

POSUDEK MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: Bc. Barbora HEROUTOVÁ

Název: Různé metodické přístupy za účelem snížení exprese podjednotek komplexu I u hmyzích forem *Trypanosoma brucei*

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

Školitel-specialista: Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.

Oponent: RNDr. Drahomíra Faktorová, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Barbory Heroutové je rozdělena do 57 stran klasické struktury: Úvod, Cíle práce, Metody, Výsledky, Diskuse, Závěr a Reference. Je složena z teoretického přehledu (11 stran) a experimentální části (40 stran), z níž Metody tvoří nejobsáhlejší část.

Cílem práce bylo studium největšího proteinového komplexu mitochondriálního elektronového transportního řetězce - komplexu I. Autorka se konkrétně zaměřila na použití různých metod pro vytvoření buněčných linií, které by postrádaly nebo měly snížené hladiny vybraných podjednotek tohoto komplexu. Studie byla provedena na buňkách parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*. Tyto linie byly vytvářeny se záměrem objasnit, zda je tento vysoce konzervovaný komplex nezbytný v rámci diferenciaci tohoto lékařsky významného parazita.

Pro snížení hladiny proteinů nebo jejich úplnou eliminaci byly konkrétně zvoleny 2 podjednotky komplexu I – NDUFA6 a NUBM – a použito několik metodických přístupů. NDUFA6 podjednotka byla vybrána, protože se na základě dat z kvasinek předpokládá, že je nezbytná pro strukturální integritu komplexu I na rozdíl od NUBM podjednotky, která je zřejmě zásadní pro jeho katalytickou aktivitu. Připravené linie měly dále sloužit: A/ k otestování růstového fenotypu, B/ ke zjištění vlivu eliminace proteinů na dehydrogenázovou aktivitu v nativním gelu a C/ k ověření citlivosti těchto linií na rotenon (inhibitor komplexu I) pomocí metody Alamar blue.

I když cíle práce nebyly zcela naplněny a nepodařilo se vytvořit všechny naplánované linie, dvě buněčné linie se sníženou expresí NUBM, které se podařilo připravit (NUBM RNAi a NUBM „single knock-out“), budou sloužit v laboratoři jako základ pro další výzkum role komplexu I v rámci diferenciaci hmyzích forem *T. brucei*. Ze získaných výsledků dále vyplývá, že snížení hladiny proteinu NDUFA6 u *T. brucei* s největší pravděpodobností nemá vliv na funkci komplexu I.

Magisterská práce je napsána přehledně a téměř bez překlepů a mám k ní následující **komentáře a otázky**:

1/ V části **Úvod** autorka seznamuje čtenáře se základními fakty týkajícími se: 1/ životního cyklu prvoka *Trypanosoma brucei*, 2/ komplexu I respiračního řetězce (NADH-ubichinon dehydrogenáza) obecně i dosud zjištěných informací u *T. brucei*. Poslední část úvodu tvoří

kapitola o metabolické adaptaci v životním cyklu *T. brucei*. Tuto část by bylo vhodné pro lepší zasazení komplexu I do kontextu doplnit o schéma celého respirační řetězce.

Vzhledem k tomu, že se autorka rozhodla psát práci v českém jazyce, měly by tak být zpracovány i obrázky nebo anglické názvy v obrázku alespoň vysvětleny v legendě.

*Např. u **Obr. 1**: Short stumpy (= krátká zavalitá forma), Long slender (=dlouhá štíhlá forma) atd. V textu jsou použity pouze názvy české a na obrázku jen anglické. Podobné nejednotnosti jsou i v dalších částech textu např. Obr. 10 (schéma v češtině) versus Obr. 11, 12 (schémata v angličtině).

***Obr. 2**: Zde by pro lepší orientaci laických čtenářů bylo vhodné na jenom místě zmínit jak název, tak vzorec ubiquinonu. V textu na str. 4 je jen název a na Obr. 2 jen vzorec.

Legendy obrázků jsou celkově velice úsporné, pro příště bych je doporučovala zpracovat podrobněji, prázdné půlstránky pod obrázky k tomu přímo vybízejí.

***Obr. 3**: Vzhledem k tomu, že pro tuto práci byly vybrány podjednotky NDUFA6 a NUBM, měly by být na obrázku zobrazeny obě, NDUFA6 jsem však nenašla (pokud je tam uvedena pod jiným jménem, bylo by dobré to zmínit) a obě podjednotky např. označit šipkami.

