POSUDEK NA MAGISTERSKOU PRÁCI Bc. Pavla Poliaka

Předkládaná magisterská práce se zabývá mechanismem importu mitochondriálních proteinů u *Trypanosoma brucei*. Stručně řečeno autor udělal následující:

1. Vygeneroval dvě polyklonální protilátky proti podjednotce alpha and beta MPP komplexu
2. Pomocí RNAi vypnul β-podjednotku MPP komplexu and MIP peptidázu u procyklického stádia *T. brucei*
3. Částečně ověřil specifičnost protilátek pomocí Western analýzy
4. Pokusil se zmapovat procesovací mechanismus lidského frataxinu v mitochondrii *T. brucei*

Dle mého názoru tato práce je na úplném začátku a místo souhrnu a závěrů otevírá spoustu zajímavých otázek a jen doufám, že autor bude v práci pokračovat. Mé hlavní výtky se týkají úvodu, kde pár kapitol by si zasloužilo více pozornosti (např. kapitola o *T. brucei*, či o importu proteinů do mitochondrie trypanosomy). Diskuze je pak mix mezi výsledky a úvodem, což je pochopitelné, jelikož zde není předloženo příliš hodně výsledků, které by stály za diskuzi.

K práci budu mít řadu poznámek a poté pár dotazů.

Poznámky:

1. Strana 5 – Tvrzení, že podjednotky α-MPP a β-MPP jsou začleněny do cytochrom c reduktázy komplexu pouze u rostlin není pravdivé. Tyto dvě podjednotky (tzv. core proteiny) jsou přítomny take v savčím, kvasinkovém, či leishmanovem a crithidiovem komplexu !
2. Strana 5 – podle citované literatury je arginin důležitý na pozicích -10 and -2 od štěpícího místa, nikoliv -2 a -3. Nicméně tomuto tvrzení bych nepřikládala žádnou důležitost, jelikož je spousta vyjímek.
3. Strana 8 – autor místo toho aby popsal jak dochází k mitochondriálnímu importu u trypanosomy, tak ukázal prakticky jen schéma bez jakéhokoliv doprovodného textu. To nepovažuji za správné.
4. Strana 9 – tabulka obsahuje neúplné informace, občas je uvedeno identifikační číslo genu, obcas ne. Občas je uvedena citace, občas ne.
5. Tabulka 1.1, první řádek. Jsem si 99.9% jista, že Hsp70 je přítomen v genomu Trypanosomy, dokonce jich je několik.
6. Záhlaví na straně 11 patří jinému projektu.
7. Cíle jsou nesrozumitelné a prakticky bez znalosti sekce Materiálu, Organismy nepochopitelné.
8. Strana 19, kapitola 4.1 – antibiotika uvedena v ul/ml, ale podle tabulky na straně14 patří ug/ml
9. Strana 23, Výsledky. Autor uvádí, že provedl PCR a klonování, nicméně tato metodika není vůbec zmíněna.
10. Strana 26. Kapitola 5.3. Uvítala bych obrázek gelu barveným Coommassie, na kterém byly rozděleny proteiny, jenž byly použity pro imunizaci.

Otázky:

