



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Katedra parazitologie
Viničná 7
128 44 Praha 2

Oponentský posudek na bakalářskou práci Zuzany Kotrbové

Bakalářská práce Zuzany Kotrbové se zabývá syntézou purinů u prvoka *Trypanosoma brucei* a využití inhibitorů některých enzymů této biosyntetické dráhy jako léku na trypanosomiázu. Experimentální část práce se pak týká dvou enzymů ze skupiny fosforibozyltransferáz (PRT), HGPRT a XPRT, u krevních stádií *T. b. brucei*. Autorka pojala literární rešerši úsporně, téma zpracovala na sedmi stranách. Nejvíce prostoru je věnováno podrobně popsané metodice experimentů, jejichž výsledky jsou následně stručně představeny a krátce diskutovány. Práci doprovází seznam literatury.

Deklarovanými cíli experimentální části práce bylo:

- připravit pro geny HGPRT a XPRT double knock-down buněčnou linii,
- připravit buněčné linie overexprimující dané proteiny s v5 tagem a sledovat lokalizaci tagovaných proteinů,
- porovnat cytotoxicitu vybraných fosfonátů acyklických nukleosidů u kontrolních buněk a u kultur s indukovanou overexpresí HGPRT_v5 nebo XPRT_v5.

Cíle, které si autorka vytyčila, byly uspokojivě splněny a je třeba vyzdvihnout, kolik práce k tomu jistě bylo třeba. O dosažení prvního úkolu, umlčení exprese genů pro HGPRT a XPRT, je v práci podán nepřímý důkaz – zpomalení růstu kultur, u nichž byla indukována RNAi. Lokalizace overexprimovaných proteinů HGPRT a XPRT s v5 tagem byla sledována pomocí Western blotu na digitoninových frakcích a pomocí imunofluorescence. Cytotoxicita fosfonátů acyklických nukleotidů (PMEG, S HPMPG, R PMPG) pro buňky, u nichž byla indukována overexprese HGPRT nebo XPRT, byla testována za použití alamar blue testu.

I. Hodnocení experimentální části práce

Z uvedeného vyplývá, že si autorka během práce v laboratoři vyzkoušela širokou škálu metod, což oceňuji. Uvědomuji si také, že bakalářský student je v laboratoři „v zácvičku“ a tak následující otázky směřují spíše k tomu, zda si autorka uvědomuje slabiny některých výsledků a zda tuší, co by bylo potřeba zlepšit, jednalo-li by se o magisterskou práci nebo výsledky pro odbornou publikaci.

1. Sama autorka zmiňuje v diskusi, že pro ověření fungování RNAi by bylo třeba prokázat pokles exprese obou genů na úrovni RNA a proteinů. Sledování růstového fenotypu však provedeno bylo. Proč pouze jedenkrát? Nebo hodnoty v grafu představují průměry z více experimentů?

2. U obrázku 4.5 (Digitoninová frakcionace a detekce TbXPRT_v5) by mě zajímal autorčin názor na to, co představuje dvojitý band rozpoznávaný protilátkou proti v5 tagu. Může autorka vyvozovat jasné závěry z blotů na obrázku 4.6 (Digitoninová frakcionace a detekce TbXPRT_v5), nebo by bylo lepší frakcionaci zopakovat?

3. Podobně nejednoznačné je podle mě barvení protilátkou proti hexokináze na obr. 4.8. Kvalita obrázků není taková, aby se dalo vyloučit, že hexokináza a XPRT_v5 jsou lokalizovány ve stejném buněčném kompartmentu. Co si o těchto výsledcích autorka myslí, také v souvislosti s možnou přítomností C-terminálního lokalizačního signálu zmíněnou v diskuzi? Hledala autorka takový signál v sekvenci daných proteinů *T. brucei*?
4. Dal by se pro porovnání hodnot EC50 pro jednotlivé buněčné kultury (indukované / neindukované) použít nějaký statistický test?
5. Co si autorka představuje, že se stane s buňkou po zablokování enzymů XPRT a HGPRT? Jakými enzymy může *T. brucei* chybějící dráhy obejít? Jaké jsou různé možnosti interpretace vymizení růstového fenotypu po indukci RNAi (obr. 4.2)?
6. Je známo, zda testované ANP překračují hematoencefalickou bariéru?

