

Posudek školitele na bakalářskou práci Jitky Kručinské „Construction of expression vector for cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“

Sinice *Synechocystis* 6803 zaznamenala během dvaceti let rychlý vzestup mezi významné modelové organismy. V dnešní době tato bakterie dominuje molekulární biologii sinic především jako „modelový chloroplast“. Většina prací na *Synechocystis* má zřejmý přesah do biologie rostlin, o čemž svědčí fakt, že jsou běžně publikovány v úzce profilovaných časopisech, jako je *The Plant Cell* nebo *Plant Physiology*.

Slečna Jitka Kručinská se při zpracování své bakalářské práce věnovala přípravě expresního vektoru pro tento modelový organismus. Nepochybně se jedná o zásadní téma, neboť nedostupnost vhodných vektorů pro sinice je obecně dlouhodobým problémem. Od prvních pokusů o přípravu expresních vektorů v polovině osmdesátých let nebyly zaznamenány větší úspěchy a řada kolegů ze zahraničí mi potvrdila, že o případný expresní plasmid je enormní zájem. Obliba *Synechocystis* je daná nebývalou jednoduchostí, s jakou lze provádět genetické manipulace, což platí i v porovnání s jinými bakteriemi. Vědci, a to nejen ti zabývající se fotosyntézou, si dobře uvědomují, jak mocný nástroj by získali, pokud by měli k dispozici expresní systém pro *Synechocystis*.

Práce diplomantky vycházela z nativního plasmidu ze *Synechocystis*, který je nositelem mutace, jež vede k neřízenému hromadění tohoto plasmidu v buňce. Cílem bylo zjistit základní parametry plasmidu, jako je počet kopií, vložit do něj gen pro rezistenci a případně gen, jenž by byl exprimován v buňce. Je třeba zdůraznit, že doposud nebyly popsány žádné manipulace s plasmidem ze *Synechocystis*, a tudíž chybí jakákoli metodika. V takovémto případě nezbyvá jiná metoda než pokus-omyl, přesněji řečeno řada po sobě následujících omylů, což je náročné nejen časově, ale také psychicky. Proto bych chtěl ocenit pracovitost a trpělivost studentky. Poznání, že běžný pocit molekulárního biologa je frustrace Jitku nijak výrazně nepoznámalo.

Díky intenzivní práci se Jitce podařilo poměrně záhy připravit a naizolovat plasmid nesoucí gen pro rezistenci ke kanamycinu. K jeho konstrukci studentka použila zcela nový postup, založený na PCR mutagenezi a homologní rekombinaci. V otázce, který protein zvolit pro expresi, školitel trval na poněkud nenasytném požadavku na něco průlomového. Jitka se tak řadu měsíců pokoušela přimět sinici k nadměrné expresi esenciálního membránového proteinu, který váže množství chlorofylů. Opakované pokusy naplno prokázaly Jitčinu obdivuhodnou píli a vytrvalost, až zarputilost. Ačkoli se jí nepodařilo přimět buňky *Synechocystis*, aby akumulovaly nadměrné množství zvoleného proteinu, je nutné zdůraznit, že získané výsledky jsou neobyčejně cenné. Práce na expresním vektoru budou samozřejmě pokračovat a díky systematickosti, s jakou byly experimenty prováděny, máme nyní mnohem jasnější představu, co lze od *Synechocystis* očekávat. Jitčiny výsledky ukazují, že v případě nouze dokáže tento organismus neznámým způsobem využít fragmenty DNA, což působí fantasticky a dává tušit, že na úplný význam tohoto zjištění zatím nedohlédneme. Osobně bych velmi uvítal, kdyby si Jitka pro svou magisterskou práci vybrala opět naši laboratoř a stejného školitele.

Domnívám se, že předložená diplomová práce má výbornou úroveň a doporučuji ji k obhajobě.

Ing. Roman Sobotka, PhD
Laboratoř fotosyntézy
Mikrobiologický ústav, AVČR
Opatovický mlýn, Třeboň

V Třeboni 5.6. 2007

sobotka@alga.cz