1. Bylo ukázano, že některé eukaryotické cyt c reduktázy obsahují α- a β- MPP podjednotky. Jsou tyto proteiny aktivní? Je tedy možné, že cyt c reduktáza má dvě funkce?
2. Priest and Hajduk (1992) ukázali, že *Crithidia* cyt c reduktáza obsahuje obě podjednotky MPP. Jsou to ty samé proteiny, které jsou studovány v této práci ?
3. Kolik genů pro α- a β-MPP se nalézá v genomu Trypanosomy? Pokud vice, jaká je jejich podobnost a jak si autor vybral své kandidáty?
4. Strana 7 – Co to jsou oktapeptidy?
5. Tabulka 1.1 - Autor zvýrazňuje pár genů (modře), které nebyly identifikovány v článku Shneider et al., nicméně jim připisuje potenciální funkci. Jak tedy byly tyto geny identifikované ? Jaka je jejich homologie k jiným organismům a jak si je autor jist jejich anotací ?
6. Jaké byly výsledky westernů s pre-immunním sérem? Viděl autor dva výrazné proužky, které jsou patrné na westernu 5.4 (potkanní protilátka)?
7. Proč není ukázána western analýza RNAi β-MPP linie a anti-β MMP protilátky ? Pokud byla provedena, s jakým výsledkem? Bez tohoto westernu jsou bohužel závěry kapitoly 5.3.1 příliš předběžné.
8. U jiných organismů je stability α- a β-MPP podjednotky na sobě závislá?
9. Obrazek 5.5 sleduje procesování lidského frataxinu. Tento výsledek nicméně nekoresponduje s výsledkem v publikaci Long et al., kde byly pozorovány meziformy také u neindukovaných buněk. Má pro to autor nějaké výsvětlení ?
10. Obrázek 5.5 Jak to že, stále dochází k odštěpení prekurzorové sekvence (detekce maturované formy 6 dnů po indukci) a přitom western analýza ukazuje naprosté vymizení β-MPP podjednotky. Je v mitochondrii přítomna ješte jiná peptidáza ?
11. Posledni otázka: Mohl by autor nastínit jaké experimenty ho čekají v budoucnosti a jak si představuje směr, kterým by se měl projekt ubírat? ¨

Autor sám zmiňuje, že tato práce je pouhým odrazovým můstkem. Ano, má pravdu, ale i přes tento handicap, předložená práce, dle mého názoru, splňuje požadavky kladené na magisterskou práci a práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, dne 19.5.2010

Alena Zíková

Alena Zíková

Neratovice, 16.5.2010

Posudek magisterské práce Bc. Pavla Poliaka s názvem „Studium mitochondriálních procesovacích peptidáz u procyklických stádií *Trypanosoma brucei*".

Úvod

Úvod každé publikace by měl stručně a srozumitelně shrnout, co je o dané problematice známo. I čtenář neznalý problematiky by měl být schopen porozumět dalšímu textu a správně interpretovat výsledky. Bc. Pavel Poliak v úvodu své magisterské práce však použil ve snaze o stručnost zkratky, které vedou k zásadním nepřesnostem.

„Procyklická forma T. brucei se rozmnožuje ve střevě hmyzího vektoru a diferencuje do krevní formy, která je nalézána v krvi a tkáňovém moku savčích hostitelů." K diferenciaci do stadia kompetentního k přenosu do savčího hostitele dochází ve slinných žlázách a nejedná se o krevní formu, ale o metacyklické stádium.

„Mitochondrie T. brucei je stejně jako u všech eukaryot životně důležitou organelou, která ... hraje klíčovou úlohu v .. syntéze Fe-S proteinů." a, Autor nedefinuje, zdali považuje za mitochondrie i organely mitochondriálního původu, ale vysoce redukované (hydrogenosomy, mitosomy). Učebnicové mitochondrie samozřejmě nejsou u všech eukaryot. b, Nejedná se o syntézu Fe-S proteinů, ale biosyntézu Fe-S center, případně maturaci Fe-S proteinů.

„Mitochondrie jsou obklopeny vnější membránou a vnitřní membránou vytvářející kristy, které zakládají mezimembránový prostor a matrix." Mezimembránový prostor a matrix „zakládá" vnitřní mitochondriální membrána, která může, ale nemusí mít kristy.

Pasáž o mitochondriálních procesovacích peptidázách je do značné míry převzata z review Gakh et al., 2002, včetně citací. Pro účel diplomové práce bych to nepovažoval za příliš velký prohřešek, pokud by autor doplnil informace z originálních článků pozdějšího data. Zejména články japonského týmu (Ito a kolektiv) v posledních letech přispěly k porozumění interakce mezi MPP a mitochondriálními presekvencemi a úloze podjednotek MPP.

