



## Oponentský posudek na diplomovou práci

**Autor:** Bc. Kateřina Pilařová

**Název:** Charakterizace železito-sírných flavoproteinů z hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis*

**Základní parametry práce:** 75 str. (řádkování 1,5), 104 citací

V předložené práci si autorka vytyčila za cíl charakterizovat jednu vybranou proteinovou molekulu (ISF3) ze skupiny železito-sírných flavoproteinů (ISF) z hydrogenosomu *Trichomonas vaginalis* (celkem známo 7 paralogů z toho 3 v hydrogenosomu), jejichž funkce není doposud zcela objasněna a z nichž byl mezi eukaryoty identifikován pouze jeden další homolog u parazitického organismu *Entamoeba histolytica*. Jako teoretický komparativní model byla pro tuto studii zvolena mírně termofilní metanogenní autotrofní bakterie *Methanosarcina thermophila*, u níž byla funkce ISF již detailněji popsána; na základě těchto informací autorka předpokládá, že i v hydrogenosomu *T. vaginalis* by se ISF3 mohl podílet např. na redukci kyslíku či jeho reaktivních forem a tím mimo jiné napomáhat trichomonádě vypořádat se s oxidativním stresem.

Vytyčených cílů (1. Prokázat expresi a určit lokalizaci ISF v buňce *T. vaginalis*, 2. Zaklonovat a overexprimovat rekombinantní ISF v *E. coli*, 3. Charakterizovat fyzikální a chemické vlastnosti ISF, 4. Pomocí biochemických metod zjistit aktivity enzymu s využitím rekombinantních proteinů *T. vaginalis* – feredoxin a pyruvát:feredoxin oxidoreduktáza) bylo dosaženo pomocí pokročilejších molekulárních (např. transformace buněk, purifikace rekombinantního proteinu, qRT-PCR), separačních (např. gradientová centrifugace, chromatografie), imunologických (např. Western blot, imunolokalizace) a biochemických technik (spektrofotometrické měření aktivit enzymů). Autorka ve své práci navazuje na výsledky výzkumného týmu kolem prof. RNDr. Jana Tachezyho, PhD. a doc. RNDr. Ivana Hrdého, Ph.D. (hl. školitel); např. citované práce Hrdý, I. & Müller, M. (1995a). Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate, ferredoxin oxidoreductase of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Molecular Evolution* 41, 388-396; Hrdý, I., Tachezy, J., Müller, M. (2007). Metabolism of Trichomonad Hydrogenosomes. In: *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*. Ed. Tachezy, J., Microbiology Monographs, Springer - Verlag Berlin Heidelberg; Smutná, T., Goncalves, V. L., Saraiva, L. M., Tachezy, J., Teixeira, M. & Hrdý, I. (2009). Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryotic Cell* 8, 47-55. Některé z dalších hydrogenosomálních enzymů *T. vaginalis* např. feredoxin a pyruvát feredoxin oxidoreduktáza (TvFdx a PFO) byly tímto týmem v minulosti již zkoumány, připraveny v rekombinantní formě a feredoxin a pyruvát:feredoxin oxidoreduktáza (TvFdx a PFO) jsou použity také v experimentech zahrnutých v předložené práci.

**Literární přehled:** Na 13 stranách autorka definuje modelový organismus *T. vaginalis* a cílovou organelu - hydrogenosom, shrnuje problematiku metabolismu hydrogenosomu, vztah *T. vaginalis* ke kyslíku a metabolizaci nejčastěji používaného chemoterapeutika proti trichomoníaze – metronidazolu. Dále je v této kapitole představen také teoretický komparativní model bakterie *M. thermophila* a nastíněn rozsah známých informací týkajících se zkoumaných železo-sírných flavoproteinů *T. vaginalis* (2/3 str. 17).

Dle mého názoru není členění kapitol v literárním přehledu zcela logické a některé kapitoly by měly být uvedeny spíše v rámci kapitoly 3.1 *Trichomonas vaginalis* např. 3.2 Morfologie *Trichomonas vaginalis*, 3.4 *Trichomonas vaginalis* a kyslík či 3.5 *Trichomonas vaginalis* a metronidazol.

