



**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

**Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Lenky Richterové**

**Obecná charakteristika práce:**

Předložená diplomová práce „Functional Analysis of Mitochondrial Ribosome of *Trypanosoma brucei*“ byla napsána v anglickém jazyce a shrnuje poznatky, kterých Lenka dosáhla v průběhu svého magisterského studia. Diplomová práce si kladla za svůj cíl funkčně charakterizovat 3 předpokládané podjednotky mitochondriálních (mt) ribozómů prvoka *Trypanosoma*. Vzhledem k nezastupitelné roli mt ribozómů v mt translaci byly „knock-downy“ jednotlivých genů funkčně studovány pomocí nově zavedené metody radioaktivního značení *de novo* translatovaných proteinů v mitochondrii. Jelikož tato metoda je poměrně náročná na přípravu a analýzu Lenka použila buněčnou kulturu, v níž je možné pozastavit mt transkripci pomocí RNAi mtRNA polymerázy jako pozitivní kontrolu pro správnost této eseje. Lence se podařilo ukázat úbytek dvou mt kódovaných proteinů v případě tohoto knock-downu, ale, aspoň dle mého názoru, se nepodařilo ukázat úbytek nově nasyntetizovaných mt proteinů v případě RNAi mt ribosomálních proteinů. Nicméně Lenčiným velkým úspěchem je zavedení této eseje v laboratoři prof. Lukeše, jelikož tato metoda bude mít široké uplatnění v projektech laboratoře. A také je nutné podotknout, že Lenka zvládla celou řadu náročných molekulárně biologických metod přes over-exprese rekombinantních proteinů po přípravu RNAi „knock-downů“ u *T. brucei*.

K práci budu mít pár poznámek a několik otázek.

**Poznámky:**

1. V práci se vyskytuje pár formálních nedostatků jako např. nepřesné citování literatury, nepřesné používání názvů proteinů, překlepy, růstové křivky v různých formátech apod., které jsme již probraly s Lenkou osobně a netřeba je znova rozebírat.
2. Má hlavní poznámka se týká skladby práce. Práce byla napsána ve stejném chronologickém sledu jak byly dělány pokusy a práce je tudíž ne moc přehledná. Podle mého názoru je důležité, aby Lenka byla schopná se podívat na práci jako na celek a sepsat ji co nejjednodušeji a nejpřehledněji, i když to znamená experimenty různě zpřeházet. Např. ze současných 8 cílů by stačilo mít pouze tři: 1. Overexprese LR helikázy, 2. Základní charakteristika RNAi knock-downů mt ribosomálních podjednotek, 3. Zavedení metody *de novo* syntézy mt proteinů a její aplikace ke studiu mt ribosomálních podjednotek.

3. Má druhá poznámka se týká Lenčiných závěrů. Často jsou její závěry příliš silné a ne moc dobře podpořené dosaženými výsledky. Chybí kvantifikace gelů, či podrobná charakteristika RNAi knock-downů, což Lenka sama uznává v diskuzi. Bylo by lepší, kdyby Lenka své závěry změkčila a nechala si prostor pro výsledky dalších pokusů.

### Otázky:

**Strana 5** – Proč Lenka pojmenovala předpokládanou helikázu „LR“ ?

**Strana 6** – Lenka uvádí, že S5 se účastní formování „exit“ místa na 40S ribosomální podjednotce u kvasinek a udává odkaz na obrázek č. 5. Nicméně na obrázku č. 5 šipka ukazuje na protein MRPS5 a vstupní místo (entry site) savčí 28S ribosomální podjednotky vloženou do struktury 30S bakteriální podjednotky (podloženo citací na Sharma et al., 2003). Mohla by Lenka uvést tuto informaci na pravou míru, či zmínit ze které literatury čerpala informaci ohledně kvasinkového ribosomu.

**Strana 22** – Pokud over-exprimovaný protein měl být využitý na přípravu protilátek, proč Lenka neexprimovala jen nejvíce hydrofilní část proteinu ?

**Strana 23** – Dle výsledku Northern blotů to vypadá, že transkript LR helikázy je větší u krevní formy než u formy hmyzí. Má Lenka nějaké vysvětlení ?