2/ V části **Cíle práce** je v prvních dvou bodech naplánováno vytvoření „knock-outových“ linií NDUFA6 a NUBM proteinů, ale vůbec není zmíněn přístup RNA interference (RNAi), který je používán ke snížení exprese specifického genu na úrovni mRNA a tedy pro vytváření buněčných linií sníženou expresí daného genu tzv. „knock-downových“ linií, kterými se práce z velké části zabývá.

3/ Část **metody** popisuje přístupy: A) RNA interferenci obou podjednotek pomocí 2 různých RNAi vektorů; B) vytvoření dvojitého „knockoutu“ - v případě NDUFA6 pomocí CRISPR/Cas9 technologie a v případě NUBM pomocí klasického přístupu - homologní rekombinace.

***Str. 23 a 24**: Schéma na Obr. 10 je zavádějící, jelikož neodpovídá skutečnosti, že gen pro puromycinovou rezistenci (Puro^R) je mnohem menší než NDUFA6 gen (600bp vs. 2142bp). Vzhledem k tomu, že kombinace primerů AZ1370+AZ1373 v PCR reakci může vést ke vzniku 2 různých velikostí produktů (velikost 2550bp odpovídá velikosti původní alely, kdežto 1307bp velikosti v případě výměny ze Puro^R), mělo by to být pro lepší orientaci v tabulce VIII uvedeno.

4/ **Výsledky**:

*Obr. 18: Dovedete vysvětlit, proč je signál NDUFA6 protilátky u neindukovaných buněk na western blotu o tolik slabší než na obr. 16? Vzhledem k tomu, že je signál velmi slabý, je otázka, zda je RNAi stále funkční. Navíc na Obr. 18 chybí „loadovací“ kontrola – kontrola nanesení stejného množství proteinů - stejně jako na Obr. 14, 16 a 28, která je pro interpretaci dat z western blotu zásadní.

*Z práce vyplývá, že použitá metoda detekce aktivity komplexu I v nativním gelu je problematická. Bez ověření velikosti komplexu pomocí western blot analýzy není tedy možno s jistotou tvrdit, že „band“ o velikosti 1-1,2MDa odpovídá komplexu I - nebo již byla tato informace v literatuře experimentálně prokázána?

*Str. 41: Ověření delece jedné alely genu NUBM: Ze schématu na Obr. 12 vyplývá, že byla ověřena jen přítomnost alely vyměněné za T7 polymerázu a neomycinovou rezistenci. Testovala jste, jestli je původní WT alela stále přítomna? (např. pomocí kombinace primerů

AZ1532 a AZ1533, tedy pokud se jedná o primery, které jsou „vnější“ od elektroporovaného konstruktů, což ze schématu na Obr. 12 není zcela jasné).

V případě „single knock-outu“ byste při provedení z této PCR reakce byste měla vidět jak alelu původní velikosti, tak i alelu vyměněnou. Toto ověření se doporučuje udělat, protože v ojedinělých případech mohou být vyměněny obě alely najednou a po jediné elektroporaci tak vznikne rovnou „double knock-out“ linie.

5/ Diskuse

* V první větě na str. 46 chybí číslo komplexu...“role komplexu I“

* Část poslední věty v Diskusi se zdá být zavádějící – „Pro pokračování výzkumu touto cestou je však esenciální připravit linie buněk, které nebudou obsahovat komplex I a zároveň v nich bude možné spustit indukci diferenciaci *in vitro*.“

Tuto větu by bylo potřeba přeformulovat, protože připravit linie, které nebudou vůbec obsahovat komplex I (vypnout všechny podjednotky najednou) z technických důvodů nelze. Pravděpodobně jste měla na mysli opět snížení exprese některých podjednotek komplexu I?

* Plánujete v tomto projektu dále pokračovat? Pokud ano, máte nějaké další kandidáty (podjednotky komplexu I), na které plánujete použít stejný přístup jako pro podjednotky NDUFA6 a NUBM?

Drobné poznámky:

* V části Obsah je rozhozené formátování čísel stran.

* Str. 13: Věta: „Buňky byly chovány v inkubátoru při 27°C.“ Místo slova chovat používáme pro buňky většinou kultivovat nebo pěstovat.

Závěrem lze říct, že práce splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci, a proto doporučuji udělit Barboře Heroutové titul Mgr., což je podmíněno kvalitou prezentace diplomové práce, odpověďmi na dotazy a diskusí se členy komise při obhajobě.

V Českých Budějovicích, 9.5.2022

RNDr. Drahomíra Faktorová, PhD.