

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Veroniky Klápšťové:

Struktura a funkce mitochondriálního sekretinu

Školitelem je Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Diplomová práce Veroniky Klápšťové s názvem Struktura a funkce mitochondriálního sekretinu se zabývá experimentálním studiem GspD, klíčové komponenty T2SS sekrečního systému bakterií, který byl nedávno spolu s dalšími podjednotkami této mašinerie identifikován v mitochondriích *Naegleria gruberi* a dalších několika protist, především ze skupiny Discoba.

Literární přehled

Literární přehled je velmi zdařilý, a to nejen díky vysoké jazykové úrovni, ale především také po obsahové stránce. Čtenář je fascinován množstvím informací, které se o dané problematice vědí a způsobem jak jsou přehledně prezentovány. Zdroje jsou náležitě citovány.

Jako jediný nedostatek literárního přehledu vidím v nedostatečné specifikaci objevu mitochondriálních sekretinů. Měl by být dle mého názoru citován jako připravující se publikace, abstrakt z konference, nebo alespoň zmínit že objev je čerstvý. V poslední kapitole (v abstraktu také) by podle mě čtenář neznalý pozadí objevu nabyl dojmu, že v textu jen chybí citace na dávno vědecké komunitě známou informaci.

Materiál a metody

V části materiál a metody se úvodní přehlednost místy vytrácí, patrně díky snaze autorky uvést experimentální procedury v co největším detailu. Autorka by zcela jistě mohla některé rutinní procedury nebo postupy aspoň částečně zestručnit odkazem na předešlé experimenty. Na stránkách 42 a 43 se tak kupříkladu vyskytuje téměř identický odstavec, popisující podobné úvodní části dvou jiných experimentů. Zpřehlednění by jistě přineslo i užití odkazů na literaturu. V celé 21 stránce dlouhé kapitole materiál a metody je pouze 6 odkazu na literaturu, přičemž 5 z nich je na první stránce v části popisující bioinformatické metody. Ty jsou tak svou stručností ve vysokém kontrastu se zbytkem textu. V kontrastu s podrobným popisem většiny metod jsou pak také místy se vyskytující chybějící údaje u některých z nich, například odkazy na zdroje plasmidů, jak konkrétně byla optimalizována PCR, specifikovat jaká sekundární protilátka a od jaké firmy byla použita pro detekci na western blotu, co je 1x koncentrovaný vzorkový pufr, nebo které inhibitory proteáz nebo od jaké firmy byly použity atd...

Výsledky

Kapitola výsledky je zdařilá a vysoce nadstandardní. Úvodní část se věnuje konstrukci fylogenetického stromu a modelování struktury eukaryotického GspD proteinu. Poté se autorka zabývá různými testy cytotoxicity GspD proteinů pro bakteriální buňky, pomocí kterých se snaží ukázat podobnost eukaryotických a bakteriálních GspD homologů. Dále se jí pomocí pokusů s *in vitro* translací sekretinu a jeho vkládání do lecitinových lipozomů nebo do izolovaných mitochondrií podařilo odhalit post-translační mód samovolného vkládání GspD proteinu do buněčných membrán. Navíc také testovala interakci GspD s dalšími komponenty T2SS systému pomocí Yeast 2 hybrid systému. Zejména v posledních dvou zmíněných experimentech autorka získala velmi cenné výsledky.

