



**INSTITUTE OF PARASITOLOGY
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC**

BRANIŠOVSKÁ 31, 370 05 ČESKÉ BUDĚJOVICE
CZECH REPUBLIC
PHONE: 00420-385 310 351; FAX: 00420-385 310 388
HTTP://WWW.PARU.CAS.CZ

Review of Zdeňka Čičová's Master Thesis

At the beginning, allow me to briefly characterize Zdeňka's master thesis. The thesis is written in English and it contains several parts: Introduction, Results and Conclusions. The Results section is very unique because it is composed of a published manuscript entitled „Kinetoplast guide RNA biogenesis is dependent on subunits of the mitochondrial RNA binding complex 1 and mitochondrial RNA polymerase“ of which Zdeňka is second author. The paper was published in a high impact international journal and thus had been subjected to an extended review process. The main goal of this manuscript was to characterize four novel components of the putative mitochondrial RNA binding complex (MRB1) in both stages of *Trypanosoma brucei*. The four proteins were down-regulated by RNA interference and the resulting phenotypes were studied using cellular and molecular biology methods. This repertoire of employed methods is impressive for a master student. In my opinion, this master thesis is of very high quality.

I have a few remarks and a few questions for Zdeňka.

Remarks:

I appreciated the nice introduction into the unique RNA metabolism of *Trypanosoma* cells and the protein complexes involved in these processes. Zdeňka discusses the composition and potential function of MRB1 complex in a very detailed way based on published information from Panigrahi et al., 2008. Hashimi et al., 2008 and 2009 and Fisk et al., 2008. However, recently, at least two more papers were published regarding the same protein complex: Weng et al., 2008 and Acestor et al., 2009. Data presented in those two papers should have been mentioned in the Introduction.

Instead of Figure 1.7, I would suggest to prepare an easy table summarizing the composition of all purified MRB1 complexes and compare this with the GRBC complex and KPAP complex. Additional information pertaining to the references and purification method should also be included.

Questions:

Regarding the manuscript:

1. GAP1 and GAP2 are named as gRNA associated proteins. Do GAP1 and GAP2 bind gRNA? What experiments would Zdeňka perform to show that these two proteins are gRNA binding proteins? Do they bind other types of RNAs? Do they bind poly-U, poly-A stretches? Do they bind DNA?

2. Authors analyzed putative MRB1 subunits (GAP1, GAP2 and RNA helicase) and mtRNAP by a gRNA labeling assay. The results from the assays on these proteins were exactly the same; however, it was concluded that mtRNAP is involved in transcription of gRNA while the MRB1 complex is most likely involved in gRNA processing and/or stability (Results, page 8).
Furthermore, is there any evidence that MRB1 complex is not involved in transcription of minicircles? What experiments could help illuminate this issue?
3. Based on qRT-PCR data and glycerol gradient sedimentation, it seems that NUDIX hydrolase is associated with different functions than the other three subunits of the MRB1 complex. This observation raises a question: Is NUDIX a *bona fide* subunit of MRB1 complex? Has NUDIX hydrolase been tagged? If yes, what are the results? Finally, what experiments could Zdeňka do to resolve this issue?
4. TbRGG2 protein is up-regulated 100x in procyclic form than in bloodstream form (Fisk et al., 2008). Have you observed a similar pattern for GAP1 and GAP2 proteins?

Results, Figure 3C. Based on qRT-PCR for RNA helicase, the decreased transcription of the silenced gene is not very robust (down by only 20-30%). Zdeňka mentioned in "My contribution to data published" that she also prepared a Northern blot analysis on this RNAi cell line. What was the result of this analysis?

Results, Figure 5. How would Zdeňka explain the broad distribution of GAP1 signal in glycerol gradients that usually extended between fractions 3-23?

Results, Figure 7. Is the change in sedimentation of MRB1 complex after silencing of the mtRNAP a primary or secondary effect?

If the sedimentation of MRB1 complex is RNase sensitive, how does the sedimentation profile change? Another interesting experiment would be to compare these results to the sedimentation of the MRB1 complex in akinetoplastid cells (cells without mt DNA). Was this experiment performed and if yes with what result?

Page 26. Unpublished data regarding RNase treatment of TAP-tagged purified GAP1 and GAP2 complexes are mentioned. What are the results of these experiments? Does Zdeňka know what the "core" MRB1 complex is?

In my opinion Zdeňka's master thesis fulfills all the criteria for a master thesis and I would award this thesis by grade „výborně“.

In České Budějovice, 25.5.2009



Alena Zíková, PhD



21. května, 2009

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Zdeňky Číčové

Obecná charakteristika práce:

Předložená diplomová práce „Functional analysis of subunits of mitochondrial RNA binding complex 1 in *T. brucei*“ se skládá z: i) 12-ti stránkového úvodu, ii) výsledkové části prezentované ve formě recenzované publikace, a iii) shrnutím začleňujícím výsledky práce do širších perspektiv oboru. Diplomová práce byla vypracována v anglickém jazyce.

