, nikoli nadpočetný, a naznačuje autorčin hluboký vhled do problematiky.

Drobné připomínky:

Vzhledem k možnosti, že podle získaných výsledků by hlavním protein-transportním mechanismem mohl být ERAD, zasloužil by tento v Literárním přehledu větší pozornost (str.19). Není např. uveden žádný ze skutečně hledaných proteinů na str. 44 kromě Der1.

U použitých protilátek by bylo vhodnější použít katalogové číslo, aby se předešlo nejasnostem. Pro příklad, anti-RbcL pro *E. gracilis* není firmou Agrisera vyráběna (v laboratoři Prof. Oborníka používáme AS03 037, která byla na *E. gracilis* testována, je však polyklonální, proti několika imunogenům).

Cíle práce neobsahují záměr přípravy proteomu *Eutreptiella gymnastica*, která se nepovedla, přesto je probírána ve výsledcích a diskusi.

Zkratky jsou nestandardně zavedeny (tím míněno na prvním výskytu ve formě „zkracovaný pojem (ZP)“) a nejsou použity konzistentně (např. zkratka TP pro tranzitní peptid se používá až od str.26, a to jen občas).

Není jasné, na co konkrétně odkazuje formulace „Použití tří různých postupů...“ na str.65, lze se domnívat, že na Tab. 5.8.

Pufr B ze str. 33 zjevně není nikde dále použit.

U některých zkratk v seznamu zřejmě zlobil Autocorrect („signal-recognition partije“). Dále, jsou užity anglické termíny i pro do češtiny snadno přeložitelné pojmy, v případě

nutnosti vysvětlení zkratky lze použít obou termínů (srv. DUF vs HMM). Ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza se v textu zkracuje na Rbc i RuBisCO, pouze druhá zkratka je však uvedena v seznamu.

Otázky:

Na str.10 autorka zmiňuje opačný směr transportu přes Toc75/Omp85 u cyanobakteriálního předka, není však vysvětleno, jak a za jakým účelem u tohoto předka transport probíhá, když TIC komplex na vnitřní membráně pořád transportuje směrem dovnitř buňky?

Odhad, do jaké míry získaná proteomická data pokrývají skutečnou bohatost membrány, by mohl být učiněn srovnáním s jinými plastidy. Je známo, jak velký je obvyklý proteom plastidové membrány? Uvažovalo se o obohacení transportních proteinů na úkor fotosyntetických např. zatemněním nebo použitím antibiotika cíleného na plastidovou translaci?

Jaké je vysvětlení pro druhý, slabší proužek u celkového a celoplastidového proteinového extraktu, za použití anti-RbcL protilátky (Obr. 5.5)?

Str. 61. Co znamená „získat či sami připravit spolehlivou protilátku pro značení“? Zahrnuje to přípravu protilátek na objednávku oproti definovaným konzervovaným epitopům? Bylo zkoušeno značení mitochondrií pomocí některého z MitoTrackerů, nebo připadá v úvahu?

Jak si autorka vysvětluje vysoké číslo proteinů bez transmembránové domény (str.55)? Proč také z bioinformatických analýz (Kap. 5.3.2) nevyřadila jasně mitochondriální proteiny?

Závěrečné hodnocení

Předložená práce je kvalitně zpracovaná a nezdarům navzdory přináší cenné informace k tématu transportu proteinů přes membrány sekundárních plastidů. Obsahuje též perspektivy pro příští optimalizaci zaváděných postupů, zrovna tak testovatelné pracovní hypotézy, má tudíž značnou vědeckou hodnotu. Práci doporučuji k obhájení, navrhuji známku A/jedna a doufám v úspěšné naplnění nadcházejících cílů.

V Českých Budějovicích 1.zář 2014

Mgr. Zoltán Füßy, Ph.D.