

Bakalárska práca Julie Kovářové sa zaoberá problematikou prítomnosti hému v organizmoch skupiny Trypanosomatidae, s dôrazom na *Phytomonas serpens*. Prevedené experimenty naznačujú, že tento organizmus je schopný dlhodobo prežívať bez prítomnosti hému v jeho prostredí, i keď sám túto molekulu nie je schopný syntetizovať. Napriek tomu je schopný hém prijímať a pravdepodobne i čiastočne metabolizovať. Uvedený poznatok je nesmierne zaujímavý a určite si zasluhuje ďalšie, podrobnejšie preskúmanie. V tejto fáze výzkumu by som však bol opatrný s tvrdením v závere práce, že sa jedná o prvý známy eukaryotický organizmus, ktorý nepotrebuje hém. Totiž absenciu stopového množstva hému je ťažké dokázať a pokiaľ viem, prítomnosť hémovej biosyntetickej dráhy u *P. serpens* nebola zatiaľ vylúčená. Rovnako ma prekvapuje presvedčenie že *P. serpens* využíva hém na obranu proti oxidačnému stresu, keďže žiaden experiment potvrdzujúci túto teóriu som v práci nezaznamenal, práve naopak. Navyše autorka sama uvádza, že v bunkách *P. serpens* sa nachádza napr. nehémová superoxid dismutáza. Čo sa týka možnosti že *P. serpens* hém iba nešpecificky prijíma a čiastočne metabolizuje, ale neinkorporuje do proteínov, tá bude najlepšie vyvrátená po inkubácii buniek s rádioaktívne značeným hémom a následnou detekciou hémových proteínov natívnou elektroforézou bez nutnosti blotovania.

V literárnom prehľade autorka prehľadne spracovala úvod do problematiky metabolizmu študovaných organizmov. Avšak, a to je moja najväčšia výhrada, značne zanedbala problematiku hému, čo je nosná téma práce. Nevysvetlila dostatočne v ktorých proteínoch sa jednotlivé hémy vyskytujú; neobjasnila dôkladne syntézu hému, i keď sa na ňu často odvoláva; v práci nie je dokonca ani znázornená štruktúra porfyrinového kruhu. A to je škoda, pretože práve v mikrobiológii je problematika metabolizmu hému obzvlášť zaujímavá (napr. bunková kompartmentalizácia jeho syntézy, využitie ako zdroj železa z hostiteľa.....). Konečne, autorka absolútne nespomína degradáciu hému, pritom táto otázka môže priniesť zaujímavé nápady do budúceho štúdia uvedených organizmov.

Drobné pripomienky a návrhy:

- Zaskočila ma zmienka v závere, že je ťažké získať axenickú kultúru u prvokov *Trichomonas* a *Giardia*, keďže tieto organizmy takmer desať rokov (dúfam) axenicky pestujem.
- Na kvantitatívne stanovenie hémov by som navrhol skúsiť pyridine hemochromovú metódu (Berry EA, Trumpower BL. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem.* 1987 Feb 15;161(1):1-15.)
- Odporúčam skúsiť blotovať proteíny po natívnej elektroforéze v pufovanom roztoku bez metanolu. Z vlastnej skúsenosti viem, že takýto prenos je možný (i keď menej kvantitatívny) a nie je vylúčené, že sa podarí udržať v niektorých proteínoch aj nekovalentne viazaný hém.
- V metodike je uvedená kvantifikácia hémov podľa štandardu, vo výsledkoch však akékoľvek hodnoty chýbajú
- Značenie obrázkov v poradí 1,9,2,3,5,7,4,6....je značne neštandardné a ťažko sa v nich orientuje
- Vo výsledkoch HPLC je uvedené že u *P. serpens* (obr.1) je najnižšie množstvo hému, zatiaľ čo v bunkách *L. tarentolae* (obr.2) najvyššie. Pri pohľade na jednotlivé chromatogramy mi toto tvrdenie neseďí. Najnižšie hodnoty sa mi zdajú u *T. brucei*.

Napriek uvedeným pripomienkam sa nazdávam, že Julie Kovářová predložila veľmi kvalitnú bakalársku prácu, zorientovala sa v problematike, zvládla rozmanité laboratórne techniky ako je axenická kultivácia, HPLC, natívna elektroforéza, western blotting a PCR a preukázala schopnosť diskutovania výsledkov. Uvedenú bakalársku prácu jednoznačne doporučujem k úspešnej obhajobe.



Róbert Šuták
Katedra Parazitologie
Přírodovědecká Fakulta
Univerzita Karlova v Praze