

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Bruno Sandnera

Předkládaná práce se jmenuje „Metabolismus mědi u *Trypanosoma brucei*“. Úvodní částí práce je literární přehled, v němž autor představuje jednak hlavní buněčné proteiny s kofaktorovými ionty mědi, transport a buněčnou toxicitu mědi, jednak zájmový organismus *T. brucei*. V experimentální části práce se autor zaměřuje na kandidátní transportér mědi, který označuje jako TbATPáza. Cíli práce je nalezení funkce a lokalizace tohoto proteinu u *T. b. brucei*, provedení RNAi TbATPázy a zjištění jejího efektu, stanovení míry exprese TbATPázy za různých podmínek. Dalšími cíli je potom stanovení koncentrace mědi v buňkách *T. b. brucei* a stanovení toxicity mědi pro *T.b. brucei*.

Práce má celkem 88 stran a běžné členění (Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuse, Závěr; Seznam použitých zkratk, Seznam použité literatury). Objem experimentální práce je značný. Je zřejmé, že autor během magisterského studia v laboratoři strávil dost času a seznámil se s velmi širokou škálou metod. Takový záběr není samozřejmý a je třeba to ocenit! Naproti tomu kvalita textu je velmi slabá. Hlavní překážkou hladkého čtení jsou neobratné formulace a chybná syntaxe, které mnohdy komplikují pochopení textu. V kombinaci s nejasnou, ne-li rovnou nepřesnou interpretací výsledků je celkový dojem přinejmenším rozpačitý.

Literární přehled má dobrou strukturu a čerpá z dostatečného množství původních i přehledných odborných článků. Kvůli výše zmíněným nedostatkům bohužel k orientaci v tématu slouží jen velmi odhodlanému čtenáři.

Metodická část je podrobná, až na výjimky by podle popsaných postupů bylo možné experimenty reprodukovat, popsáno je i statistické vyhodnocení. Tato část je psána se zjevnou snahou o držení linie příběhu, což tuto kapitolu prodlužuje a ve výsledku znepřehledňuje. V molekulárně biologických pasážích se např. opakovaně provádí PCR, liguje a transformují se bakterie podle toho, jaký cílový plazmid je zrovna připravován. Textu by prospělo, kdyby tyto postupy byly zmíněny jen jednou.

Sekce Výsledky obsahuje všechny relevantní výstupy v podobě grafů, tabulek a obrázků. Textový popis a interpretace je bídná. Mnohdy by se kostrbatost dala vyřešit vhodnějším označením vzorku buněk, se kterým daný experiment pracuje, např. zavedením zkratky, horních či dolních indexů apod. To se týká zejména buněk, u nichž byla indukována RNAi pro TbATPázu (v práci označeny jako “kmen Δ tbatpáza *T. brucei* se sníženou TbATPázou”). Přehlednosti také nepomáhá, když klíčové podmínky popisovaného experimentu musí čtenář dohledávat v metodice (např. v kapitole 5.6, kde je sledován růst různých kultur *T. b. brucei* "v podmínkách o různé koncentraci mědi", tato koncentrace není uvedena; zřejmě byly takto sledovány buňky připravené podle metodického postupu 4.7 a tam uvedené Tabulky 38?). Interpretaci jsem v některých případech neporozuměla, v jiných s ní přímo nesouhlasím, viz dotazy 6 a 7.

Diskuse má adekvátní rozsah, autor vhodně porovnává svoje závěry s literaturou. Vzhledem k tomu, že některé tyto závěry vnímám jako sporné (viz výše), bylo mi zatěžko příslušným pasážím v diskusi přitakat a doufám, že při obhajobě bude prostor pro vyjasnění.

Rozumím, že text DP je zveřejněn ve stávající podobě a není již možné do něj zasahovat. S nadějí na smysluplnost zpětné vazby jsem přesto vygenerovala samostatnou sadu komentářů k jazykové úrovni práce, kterou nechci zatěžovat účastníky obhajoby a kterou zasílám autorovi nezávisle na samotném posudku. Autor zřejmě nevyužil možnost nechat si text přečíst někým dalším, byť by jeho odbornost neodpovídala zaměření práce. To je škoda, nebyla by to známka nesamostatnosti, ale snahy o kvalitu. Výstupy vědecké práce také procházejí několikerou kontrolou a vidí je mnoho párů očí před tím, než jsou odeslány do časopisu k recenznímu řízení.

K práci mám následující dotazy a věcné komentáře:

