

Evaluation of the Master Thesis of Bc. Michala Boudová Entitled "The role of Q tRNA modification in the virulence of *Leishmania mexicana*"

The thesis of Bc. Michala Boudová deals with how the post-transcriptional modification of the wobble-position guanosine to queuosine (Q) of certain tRNAs affects *Leishmania mexicana* virulence. The thesis encompasses an impressive range of techniques, including molecular biology, implementation of *in vitro* and *in vivo* infection models and CRISPR/Cas9 gene editing tools. In my opinion, the scope of the thesis is on the level of a doctoral student project. Given that Michala was able to get meaningful results for such an ambitious project during the short time frame (albeit prolonged by a single semester) of a Magister project is a testament to her hard work, motivation and competence.

The thesis itself was a very interesting read. However, my evaluation is not fully positive, because while it starts off very strong, the quality of the thesis perceptively deteriorates toward the end.

I have to say the level of English, particularly in the Introduction, is very high. Michala clearly has an excellent command of written English. She makes very few mistakes when it comes to using articles, which is unusual for native Czech speakers. Furthermore, she has an impressive vocabulary that is clearly influenced by the literature that she has read. Picking up words in this way is a very important skill and I encourage her to continue this excellent trait in the future.

However, it is not perfect. The first major problem is Michala's tendency to write in run-on sentences: super-long sentences that can be easily be cut into smaller, more digestible ones that will better get across to the reader the points she wants to make. The second major problem is the rather overzealous use of the semicolon (";"). This is of course her stylistic choice, but I encourage her to rein this in as it needlessly distracts from her message. While not wrong, it should be used sparingly. However, these are problems that students in US universities often struggle with, and thus is a testament to her excellent command of English¹.

However, the writing quality deteriorates from the Introduction to the Conclusion section. I assume this is because she wrote these sections sequentially and ran out of time toward the end. While this is understandable, all sections of such a work deserve the same high quality of the Introduction. The Introduction is well-written, interesting and extremely thorough. However, much of it in my opinion is not so relevant to the project presented. For instance:

- 1) The section entitled "The complex life of tRNAs" is very interesting, but most of it has not much to do with Q.
- 2) The section entitled "Physiological relevance of Q-tRNA lists many putative alternative functions of Q and the enzymes that perform this function. This may be relevant, but it is not really utilized later to explain the results or connected to the rest of the text.

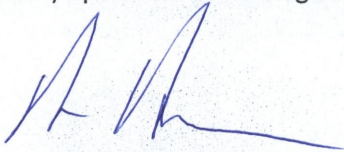
¹ Run-on sentences and other small grammatical mistakes are marked in my copy of her thesis: I am happy to exchange this with her for a clean, bound copy if she would like to see my changes.

- 3) The epidemiology of Leishmaniosis is well written but again not well connected to the rest of the text.

Other things that are relevant for the text, particularly gene editing by CRISPR/Cas9 is poorly explained. This is a shame, because it is very relevant to her project. Perhaps it would make more sense to write the Introduction AFTER Results, Discussion and Conclusion so you have a better idea of what relevant information can go into this part.

I will enumerate the major points as questions for Michala to address during her defense as Major Points/Questions and then follow this with some Minor Points.

In conclusion, I did enjoy reading the thesis and appreciate and admire the work Michala describes herein. However, because of the aforementioned problems, for now I recommend a grade of "excellent minus" and will adjust this (hopefully to the more deserved "excellent" grade) upon Michala's Magister defense performance.



