

V Praze dne 11.9. 2015

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Marie Glavanakovové: „Metabolismus železa u améb“

Školitelem práce byl RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Oponentský posudek vypracoval: Mgr. Jan Pyrih, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra parazitologie

Diplomová práce Marie Glavanakové s názvem Metabolismus železa u améb obsahuje 57 stran a je tradičně členěna. Obsahuje abstrakt jak v českém tak i anglickém jazyce. Následuje úvod a literární přehled, experimentální cíle práce a uvádí použité metody. Experimentální část práce se poté zaměřuje na charakterizaci feritinu u amoebflagelátní *Naegleria gruberi* a potenciálního železo skladujícího proteinu Dps u *Acanthamoeba castellanii*. Následuje diskuze a přehled literatury.

Abstrakt je čtivý, avšak záběrem neodpovídá názvu práce a výhradně se zabývá pouze feritiny u *Naeglerie* a *Acanthamoeb*y. Jeho anglická verze pak navíc na několika místech trpí českým slovosledem, který kupříkladu mírně mění sdělení první věty.

Literární přehled nejprve stručně shrne význam železa pro organismy se zaměřením na parazitická protista a poté poměrně detailně uvede různé mechanismy, které parazitičtí i volně žijící protisté využívají při získávání železa z prostředí. Další kapitola dopodrobna pojednává o feritinech a nakonec jsou rozebrány poznatky o metabolismu železa u *Naegleria fowleri* a *gruberi*, *Acanthamoeba castellanii* a *Entamoeba histolytica*. V literárním přehledu mi chybí alespoň krátký úvod k železným kofaktorům- hemu a železitosirným klastrům, které jsou hlavní důvod pro import železa do buňky. Například mohla být stručně zmíněna jejich syntéza a v jakých konkrétních proteinech se nachází. Postrádám také informace o regulaci importu a hladiny železa v buňce, v práci zmíněná regulace feritinu pomocí IRE/IRP systému zdaleka není jediným známým mechanismem.

Kapitola pojednávající o materiálech a metodách je dobře a podrobně napsaná, nicméně pár nepřesností se mi nalézt podařilo. Kupříkladu je patrně chybně uvedený PCR program, kde doba syntézy v rámci jednoho cyklu je 7 minut, dále není uvedená koncentrace použitého IPTG nebo není uveden jistě použitý krok DNázy při syntéze cDNA.

Výsledky jsou dle mého názoru nejsilnější částí celé práce. *Naegleria gruberi* je experimentálně velmi těžko uchopitelný prvek hlavně proto, že neexistují žádné metody její genetické manipulace. Přesto autorka získala při jejím studiu velmi cenná data. Celý projekt byl založen především na úspěšné produkci protilátky proti feritinu. To se autorce ve spolupráci s Honzou Machem skutečně podařilo. Pomocí protilátky se jí poté podařilo feritin v buňce *Naeglerie* lokalizovat a dokázat jeho schopnost reagovat na extracelulární koncentraci železa. Dalším dílčím výsledkem je, že se autorce podařilo demonstrovat důležitost železa pro buňku *N. gruberi*. Navíc jsou výsledky dle mého názoru prezentovány správnou a přehlednou formou.

Diskuze naproti tomu působí jako nejméně povedená část práce. Především není čtivá. Věty na sebe ne vždy úplně navazují a celá diskuze působí dojmem, že vznikala na poslední chvíli. I jedna z úvah že

feritin je v mitochondrii právě kvůli hodně exprimovaným cytosolickým hydrogenázám působí odvážně a podle mého názoru nebere v potaz fakt, že se mezi mitochondriální a cytoplasmatickou klastrovací dráhou přenáší pouze síra a ne železo. Rovněž hypotéza o tom, že se protein Dps nepodařilo lokalizovat díky tomu, že se možná neexprimuje za daných podmínek rovněž není příliš zdařilá, neboť autorka úspěšně prováděla PCR genu z předtím vyizolované cDNA.

Použité zdroje jsou náležitě citovány, ale uvítal bych psaní jmen organismů italikou.

V celé práci se místy objevují překlepy, anglický slovosled ve větách a vyskytuje se i pár drobných vědeckých nepřesností. Navíc práci občas prostoupí nevědecký styl psaní, který však nutno podotknout nijak negativně neovlivňuje srozumitelnost textu. V několika málo případech kdy se kupříkladu dočteme, že železo má i svou odvrácenou stránku, dokonce i mírně pobaví. I přes výše zmíněné nedostatky považuji práci Marie Glavanakovové za zdařilou. Získané výsledky svědčí o značné experimentální nadanosti autorky a jistě budou brzo součástí nějaké kvalitní publikace. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Otázky k literárnímu přehledu

1. Jak funguje Fe sensing mechanismus založený na Fra1, Fra2, Aft1 a Grx3/4 genech a co ovlivňuje?
2. K čemu slouží *ccc1* gen u kvasinky?
3. U *Entamoeba histolytica* bylo zjištěno, že její růst silně závisí na přítomnosti železa. K čemu konkrétně (v jakých proteinech) železo pravděpodobně potřebuje?

Otázky k výsledkům

4. Je možné, že se DPS protein reguluje podobně jako feritin a jeho exprese by se mohla zvýšit za přítomnosti železa v médiu? Stál by takový experiment za úvahu? Dá se něco o jeho expresi zjistit studiem dostupných sekvencí z EST databází?
5. Autorce se podařilo prokázat, že gen pro feritin u Naeglerie je ukaryotického původu. Zároveň ale poukazuje na to, že je feritin v buňkách protist neobvyklý. Má autorka nějakou hypotézu o jeho původu, např. horizontální genový transfer, a dala by se její hypotéza nějak testovat?