**Strana 23** – Velikost dsRNA na membráně neodpovídá velikosti fragmentu zaklonovaného do RNAi vektoru (955 bp vs 428bp). Má Lenka nějaké vysvětlení i pro toto ?

**Strana 24** - Lenka analyzovala LR helikázové buňky metodou de novo syntézy mt proteinů čtvrtý den po RNAi indukci, kdy ještě nebyl viděn růstový fenotyp. Proč ? Byly analyzovány i další časové body ? Pokud ano, s jakým výsledkem ?

**Strana 25-26** - Jaké experimenty by Lenka navrhovala, aby lépe charakterizovala RNAi linie, co se týče efektivity RNA interference ?


**Strana 28** – Tady bych si dovolila nesouhlasit s Lenčiným závěrem ohledně možného úbytku de novo nasyntetizovaných proteinů. Spíše to vypadá, že bylo gelem rozděleno celkem méně proteinového vzorku. Byl tento výsledek reprodukovatelný ? Je možné tyto gely kvantifikovat ?

**Strana 30** - Lenka píše že, cituji: „Attempts to generate antibodies against the putative LR helicase failed..... Therefore it was not possible to visualize the ribosome by western analysis or immunolocalization“. Jaké jiné metody mohla Lenka použít na zodpovězení těchto otázek ?

**Strana 32** - Je zcela možné, že LR helikáza není součástí mt ribozómů a její identifikace v ribosomálních částicích je pouze artefakt. Jaké experimenty by Lenka navrhla, aby hypotézu, že LR je podjednotka mt ribosomu vyvrátila či potvrdila ?

I přes mé poznámky a otázky si myslím, že Lenka vykonala velký kus dobré práce a diplomovou práci tudíž doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 27.5.2009

  
Alena Zíková, PhD.



### Oponentský posudok na magisterskú diplomovú prácu:

#### Functional Analysis of Mitochondrial Ribosom of *Trypanosoma brucei*,

ktorú vypracovala Lenka Richterová, BSc. pod vedením prof. RNDr. Júliusa Lukeša, CSc. na Prírodovedeckej fakulte Juhočeskej univerzity v Českých Budějoviciach..

*Trypanosoma brucei* sa teší záujmu vedcov už viac ako 100 rokov. Štúdium tohto parazita je klasickým príkladom prelínania sa základného a aplikovaného výskumu. V jeho metabolizme bolo objavených mnoho neobyčajných fenoménov, ktorých lepšie poznanie nám odкрýva nové stránky fascinujúcej rôznorodosti života. *T. brucei* je spolu s viacerými ďalšími predstaviteľmi čeľade trypanozomatíd pôvodcom veľmi vážnych chorôb. Podrobné poznanie ich života a metabolizmu môže pomôcť pri príprave nových liečiv proti chorobám, ktoré trypanozomatidy spôsobujú. Zvolená téma je výzvou. Je súčasťou charakterizácie mitochondriálnej translácie trypanozomatíd. Tento proces je stále málo poznaný a v mnohých laboratóriách sa jeho štúdiu radšej vyhýbajú, zrejme aj pre experimentálne ťažkosti, kde progres je závislý aj na schopnosti hľadania nových postupov.

Autorka preto musela popri experimentoch, ktoré na jej pracovisku boli zabehnuté (napr. RNA interferencia) zvládnuť aj nové techniky a zrejme sa podieľať na ich zavedení v laboratóriu prof. Lukeša. Lenka sledovala vyradenie troch mitochondriálnych génov pomocou RNA interferencie - predpokladanej mitoribozomálnej helikázy a dvoch konzervatívnych ribozomálnych proteínov. Za veľmi dôležité považujem použitie konštruktu na vyradenie mtRNA poli. Študentka tak dokázala, že zvolené podmienky  $^{35}\text{S}$  *in vivo* značenia novo syntetizovaných proteínov a dvojrozmerné SDS elektroforézy sú vhodné na sledovanie mitochondriálnej translácie. Detegovanie malého, alebo dokonca žiadneho vplyvu RNAi sledovaných proteínov na transláciu nie je neúspechom, ale ďalšou tehličkou do nášho poznania mitochondriálnej translácie *T. brucei*.

