

Proteom encystačních váčků *Giardia intestinalis*

Tvorba cyst a vytvoření funkční cystové stěny je základní podmínkou k přežití mnoha mikroorganismů v enviromentálním prostředí a - v případě parazitických organismů – také k přenosu mezi hostiteli. Předkládaná diplomová práce má ambici přispět k poznání proteomu encystačních váčků giardií, zajímavých organel, které se účastní sekrečního procesu proteinů cystové stěny. Základními metodami, které byly k dosažení cíle zvoleny, jsou *in vivo* enzymatické značení, resp. biotinylace CWP proteinů, izolace jejich komplexu s interagujícími proteiny a jejich charakterizace pomocí hmotnostní spektrometrie. Diplomová práce se přiblížila k vytčenému cíli, přestože jej nenaplnila; zvolené experimentální postupy jsou adekvátní a na úrovni state-of the-art metod. Autorka postupně vyřešila metodické obtíže a zřejmě z časových důvodů se jí nepodařilo dovést práci až k identifikaci nových neznámých proteinů encystačních váčků. Nicméně objem experimentální práce je značný, taktéž spektrum použitých metod, které diplomatka zvládla, je velmi široké, od kultivace, bioinformatiky, imunodetekci proteinu, po pokročilé metody molekulární biologie (koexprese, místně cílená mutagenese). Diplomová práce má 69 stran, dodržuje očekávané členění a rozsah kapitol.

a) Po věcné stránce lze práci vytknout poměrně málo. U diplomové práce nevádí, že nepřinesla nové autonomní výsledky, nicméně vytvořila pro ně předpoklady, že mohou být v reálné době dosaženy (přítomnost BirA pravděpodobně také v lumen cisteren ER, uspokojivá exprese CWP1-BAP). Literární zpracování diplomové práce však trpí mnohými neduhy. Úvod a literární přehled bohužel svědčí o horší orientaci autorky v obecných faktech protozoologie (a to je jen pět prvků, o kterých píše), nicméně popis tvorby a stavby komponent cystových a oocystových stěn je dostačující. Je zarážející, že vlastní proces encystace giardií je v práci zmíněn jen minimálně, nejsou popsány jednotlivé fáze encystace, co se v nich děje, neboť i to je důležité vzhledem k biogenezi a sekreci obsahu ESV. Autorce by rešerše v tomto ohledu umožnila lépe pochopit proces encystace giardií a mohla by se vyvarovat chybných tvrzení, např. str. 1, že cysta je hlavní patogenní agens, str. 2, že během encystace probíhají dvě kola replikace jaderné DNA a že vznikají 4 tetraploidní jádra. Taktéž nedochází k rozpadu či resorpci bičíků (str. 3). Není zmínka o fázi buněčného cyklu, ze které se giardie encystují. Při popisu ESV zcela chybí rešerše dosud identifikovaných giardiových

proteinů, kromě CWPs, které byly již do ESV lokalizovány (např. Reiner et al. 2001, Touz et al. 2002, Marti et al. 2003, Krtková et al. 2016). V kapitole Materiál a Metodika chybí některé důležité věci. Např. konkrétní složení kultivačního a encystačního média, specifikace typu Western blotu a metody vyvíjení imunoreakce na membráně, chybí koncentrace selekčních antibiotik, chybí specifikace střídání teplot použitých k narušení stěny bakterií, chybí označení použité protilátky proti CWP1, chybí složení „vzorkového“ pufru, chybí koncentrace biotinu přidaná v závěrečné eluční fázi. V kapitole Výsledky chybí endogenní kontrola proteinového loadu na SDS-PAGE, v legendě k obr. 33 je popisována frakce A7 – v obrázku ale chybí, popis pozorovaných jevů z imunofluorescence a Western blotů ve Výsledcích v některých případech neodpovídá tomu, co je pak diskutováno v Diskuzi. Vlastní kapitola Diskuze trpí tím, že nebyly dosaženy konkrétní nové výsledky, které by bylo možné konfrontovat s informacemi od jiných autorů. Je proto logicky zaměřena spíše na jednotlivé experimentální kroky. Chybí ale zasazení do kontextu již identifikovaných proteinů encystačních váčků, opět nejsou zmíněny, biogeneze a zániku ESV, a sekreční dráhy CWP od ER po jejich extracelulární lokalizaci vně cysty. Tato dráha je popsána do značného detailu a je jí věnováno mnoho studií. Ocenit je třeba v kapitole Diskuze snahu odůvodnit jednotlivé experimentální nezdary a zdůvodnění volby alternativních postupů.

