



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie

Mlynská dolina
842 15 Bratislava 4

Tel.: +421 02 / 602 96 546
Fax: +421 02 / 602 96 452
e-mail: horvath@fns.uniba.sk

Oponentský posudok na magisterskú diplomovú prácu:

Functional analysis of Ssc1 and Iba57 proteins in *Trypanosoma brucei*,

ktorú vypracoval Tomáš Skalický, BSc. pod vedením prof. RNDr. Júliusa Lukeša, CSc. na Prírodovedeckej fakulte Juhočeskej univerzity v Českých Budějoviciach..

Trypanosoma brucei je dlhoročným modelovým organizmom tak pre svoju patogenitu ako aj pre veľký počet neobyčajných metabolických dráh. Biogenézy Fe-S klastrov je esenciálnym dejom a preto jej štúdium v *T. brucei* je aktuálne a potenciálne zaujímavé pre základný aj aplikovaný medicínsky a farmaceutický výskum. Cieľom diplomanta bolo objasniť úlohu, ktorú v metabolizme Fe-S klastrov v *T. brucei* majú proteíny Ssc1 a Iba57.

Práca je napísaná pomerne dobrou angličtinou a má klasické členenie. Nebudem sa venovať drobným preklepom, či niektorým nesprávnym slovosledom a nejasným formuláciám, pretože ich nie je veľa a nemenia celkové vyznenie práce.

V Úvode Tomáš podáva stručný prehľad literatúry súvisiacej s riešenou problematikou. Táto časť je napísaná stručne a prehľadne. Polemizoval by som len s tvrdením na str. 2 hore, že „mitochondrion of the BS has only minor role in the energy metabolism relying on glycolysis as the main metabolic source of ATP (Tielens and Hellemond, 2009)“. Vzhľadom na to, že v mitochondrii prebieha regenerácia dihydroxyacetónfosfátu z glycerol-3-fosfátu, ktorá je esenciálna pre glykolýzu prebiehajúcu v glykozóme, nepovažoval by som úlohu mitochondrie v bioenergetizme BS formy za minoritnú.

Druhá časť Materiál a metódy je vypracovaná veľmi precízne a jednotlivé protokoly možno použiť ako laboratórny manuál. K tejto časti mám nasledujúce menšie pripomienky. Názov tabuliek sa zvykne písať nad tabuľku a nie pod ňu, ako to používa autor. Na str. 17 chýba pri tlmivom roztoku fosfátu sodného dôležitá informácia o jeho pH. Zloženie blotovacej aparatury na prenos RNA na membránu je už tak známe, že obrázok 8. považujem za zbytočný. Na str. 30 chýba informácia o podmienkach, pri akých boli proteíny prenesené na PVDF membránu.

V tretej kapitole sú výsledky nakopené jeden vedľa druhého bez dostatočného komentára. Chýba mi v tejto kapitole jednotiaci niť, ktorá by prezentované výsledky spájala do jedného celku. Viaceré výsledky sú síce zhodnotené v nasledujúcej kapitole „Diskusia a závery“, no bez lepšieho vysvetlenia prezentovaných dát už hneď pri ich prezentovaní nie sú dobre pochopiteľné ani viaceré tvrdenia v Diskusii. Celá kapitola „Výsledky“ pôsobí veľmi rozhárané. Napríklad kapitola začína neúspešným experimentom dokázať mRNA sledovaných génov a jej úbytok po RNA interferencii Northernblotovou analýzou. (Je otázne, či je potrebné takéto negatívne výsledky ukazovať a nestačilo by ich len konštatovať.) Potom nasledujú rastové krivky a až po nich sa autor opäť vracia k mRNA a pomocou qPCR dokazuje, že zodpovedajúca mRNA je skutočne eliminovaná. Výsledky qPCR na obr. 12 sú však pre človeka, ktorý nie je podrobne oboznámený s experimentom málo pochopiteľné. Môže sa len spoľahnúť na tvrdenie v legende k obrázku, že prezentované grafy skutočne ukazujú úbytok sledovanej mRNA po RNAi.

Prezentované obrázky sú zbytočne veľké a/alebo zle rozložené v texte, takže veľmi často je koniec obrázku s legendou na inej strane ako jeho začiatok. Pri niektorých obrázkoch je

legenda príliš obsiahla a aspoň časť z nej patrí do metód (napr. obr. 15). To tiež veľmi sťažuje orientáciu v prezentovaných výsledkoch.