Všiml jsem si však, že je u některých pokusů vidět jistá uspěchanost. Například při neúspěšném pokusu o nativní izolaci GspD proteinu z bakterií autorka pouze konstatuje, že protein byl patrně nerozpustný a nejspíš sedimentoval spolu s membránami, ale příslušný western blot chybí. Nebo že při růstových pokusech v rámci měření cytotoxicity indukce GspD proteinu chybí směrodatné odchylky a vyvstává otázka, kolikrát nezávisle byl daný pokus prováděn. To ale osobně nepovažuji za chyby, neboť byl ušetřený čas evidentně dobře investován na přípravu jiných složitých a přínosnějších experimentů. Mám tedy jen několik poznámek. V kapitole 5.5. se píše, že bylo testováno kotranslační vkládání GspD do lipozomů. Patrně jde o formulační nepřesnost, neboť hned v dalším pokusu je demonstrována schopnost GspD se vložit do membrán samovolně. Pomocí tohoto pokusu tedy dle mého názoru nelze o kotranslačním vkládání nic určitého tvrdit. Nejzávažnější výtka směřuje k amplifikaci genu (popřípadě umělé nasyntetizování) pro Ng GspD z genomové DNA namísto cDNA. Vzhledem k tomu, že hodně genů v *Naegleria* má špatně predikovaný začátek transkripce, by bylo užítí cDNA jako templátu více než na místě. Navíc, začátek translace proteinu je v genomové databázi (JGI genome portal) i na NCBI označen jinde než jaký zvolila autorka. Z textu pak není přesně jasné, proč si autorka zvolila právě tento počáteční Metionin.

Diskuze

Diskuze je dobrá, výsledky jsou dávány do kontextu a náležitě diskutovány. Všiml jsem si jen jedné formulační nepřesnosti (dvojsmyslu), v prvním odstavci diskuze se patrně omylem tvrdí, že mitochondriální sekretiny hrají v buňce nezastupitelnou úlohu.

Celkové zhodnocení

Celkově považuji diplomovou práci Veroniky Klápšťové za mimořádně zdařilou. Především po experimentální stránce značně přesahuje standard jiných diplomových prací. Podařilo se získat velmi cenné výsledky, které jistě budou v budoucnu základem pro výjimečnou publikaci. Vznesené výhrady

jsou především formálního charakteru a zastiňuje je celkový dojem z práce, proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Otázky:

1. Výsledky získané při *in vitro* importech M249 GspD jsou velmi zajímavé. Jak si autorka vysvětluje, že množství proteinu v mitochondriích v čase nevzrůstá? Obvyklé vysvětlení jako například, že malá sub-populace *in vitro* přepsaných GspD proteinů není štěpitelná proteinázou K, zde nemůže být aplikováno, neboť v čase 0 na western blotu žádný signál pro GspD protein není. Jaký je tedy podle autorky mechanismus, díky kterému se během 1 minuty vloží do mitochondrií cca 10% z celkového množství GspD proteinu, ale dále se vkládání zastaví?
2. Mohla by být 100% bootstrapová podpora na fylogenetickém stromu pro monofylii eukaryotických GspD proteinů artefaktem díky tomu, že pro účely této analýzy byly eukaryotické GspD uměle zfúzovány s GspND? Jak by se to dalo případně otestovat?
3. V rámci Y2H systému nebyla potvrzena interakce mezi dvěma monomery GspD proteinu. Tuto interakci však autorka již předtím pozorovala při vkládání *in vitro* translatovaných GspD proteinů do lipozomů. Dá se rozpor v těchto výstupech vysvětlit arteficiální vazbou GspD monomerů při *in-vitro* pokusech? Bylo něco takového již dříve v literatuře popsáno?
4. Na alignmentu GspD proteinů je vidět poměrně velká sekvenční divergence mezi eukaryotickými mitochondriálními GspD a bakteriálními GspD. V textu zmiňovaná dobrá zakonzervovanost C koncové oblasti proteinu mi z pohledu na alignment nepřijde příliš zřejmá. Pomocí jakých kritérií byly na základě sekvenční podobnosti proteiny klasifikovány jako homology?
5. V diskuzi jsem nenalezl hypotézu proč je (na rozdíl od bakterií) u mitochondriálních sekretinů GspND podjednodka oddělena od samotného GspD proteinu. Může mít toto uspořádání nějakou výhodu?
6. Jak byl predikován začátek translace genu pro Ng GspD?

Mgr. Jan Pyrih, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 2.6. 2017