

V Praze dne 28.5. 2012

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Věry Zedníkové: Homology pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy z hydrogenosomů *Trichomonas vaginalis*. Školitelem byl doc. Ivan Hrdý, Ph.D.

Diplomová práce Věry Zedníkové se zabývá biochemickou charakterizací jedné ze sedmi forem hydrogenosomálního enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy u lidského parazitického prvoka *T. vaginalis*. Práce řeší komplikované experimentální téma, které vyžaduje základní pochopení metabolismu sacharidů, evoluce eukaryotické buňky i mechanismů rezistence k používaným chemoterapeutikům.

Autorka rozčlenila práci na Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi, Závěr a Seznam použité literatury. Na závěr je přiložena i publikace v impaktovaném mezinárodním časopise, která vychází z výsledků diplomové práce a již je Věra Zedníková první autorkou.

Literární přehled začíná výčtem enzymů metabolizujících pyruvát s důrazem na pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu, která je předmětem diplomové práce. Následuje popis energetického metabolismu *T. vaginalis*. Významná část je věnována aktivaci specifického chemoterapeutika - metronidazolu, včetně nově popsaného mechanismu aktivace. Závěr úvodu je věnován problematice alternativních 2-keto acid oxidoreduktáz, které byly popsány u kmenů rezistentních k metronidazolu.

Jako celek působí Literární přehled logicky a kompaktně, obsahuje nejdůležitější informace dané problematiky. Občas se objevují některé nepřesné nebo nevhodné termíny jako eukaryotní (namísto eukaryotická) buňka a karbohydráty (namísto sacharidy). Autorka používá i poetičtější spojení typu: "Přesto není PFO světu hub úplně cizí".

Asi nejvýraznějším nedostatkem přehledu je absence molekulární charakterizace PFO a příbuzných enzymů, tj. např. graficky naznačené doménové složení jednotlivých PFO i dalších pyruvát metabolizujících enzymů, strukturní informace z „homologního modelování“, které by mohly naznačit i odlišné funkční zaměření jednotlivých enzymů. Práce se tak zcela opírá o biochemickou charakterizaci proteinů.

Cíle práce i Materiál a metody jsou jasně formulované bez výraznějších nedostatků. Poněkud zvláštní je souhrnné uvedení použitých vektorů a poté následující jednotlivé klonovací postupy. Vhodnější by bylo vždy popsat použitý plasmid v rámci popisu vlastního klonování.

Výsledky jsou v zásadě rozděleny podle použitých buněčných systémů, které posloužily autorce pro experimentální expresi rekombinantního proteinu PFOD. V bakteriálním systému *Escherichia coli* se podařilo indukovat poměrně nízkou expresi proteinu o správné molekulární hmotnosti. Částečně purifikovaná frakce pak byla následně použita pro stanovení přítomnosti nativní velikosti enzymu, přítomnosti prostetické FeS skupiny a konečně k detekci enzymové aktivity. Autorčino úsilí bylo významně komplikováno absencí dostatečně čistého proteinového vzorku, která byla spolu s pravděpodobnou nestabilitou proteinu hlavním důvodem neúspěchu ve funkčních analýzách získaného rekombinantního proteinu. Tomu pak odpovídá kvalita imunoblotů, které proto působí velmi

nepřesvědčivě. Neúspěchem skončil i pokus o expresi proteinu v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a autorka proto přistoupila k bakteriální expresi pouze proteinového fragmentu pro získání specifické protilátky. Tento fragment byl úspěšně vyizolován a použit k tvorbě specifického antiséra, které však mělo pouze omezenou specifitu.

V přirozeném systému *T. vaginalis* se podařilo úspěšně exprimovat zkrácenou verzi proteinu, které chyběla teoreticky předpovězená N-terminální signální sekvence. Přes její absenci byl protein specificky lokalizován v hydrogenosomech *T. vaginalis*.

Zajímavým, byť opět neúspěšným, byl pokus autorky zopakovat tuto expresi u laboratorního kmene trichomonád s rezistencí k metronidazolu. Celková náchylnost této buněčné kultury však neumožnila ověření úspěšnosti exprese či testování navozeného fenotypu. Ve světle získaných dat z kvantitativní real-time PCR by takový experiment byl jistě velmi zajímavý.

Závěr výsledků je věnován odlišné, ale související problematice přítomnosti tzv. alternativních KOR, které byly před časem nalezeny u metronidazol rezistentních trichomonád. Jak je zcela názorně demonstrováno v diplomové práci zjištěné aktivity jsou zřejmě artefakty detekční metody. Tyto výsledky jsou zároveň shrnuty do samostatné publikace, již je Věra první autorkou.

V diskuzi jsou hlavním tématem neúspěšné pokusy o expresi vybrané formy PFO. Autorka diskutuje důvody slabé (či žádné) exprese proteinu v heterologních systémech, což bylo hlavním úskalím projektu. Dále je diskutována přítomnost alternativních KOR v *T. vaginalis*, které jsou zřejmě jen výsledkem experimentální nedokonalosti stanovení enzymové aktivity. Možná by bylo vhodné, kdyby byla daná problematika diskutovaná ve větší šíři. Tedy např. proč je v genomu *T. vaginalis* tolik různých PFO, jaká by mohla být aktivita PFOD u rezistentních trichomonád a pod.

Závěr stručně shrnuje dosažené výsledky.

Použitá literatura obsahuje minimum chyb (zachytil jsem jeden chybějící odkaz).

Jako celek je diplomová práce Bc. Věry Zedníkové velice kvalitní dílo, které naprosto vyhovuje požadavkům pro diplomovou práci na Katedře parazitologie PŘF UK.

Otázky:

1. Jak anaerobní je Anaerobní pufr pro detekci KOR? Byla nějakým způsobem stanovována přítomnost kyslíku v kultuře?
2. Proč byla v *T. vaginalis* exprimovaná N-terminálně zkrácená verze PFOD?
3. Můžete zmínit nějakou další výhodu složitějšího PDH komplexu klasických aerobních mitochondrií nad jednoduchým enzymem PFO kromě jeho (ne)citlivosti na kyslík?
4. Existuje jedna proteinová rodina PFO enzymů, nebo se jedná o strukturně různé proteiny se stejnou aktivitou?
5. Jak to tedy je s mechanismem rezistence/citlivosti trichomonád k metronidazolu? V jakém vztahu jsou podle Vás nově objevený mechanismus aktivace metronidazolu a původně popsané dráhy jeho aktivace?

Pavel Doležal, Ph.D.