Na str. 38-39 nesúhlasím s interpretáciou dát na obrázku na Obr. 14B. 35% pokles fumarázovej aktivity v celkovom bunkovo lyzáte by som si nedovolil interpretovať ako „no effect“. Navyše autor aj v diskusii ignoruje disproporciu medzi poklesom fumarázovej aktivity v cytosolickej (okolo 20%) a celkovom (okolo spomínaných 35%) lyzáte. **Keďže v mitochondriálnej frakcii k zmene v tejto aktivity nedošlo, očakával by som, že relatívny pokles aktivity bude v cytosolickej frakcii ešte výraznejší, ako v celkovom lyzáte. Tu mám niekoľko otázok. V akom pomere sú merané cytosolickej a mitochondriálnej fumarázovej aktivity? Je ich súčet približne rovný fumarázovej aktivite v celkovom lyzáte? Ako Tomáš interpretuje výsledky na obr. 14B?**

Ako som už spomenul vyššie, v kapitola Diskusia a závery autor komentuje výsledky, no aj tu mám pár pripomienok a nejasností. Na str. 46 Tomáš píše: „The eventual resistance to RNAi was not surprising; this phenomenon was observed in many cases (Lukeš, personal communication).“ Rezistencia na RNAi však nie je fenomén pozorovaný len v laboratóriu prof. Lukeša, ale už dávnejšie publikovaný a preto by mala byť zodpovedajúca literatúra citovaná (napr. Chen a kol. 2003, MBP 126, 275-279).

Na str. 47 autor na základe svojich výsledkov deklaruje: „... in *T. brucei* Ssc1 is required for proper biogenesis in some of these Fe-S clusters ...“. Toto tvrdenie bez ďalšieho komentára považujem za príliš silné. Autor totiž nesledoval Fe-S klustery, ale len aktivitu enzýmov, ktoré Fe-S klustery obsahujú. Na aktivitu jedného z nich vyradenie Ssc1 aktivitu malo vplyv na druhú nie. Ak aj by bola interpretácia výsledkov na obr. 14 správna a naozaj je akonitáza ovplyvnená a fumaráza nie, tak by išlo o dôkaz len nepriamy, ktorý by bolo potrebné takto aj diskutovať.

Za posudzovanou prácou nasleduje príloha – manuskript článku, ktorého je Tomáš Skalický spoluautorom. Aj tu mi však chýba ďalší komentár napríklad:

- Pár slov o prepojení prílohy s témou diplomovej práce
- Informácia o tom, na ktorých experimentoch autor participoval
- V akom štádiu je manuskript (pripravený do tlače, podaný, v tlači, ...)

Tomáš v rámci svojej diplomovej práce zvládol celú škálu náročných molekulárno-biologických a biochemických techník. Pomocou nich získal viacero cenných originálnych výsledkov, ktoré aj diskutoval. Pozitíva predloženej práca ďaleko prevyšujú nedostatky, na ktoré som poukázal. Predkladaná práca bezo sporu spĺňa nároky kladené na diplomovú prácu a dokazuje vedeckú vyspelosť Tomáša Skalického. Odporúčam ju k obhajobe.

Hodnotím 2

16. 5. 2011


doc. RNDr. Anton Horváth, CSc.

Opponency of master thesis submitted by bc. Tomáš Skalický: Functional analysis of Ssc1 and Iba57 proteins in *Trypanosoma brucei*

(University of South Bohemia, Faculty of Science, Department of Molecular Biology)

In the submitted thesis the author described some functions of two genes Ssc1 and Iba57 in the cell of procyclic and bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Both proteins were shown to have function in biogenesis of Fe-S cluster containing proteins. In the case of Iba57 the author also suggested a role in handling of oxidative stress.

Functional investigation of Ssc1 and Iba57 was based on RNAi against corresponding transcripts, a method which is well established and extensively used in Prof. Lukeš laboratory. It was certainly a method of choice for investigation of such complex pathways as Fe-S cluster biogenesis and oxidative stress protection. The results acquired in this thesis are original providing a solid base for interesting publication. It is clear that there is a lot of work behind all shown results. Unfortunately, it is also clear that this thesis was written in time pressure, which is apparent in many parts and aspects of the text.

The thesis has logical sorting, but I would expect a short introductory chapter to the whole work (what is it all about and why author did this). Defined aims of the work are also missing.

Introduction consisting of only 7 pages of text including 4 pictures obtained from various sources. Text is too condense, and deserves to be more comprehensive. At some places the author generalizes specific features of yeast to all eukaryotes without clarification. I would expect more information about the use of the Fe-S clusters and oxidative stress handling in *T. brucei* cell, which should help to understand subsequent chapters.

Chapter "Materials and methods", consisting of 24 pages, is written in detail and mostly nicely describes procedure of the experiment. Unfortunately, some methods should be more clarified (principles of ROS measurement, digitonin fractionation, and statistics behind almost all methods). Detail description of bloodstream *T. brucei* transfection is identical with text at web page http://tryps.rockefeller.edu/Protocols/transfection_amaxa.pdf without providing any reference.

Chapter "results" has a lot of ilustrative and well described figures, but mostly there is no description of what the actual result is.

Chapter called “discussion and conclusions” consists of only 4 pages, mostly repeating results, and unfortunately there is not much of a discussion.

There are also few minor mistakes, like missing references (page 3 – „Fe-S clusters were discovered in the early 1960s“; page 5 – „Electrons for the Fe-S cluster biogenesis on scaffold protein are provided by ferredoxin reductase Arh1 and ferredoxin Yah1“; etc.) and use of secondary references instead of primary (for example Lill and Mühlenhoff, 2008).