Doc. Hassan Hashimi Ph.D.
23 December 2018

MAJOR POINTS AND QUESTIONS

- 1) How does CRISPR/Cas9 work?
- 2) How the TGT1 and TGT2 KO cell lines were generated and verified is described in a very scattered and unclear way. Much of the procedure must be pieced together by the reader, which goes against the convention used in scientific literature in which the writer bears sole responsibility for clearly explaining procedures and results and not the reader to piece together how things were done from fragments of text. This is also very irritating to the reviewer, who is the first person to read your thesis/manuscript. I ask Michala to go step by step in the process of how the KOs were constructed and verified. *E.g.* which PCR primers go together, how were the plasmids used as templates (particularly pVY013), what construct(s) was integrated or not into the genome. Tables 1-2 and Figures 7-10 poorly explain this.
- 3) What does the infection index in Figure 13 tell you differently than the parasites/macrophages in Figure 14? The latter is part of the former's calculation.
- 4) This more of a major point with a small question: it took me some time to realize that Fig 14 is a Tukey box plot. This should be stated explicitly. Usually the line is the median. What is the "X"? What do whiskers demark?
- 5) In the bar graphs in Figures 13 and 14A, it is stated that they are from biological triplicates (if I correctly understood the legends). Please show error bars and t-test for statistical significance. This may even help to support your hypothesis.
- 6) This is more of a suggestion: In Figure 16 you have a very nice result showing Q modification changes during *L. Mexicana* differentiation. This is the basis of your conclusion model (figure 24). This hypotheses would be more convincing if you looked at other Q-modified tRNAs. Also, do Ile tRNAs fluctuate during differentiation, especially the dramatic drop at time point

- 10? Can you think of a good loading control across these different differentiation steps? Was RNA loaded by amount (e.g. ug) or cell number?
- 7) Is the *in vivo* infection model employed in the thesis really a failure as is somehow implied. The majority of mice were not infected by TGT2 KO *L. mexicana*. This agrees with the *in vitro* macrophage infection experiments and differentiation assay. One of the two mice exhibiting a phenotype was considered to be an outlier due to the mouse itself in the text. What do you suggest to move the project forward? Also, I did not entirely understand the explanation as summarized in Fig. 23.
 - 8) Michala speculates that tRNA tertiary structure may play a role in Q modification and account for varying degrees of modification. Perhaps, but how would this explain the observations you make about differing Q modification during differentiation, as mentioned in point 6?
 - 9) *Saccharomyces cerevisiae* is claimed in the Discussion to be an exception for Q modification but was not explained. So, how? Also, what does this tell you about Q modification, if anything at all?
 - 10) In the text, Michala speculates that TGT1 may interact with other proteins other than TGT2 and/or have a different role than modifying tRNAs. How can you address this using whatever tools you have on hand (e.g. *L. mexicana* or *Trypanosoma brucei* cell lines)?
 - 11) In Figure 6A, the oxidized RNA controls are fainter than their untreated counterparts. Why?
 - 12) In Figure 15, qPCR was employed to measure the levels of stage-specific marker transcripts. The *Pfr1d* marker of procyclics was claimed not to show any differences between WT and TGT2 KO cells. However, there is a difference at Day 17. First, some statistical analysis and biological replicates would be useful here. With that out of the way, why is this difference observed?
 - 13) On page 46 in chapter 5.4, Michala says that several studies suggest a role for Q in differentiation and development, but fails to say in what organism or context. Please elaborate using the references you have cited.

MINOR POINTS

- 1) Figs 1-3, 5 and 12 are very pixelated and thus often unreadable (particularly Fig. 5) compared to the others.
- 2) PMN leukocytes depicted in Fig. 3 are not mentioned in main text. What are they?
- 3) If mentioning a web site in any text, there should be a reference (usually mentioned on the website as "How to cite" or something to that effect) or http.
- 4) TGT1 and TGT2 human orthologs are confusingly called QTRT1 And QTRTD1. This is really unfortunate. I would suggest calling them human TGT1 and 2 and saying they are known by these names.
- 5) In results section 4.2, Michala says that 3 out of 4 tRNAs assayed that were expected to be modified by Q were verified, but failed to mention which ones. This goes back to what I wrote in Major Point 2 above.
- 6) In Northern blots assaying Q- and G- tRNAs, these two species are not well marked for all tRNAs. The arrows for Q don't really point to anything.
- 7) On pages 36 and 37, you have two Figure 16s
- 8) On page 44, a Shinji 1996 reference is mentioned but not listed in the references in the back.

POSUDEK OPONENTA

na diplomovou práci Bc. Michaly Boudové

“The role of Q tRNA modification in the virulence of *Leishmania mexicana*”

vypracované na Jihočeské universitě v Českých Budějovicích.

