



BIOLOGY CENTRE CAS

Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN: CZ39 0300 0000 0006 0077 3445 | SWIFT CODE: CEKOCZPP | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Ondřej Gahura
Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR
Branišovská 31
České Budějovice
370 05

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Alžběty Johánkové

Diplomová práce Alžběty Johánkové se zabývá charakterizací proteinu Get1 u parazitické diplomonády *Giardia intestinalis* a jeho rolí v procesu vkládání proteinů do membrány endoplazmatického retikula.

Po formální stránce nelze práci vytknout v zásadě nic. Rozsah je přiměřený, struktura textu smysluplná, reference a literatura zpracovány důkladně. Text neobsahuje překlepy ani jiné nedostatky. Především je ale práce napsaná na velmi vysoké úrovni, jak po stránce gramatické, tak po stránce odborné. Terminologie je správná, vyjádření jasná a přesná. Téměř žádnou větu jsem nemusel číst dvakrát, a pokud ano, chyba byla na straně čtenáře. Autorka také vytvořila řadu schematických obrázků, které vhodně ilustrují popisované molekulární procesy nebo proteinové komplexy.

Odborná úroveň práce je také velmi vysoká. Literární přehled poskytuje základní informace o organismu zájmu, a podává podrobný přehled o hlavním tématu práce, tj. biogenezi membránových proteinů a specifických molekulárních mechanismech, které využívá. Splnění dvou základních cílů – identifikace interakčních partnerů Get1 a vytvoření a fenotypová charakterizace buněčné linie s knock-outem genu Get1 – vyžadovalo osvojení velmi široké palety technik, zahrnující metody molekulárního klonování, práci s buněčnými kulturami, proteinovou biochemii, pokročilou mikroskopii, ale také využití hmotnostní spektrometrie a high-throughput sekvenování. Alžběta také využila AlphaFold pro predikci struktur proteinů a jejich komplexů, a také vyhledávání homologních proteinů na základě strukturní podobnosti. Z mého pohledu je takový rozsah použitých technik výrazně nadstandardní a je určitě skvělou investicí do budoucna. Všechny metody (a použitý materiál) jsou navíc velmi přesně popsány.

Výsledky jsou popsány jasně, dokumentovány přehlednými obrázky. V případě použití metod, které nejsou naprosto běžné, je vždy vysvětlen princip experimentu či metody, případně způsob analýzy a vyhodnocování dat. Každý experiment má také jasně popsáný smysl a výsledek. Diskuze je také velmi přesvědčivá. Oceňuji zejména alternativní možnosti interpretaci výsledků, kdy všechny alternativy jsou popsány vždy v kontextu literatury nebo nepublikovaných výsledků kolegů ze skupiny, i s případnými nedostatky a nejasnostmi. Autorka interpretuje výsledky konzervativně a navrhuje navazující experimenty, které mohou přinést odpovědi na nedořešené nebo nově se objevené otázky.

K celé práci mám několik drobných připomínek a dotazů motivovaných zvědavostí nebo neznalostí (seřazeno podle výskytu v textu, nikoliv podle závažnosti):

