

Oponentský posudek na magisterskou práci
Lucie Bardoňová (2006) Komplex I dýchacího řetězce v hydrogenosomech
Trichomonas vaginalis

Magisterská práce Lucie Bardoňové je zaměřena na studium a hledání komponent Komplexu I dýchacího řetězce u anaerobního bičíkovce *Trichomonas vaginalis*. Autorka ukázala, že dva proteiny Tvh22 a Tvh47, které jsou podobné proteinům katalytické části mitochondriálního Komplexu I, jsou lokalizovány v hydrogenosomech, tvoří komplex a mají NADH dehydrogenázovou aktivitu. Dále autorka vytypovala další 4 geny kódující proteiny, které vykazují slabou sekvenční homologii s proteiny membránové části mitochondriálního Komplexu I. I přes neúspěch s homologní i heterologní expresí těchto genů jejich objev v genomu *Trichomonas vaginalis* dále podporuje hypotézu o evolučním původu hydrogenosomů v mitochondriích. V neposlední řadě autorka v laboratoři nově zavedla metodu Blue Native PAGE a ukázala na přítomnost minimálně dalších čtyř dosud neidentifikovaných, hydrogenosomálních proteinových komplexů.

Výsledky práce významně přispěly k odhalení evolučního původu hydrogenosomů. O významu předkládaných dat svědčí i to, že jejich část byla publikována se spoluúčastí autorky v jednom z nejprestižnějších vědeckých časopisů Nature.

Na práci oceňuji především to, že autorka technicky velmi dobře zvládla širokou škálu metod od molekulárně biologických, biochemických, mikroskopických až po bioinformatické. Dle názoru oponenta je práce výbornou vizitkou pro další působení autorky. Lucie Bardoňová prokázala, že je schopna získat data vynikající úrovně, a také, že je schopna data kriticky hodnotit.

Dílejší připomínky k práci:

V seznamu citací chybí citace Čerkasov et al., 1973 ze strany 7.

V části Materiál a metody mi chybí často opomíjený popis použitého odborného softwaru. Programy jako jsou ClustalW, BLAST, PSORT a TOPO2 by měly být citovány. Případně by mělo být popsáno i jejich nastavení, pakliže nebylo standardní.

V části Materiál a metody chybí popis kapalinové chromatografie. Metoda samotná je sice podrobně popsána v části Výsledky, ale postrádám popis přístrojového vybavení.

U obrázku 17. a 18. "Lokalizace podjednotky Tvh22-HA3 a Tvh47-HA3" by pro lepší porozumění mělo být uvedeno měřítko a případně též popis použité optické soustavy mikroskopu.

Poznámky k metodice:

Pro TA klonování PCR fragmentů je zbytečné přidávat na 5' konec primerů extenze před restriční místo.

Podle popisu v části Materiál a metody bylo pro PCR amplifikaci standardně používáno 35 cyklů. Z obrázků 13., 21. a 23. je vidět velké množství amplifikované DNA. 35 cyklů je tedy pro amplifikaci genů pro expresi z genomové DNA nadbytečných a vzhledem k žádoucí minimalizaci pravděpodobnosti inkorporace mutace způsobené PCR i kontraproduktivních. Nižší počet cyklů by jistě postačoval k amplifikaci dostatečného množství DNA.

Otázky na autorku:

Je známo, zda jsou geny ND1, ND2, ND4 a ND6 v *Trichomonas vaginalis* exprimovány?

Pro amplifikaci genů určených k expresi byla vždy použita jako zdrojová DNA genomová DNA. Jsou všechny takto amplifikované geny bez intronů? Intronové sekvence by pro homologní expresi v *Trichomonas vaginalis* nebyly na překážku, ale znemožnily by úspěšnou heterologní expresi v bakteriích, viz. neúspěšná bakteriální exprese genu ND6.

Jak častá je přítomnost intronů v genech *Trichomonas vaginalis*?

Liší se nějak intronovou strukturou geny kódující cytoplazmatické proteiny a geny kódující hydrogenosomální proteiny?

MS analýza proteinů kopurifikovaných s Tvh22 a Tvh47 ukázala na možnou přítomnost sukcinyl-CoA ligázy v komplexu s Tvh22 a Tvh47. Jaká by mohla být její funkce v tomto komplexu?



RNDr. Daniel Rösel, PhD.

V Praze dne 22.5. 2005