II. Hodnocení literárního přehledu

Úroveň literárního přehledu mě velmi zklamala. Kromě dětských neduhů, které jsou u bakalářských prací běžné (řada překlepů a anglicismů, místy nesprávná forma citací), mě nejvíce mrzí, že v textu se opakovaně vyskytují pasáže doslova přeložené z citovaných publikací. Příkladem budiž strana 5, na které se nachází asi 3 věty, které nejsou přímým překladem cizího textu. Kuriózní je na této straně navíc část věty doslova přeložená z článku Keough a kol., 2009 (“ (...) lidé, kteří zdědili částečný defekt v aktivitě HGPRT, vedou normální život, i když aktivita enzymu klesne na 3%“), u níž je ale uvedena zcela irelevantní citace článku Yu a kol., 2012 (ten se týká Polo-like kináz a ke zmíněnému nemá žádný vztah). Přímé překládání textu se jednak podepisuje na bídné stylistické úrovni textu (zachovávání anglického slovosledu apod.), jednak může docházet k tomu, že věty vytržené z kontextu ztrácejí původní význam. Nejdůležitější ale je, že při podobném přístupu mizí tvůrčí aspekt práce a psaní se v podstatě stává plagiátorstvím. Překlad z cizího jazyka velkým tvůrčím vkladem není.

Otázky a komentáře k literárnímu přehledu:

7. Zajímalo by mě, jaké názvosloví je správné v případě ANP: v literatuře jsem se setkala pouze s výrazem „fosfonát“, nikoli „fosfanát“, který autorka standardně používá a který je také součástí názvu práce.
8. Termín „purinová záchranná cesta“ v malé anketě na naší katedře nezískal mnoho příznivců. Pokud je vůbec nutné tento zavedený název překládat, pak „pathway“ by byla spíše „dráha“ a místo poněkud emotivní „záchrany“ se dá uvažovat např. o „recyklaci“.
9. U převzatých obrázků by často bylo dobré zasáhnout do grafiky, zvýraznit to, co je podstatné pro daný text, a adekvátně popsat („upraveno podle XY“). Např. v obr. 1.3 se tak zbytečně objevují označení přenašečů a čísla, o kterých se v legendě nic nedozvíme a ani dozvědět nechceme, v obr. 1.4 zbylo označení „A“ a „B“, které v legendě není rozvedeno, jednotlivé vzorce v obr. 1.5 jsou převzaty z jiných zdrojů, což se projevuje nejednotnou grafikou a různým znázorněním fosfonátové skupiny.
10. Na straně 4 jako doklad tvrzení o *T. brucei* autorka cituje článek o *T. vivax*. Vhodnější by zde byla např. studie Vandemeulebroucke a kol., 2010, která se týká přímo IG-NH u *T. brucei*.
11. Na straně 5 autorka cituje studii Krahn a kol. (1997) při popisu strukturního rysu údajně společného PRTázám, flexibilní smyčky, která se po navázání substrátu uzavírá kolem aktivního místa enzymu. Z citované studie přitom vyplývá, že tato charakteristika platí pro

PRTázy typu I. Také vzhledem k dalším hypotézám o struktuře PRTáz a případné vazbě ANP na ně (např. na straně 7) by mě zajímalo, zda se autorka či její předchůdci v laboratoři pokusili o alignment aminokyselinové sekvence PRTáz z *T. brucei* s enzymy, u nichž je známá struktura. Patří TbXPRT a TbHGPRT do skupiny PRTáz typu I? Dá se na základě predikce jejich struktury předpokládat přítomnost podobných smyček a podobné uspořádání aktivního místa enzymu?

12. Ke straně 6, „ (...) ANP (...) by mohly působit jako antivirotika“: je prokázáno, že tak působí, navíc minimálně tři zástupci ANP se jako antivirotika uplatňují i na trhu.

Tvrzení, že „ANP mají stejně jako mononukleotidy GMP a IMP purinovou bázi a fosfátovou skupinu (...)“, neodpovídá větě o několik řádků výše („ANP jsou (...) deriváty purinových a pyrimidinových bazí“).

13. K části věnované metodice:

„sódium acetát“ je česky octan sodný,
„akorát“ se v odborném textu neužívá,
„anti-myš“ a „anti-králík“ je třeba nahradit konkrétním označením protilátky,
„esej“ je literární útvar, nikoli laboratorní test (anglicky „essay“ vs. „assay“),
chybí uvedení substrátu peroxidázy,
zásobní ředění poly-L-lysinu,
koncentrace tetracyklinu pro indukci overexprese,
montovací médium pro mikroskopii (pravděpodobně něco s DAPI.),
typ mikroskopu,
původ protilátek (výrobce? vlastní?),
metodika sekvenace (někam posíláno? kam?).

Bakalářskou práci Zuzany Kotrbové doporučuji k obhajobě a přes rozladění ze způsobu psaní navrhuji s přihlédnutím k experimentální části práce hodnocení známkou 2.

V Praze, dne 11.5.2012

Jitka Hostomská