1. Z článku Isah a kol., 2020 pochází tvrzení o rozdílné velikosti TbbCuATPase odhadnuté podle Western blotu provedeného autory a velikosti predikované v TriTrypDB. Toto tvrzení se v diplomové práci objevuje opakovaně. Můžete při pohledu na Western blot na obr. 5F v citovaném článku sám odhadnout velikost daného proteinu?
2. V práci zmiňujete předpoklad různých potřeb mědi u krevních a procyklických forem *T. brucei* s ohledem na rozdíly v energetickém metabolismu. Jaká je obecná představa o transportu mědi do mitochondrie, kde je potřeba pro cytochrom c oxidázu? V práci je zmínka pouze o chaperonech, které se zřejmě transportu účastní. Mezi jakými membránovými přenašeči by se daly hledat kandidátní proteiny u *T. brucei*?
3. V závěru Literárního přehledu je zdůrazněna důležitost iontů mědi ("Činností cytochromových komplexů obsahujících měď je generována protonmotivní síla k syntéze ATP pomocí FoF1 ATP syntázy."). Vyznění je ale zavádějící. Kolik je různých cytochromových komplexů, které obsahují měď? Proč není rovnou zmíněn komplex IV?
4. K expresi rekombinantního proteinu v BL21 zřejmě nedocházelo kvůli kodonové preferenci daného kmene. Byla v kmeni Rosetta 2 testována i exprese nezkrácené verze TbATPázy?
5. V části Výsledky a Diskuze se s ohledem na lokalizaci odkazujete na studii Price a kol., 2007: "Protein kódovaný *tbatpázou* není lokalizována v jádře ani mitochondrii (Obr. 16), výsledný signál pro TbATPázu byl následně porovnán s výsledky z článku od Price et al. (2007). Lokalizace TbATPázy byla poté navrhována v ER." Daný článek se věnuje proteinu TbARF1, u kterého byla zaznamenána lokalizace v Golgiho systému. Na základě jakých informací z onoho článku jste dospěl k závěru ohledně lokalizace TbATPázy? Jak si vysvětlujete odlišnou lokalizaci TbATPázy na obrázcích 16B a 18C?
6. V experimentech s komplementací mutantních kvasinek dle předpokladu na plotně s BPS hůře rostly mutantní kvasinky CCC2Δ. Kmen CCC2Δ + TbATPáza rostl na stejné plotně lépe a Vy proto sdělujete, že „tím byla potvrzeno, že TbATPáza dokáže nahradit funkci CCC2 a dále určena její role v transportu mědi“. Zneklidňuje mě ale další bod: „Dále byla použita SC-U plotna s BPS přidáním doxycyklinem, čímž bylo zkontrolováno, že nárůst CCC2Δ závisel pouze na vloženém genu. TbATPázy doxycyklinem. Transkripce *tbatpázy* na plazmidu pCM189 je inhibována právě doxycyklinem.“ Jenže na zmíněné plotně kvasinky kmene CCC2Δ + TbATPáza narostly také. Mohl byste tyto výsledky znovu interpretovat?
7. Proč byl resazurin použit kromě stanovení IC₅₀ i pro hodnocení růstu testovaných kmenů *T. brucei*? Bylo předem ověřeno, že hodnoty fluorescence odpovídají koncentraci buněk? Bylo ověřeno, že přidávané ionty mědi se nepodílí na neenzymatické redukci resazurinu na fluorescenční produkt? Viz např. práce Gould et al, 2008 (doi.org/10.1016/j.ab.2008.07.036). Vzhledem k deklarované překvapivým výsledkům (Obr. 23B) by bylo na místě to prověřit.
8. Proč byl pro transformaci *T. brucei* použit linearizovaný plazmid, byla cílem integrace plazmidové DNA do genomu? Jak se liší strategie pro získání stabilních transformantů a pro získání transformantů, u nichž se bude vkládaná DNA replikovat extrachromosomálně?
9. Předpokládáte, že chelatační efekt bathocuproinu přítomného v médiu HMI-9 se nějakým způsobem skládá s efektem Vámi testovaného neocuproinu? Jak vnímáte logiku používání bathocuproinu v médiu?
10. Jaká je velikost sledovaných forem *T. brucei* (long slender, procykly)? Koncentraci mědi v buňkách uvádíte v ng / g sušiny. Pokud by se hodnoty přepočítaly na ng / buňky, změnil by se Vámi zaznamenaný rozdíl mezi koncentrací mědi u long slender a procyklických forem?

11. Jak u proteomické studie definujete zvýšenou a sníženou expresi? Ve stejné kapitole tvrzení “Expresie TbTAPázy byla zvýšena při zvýšené koncentraci mědi 2,85x a při snížené koncentraci mědi 2,22x oproti expresi v HMI-9” neodpovídá grafům na Obr. 26 a 27.
12. V metodice mj. schází: specifikace všech použitých protilátek, složení blokovacího roztoku (zmíněno jen sušené mléko), popis metody SDS-PAGE nebo alespoň uvedení použitých pufrů, způsob přípravy vzorku z peletu lyzátu bakterií v metodice purifikace proteinu, specifikace kyvet pro nukleofekci, způsob kontroly identity produktu v qPCR (melting curve? gel?), původ a genotyp kmene *S. cerevisiae* CCC2 Δ (komerčně dostupný? od spolupracovníků?), způsob přípravy ploten s BPS a doxycyklinem (jak bylo na plotnu aplikováno 13,2 μ l roztoku BPS?), postup transformace kvasinek (odkaz na článek nestačí), časový odstup mezi poslední imunizací potkana a jeho vykrvením.

Závěrem konstatuji, že přes všechny zmíněné výhrady předložená práce Bc. Bruna Sandnera splňuje požadavky kladené na PŘF UK na diplomové práce a lze ji doporučit k obhajobě.

V Praze, 17.5.2024

Mgr. Jitka Štáfková, Ph.D