

Funkční analýza NifS1 u procyklických stádií *Trypanosoma brucei*

Práce se zabývá studiem produktu genu, nalezeném v genomu *T. brucei* se signifikantní podobností k selenocystein lyázám. O významu těchto enzymů je velmi málo známo. Jedním z důvodů je patrně absence cystein lyázy v klasických modelech jako je *Saccharomyces cerevisiae*. Nález homologu selenocystein lyáz u trypanosom je proto pozoruhodný a výzkum jeho funkce může přinést zajímavé výsledky jak z hlediska poznání funkce buněk *T. brucei*, tak ostatních eukaryotických buněk, nesoucích obdobné geny včetně lidských buněk.

Práce je klasicky členěna, velmi přehledně zpracována, výsledky bezpochyby odpovídají stupni bakalářského studia, úvahy nad výsledky logické a dobře formulované, byť někdy až příliš optimistické. Z práce mám celkově velmi pozitivní dojem a doporučuji nejlepší hodnocení. Následující připomínky jsou proto jen snahou poradit, nikoliv vytykat nějaké zásadní nesrovnalosti.

1. Název práce

Selenocystein lyáza patří společně s mitochondriálními cystein desulfurázami (IscS) a specifickou skupinou bakteriálních cystein desulfuráz (NifS) do široké rodiny PLP-dependentních enzymů. Označení NifS1 je proto zavádějící, neboť se nejedná o protein skupiny Nif, jež se téměř výhradně podílí na biogenezi nitrogenáz u bakterií fixujících dusík (Nif – **n**itrogen **f**ixing). Navíc tento gen byl již dříve popsán pod jménem TbiscS1 (Šmíd et al., 2006).

I v dalším textu autor zaměňuje proteiny skupiny Nif (NifU, NifS, NifA), jejichž funkce i struktura je odlišná, s proteiny skupiny Isc (**I**ron **s**ulfur **c**luster), kterou má evidentně na mysli a která je zodpovědná za tvorbu FeS center jak v mitochondrii eukaryot, tak v bakteriích (např. str. 1, 2, 5 aj.)

Úvod

Autor se musí přesněji naučit používat citace. Např. Práce Bakker a kol, sice zmiňuje patogenitu *T. brucei*, avšak její hlavní zaměření je na metabolismus, nikoliv patogenitu. Rovněž práce Lukeš a kol. jistě pojednává o editování RNA, ale není specializována na povrchovou antigenní variabilitu (část 1.1)

1.4. Selenoproteiny – autor by měl použít EC čísla pro uváděné enzymy aby bylo jasné o jaké enzymy se jedná. Název selenocystein syntetáza ani syntáza není přesný (viz např Brenda <http://www.brenda-enzymes.info/>).

Metodika

Perfektně zpracováno, pouze pár drobností:

Autor by měl vysvětlit co je MilliQ voda. Firma Millipor vyrábí asi 4 MilliQ systémy, každý má jiné určení.

Str. 10 – filtrace přes 0,22 um filtr – v principu se jedná o sterilizaci filtrací s využitím filtrů o průměru 0,22 um.

Pokud jsem se nepřehlédl, nenašel jsem v metodice původ použitých protilátek.

4.10.2 Hybridizace s protilátkami a autoradiografie, v principu se nejedná o autoradiografii, pro western blotting nebyly používány radionuklidy.

4.11.2 popis podmínek PCR reakce, vím jak je to myšleno, ale tak jak je to napsáno by se mohlo zdát, že denaturace probíhala 1 min 35x a pak nasedaly priméry 2 min 35x atd. Elegantnější by bylo zmínit se o 35 cyklech kroků 2-4.

Výsledky

Str. 35 růstové pokusy

Vertikální osy jsou poněkud neobvykle popsány $1,00E+06$ atd. stačilo by 10^6 . Co vlastně tato osa ukazuje, aktuální koncentraci buněk ve zkumavce? Asi ne, tedy přírůstek od očkování k očkování? Byl růst buněk exponenciální? Kolikrát byly buňky během 14 dnů přeočkovány?

...linie NifS1 nevykazuje.. mělo by být jasně definováno (i když z kontextu to lze vdedukovat) co je myšleno linií NifS1.

Str 36 název obrázku 2 a 3 by mohl být jasnější.

Str. 37 – proč nebyla sledována exprese proteinu NifS1? –je mně to jasné, nebyla protilátka, ale do publikace by to bylo potřeba. Vztahovat změny hladiny mRNA jednoho proteinu, s western bloty jiného proteinu je vždy problematické.

Obr 4, 5, - mělo by být jasně vysvětleno co je NifS1/NI, NifS1/2I atd.

Str. 41 Obr 11 co znamená dvojitý proužek v oblasti 1000-1650 bp?

Str. 43 Jaký je výsledek měření u Dr. Piona? Splnili se vaše představy?

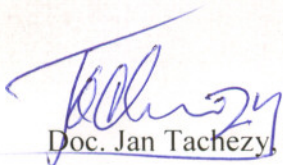
Str. 44. Auranofinový experiment je jistě zajímavý, ale bude jistě nutné tento pokus zopakovat, a na rozdíl od autora se domnívám, že alespoň dvakrát (str. 45). Rovněž bych zařadil jako kontrolu linii s indukovanou či neindukovanou RNAi proti jinému genu, než je IscS1. K vyvozování závěrů z tohoto pokusu bych zatím byl velmi opatrný.

Diskuse

Str. 47 – buněčná lokalizace IscS1 - Co znamená, že....nebyl získán interpretovatelný výsledek?

Na základě jaké kauzality autor uvažuje, že když neklesá hladina mitochondriální IscS2 a IscU je mitochondriální lokalizace IscS1 nepravděpodobná? IscS1 patrně neiteraguje s IscU – nemá konzervovanou C-terminální doménu, její funkce může být jiná než IscS2, ale stále by mohla být v mitochondrii.

Poslední odstavec: ...výsledek ukázal...., byl bych opatrnější, jeden předběžný pokus bez patřičných kontrol mnoho neukazuje, i když osobně doufám, že další pokusy potvrdí, že IscS1 je opravdu selenocystein lyáza.



Doc. Jan Tachezy, Ph.D.