

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Josefa Pelce:

## **Studium nově objeveného proteinu GL50803\_16424 u *Giardia intestinalis***

Školitelem je Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Diplomová práce Josefa Pelce se zabývá studiem neznámého proteinu u *G. intestinalis*, modelového organismu pro studium mitochondriální evoluce. Mitosóm Giardie je extrémně redukováná mitochondrie, avšak jak se nyní ukazuje, obsahující velké množství Giardia specifických proteinů s nejasnou homologií k jiným eukaryotům. Tato práce si klade za cíl charakterizovat neznámý s mitosomem asociovaný protein GL50803\_16424, což je však u Giardie velmi odvážné, neboť v tomto organismu neexistuje žádná zavedená technika pro umlčování genů. Respektive žádná, kterou by se někdy povedlo exportovat mimo laboratoř, jež danou metodu vyvinula.

### Literární přehled

Literární přehled je ucelený. Mám jen pár připomínek. V obecné části věnované Giardii se autor podle mě až příliš podrobně věnuje různým Giardiovým kmenům a cyklu. Dále by pak určitě stálo za to se trochu podrobněji zmínit o nedávno zjištěném napojení mitosomů na endoplasmatické retikulum od autorů Voleman a kol. (2017) nebo Rout a kol. (2016).

### Materiál a metody

Část metody je obsáhlá, pokusy jsou správně popsány. Místy se vyskytují drobné nepřesnosti nebo neúplné informace jako například, že byla změřena OD bakterií, ale není specifikováno při jaké vlnové délce, nepřesně je uveden zdroj některých použitých protilátek atd.

### Výsledky

Kapitola výsledky v podstatě aplikuje téměř všechny dostupné metody pro studium proteinu v *Giardii*. Metodami jako subcellulární frakcionací, protease protection assay, nebo superresoluční STED mikroskopii se autor snaží popsat lokalizaci proteinu. Pomocí in vivo biotinylovaného značení, proteomiky a native elektroforézy se pak snaží nalézt možné interakční partnery proteinu. Většina pokusů přinesla zajímavé poznatky. K doplnění získaných výsledků by dle mého názoru určitě stálo zato otestovat lokalizaci vybraných proteinů proteomicky identifikovaných jako možné interakční partnery GL50803\_16424. To by bylo jistě dobré už jen z toho důvodu, že některé tyto proteiny byly

stejně jako GL50803\_16424 již dříve lokalizovány do oblasti ventrálního disku, ne tedy do blízkosti mitosomu nebo endoplasmatického retikula, kde se pravděpodobně vyskytuje protein GL50803\_16424. Ale chápu, že to by možná bylo nad rámec diplomové práce. A dále, pokud autor spekuluje na základě proteomických dat, že by protein GL50803\_16424 mohl interagovat s endoplasmatickým retikulem, asi by bylo dobré toto ověřit buď pomocí markerové protilátky nebo co-exprese ER markerového proteinu.

Jedinou faktickou výhradu k dizajnu experimentů pak mám v nepoužití adekvátní kontroly při proteomické identifikaci interagujících proteinů s GL50803\_16424. Buňky exprimující dva proteiny: BAP-tagovaný GL50803\_16424 a BirA se kvantitativně srovnávají s kontrolou, která však exprimuje pouze BirA. Autor tedy nemůže stoprocentně odlišit proteiny nespecificky interagující (abundantní) s GL50803\_16424-BAP od skutečných interakčních partnerů. I to je možný důvod, proč jsou mezi identifikovanými proteiny Giardini, Nek kinázy, nebo proteiny 21.1, které se často při proteomických analýzách objevují jako kontaminanty. Nutno ovšem uznat, že v tomto případě se patrně adekvátní kontrola (např. buňky exprimující BirA a zároveň leader sekvenci+BAP tag) udělat nedala, neboť se neví, kde přesně protein GL50803\_16424 lokalizuje. Jediná možnost by snad mohla být v použití BAP tagované N-terminální poloviny GL50803\_16424 proteinu, ale to sebou také nese jistá rizika.

### Diskuze

Diskuze je dobrá, výsledky jsou dávány do kontextu a náležitě diskutovány. Dle mého názoru by si však zasloužila více do hloubky rozebrat, co získané výsledky mohou znamenat pro model možné interakce mezi endoplasmatickým retikulem a mitochondrií.

### Celkové zhodnocení

I přes zmíněné výhrady považuji diplomovou práci Josefa Pelce za zdařilou a nadstandardní. Autor měl nelehký úkol, a sice charakterizovat neznámý protein v organismu, kde je k dispozici minimum technik molekulární biologie. Tyto techniky, včetně kvantitativní proteomiky, se mu však povedlo osvojit a jejich pomocí se mu podařilo získat cenné výsledky, které jistě budou v budoucnu základem pro zajímavou publikaci. Práci proto doporučuji k obhajobě a navrhuji známku 2.

Otázky:

1. V práci je patrný velký rozpor mezi lokalizačními daty pro GL50803\_16424 a minimálně pět dalších proteinů získanými
  - laboratoří Scota Dawsona v práci Hagen a kol. (2011) – ventrální disk

- a získaných autory Martinová a kol. (2015), Rout a kol. (2016) a autorem diplomové práce – mitosom nebo endoplasmatické retikulum

Autor uvádí jako možný důvod rozporných dat buď vystavení Giardia oxidativnímu stresu při detekci GFP konstruktů v laboratoři prof. Dawsona, nebo samotnou fúzi reportetového proteinu s GFP proteinem. Mohl by autor rozvést, jaký by mohl být mechanismus, který by relokalizoval proteiny za přítomnosti oxidativního stresu do oblasti ventrálního disku, nebo popřípadě GFP fúzní proteiny lokalizoval přímo do tohoto místa? Napadají autora případně nějaká další vysvětlení rozdílnosti výsledků?

2. V textu na straně 1 se píše, že tvorba železitosirných klastrů v mitosomu Giardia slouží k zásobení klastry pro mnoho esenciálních proteinů. Které to jsou?
3. Tabulky 11 a 13 obě obsahují 15 nejvíce nabožených proteinů získaných při proteomické analýze interagujících proteinů s GL50803\_16424. Postup identifikace proteinů v tabulkách se liší pouze následnou analýzou identických dat z hmotnostního spektrometru. Jak je možné, že překryv výsledných proteinů v těchto dvou seznamech je relativně malý? Jaký byl přesný rozdíl v analýze dat a který z oněch dvou vyhodnocovacích postupů je dle autora více relevantní.
4. V textu se píše, že je protein GL50803\_16424 velmi podobný lidskému proteinu Mlf1IP. Jaká byla dle autora evoluce této proteinové rodiny v eukaryotech? Je možné, že homolog tohoto proteinu interaguje s mitochondrií i v jiných organismech?

Mgr. Jan Pyrih, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 02.9. 2018