

Oponentský posudek bakalářské práce Hany Váchové: „ Charakterizace inhibičních vlastností proteinu TbIF1 vůči mitochondriálnímu komplexu F₁-ATPázy u bičíkovce *Trypanosoma brucei*.“

Předkládaná bakalářská práce se zabývá základní biochemickou charakteristikou proteinu TbIF1 – inhibičního peptidu mitochondriální F₀F₁ ATP syntázy u parazitického bičíkovce *Trypanosoma brucei*. Práce tak dobře zapadá do vědeckého programu laboratoře Funkční biologie protist PARU AV ČR, která se zabývá charakterizací unikátních proteinových komponent oxidačně-fosforylačního (OXPHOS) aparátu v mitochondriích kinetoplastid. Díky signifikantní odlišnosti od jejich savčích homologů jsou OXPHOS komplexy těchto parazitických organismů potenciálními cíly pro vývoj účinných terapeutických látek. Téma práce mi připadá velmi atraktivní, inhibiční faktor IF1 představuje zástupce skupiny mitochondriálních proteinů, které patrně nepocházejí z původního alfa-proteobakteriálního symbionta a které svou funkcí zřetelně ztělesňují snahu o „zkrocení“ této sice nesmírně užitečné, ale potenciálně nebezpečné organely.

Bakalářská práce sleduje klasické formální členění. V teoretické části jsou krátce shrnuty znalosti o životním cyklu trypanozom a jimi způsobovaných onemocnění z hlediska epidemiologie a aktuálních možností terapie. Dále se autorka věnuje popisu mitochondriálního metabolismu s důrazem na jeho rozdíly u jednotlivých životních forem *T. brucei*. Dále je popsána struktura a funkce F₀F₁ ATP syntázy, včetně srovnání prokaryotické a mitochondriální formy enzymu. Závěr teoretické části je věnován samotnému proteinu IF1, jehož funkce byla studována především u kvasinkové a bovinní formy. S jejich sekvencemi je pak porovnán homolog IF1 *T. brucei* (TbIF1), který byl objeven v laboratoři školitelky.

Cíle práce jsou formulovány jasně a stručně formulovány, představují obvyklé schéma pro biochemickou charakterizaci nově objevených proteinů. Metodická část obsahuje podrobně popsaný postup tvorby expresních konstruktů různých variant TbIF1, jejich exprese v bakteriích a následnou purifikaci a *in-vitro* inhibiční ATPázovou esej s preparací TbF₁ ATPázy poskytnutou školitelkou. Experimentální rozsah bakalářské práce považuji za velmi úctyhodný.

Ve výsledkové části nejprve autorka popisuje jednotlivé formy studovaného proteinu, jedná se celkem o 9 variant proteinu (WT, čtyři verze N-terminálně krácené celého proteinu a čtyři verze N-terminálně krácené proteinu bez 30 aminokyselin na C-konci). Autorce se podařilo úspěšně připravit všechny varianty kromě té úplně nejkratší, nicméně čím byl protein více krácen na N-konci, tím se výrazně snižovala účinnost exprese. Na základě zobrazených SDS-PAGE gelů lze konstatovat, že exprimované proteiny byly purifikovány do téměř úplné čistoty. Inhibiční účinky na F₁ ATPázu se u jednotlivých variant TbIF1 výrazně lišily, obecně byly lepší u C-terminálně zkrácených forem, pomyslným „vítězem“ s nejlepšími inhibičními vlastnostmi se stala varianta Δ_{amin5-64}. Inhibiční vlastnosti jednotlivých forem jsou pak komentovány v diskuzi v rámci porovnání s bovinním IF1, tak i z hlediska nejasného místa odštěpování mitochondriální presekvence, které vychází odlišně na základě predikce v porovnání s alignmentem s kvasinkovým IF1. Dosažené výsledky pokládám za velmi věrohodné a zajímavé, představují dobrý základ pro pokračování v rámci diplomové práce.

K práci mám následující připomínky a otázky:

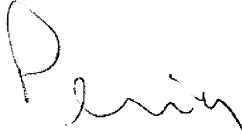
1. Formální připomínky – dojem ze zajímavých výsledků kazí některé překlepy a další chyby – dokonce někdy i humorné záměny slov způsobené možná automatickými opravami v textovém editoru (např. endemické místo epidemické, katechizace místo kachektizace).

2. Je známo, jestli je v krevní formě *T. brucei* přítomna v mitochondriích plně asemblovaná ATP syntáza. Např. u modelu savčích buněk bez mtDNA (ρ_0) je přítomen nekompletní enzym, který jen hydrolyzuje ATP, aniž by transportoval protony. Membránový potenciál je pak generován pouze elektrogenní výměnou ATP za ADP adenin-nukleotidovým translokátorem. Nemohlo by k něčemu podobnému docházet u trypanozom, případně jiných parazitů.
3. Odstavec věnovaný trypanozomovému IF1 faktoru v teoretické části je zcela bez citací. Ač byl patrně nedávno objeven přímo v laboratoři školitelky, očekával bych alespoň citaci typu „osobní sdělení“. Předpokládám, že by se shodovala s citací „Gahura et al. nepublikované výsledky“ uvedenou v diskuzi.
4. Při popisu ATPázové eseje jsou uvedeny nesprávné koncentrace některých chemikálií – např. u NADH, PEP, MgATP jsou uvedeny v nereálných mM koncentracích místo μM . Dále se v této části uvádí příprava dvou variant pufrů o různém pH, ve výsledkové části jsou pak uvedena data získaná jen při jedné variantě pH.
5. Zpřažená ATPázová esej mívá někdy signifikantní pozadí, možná by se hodilo použít v eseji některý ATPázový inhibitor pro kalibraci pozadí změny absorbance při maximální inhibici enzymu. Je známo, které z klasických inhibitorů ATPázy (oligomycin, aurovertin) fungují s Tb ATPázou? Který z těchto inhibitorů by bylo na místě použít pro preparaci obsahující pouze F_1 část enzymu?
6. Máte nějakou hypotézu, proč se tak výrazně lišily účinnosti exprese různých forem TbIF1, může to být různá toxicita pro C41 buňky, spočívající například ve vazbě IF1 proteinu na bakteriální ATPázu?
7. Pro další pokračování práce bych navrhoval sledovat inhibiční vlastnosti variant TbIF1 i na savčí ATPáze, aby bylo možno vytipovat variantu působící jen na enzym parazita.

Přes uvedené připomínky považuji předkládanou bakalářskou práci Hany Váchové za velmi hodnotnou, autorka splnila vytyčené cíle a získala některé cenné poznatky, které mohou v budoucnu přispět k vývoji terapií proti spavé nemoci.

Předkládaná práce podle mého názoru splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci a doporučuji ji proto přijmout.

V Praze 23. května 2013



Mgr. Petr Pecina, PhD.