

Oponentský posudek bakalářské práce

Název diplomové práce: Důležitost dimerů FoF₁ ATP syntázy pro krevní formu savčího parazita *Trypanosoma brucei*

Autor práce: Monika Čížková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Alena Panicucci Zíková, Ph.D.

Oponent: RNDr. Eva Horáková, Ph.D

Hodnocení práce:

Předložená diplomová práce je psána česky (rozsah 55 stran) a je klasicky členěna do několika kapitol, jako je úvod, metodika, výsledky a je uzavřena diskusí a závěrem. Myslím, že práce odpovídá rozsahem i obsahem nárokům na bakalářskou práci a cíle byly školitelkou zvoleny adekvátně a posléze splněny. Po formální stránce bych snad jen vytkla místy ne úplně pěkné formulace v češtině, na kterých může autorka do budoucna zapracovat, pokud se tedy nerozhodne rovnou pro angličtinu, což je z dlouhodobého hlediska lepší. Dále pak vidím mírné nedostatky v interpretaci nasbíraných dat a ačkoliv bakalářská práce má studenta naučit zejména metodickým přístupům, důležité je i přesné vědecké vyjadřování (rozvedeno níže).

Cílem práce bylo vytvoření mutantní linie podjednotky *g* komplexu *V* u krevní formy *Trypanosoma brucei*, její ověření a následná fenotypická analýza zahrnující ověření integrity ATPsyntázy, vytváření dimerů a citlivost na oligomycin. Množství metodických přístupů a odvedené práce je pro bakalářskou práci dostatečně široké. Vytvořená linie bude použita k dalším pokusům, které zodpoví klíčovou otázku, jaká je role podjednotky *g* (dimeru ATPsyntázy) pro tvorbu mitochondriálních krist u krevní formy parazita a jeho důležitost pro vývoj v hmyzí formu. Tato část již není experimentálně řešena, nicméně bych ráda, aby autorka práce hypoteticky nastínila a dále rozvedla možné očekávané výstupy během obhajoby.

Připomínky a dotazy k práci:

Úvod poměrně dobře pokrývá studovanou problematiku. i když místy je možná zbytečně zatížen nepodstatnými detaily. A tak se čtenář dozvídá spoustu informace o nejružnějších ATPázách, ale málo se dozvídá o struktuře tohoto komplexu u *T. brucei*. A to je škoda, protože vím, že v laboratoři školitelky byl doslova studován do každé molekuly.

Str. 42-43 – U obrázků 24-29 prosím o přesnější vyhodnocení Western blotů za použití loadovacích kontrol pro normalizaci signálu a jejich kvantifikaci. Specifikujte, z jakých částí ATPázy jsou jednotlivé proteiny použité na WB analýzu. S podjednotkami jako je Tb1 a Tb2 se poprvé setkáváme až ve výsledcích.

Otázka 1: Jak vypadají krysty v krevní formě *T. brucei*? Jakou morfologickou změnu očekáváte u dKO sub *g*?

Otázka 2: Jaký očekáváte fenotyp u dKO sub *g* během vývoje *in vitro* a *in vivo* v porovnání s WT linií? Bude u vašich linií možnost sledovat tzv. stumpy formy?

Otázka 3: Tvoří podjednotka *g* a *e* v *T. brucei* komplex? Pokud ano, byla nějakým způsobem u dKO sub *g* linie sledována podjednotka *e*? Pokud ne, jaký experimentální postup by autorka navrhovala?

Menší připomínky:

V celé práci nejsou jakkoliv označeny použité markery, označit jen velikosti produktů (PCR, WB) nestačí.

Pozor na převádění do PDF formátu, může dojít k deformitám v obrázcích, což se místy stalo i zde.

Str. 9 – V Obr. 5 je uvedeno “Zobrazeny jsou také úhly vyskytující se v dimeru“, ale úhly na obrázku nejsou specifikovány.

Str. 38 – Špatné označení jamek u klonu A3 u obrázku 18.

Str. 39 – Špatné označení osy X (není uvedena jednotka, jednodušší pokud by byly uvedeny dny) a Y (velikost buněk?) růstových křivek u obrázků 19. a 20.

Str. 40 – Obr. 21: WT a KO vzorky byly analyzovány na separátních membránách a jejich zarovnání do obrázku není přesné (WT gel pravděpodobně běžel kratší dobu). Jaký byl důvod k tomuto kroku? Obdobná situace se objevuje i u obrázků 22 a 23 a považuji ji za poměrně nešťastnou, protože bude pravděpodobně nutné experiment opakovat pro publikační účely.

Str. 43 – Nejednotnost v hodnocení růstových křivek v části výsledky a diskuse. Chápu, že bylo použito z důvodů zjednodušení, nicméně není dobré uvést, že z experimentu nelze vyvodit výsledky (**str. 38**) a pak jej později interpretovat jinak (**str. 46** “z výsledků je zřejmé, že ani u jedné linie, ani v jednom médiu, nedošlo k markantní změně v růstu“).

Pozor na krkolonné a nepřesné vyjadřování, v textu např.:

Str. 8 – “Typ IV, vyskytující se u Euglenozon, (např. *Trypanosoma brucei*).“
Vyskytující se u euglenozoi?

Str. 9 – „Absence těchto podjednotek nemá vliv přímo na životnost buněk za ideálních růstových podmínek, tedy podmínek, kdy má buňka dostatek glukózy a dalších esenciálních látek. Pouze u buněk dojde ke snížení schopnosti růstu až o 60 %.“ *Nesrozumitelné. Je myšleno u buněk v chudém médiu?*

Str. 38 – „Růst buněk jsem ve dvou **odlišných** mediích pozorovala kvůli tomu, že buňky se v **odlišném** médiu mohou chovat velmi **odlišně**, což je způsobeno **odlišným** množstvím glukózy, kdy v médiu CMM se nachází mnohem méně glukózy než v médiu HMI-11.“ ☺

Str. 44 – “Pokud by absence podjednotky g ovlivňovala výšku $\Delta\Psi_m$, tedy v případě, kdy by byl nižší, buňky *T. brucei* by byly více senzitivní na oligomycin,“ *Opravdu, nejedná se o sníženou citlivost na oligomycin?*

Předložená bakalářská práce splňuje formální požadavky pro udělení akademického titulu bakalář a tímto ji doporučuji k obhajobě. Práce mě zaujala a těším se na obhajobu kandidátky, a na základě prezentace a následné diskuse udělím hodnocení.

V Třeboni 20. dubna 2023

.....

Eva Horáková