Follows comments and questions for the individual chapters

Introduction:

1) Is there any reason to use yeast name Ssc1 for yeast specific mitHSP70 in the case of trypanosomes? The author should clarify at page 6 that yeast and some other fungi possess three types of mitHSP70 with specific functions (Ssq1, Ssc1 and ECM10), while other eukaryotes including *T. brucei* contain a single type of multifunctional HSP70.

2) On the page 5 author writes that „Grx5 is also involved in this second major step“. What is meant by this „second major step“?

3) Author should be careful about unknown facts. For example page 5: “...After export of mitochondrially formed FeS clusters...”. As far as I know, no one proves that Fe-S cluster is the compound that is exported from the mitochondria to the cytosol.

4) Can author explain why organisms use Fe-S cluster proteins?

Materials and methods:

5) Page 8: Restriction enzymes in the text don't correspond to the table 1. Also in the table 1 restriction sites in both primers for Ssc1 gene has nucleotide C on the 5' end, why is that?

6) Page 9: Why author used IPTG for transformation of *E. coli* and didn't use antibiotics?

7) Page 10: Ligation reaction doesn't look right, there should be about 1 ul of 10x ligation buffer.

8) Page 13: Final concentrations of Hygromycin and G418 should be 50 ug/ml and 15 ug/ml respectively.

9) Page 23: Can you explain Table 9? It looks like there is missing any cooling at the end of the program and are temperatures for annealing and elongation really the same?

10) If you want to use RPM, you have to write what type of rotor you used. It's better to use RCF (relative centrifugal force).

11) Some abbreviations are not clarified (NaPi). There are absurdly precise weights in the solution of HBSS (table 11, page 26)

12) It is not necessary to describe in detail preparation of 10% solution of Triton.

13) At some places it looks like it was just used „copy paste“ approach and no one read the text – for example: „Label tubes and place into metal rack kept in the fridge upstairs“ (page 22, chapter 2.6.6).

Results:

14) How many repeats of the growth phenotype author did?

15) At what cell concentration did author start induction of RNAi? From the graphs at page 34 and 35 it looks like that it differs for each gene. Why is that?

16) Why didn't author use β -tubuline as a control for qPCR, when he prepared primers for it?

17) Why did author use different loading controls on western blots?

18) Standard deviations in graphs with enzymatic activities (fig. 14) seem to be always the same for each graph. Is it real or is it just mistake?

19) In some experiments, induced cells has almost the same dose responsive curve as WT but very different from non-induced (fig. 15 C and D)? Can author explain this phenomenon? Is it possible to show standard deviations for EC50?

20) Why author didn't show the data from enzymatic activities of Iba57 KD cell lines?

Discussion and conclusions

21) Why author thinks that trypanosomal hsp70 is Ssc1 homolog? Schilke et al showed that in yeast, Ssc1 can replace function of Ssq1 when *ssq1* gene is deleted, and interact with Jac1. However, in other eukaryotes there is multifunctional HSP70.

22) The presence of multiple paralogs of mit HSP70 in *T. brucei* is not mentioned in the text. The author should explain whether RNAi caused gene silencing of all mitochondrial HSP70s. Does monoclonal anti Hsp70 antibody recognize products of all HSP70 genes?

23) Author writes that RNAi was clearly confirmed by northern blot, but from the figure 10, it's hard to say anything (in fact it looks like there is more mRNA of Ssc1 in induced cells). On the same picture there are 2 cell lines (C2 and D2), which cell line was used for the rest of the work?

24) There was a difference between aconitase and fumarase activities. Do they have different Fe-S cluster, or what author thinks about that difference?

Literature:

Differences between cited papers are minor (dot vs. without dot after first name), different line spacing and sorting by second author instead of year is making harder to find desired reference.

References of three papers are included twice in the list of references.

Lill R. and Mühlenhoff U. (2008). Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. **Annu. Rev. Biochem.** 77:669-700.

Panigrahi A.K., Zíková A., Dalley R.A., Acestor N., Ogata Y., Anupama A., Myler P.J., Stuart K.D. (2008). Mitochondrial complexes in *Trypanosoma brucei*: a novel complex and a unique oxidoreductase complex. **Mol. Cell. Proteomics.** 7:534-45.

Schilke B., Williams B., Knieszner H., Puksza S., D'Silva P., Craig E.A., Marszalek J. (2006). Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. **Curr. Biol.** 16:1660-65.

After consideration of all mistakes, inaccuracies and very short introduction and discussion, I dare to say that submitted master thesis is below the level of the average. When I take in consideration a large amount of work in laboratory which author had to spend to get all interesting results that were presented in his thesis, I am sure that the author has potential to submit thesis of very high quality. I would suggest letting the author pass with the conditions of answering all questions and perfect presentation and defence.

In Prague 20.5.2011

Jan Mach