V části pojednávající o importu proteinů do mitochondrie u trypanosom chybí alespoň základní popis složek mitochondriálního importního aparátu, i když je zde jejich seznam a schema uspořádání.

A ještě poslední formální připomínka – v textu Úvodu často chybí citace k zásadním informacím a zcela chybí odkazy na obrázky.

Výsledky a diskuze

Bc. Pavel Poliak připravil buněčné linie procyklického stádia *T. brucei*, ve kterých je možné indukovat RNAi proti βMPP a MIP. Pro analýzu těchto buněk autor připravil polyklonální protilátky proti αMPP, βMPP a MIP. V magisterské práci jsou popsány tři experimenty:

1. Experiment s cílem zjistit, jestli jsou βMPP a MIP esenciální pro procyklická stádia *T. brucei*. Autor pozoroval zastavení růstu kultury, tedy jasný růstový fenotyp, od 5. dne po indukci RNAi.

- Bylo zastavení růstu způsobeno inhibicí dělení buněk, nebo rovnováhou procesů smrti a dělení?

2. Experiment s cílem zjistit, jestli po snížení exprese/eliminaci βMPP dochází ke změnám exprese/stability αMPP. Autor pozoroval, že RNAi proti βMPP neovlivní expresi/stabilitu αMPP.

- Jak byla kontrolována účinnost snížení exprese/eliminace βMPP v tomto experimentu? V předložené práci kontrola chybí.
- Za předpokladu, že RNAi opravdu fungovala, svědčí tento výsledek o tom, že RNAi působí pouze proti podjednotce αMPP, ne proti podjednotce βMPP (i když se jedná o homology). Očekával autor jiný způsob regulace exprese mezi těmito dvěma podjednotkami? Jaký?
- Nemůže αMPP tvořit v nepřítomnosti βMPP homodimer, který odolává degradaci? Je možné, že by měl případný αMPP homodimer proteázovou aktivitu?

3. Experiment s cílem zjistit, zda je lidský frataxin (hFTX) v mitochondriích *T. brucei* procesován stejným způsobem jako v mitochondriích lidských. Autor pozoroval, že od 2. dne po indukci RNAi proti βMPP dochází k akumulaci prekurzoru hFTX. Kontrolní imunoblot s protilátkami proti βMPP prokázal, že RNAi byla účinná a od 4. dne po indukci nebyla βMPP detekovatelná.

- Proč nebyl signál na imunoblotech kvantifikován (alespoň pomocí analýzy obrazu)? Bylo by potom možné vyjádřit jednotlivé formy hFTX jako % z celkové koncentrace proteinu v jamce (odpadl by problém s rozdílným nanesením do jamek).
- Prezentovaný výsledek dokazuje účast MPP v procesu maturace hFTX v *T. brucei*. Po eliminaci βMPP však nedošlo k úplné inhibici procesování hFTX v *T. brucei*. Jaké jsou možné interpretace tohoto výsledku?

Metoda RNAi je zejména pro svou relativní časovou nenáročnost jistě užitečným nástrojem reverzní genetiky. Protože se však jedná pouze o snížení, nikoliv inhibici exprese, interpretace výsledků nemusí být vždy jednoznačná. Neuvažuje proto autor o přípravě knock-outů? Neplánuje autor přípravu RNAi knock-downů či knock-outů MPP také v krevních formách?

Shrnutí

Předložená magisterská práce Bc. Pavla Poliaka prezentuje výsledky, které dokládají, že MPP se v mitochondriích *T. brucei* účastní maturace lidského frataxinu. Co se týče obsahu, nemám zásadnější připomínky. Formálně však má práce jisté nedostatky, zejména v úvodní části.

Dle mého názoru předložená práce dostačuje pro udělení titulu Mgr, navrhuji známku chvalitebně.

RNDr. Ondřej Šmíd, Ph.D.