Diplomová práce má 66 stran, z toho 53 stran textu, a je klasicky členěna na úvodní literární přehled, cíle práce, materiál a metodiku, výsledky, diskusi, závěr a seznam použité literatury. Psána je v anglickém jazyce, a pokud mohu soudit, jazyková úroveň práce je vynikající. Po formální stránce práce splňuje všechny náležitosti vědeckého textu s výjimkou drobných nepřesností při citování literárních zdrojů. Při úctyhodném počtu 189 citovaných zdrojů není příliš divu, že se chybička občas vloudila. Doporučila bych autorce zkusit používat citační software typu Mendeley nebo EndNote – usnadní Vám to práci a vyhnete se většině chyb. Seznam nalezených chyb přikládám na konci posudku a to spíše pro potřebu revize textu pro případnou budoucí publikaci, nepovažuji za důležité řešit tyto drobnosti při obhajobě.

Literární přehled je velice obsáhlý, od obecného přehledu leishmaniózy a životního cyklu leishmanií se autorka dostává k interakcím mezi leishmaniemi a imunitním systémem savčího hostitele, přičemž se věnuje zejména poznatkům získaným na myším modelu. Poté vysvětluje funkci tRNA a jejích modifikací a ve dvou dalších kapitolách podrobně rozebírá známé poznatky o queuosinu (Q) a možných funkcích tRNA obsahujících tento nukleotid. Celý literární přehled považuji za tak dobře sepsaný, že by se dal jen s malými úpravami publikovat jako kvalitní přehledná literární rešerše. Drobné připomínky ponechávám na konec posudku.

Vytčené cíle práce – zjistit roli genů potřebných pro syntézu Q-tRNA leishmanií při jejich přežívání v hostitelských buňkách – mi připadají zajímavé a aktuální – prostě sexy. Se zavedením metody CRISPR/Cas9 do výzkumu funkce genů leishmanií se otevřelo pole právě pro takovéto biologicky zajímavé projekty.

Oceňuji, že se studentce skutečně podařilo vytvořit KO leishmanie s delecí genu pro LmxTGT2, takže získala linii, která nebyla schopna tvorby Q-tRNA. Svědčí to o tom, že metody molekulární biologie zvládla perfektně. Za zásadní výsledek navazujících experimentů považuji signifikantní rozdíly v přežívání a množení KO leishmanií oproti kontrole v myších makrofázích. Také zjištění významu LmxTGT2 pro transformaci leishmanií z promastigotů v amastigoty a růst hladiny Q během metacyklogeneze jsou cenné poznatky. Výsledky *in vivo* infekcí autorka správně hodnotí jako předběžné, protože lze těžko dělat velké závěry z infekcí pěti/šesti myší, když se v nich patogenita infekcí navíc podstatně liší.

Obsáhlá diskuse dosažených výsledků je rozčleněna do pěti kapitol. Je věcná, logická a přiměřeně kritická.

Na závěr mohu konstatovat, že Bc. Michala Boudová jednoznačně prokázala schopnost samostatné vědecké práce, předložená práce je po všech stránkách kvalitní a doporučuji ji k obhajobě s výborným hodnocením.

Otázky a připomínky:

- 1) Autorka na straně 6 zmiňuje, že rozvoj a průběh leishmaniové infekce v hostiteli je ovlivněn mnoha faktory ze strany jak parazita, tak přenašeče i samotného hostitele. Mohla by uvést alespoň několik důležitých „virulenčních faktorů“ sekretovaných promastigoty leishmanií ve flebotomech, které jsou při sání flebotomů na hostiteli součástí přirozeného infekčního inokula?
- 2) To, že počáteční fáze infekce hmyzího přenašeče se odehrává v zadním střevě flebotomů a poté se infekce přesouvá anteriorně (str. 6) se týká jen jedné ze tří velkých skupiny leishmanií – jaká je to skupina (podrod) a jak probíhá v přenašeči vývoj těch dalších dvou skupin? A jakým mechanismem se leishmanie do hostitele dostávají?
- 3) Byla linie leishmanií označovaná v práci jako wild type (WT) skutečně původním WT kmenem, nebo to byly již leishmanie geneticky upravené vložením Cas9 nukleázy? Pokud je správná druhá verze, nebylo by lepší označovat tuto linii jako parentální, ne jako WT? Testovali jste rozdíl v infektivitě mezi skutečným WT a parentální linií, případně - uvažovali jste o konstrukci add-back linie?
- 4) Jaká byla úspěšnost zisku MF peritoneálním výplachem? Ptám se, protože v našich rukou jsme dosahovali větší výtěžnosti výplachem kostní dřeně myši a takto získané makrofágy nebyly kontaminované jinými typy buněk. Zkoušeli jste i tuto metodu?
- 5) Inokulovali jste leishmanie myším skutečně v 25 μ l PBS? (Tento objem mi přijde příliš velký na úspěšnou intradermální inokulaci do ušního boltce myši. V naší laboratoři vpichujeme inokulum v 5.5 μ l fyziologického roztoku a ani tento pětikrát menší objem není snadné dobře vpíchnout).
- 6) Není mi jasné, zda jste měřili skutečně velikost lézí nebo spíše velikost otoku ucha. Formulace v textu (materiál a metodika vs. výsledky) se v tomto ohledu trochu rozcházejí.
- 7) V metodice popisujete odběry periferní krve pro analýzu produkce cytokinů pomocí metody ELISA a RT-PCR. Ve výsledcích jsem ale tuto pasáž nenašla. Stejně tak jsem nenašla zmínku o výsledcích kultivací splenocytů. Prováděli jste tyto analýzy?

RNDr. Jovana Sádlová, Ph. D.

V Praze dne 8. 1. 2019

Připomínky k citacím a seznamu literárních zdrojů:

- V seznamu literatury jsou některé práce uvedeny dvakrát: Alexander et al. 1998, Bates 2007, Belkaid et al. 1998.
- V textu chybí citace některých publikací uvedených v seznamu citovaných zdrojů: Altschul et al. 1990, Buffet et al. 1995, da Mata et al. 2015, Buffet et al. 1995, Kelly et al. 2012, Kramer et al. 2012, Larkin et al. 2007, Loeuillet et al. 2016, Mallinson and Coombs 1989, Padigel et al. 2003, Padilla-Mejía et al. 2009, Ray and Dittel 2010, Satoskar et al. 1995, Teixeira et al. 2013.
- Naopak v seznamu literatury nejsou uvedeny některé zdroje citované v textu: str. 12 Bienz and Kubli (1981), str. 13 Iwata-Reuyl (2003), str. 44 Shinji et al. (1996).
- Práce více autorů nejsou v seznamu literatury citovány jednotně – někdy je zde výčet všech autorů, jinde je výčet zkrácen na prvních tří autory, jinde jen uveden jen první autor se zkratkou et al.
- V textu (str. 52) je práce da Silva and Sacks (1987) citována jako da Silva et al. (1987), práce Chakraborty and Bassu (1997) jako Chakraborty (1997) (str. 7), Gomez et al. (2009) jako Gomez (2009) (str. 9), Zhang et al. (2017) jako Zhang (2017).
- Práce stejného autora nejsou v seznamu řazeny chronologicky podle data publikace (viz. Ischemlugova et al., Okada et al.).
- Někdy se neshoduje rok publikace citovaných zdrojů v textu a seznamu literatury: Práce Morris et al. „Activation of transfer RNA-guanine ribosyltransferase by protein kinase C“ publikovaná v roce 1995 je v textu citovaná s rokem publikace 1999. Práce Pathak et al. „Queuine mediated inhibition in phosphorylation of tyrosine phosphoproteins in cancer“ je v textu uvedena chybně s rokem publikace 2007, v seznamu správně s rokem 2008. Práce Ramos-Martínez et al. „Effect of 1,25(OH)2D3 on BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*“ je v textu uvedena chybně s rokem publikace 2012, v seznamu správně s rokem 2013, práce Bates AP „Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture“ je v seznamu literatury uvedena chybně s rokem publikace 1993 místo 1994. Práce citovaná jako Zhang et al. 2009 (str. 7) má být zřejmě práce Zhang and An 2007.
- Názvy časopisů jsou většinou zkráceny, ne ale důsledně u všech zdrojů.
- Práce stejného autora se stejným rokem publikace nejsou v seznamu odlišeny jako (a), (b) – viz Belkaid et al 1998, Pathak et al 2008.