b) Po formální stránce lze vytknout poněkud neobratný jazyk diplomatky především v literárních částech práce, např. „organely jsou stádiově specifické“ (str. 5), „T. gondi za svůj život projde stádiem oocysty, sporocysty a tkáňové cysty“ (str. 9), „lahve... byly zcystovány“ (str. 32), „buňky narostlé na povrchu encystační lahve“ (str. 32). Někdy si autorka protiřečí, např. str. 12, řádek 1: „prvokem, který tvoří stádium cysty je *Spironucleus salmonicida*..., a pár řádků pod tím: „...ačkoliv u tohoto prvoka nebylo nikdy stádium cysty detekováno“. Oproti tomu vlastních překlepů se vyskytuje minimum, citace jsou uvedeny velmi pečlivě. Z formálních nedostatků lze dále uvést např. testované koncentrace crosslinkeru by měly být uvedeny v kapitole Materiál a Metodika, nikoliv až ve Výsledcích, podobně zdůvodnění použití 5'UTR oblasti pro CWP1 a SP v kazetě pro expresi biotin ligázy patří již do Metodiky. V Metodice str. 24 se uvádí, že pro amplifikaci DNA se postupovalo dle doporučeného protokolu pro Q5 High-Fidelity DNA polymerázu. V PCR reakci ale byla použita 4x větší koncentrace této polymerázy, než protokol doporučuje. Zpřehlednění složitého systému kontrol a frakcí při izolaci interagujících proteinů by prospělo grafické schéma, ze kterého by

bylo jasné, čemu odpovídají jednotlivé kombinace z hlediska použití lyzovaných a nelyzovaných buněk, použití/nepoužití crosslinkeru, merkaptoetanolu a DMSO. Legendy obrázků by ideálně měly být samonosné, použité zkratky by měly být uvedeny také přímo v legendě k obrázku. I přes jmenované věcné a formální nedostatky je předložená práce vypracována v upravené, přehledné formě a objem a rozmanitost provedených experimentů poukazuje na získané laboratorní dovednosti autorky.

Závěr: Dle mého názoru předložená práce splňuje požadavky kladené UK v Praze na diplomovou práci. Proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byla přijata jako součást závěrečné zkoušky magisterského studie.

Otázky:

1/ Jaká je pravděpodobná role ESV pro biogenezi/processing proteinů cystové stěny? Jak vznikají ESV a jaké posttranslační modifikace přicházejí v úvahu u CWP proteinů? Existují organely analogické ESV u jiných prvků, kteří vytvářejí stěnu cysty nebo oocysty?

2/ V diplomové práci se zatím nepodařilo ověřit, zda je systém biotinylace uvnitř ER je funkční, ani zda se BirA nachází přímo v lumen ER. Jaké metody či postupy by autorka použila, aby uvedené informace získala?

3/ Diskuze str. 60 – interpretace obr. 30, N_{+M} – „neredukovaný komplex obsahující CWP1 o velikosti 40 kDa se po redukci rozpadá na protein o velikosti 25 kDa a komplex o velikosti ~ 50 kDa“. Jak lze uvedené tvrzení objasnit?

4/ Proč se přidává biotin ještě k poslední eluční frakci, když předtím byly buňky inkubovány 18 hod v encystačním medium s 100 μ M biotinem? Jakou výslednou koncentraci měl přidaný biotin k poslední frakci?

5/ Byl by problém použít metodu BioID u giardií (promiskuitní biotin ligázu), pokud by se jí podařilo targetovat do ESV? Co tomu brání?

6/ Zvažovali jste se školitelem při interpretaci obr. 31 (Testování hypotézy tvorby proteinových komplexů v cystách) možnost detekce dimerů CWP1, či heterodimerů s jinými CWPs, vzhledem k přítomnosti LRR domény, která je považována za doménu dimerizační? Molekulová velikost až 55kDa u WB_{-M} a CWP_{-M} by tomu nasvědčovala.

RNDr. Pavla Tůmová, Ph.D.

V Praze, dne 25. 5. 2018