



**Oponentský posudok na diplomovú prácu Bc. Barbory Heroutovej  
“RŮZNÉ METODICKÉ PŘÍSTUPY ZA ÚČELEM SNÍŽENÍ EXPRESE  
PODJEJNOTEK KOMPLEXU I U HMYZÍCH FOREM TRYPANOSOMA BRUCEI”**

Bc. Barbora Heroutová vypracovala svoju diplomovú prácu pod vedením RNDr. Aleny Panicucci Zíkovéj, Ph.D.. Diplomová práca sa zaoberá funkčnou analýzou respiračného komplexu I (NADH dehydrogenázy) v organizme *Trypanosoma brucei* s dôrazom na jeho potenciálne zapojenie v procese transformácie buniek do ďalšieho životného štádia. Pre tento účel bolo cieľom práce pripraviť niekoľko variácií bunkových línii s vyradenou podjednotkou komplexu I (NDUFA6, NUBM) na pozadí RBP6<sup>O/E</sup>, prípadne samostatne. Práve línie RBP6<sup>O/E</sup> schopné diferenciácie ponúkajú nový priestor na skúmanie funkcie komplexu I, pretože doterajšie funkčné štúdie komplexu u *T. brucei* viac-menej zlyhali. Napriek tomu, že diplomantka skúsila rôzne molekulárne prístupy, nepodarilo sa jej zaviesť vyradenie komplexu I súbežne so zvýšenou expresiou proteínu RBP6, ktorý je zodpovedný za diferenciáciu buniek. Potenciálne dôvody sú sumarizované v diskusii, kde sa ako primárne dôvody uvádzajú 1) nevhodný výber podjednotiek NDUFA6 a NUBM, prípadne 2) nevhodný systém CRISPR/Cas9 pre elimináciu spomenutých podjednotiek. Napriek logickým úvahám, ktoré odôvodňujú neúspešnú prípravu požadovaných línii, vidím v negatívnych výsledkoch zaujímavý fenomén. A to, že vyradenie komplexu I ako producenta reaktívnych kyslíkových radikálov a zvýšená expresia RBP6 nie sú kompatibilné. Teda znížená produkcia ROS, ktoré pri diferenciácii zohrávajú dôležitú úlohu signálnych molekúl, a diferenciácia na ďalšie vývojové štádium sa nedajú naraz indukovať, čo samo o sebe môže znamenať esenciálne prepojenie týchto dvoch procesov. Každopádne, interpretácia negatívnych výsledkov je náročná a preto zostávajú v hypotetickej rovine. Vplyv vyradenia jednotlivých podjednotiek komplexu I bol študovaný pomocou farbenia NADH dehydrogenázovej aktivity v natívnom géli a pomocou alamar blue assay, pri ktorej bola sledovaná citlivosť komplexu I na špecifický inhibítor rotenón. Ani jedna metóda nepriniesla očakávané výsledky, ale z môjho pohľadu poskytli dobrý základ pre budúce experimenty.

Predkladaná diplomová práca je napísaná v českom jazyku na 62 stranách a má štandardné členenie. Literárny prehľad poskytuje pre čitateľa dobrý základ na pochopenie problematiky a logiky navrhnutých experimentov. Výsledky sú popísané jasne a prehľadne.

K práci mám nasledovné pripomienky:

- Na strane 8 píšete, že ubiquinón je finálny akceptor elektrónov. Ubichinón je ale mobilný prenášač a finálny akceptor elektrónov v respirácii je kyslík. V neskoršom texte popisujete prenos elektrónov na kyslík, preto nepochybujem, že sa jedná iba o nešťastnú formuláciu.





- K väčšine Westernblotových analýz nie je kontrola množstva proteínov, ideálne paralelné farbenie s Coomassie brilliant blue.
- Ja sama používam výrazy prebraté z angličtiny, ale „albumín z bovinného séra“ sa dá jednoducho napísať ako „albumín z hovädzieho séra“.

K práci mám nasledovné otázky:

- 2-oxo-glutarát dehydrogenázu (OGDH) popisujete ako možnú komplikáciu pri stanovení NADH dehydrogenázovej aktivity v géli. Skúšali ste merať NADH dehydrogenázovú aktivitu aj spektrofotometricky? Substráty a akceptor pre spektrofotometrické stanovenie NADH dehydrogenázovej aktivity sa dajú navrhnúť tak, aby OGDH neinterferovala s meraním komplexu I a použitím inhibítora alternatívnej NADH dehydrogenázy viete odfiltrovať aj tú. Navyše, farbenie v natívnom géli je semi-quantitatívna metóda a pokles v aktivite musí byť skutočne markantný, aby bol z gélu zjavný.
- V úvode pracujete s teóriou, že trypanozomálny komplex I môže byť menej senzitívny na rotenón vzhľadom na prítomnosť množstva „accessory proteins“, ktoré môžu ovplyvniť interakciu proteín-inhibítora. Napriek tomu v experimentoch používate pri meraní viability buniek pomocou alamar blue assay práve rotenón. Môžete váš postup zdôvodniť?
- Skúšali ste, aj keď iba pilotne, aj iný inhibítora komplexu I ako rotenón? V publikácii Čermáková et al., 2011, bolo ukázané, že u niektorých kinetoplastíd, ako napr. *Novymonas esmeraldas* and *Sergeia podlipaevi*, inhibuje komplex I pomerne dobre capsaicin (40% z celkovej NADH dehydrogenázovej aktivity, zatiaľ čo rotenón iba na 8%). Ďalším možným inhibítora komplexu I je piericidín A.
- Za produkciu ROS sú vo všeobecnosti zodpovedné najmä komplexy I a III. ROS, ktoré vznikli aktivitou komplexu I sa dostanú iba do vnútra mitochondriálneho priestoru, zatiaľ čo ROS produkované komplexom III sa dostanú ako do vnútra mitochondriálneho priestoru, tak aj do medzi membránového priestoru. Vedeli by ste navrhnúť mechanizmus ako by matrixové ROS mohli regulovať/ovplyvňovať diferenciáciu buniek *T. brucei*?
- V postupe pri separácii proteínov natívnou elektroforézou popisujete, že samotná elektroforéza bez proteínov beží 20 min pri 100 V pri izbovej teplote. Aký je význam tohto kroku?

Hodnota získaných výsledkov a aj spôsob ich prezentovania dokazujú kvalitu diplomantky a preto diplomovú prácu odporúčam k obhajobe.

Hodnotím: 1

V Bratislave 18. mája 2022

RNDr. Ingrid Sveráková, Ph.D.





Univerzita Komenského v Bratislave  
Prírodovedecká fakulta

Mlynská dolina  
Ilkovičova 6  
842 15 Bratislava 4

**Katedra biochémie**

RNDr. Ingrid Sveráková, PhD.  
+421 2 90 149 546  
ingrid.sverakova@uniba.sk



<https://fns.uniba.sk/>