Náplň:

Předložená práce Zdeňky Číčové si kladla za cíl funkčně charakterizovat čtyři podjednotky mitochondriálního RNA vázícího komplexu 1 (MRB1) za využití interference RNA (RNAi). Vzhledem k předpokládané roli MRB1 komplexu v editingu RNA, byl “knock-down” jednotlivých genů funkčně zaměřen na charakterizaci vlivu jednotlivých genů na stabilitu gRNA a pre-editovaných, editovaných a “never-edited” mRNA. Bylo ukázáno, že snížení hladiny mRNA odpovídající třem studovaným komponentám komplexu MRB1 (GAP1, GAP2, a RNA helikázy) vede k snížení rovnovážných hladin gRNA. Tyto data indikovala, že GAP1, GAP2 a RNA helikáza jsou důležité pro zachování stability gRNA. Snížení hladiny mRNA pro Nudix hydrolazu způsobilo celkovou redukci pre-editované a editované mRNA a nemělo žádný efekt na hladinu gRNA. Celkově, výsledky předložené práce poukázaly na roli komplexu MRB1 v mitochondriálním metabolismu RNA.

Hodnocení:

Práce je napsána výbornou a srozumitelnou angličtinou bez překlepů. Vlastní text je napsán přehledně a věcně a svědčí o nadhledu nad zpracovaným tématem. Po experimentální stránce, studentka zvládla širokou škálu molekulárně-biologických metod včetně experimentálně náročných technik jako jsou např. RT-qPCR nebo analýza fenotypů RNAi. Fakt, že práce byla publikována v časopise s IF > 5 s náročným recenzním řízením, dále jen dokládá, že experimenty byly zvládnuty na kvalitativně velmi vysoké úrovni. Samotný přínos Zdeňky k publikované práci je významný. Zdeňka připravila knock-down dvou genů pomocí RNAi a charakterizovala jejich fenotyp pomocí růstových křivek, Northern blot analýzy, RT-qPCR, a spolu-podílela se na dalších funkčních esejích. Předložená diplomová práce patří dle mého soudu mezi nejlepší 5% které jsem měl příležitost hodnotit. Zdeňka jasně demonstrovala svoje předpolady pro další tvůrčí vědeckou práci. Předloženou diplomovou práci hodnotím výborně.

Lukáš Tratírek

Komentáře:

- 1) na straně 2, studentka uvádí, že gRNA jsou dlouhé kolem 50-70 nt. Na straně 4, ale studentka uvádí, že gRNA jsou dlouhé kolem 30 nt. Domnívám se, že se jedná pouze nevhodně formulovanou větou. Mohla by tuto záležitost uvést na pravou míru?
- 2) na straně 6, v části věnované roli MRP1 a MRP2 proteinům, by měla být citována i práce Zikova et al., Int. J.. Parasitol. 2008

3) na straně 7, z popisu není jasné jakým způsobem byl komplex získaný pomocí tandemové afinitní purifikace analyzován.

Dotazy:

k práci jako takové mám jediný dotaz:

Knock-down GAP1, GAP2, a RNA helikazy vykazoval velmi podobný fenotyp na úrovni gRNA stejně jako na úrovni transkriptů pro pre-editované, editované i "never-edited" mRNA. Tento fakt však dává vzniknout otázce, zda pozorovaný fenotyp je možné skutečně přisoudit jednotlivým podjednotkám (GAP1, GAP2, RNA helikaze) MRB1 komplexu. Jako alternativní vysvětlení by se nabízela možnost, že pozorovaný fenotyp by měl být spíše přisouzen MRB1 komplexu jako celku. Mohla by Zdeňka vysvětlit jakým způsobem umožňují její data rozlišit funkci jednotlivých komponent v komplexu od funkce komplexu jako celku? Snižování hladiny mRNA pro GAP1, GAP2 a RNA helikazu může vést ke snížení efektivní koncentrace aktivního komplexu MRB1. Nebyl by náhodou fenotyp pro všechny komponenty komplexu, které jsou nezbytné pro jeho aktivitu identický?

V tomto pohledu by rozdílný fenotyp mezi Nudix hydrolázou a GAP1, GAP2, a RNA helikazou mohl naznačovat, že Nudix hydroláza není s GAP1/2 a RNA helikazou spojena prostřednictvím protein-proteinových interakcí, ale že spíše představuje nezávislou funkční jednotku (nebo ji spolu-tvoří) a s GAP1/2 a RNA helikazou je asociována např. prostřednictvím RNA jako společného substrátu. Jaký experiment by Zdeňka navrhovala pro vyvrácení této možnosti?