



Oponentský posudok na bakalársku prácu Lucie Rybová
“EFEKT OVEREXPRESIE MITOCHONDRIÁLNI ALTERNATIVNÍ OXIDÁZY V
BUŇKÁCH TRYPANOSOMA BRUCEI ”

Lucie Rybová vypracovala svoju Bc. prácu s názvom „Efekt overexpresie mitochondriálnej alternatívnej oxidázy v buňkách *Trypanosoma brucei*“ pod vedením RNDr. Aleny Panicucci Zíkovéj, PhD. Práca má štandardné členenie a rozsah 59 strán. Literárny prehľad je napísaný zrozumiteľne a poskytuje dostatočný prehľad o danej problematike. Rovnako sú prehľadne a jasne napísané aj ostatné kapitoly práce. Metodika je miestami rozpisovaná zbytočne podrobne. Napríklad, ak je dané, že mlieko pre blokovanie nešpecifických väzieb je 5%, označením w/v jasne definujete, že sa jedná o hmotnostné percentá a nie je nutné rozpisovať, koľko gramov v akom objeme ste rozpustili. Na druhej strane, nepochybujem, že tieto detaily ocení nejaký začínajúci študent.

Alternatívna oxidáza (AOX) je enzým, ktorý sa dlhé roky považuje za možný terapeutický cieľ pri liečbe ochorení, ktoré *Trypanosoma brucei* spôsobuje. Napriek možnej chemoterapeutickej liečbe cielenej na AOX, neexistuje koherentná funkčná analýza, ktorá by popísala zapojenie enzýmu do respirácie a jeho energetický prínos v rámci metabolizmu *T. brucei*.

Bakalárska práca sleduje nadexpresiu enzýmu AOX a jej vplyv na základné mitochondriálne parametre ako sú spotreba kyslíka, tvorba membránového potenciálu a tvorba kyslíkových radikálov. Získané výsledky jasne poukazujú na prepojenie AOX s metabolizmom glukózy, čo bolo bez priamych dôkazov naznačené už v starších publikovaných prácach, ktoré už predkladaná práca poskytuje.

K práci mám nasledovné otázky a komentáre:

1. Na strane 21 opisujete metodiku pre imunofluorescenciu (IFA) kde používate na permeabilizáciu buniek Triton X-100. Aké výhody poskytuje detergent oproti ľadovému metanolu, ktorý sa bežne pre tento účel používa?
2. Ďalej na rovnakej strane popisujete premývanie vzoriek pre IFA roztokom PBS s obsahom Tweenu a aj bez obsahu Tweenu. Aký význam má použitie PBS s detergentom aj bez detergentu pri oplachu?
3. Na strane 28, obrázok 8, ukazujete expresiu AOX-V5tag počas rôznych dní indukcie v médiu SDM 79. Viete vysvetliť, prečo je množstvo tagovaného proteínu viac vo vzorke 2T ako vo vzorke 4T? Tento výsledok je rovnaký vo všetkých analyzovaných klonoch, z toho dôvodu sa javí byť pokles AOX-V5tag na 4 deň od indukcie ako fyziologický prejav.
4. Na strane 30, obrázok 9, ukazujete výsledok exprese proteínov, ktoré by mohli byť ovplyvnené nadexpresiou AOX-V5tag. Legenda k obrázku však popisuje iba použitie





protilátky α -TAO pre kontrolu expresie AOX proteínu. Zvyšné tri druhy protilátok sú síce v obrázku, ale mali by sa nachádzať aj v legende. Samotný AOX detegujete špecifickými protilátkami. Vo výsledku neviete určiť, či spodný signál o veľkosti cca 33 kDa patrí rozpadovému produktu AOX-V5tag, alebo endogénnemu enzýmu. V práci neudávate akú veľkosť by endogénny AOX enzým mal mať. Podľa amino kyselinovej sekvencie vypočítal program Expasy jeho veľkosť na 37,5 kDa, čo je veľkostne skôr horný signál ako spodný. Zároveň by mal tagovaný proteín migrovať v oblasti vyššej ako 40 kDa, keďže V5 tag samotný má 5,7 kDa. Vypočítaná veľkosť endogénneho AOX proteínu koreluje s výsledkami v práci Horváth et al., 2005, kde rovnakou metódou Western blotovej analýzy detegovali signál pre endogénny AOX tesne pod 40 kDa. Nevieť určiť, či veľkosti molekulových hmotností naznačené v obrázku zodpovedajú markeru, alebo popisujú veľkosť detegovaných signálov, hodilo by sa naznačiť šípku od veľkosti k obrázku. Podarilo sa vám niekedy detegovať AOX pomocou špecifických protilátok vo WT *T. brucei* a preukázať tak, že protilátky fungujú? Zaujímalo by ma, či sa tento dvojband nachádza aj v organelárnej frakcii, ktorú ukazujete na obrázku 11, môžete ukázať celý Western blot?

5. Obrázok ďalej ukazuje zaujímavý fenomén, kedy má médium SDM 79 opačný efekt na intenzitu spodného signálu ako médium SDM 80. Spodný signál, o jeho pôvode si nie ste istí, sa počas doby indukcie akumuluje v médiu bez glukózy, zatiaľ čo v glukózovom médiu s časom indukcie klesá. Vedeli by ste poskytnúť vysvetlenie?

Študentka Lucie Rybová v rámci predkladanej bakalárskej práce pripravila bunkové línie exprimujúce tagovaný proteín AOX-V5tag v *T. brucei* a študovala vplyv nadexpresie enzýmu na rôzne mitochondriálne parametre. Práca priniesla originálne výsledky a študentka zároveň popisuje plány pre budúci výskum, ktorý bude vychádzať z nadobudnutých dát. Hodnota získaných výsledkov a aj spôsob ich prezentovania dokazujú kvalitu diplomantky a preto diplomovú prácu odporúčam k obhajobe.

Hodnotím:

V Bratislave 15. mája 2023

RNDr. Ingrid Sveráková, Ph.D.





Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

Mlynská dolina
Ilkovičova 6
842 15 Bratislava 4

Katedra biochémie

RNDr. Ingrid Sveráková, PhD.
+421 2 90 149 546
ingrid.sverakova@uniba.sk



<https://fns.uniba.sk/>