Domnívám se také, že v práci chybí jasné zdůvodnění zahrnutí komparativního modelu *M. thermophila* a hlubší polemika nad jediným doposud známým homologem ISF z eukaryotického parazitárního organismu *E. histolytica*. Rovněž v úvodu práce postrádám podrobnější charakteristiky sedmi genů ISF identifikovaných na základě znalosti genomu *T. vaginalis*, tj. definice referovaných molekul (např. anotační čísla včetně zdrojové databáze) či zásadní informace o sekvenčních podobnostech s ohledem na primární strukturu nukleotidových a aminokyselinových sekvencí a také jejich srovnání se sekvencemi zahrnutých organismů *M. thermophila* a *E. histolytica* (např. procento podobnosti, počty bází/aminokyselin, molekulové hmotnosti, pI, rozdíly signálních sekvencí apod.). Tento problém se objevuje také v případě enzymů *T. vaginalis* – feredoxin a pyruvát:feredoxin oxidoreduktáza, které jsou zahrnuty v experimentální části práce, kde je částečně popsán postup přípravy jejich rekombinantních forem, ale jejich sekvence nejsou prezentovány. V celé práci tak autorka uvádí pouze jedinou sekvenci – aminokyselinová sekvence ISF3 *T. vaginalis* (str. 17), což u práce tohoto typu považuji za nedostatečné.

### **Otázky:**

- Proč byla jako komparativní model zvolena právě bakterie *M. thermophila*?
- Co je známo o ISF *E. histolytica*?
- Proč byl pro charakterizaci zvolen právě ISF3 *T. vaginalis*?

**Cíle práce:** Jsou čtyři, stručně a jasně definovány. (Doporučoval bych dodržovat chronologii pracovního postupu, tzn. 1. Prokázat expresi, 2. Zaklonovat a overexprimovat rekombinantní ISF v *E. coli*, a pak teprve 3. Určit lokalizaci ISF v buňce *T. vaginalis*).

**Materiál a metody:** Jsou uvedeny a podrobně rozepsány na 25 stranách a jejich množství a různorodost je v souvislosti s diplomovou prací nadstandardní. I když chápu zřejmý záměr autorky prezentovat tuto kapitolu formou osnovy a co nejpřehledněji, tak z mého pohledu není zvolený formát nejšťastnější. V souvislosti s enormním počtem použitých zkratk a rozepsáním jednotlivých komponent mnoha sloučenin, odděleně od vlastního popisu použitých metod, je čtenář téměř neustále nucen v práci listovat a dohledávat podrobnější vysvětlení (např. 5.5.10 Barvení gelu stříbřením, str. 32). Některé prezentované údaje jsou na samé hranici stručnosti akceptovatelné pro diplomovou práci např. v kapitole 5.1.5 Primární protilátky – „Anti-HaHa monoklonální protilátka (myš IgG) (Exbio)“ – není např. zřejmé, zda je protilátka komerčně dostupná nebo zda byla vyrobena danou společností na zakázku (dále např. v kapitole 5.5.13 chybí ředění primární a sekundární protilátky). Podobně v kapitole 5.3 Použité geny – (jak je zmíněno výše) bych očekával podrobnější charakteristiky těchto genů. Množství dalších nepřesností vzniklo pravděpodobně nepozorností a na kvalitu práce nemají zásadní vliv (např. kapitola 5.5.4 „... Bakterie *E. coli* jsem transformovala...“ - jaký kmen, 5.5.15 „...Sterilně jsem zcentrifugovala 1 l trichomonád...“ – kolik buněk, „...Po celou dobu jsem pracovala na ledu...“, 5.5.17 „...Ivan Hrdý izoloval protein na kapalínovém chromatografu...“ apod.)

### **Otázky:**

- Jaký je rozdíl mezi kmeny *T. vaginalis* T1 a 10-02 a proč byly pro daný typ analýzy použity právě tyto?
- Z jakého důvodu se objevuje rozdíl v sekvencích „forward“ primerů pro expresi ISF3 (s plazmidy pET-42b a TagVag HaHa)?
- Kapitola 5.5.16 Imunofluorescence, Příprava preparátů. Zalití preparátu médiem Vecta-shield zároveň s DAPI (koncentrace ?) patří mezi standardní procedury?