K práci mám nasledujúce poznámky a pripomienky.

- Prvá poznámka je námetom na diskusiu o terminológii. Na str. 1 je použitý názov radu, do ktorého trypanozomatidy patria Kinetoplastea. Nie je to nesprávne, no v odbornej literatúre vysoko prevažuje termín Kinetoplastida. V PubMed je len 9 citácií na Kinetoplastea (z toho sú dva články z laboratória Dr. Lukeša), kým Kinetoplastida je použité v 28 810 prácach. Ja by som sa prikláňal k častejšie používanému názvu.
- V práci mi chýba kapitola použité skratky. V texte je ich dosť veľa a navyše nie všetky sú vysvetlené pri prvom použití.
- V kapitole Materiál a metódy mal byť uvedený aj konštrukt pre RNAi mtRNA poli s uvedením zdroja, odkiaľ bol získaný.
- Zloženie roztokov by podobne ako v publikáciách malo byť uvedené koncentraciami jednotlivých zložiek a nie len ich navážkami. Ak by mala predložená práca slúžiť ako manuál pre nasledovníkov, možno akceptovať aj druhý spôsob, no rozhodne by mala mať celá kapitola jednotný štýl. Autorka zrejme prebrala zloženie roztokov tak, ako ich našla v rôznych zdrojoch a výsledok pôsobí dosť neusporiadane.

- Pri posudzovaní vplyvu RNAi na transláciu je potrebná kvantifikácia intenzity jednotlivých bodov. Na niektorých obrázkoch je jasné (napr. na Obr. 10), že na membránach nie je nanesené rovnaké množstvo vzoriek a preto posúdenie relatívneho poklesu intenzity nemožno robiť iba okom.
- na Obr. 3 B ja nevidím výraznejší pokles mRNA po indukcii a preto nesúhlasím s jednoznačnou interpretáciou, že bolo pozorované zmiznutie mRNA rovnako v krvnej ako aj procyklickej forme.
- na Obr. 1. nie je uvedené, či je zdrojom obrázku literatúra, alebo WEB stránka (v druhom prípade treba uviesť plnú adresu);
- obrázky s dvojrozmernou elektroforézou (č. 6, 7, 10 a 11) nemajú dostatočný popis v legende. Chýba informácia, že ide o autorádiogram gélu, a že vložený podobrázok reprezentuje gél farbený Coomassie blue
- rastové krivky vo všetkých prípadoch mali byť znázornené rovnakým spôsobom
- Obr. 2 je natoľko nič nehovoriaci, že bolo lepšie ho neukazovať a len spomenúť, že sa pomocou Westernblotu nepodarilo dokázať expresiu
- v diskusii by bolo potrebné opatrnejšie formulovať to čo bolo dokázané. Veľká časť výsledkov je len naznačená. Na ich finálne potvrdenie, alebo vyvrátenie budú potrebné ďalšie experimenty. Na to nakoniec poukazuje aj Lenka poslednou vetou Diskusie, s ktorou plne súhlasím: "Additional experimentation will be needed ..."

Študentke by som rád ešte položil dve otázky:

- Možno považovať krvné formy pestované v médiu a získané z krvi za metabolicky identické? Poznáte nejaké práce, ktoré by to dokazovali?
- Nevýhodou vašej metódy detekcie mitochondriálnej translácie je, že detegujete len dva proteíny kódované mtDNA. Vedeli by ste navrhnúť experiment, pri ktorom by ste dokázali aj iné produkty mitochondriálnej translácie?

Uvedené poznámky nemajú znižovať cenu dosiahnutých výsledkov. Majú pomôcť študentke pri spracovávaní a prezentovaní výsledkov v budúcnosti. Výsledky predloženej práce sú cenné. Tvoria základ, ktorý je nevyhnutný pre ďalšie poznávanie translácie v mitochondriách trypanozomatíd. Lenka dokázala, že si zaslúži titul magistra a odporúčam jej prácu k obhajobe.

26. 5. 2009

  
doc. RNDr. Anton Horváth, CSc.