- 1) V úvodu, kapitola 2.3.1.3., je zmínka, že homolog Get3 se vyskytuje i u skupina Archea. Jaká je funkce tohoto proteinu, případně dalších komponent dráhy GET u těchto organismů? Vypovídá přítomnost Get3 u Archea o evoluci této dráhy?
- 2) V případech, kdy jsou komponenty roztoků uváděny v procentech, by mělo být specifikováno, o jaký zlomek se jedná (w/v, w/w, v/v).
- 3) U popisu transformace *E. coli* (kapitola 4.4.4.) je uvedeno, že se používá 150 ul buněčné kultury, přičemž není nijak specifikováno její zpracování. Je tedy možné transformovat buňky přímo z kultury bez předchozí koncentrace a dalších kroků běžně používaných pro získání kompetentních buněk?
- 4) Tab. 16 – chybí koncentrace primerů.
- 5) Způsob ověření knock-outu Get1 pomocí PCR, který se z ničeho nic objeví v kapitole 4.4.8 *Izolace DNA*, by měl být popsán spíše v kapitole 4.5.2. *Knock-out genu get1*. Jaký je průběh odstranění všech 4 alel genu z genomu *G. intestinalis*? Probíhá odstranění první (nebo dokonce více) alely čistě na základě homologní rekombinace, bez účasti gRNA? Nebo je transkripce gRNA z ještě neintegrovaného konstruktů nutná i pro navedení do prvního cílového lokusu? Bývá běžné, že nedojde k odstranění všech alel? Pokud ano, lze toto nějak předběžně odhadnout na základě míry rezistence k selekčnímu antibiotiku?
- 6) Kapitola 4.4.9 – není uvedeno, jaká metoda (reagent) byla použita pro stanovení koncentrace proteinu.
- 7) Pro afinitní purifikaci byl použit protein Get1 s BAP tagem na C-konci. Jak velký je tento tag? Mohlo potenciálně C-koncové tagování interferovat s některými z očekávaných interakcí (Get2 nebo dalších)?
- 8) Obr. 26 – Od 500 uM koncentrace DSP je zřetelný úbytek Get1, naznačující, že výrazná část proteinu byla kovalentně kroslinkována. Bohužel, membrána je ořezána a horní část chybí. Byl nějaký signál v horní části membrány? Lze něco z přítomnosti nebo absence takového signálu odvodit?
- 9) Obr. 27 – bylo by dobré uvést relativní množství vzorků A0-A5 (např. vzhledem k množství vstupního materiálu), aby bylo možné vyhodnotit účinnost pull-downu.
- 10) Existuje fylogenetická analýza proteinů Get2/EMC6? Lze s jistotou vyloučit, že protein kódovaný genem GL50803_6413 není ve skutečnosti ortholog Get2, nikoliv EMC6?
- 11) Obr. 28 – co lze zjistit o dalších dvou signifikantně nabohacených proteinech? Jestli se nepletu, v textu je o nich jen krátká zmínka. Vzhledem k designu experimentu (velmi mírný crosslinking) lze očekávat, že se jedná o specifické interaktory.
- 12) Modelování komplexů pomocí AF3 – jaké byly skóre ipTM pro dva páry proteinů na obr. 29? Jaký byl výstup ve formě grafů PAE? Oba parametry jsou zásadní pro vyhodnocení predikce. Graf PAE dobře dokumentuje, zda je vzájemná poloha obou proteinů predikována spolehlivě.
- 13) Obr. 30 – vzhledem ke složitosti luminální části proteinu nelze z obrázku říct, do jaké míry se tato oblast liší u třech uvedených organismů, ale uspořádání u *Giardie* se zdá odlišné. Struktura lidského komplexu EMC ukazuje, že luminální část interaguje s EMC7 a EMC10. Jsou tyto proteiny široce rozšířeny v ostatních eukaryotech? Je predikovaná struktura EMC1 u *Giardie* potenciálně kompatibilní s EMC7/10?
- 14) Poslední dva odstavce kapitoly 5.2.3.1 opakují tutéž informaci.
- 15) Obr. 35 – zdá se, že celkový signál PDI2 (tj. množství ER) u KO buněk Get1 je vyšší než u WT. Je to jen můj dojem z jedné zobrazené buňky?
- 16) Obr. 39 a 40 – lze říci, že většina proteinů s pozměněným množstvím, které vstupují do sekreční dráhy, jsou zároveň proteiny membránové? Nebo i proteiny ze skupin cytosolických a jaderných obsahují vyšší zastoupení membránových proteinů?

- 17) Lze něco o některých specifických proteinech, které by byly po KO Get1 up/downregulovány říct něco konkrétního? Mají nějaké společné vlastnosti, předpokládané funkce apod.?
- 18) Tabulka proteomické analýzy kmene KO neobsahuje stejné identifikátory, jako jsou uvedeny např. v tabulce 27. Data proto nelze konfrontovat s některými popsánymi výsledky. Tab. 27 – hodnoty v posledním sloupci jsou pravděpodobně *Log2fold Change*, nikoliv *Fold Change*.
- 19) Je možné, že dimer Get1/Get2 in vivo existuje, ale není kovalentně spojen pomocí crosslinekru DSP a Get2 tedy nefiguruje v MS datech z pull-downu?

Shrnutí:

Práci jsem si přečetl opravdu s chutí a dozvěděl jsem se spoustu nových informací, a to i přesto, že k dané problematice nemám daleko. Jedná se o jednu z nejlepších diplomových prací, se kterými jsem se setkal. Doporučuji hodnocení „výborně“.



Ondřej Gahura

V Českých Budějovicích, 11. září 2024