### **Výsledky, diskuze a závěr**

Výsledky experimentů zpracované na 14 stranách jsou vhodně doplněny fotodokumentací, diskuze 4,5 str. a závěr 1,5 str. jsou rozsahem i relevantností prezentovaných údajů odpovídající. Myslím, že prezentaci výsledků (kapitola Výsledky a Diskuze) škodí opakování popisů metod, které by měly být nebo již jsou podrobně uvedeny v kapitole „Materiál a metodika“. Většina výsledků odpovídá předpokladům, ale některé s předpoklady nekorespondují (např. Předpoklad, že stejně jako ISF u *M.*

*thermophila* bude ISF3 u trichomonád také vázat [4Fe4S] klastr na monomer. Bohužel při spektrofotometrickém měření obsahu železa v ISF3 byl naměřen pouze 1 mol železa na 1 mol monomeru proteinu).

#### **Otázky:**

- *Byla předpokládána přítomnost zbývajících dvou ISF (ISF1 a ISF5) v hydrogenosomu T. vaginalis kromě proteomické lokalizace potvrzena ještě nějakými dalšími metodami?*
- (str. 59) „...Zajímavé je, že podle výsledků qRT-PCR buňky rezistentní k metronidazolu zvyšují míru transkripce ISF2. To by mohlo znamenat, že ISF2 nemá stejnou funkci jako ISF3, není schopen redukce metronidazolu a tudíž není potřeba snižovat míru jeho transkripce. Otázkou ovšem zůstává, zda je ISF2 u buněk rezistentních k metronidazolu opravdu transkribován, neboť tyto výsledky nebyly potvrzeny proteomickými daty...“ *Mohla by autorka detailněji a srozumitelněji komentovat míru transkripce ISF2 a teoretickou souvislost aktivity ISF2 s redukcí metronidazolu? Jak lze vysvětlit závěr „...tyto výsledky nebyly potvrzeny proteomickými daty...“*
- *Kde podle autorky probíhá aktivace metronidazolu T. vaginalis – v hydrogenosomu, cytoplasmě či hydrogenosomu a cytoplasmě? Mohla by autorka blíže vysvětlit vlastní výsledky s redukcí metronidazolu v systému s ISF3?*
- *Existuje nějaké vysvětlení pro výskyt ISF3 u T. vaginalis právě ve formě dimeru?*
- *Mohla by autorka komentovat větu z diskuze „...Stanovení železosírného centra u ISF3 jsem prováděla pomocí fotometrického stanovení koncentrace železa ve vzorku proteinu a také pomocí EPR spektroskopie (Dr. A. Pierik, Philipps-Universität Marburg, Německo), která byla bohužel bez výsledku...“ S touto větou zřejmě souvisí následující komentář „...Bohužel při spektrofotometrickém měření obsahu železa v ISF3 jsem naměřila pouze 1 mol železa na 1 mol monomeru proteinu. Vzhledem k těmto výsledkům usuzuji, že rekombinantní ISF3 obsahuje substechiometrické množství železa, což svědčí pro nízký podíl holoproteinu se správně zformovaným železosírným centrem v celkovém proteinovém preparátu, ale také by se mohlo jednat o nedostatečně naklastrované železosírné centrum...“ Prosím o vysvětlení termínu „nedostatečně neklastrované železosírné centrum.“*
- *Jakou dobu autorka zpracovávala práci a zda je již autorkou (spoluautorkou) nějaké publikace v časopise s IF?*

**Přehled literatury:** Seznam 104 publikací je v pořádku s jednotným formátem. Překvapuje mne pouze, že recentních prací (myšleno od roku 2000) týkajících se zvoleného tématu je uvedeno pouze kolem dvaceti.

#### **Otázky:**

- *Reprezentuje tento počet opravdu reálný aktuální stav daného tématu?*

**Nepochybuji, že se autorka seznámila s množstvím pokročilých molekulárních, biochemických a dalších metod a dosáhla řady zajímavých výsledků. Finální zpracování práce však za touto kvalitou poněkud zaostává - v práci se objevují formální nedostatky a členění práce není z mého pohledu ideální. Nicméně se domnívám, že práce rozhodně splňuje podmínky kladené na diplomovou práci (zpracovat literární rešerši a osvojit si relevantní spektrum metod), a proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako velmi dobrou (2).**

Praha 15. září 2012

  
-----  
RNDr. Martin Kašný, Ph.D.