

Posudek školitele diplomové práce „Vliv endosymbiontů na složení a vlastnosti exosomů *Trichomonas vaginalis*“

Autor: Alois Zdrha

Školitel: prof. Jan Tachezy, Ph.D.

Kolega Alois Zdrha mě poprvé kontaktoval v březnu roku 2020 se zájmem studovat povrchové virulenční faktory u lidského parazita *Trichomonas vaginalis*, v návaznosti na bakalářské téma týkající se strukturní analýzy povrchových virulentních faktorů *Borrelia spp.* Hned po prvním setkání mě zaujal svým zápalem pro biologii a nadšením a proto jsem ho rád přijal do laboratoře, kde se již o prázdninách zapojil do našeho týmu a začal pracovat na zadaném tématu. Pro výzkum vlivu Trichomonasviru (TVV) na složení exosomů jsme v prvním kroku potřebovali odvodit izogenní linie (klony) *T. vaginalis* s virem a bez viru, což se nám podařilo pomocí inhibitoru RdRp, 2'-C-metyl cytidinu (2CMC). Nebylo však zřejmé, proč je 2CMC účinný na TVV a nikoliv na příbuzný virus leishmanií (LRV1). Vzhledem k zájmu Lojzy o modelování a obecně bioinformatiku, jeho prvním úkolem bylo pokusit se namodelovat vazebné místo RdRp a možnou interakci s inhibitorem. Pod vedením Dr. M. Novotného (tímto Marianovi děkuji), vygeneroval Lojza model, který ukazuje, téměř identický vazebný motiv mezi TVV a LRV1 RdRp. Tento výsledek ukázal, že 2CMC se váže podobně jako u LRV1 ve fosforylované formě, avšak nevysvětlil rozdíl v citlivosti. Jak Lojza správně diskutuje v práci, jedním z možných vysvětlení je právě rozdíl ve fosforylačním kroku, který předchází vazbu na RdRp. Lojzův model byl publikován v první práci Narayanasamy et al, 2021, Journal of Microbiology, Immunology and Infection.

Poté jsme mohli přistoupit k izolaci exosomů z obou linií a srovnávání jejich obsahu, jak co se týče proteinů, tak RNA. Váha Lojzovy práce byla především v bioinformatickém zpracování velkého množství dat z hmotnostního spektrometru a RNA sekvenování. V této oblasti byl jeho příspěvek zcela zásadní a velmi jsem ocenil jeho schopnosti v programování pomocí Rstudia, přípravu skriptů pro automatické vyhodnocování a porovnávání proteomů a dat z RNAseq. Rychle se zorientoval a naučil se používat servery pro detailní anotaci identifikovaných genů, mapování fragmentů a statistické vyhodnocení signifikantních rozdílů mezi liniemi. O TVV bylo dosud známo, že se šíří v populaci trichomonád výhradně při dělení buněk a nedochází k jeho uvolňování do prostředí lyzí buněk. Proto jedno z nejzajímavějších zjištění Lojzy byla přítomnost virových proteinů (RdRp, kapsidového proteinu) v exosomech infikované linie, což naznačovalo přítomnost viru v exosomech, což posléze potvrdil Petr Rada pomocí elektronové mikroskopie. Tento výsledek je zcela zásadní, protože TVV je velmi časný endosymbiont trichomonád a bylo ukázáno, že izolovaný virus, případně dsRNA stimuluje

prozánětlivou reakci epitelialních buněčných linií. Jeho uvolňování prostřednictvím exosomů tak může přispívat k tomuto procesu. Předchozí publikovaná práce však naznačovala, že exosomy uvolněné z kmenů *T. vaginalis* infikovaných TVV působí opačně tj. imunosupresivně. Lojza proto přistoupil k studiu interakce mezi exosomy z našich TVV pozitivní a negativní linie a buněčné linie HaCaT. Jak jsme předpokládali, exosomy z TVV pozitivní linie stimulovali produkci prozánětlivých cytokinů. Výsledky studia exosomů TVV plus a minus linií byly letos publikované v časopisu *Frontiers in Microbiology*, na kterém měl Lojza zásadní podíl, co se týče bioinformatických analýz a experimentálního studia interakcí exosom-HaCaT.

Vlastní sepisování diplomové práce probíhalo velmi dobře, ocenil jsem, že Lojza psal v angličtině na velmi slušné úrovni, text je čtivý a Lojza byl přiměřeně kritický ke svým výsledkům. Úvodní část by po dalších úpravách mohla sloužit jako dobrý podklad pro review o virulenci *T. vaginalis*. Výsledky obsahují kromě publikovaných údajů, zajímavou část, která stojí za další pokračování, kdy se Lojza snažil najít homologní cíl v lidských buňkách pro regulační tRNA fragmenty nalezené v exosomech *T. vaginalis*.

Formálně jsem si všiml jen drobných nedostatků a minimum překlepů. Pro čtenáře je příjemné, že Lojza vložil aktivní odkazy na citované publikace a jednoduchým kliknutím lze zjistit, co se skrývá pod číslem publikace. Pouze jsme si nerozuměli v umístění odkazu, který referuje k údajům ve větě, a tedy patří před tečku ukončující větu, nikoliv za tečku.

Celkově hodnotím práci Lojzy velmi vysoko, Lojza je spolehlivý a nadaný student a jsem rád, že bude pokračovat PhD studiem.

Prof. Jan Tachezy, Ph.D.

V Řevnicích 12. 8. 2022