

Oponentský posudek na magisterskou práci Moniky Žuberové: „Úloha ferochelatázy v regulaci biosyntézy chlorofylu a hemu“

Biosyntéza hemu a chlorofylu je jedna z nejdůležitějších metabolických drah živých organismů. Monika Žuberová se ve své magisterské práci zabývá úlohou jednoho z klíčových enzymů, ferochelatázy (FeCh), v regulaci této dráhy. Množství laboratorní práce, které tento spis reprezentuje je velmi solidní, práce je metodicky neobvykle bohatá a zahrnuje komplexní postup od vytvoření konstruktů a získání cílených mutantů FeCh v Cab doméně, až po měření aktivity FeCh těchto mutantů.

Práce je klasicky členěná na Úvod, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi, Závěr a Seznam použité literatury, a je sepsána na 38 stranách, plus 5 stran příloh. Pro mě osobně, vzhledem k tomu, že se zabývám zcela jinými aspekty syntézy hemu, je celá práce velmi zajímavá, a to jak v odlišném pohledu na věc, tak v pro mě nových metodických postupech. Z toho ovšem částečně vyplývá i charakter tohoto posudku. Některé mé otázky jsou tak netradičně motivovány zvědavostí a nikoliv obvyklou touhou oponenta-lovce po kořisti.

Úvod je napsán přehledně a čtivě, a je z něj znát fakt, že autorka se v problematice velmi dobře orientuje. Vzhledem k tomu, že se tento literární přehled logicky neomezuje jen na syntézu hemu u prokaryot, chybí mi zmínka o vnitrobuněčné lokalizaci enzymatických kroků u jednotlivých skupin eukaryot. Vzhledem k tomu, že jde o aspekt nesmírně zajímavý, tedy aspoň pro mě, týká se jej i má první otázka (viz. otázka č.1). Metodika této magisterské práce je sice bohatá, co se počtu použitých metod týče, má však bohužel jednu zásadní chybu. Řada postupů by podle ní byla totiž jen těžko opakovatelná. Týká se to především přípravy konstruktů pomocí PCR. Absence jakýchkoli informací o použitých parametrech PCR je poněkud frustrující. Dovedu si sice představit, jak celý postup funguje, ale podlé téhle kuchařky bych to prostě neuvažil. Je to o to těžší, že u řady metodických podkapitol zcela chybí odkazy na literární zdroje (2.2., 2.5., 2.6.1., 2.6.2., 2.6.3., 2.7., 2.8., 2.9.1., 2.9.2., 2.9.3., 2.9.4., 2.9.5., 2.10.), což vytváří dojem, že autorka vymyslela celý složitý metodický postup sama, aniž by nahlédla do jediné metodiky popsané v literatuře. Některé metodické postupy se mi zdají být zvláštní. Nepochopil jsem například, proč vlastně autorka konstrukt používaný pro transformaci bakterií uchovává v kmenu *Synechocystis*, kde ji musí dostávat do všech 10 kopií genomu, a nemá jej zaklonovaný třeba v plazmidu v *E. coli*. Z metodiky také není zcela jasné, zda byl konstrukt se zmutovanou Cab doménou vložen do všech kopií genomu obou transformovaných kmenů, WT a C1.8. Mám trochu pochybnosti o kontrolách vložených genů. Dovedu si ještě představit, že by fungovala PCR kontrola přítomnosti genu bez Zeo-kazety. Považuji však téměř za nemožné spolehlivě zjistit pomocí PCR a sekvenování produktů, jestli není v některé z deseti kopií v genomu transformovaného kmene nějaká nežádoucí mutace. Nespecifická amplifikace u WT popsaná na obrázku 3.6.

mi dává, i když není na zmíněném obrázku vidět, za pravdu. Sem směřuje i moje první výhrada k výsledkům. Velmi malé množství PCR produktu u kontroly segregace Zeo-kazety (obr. 3.2. produkt 1660 pb) ve srovnání s původním genem u WT dle mého názoru značně oslabuje průkaznost této kontroly a hlavně předpoklad, že v cílové sekvenci nedošlo k žádným nečekaným mutacím (viz. otázka č. 2). Viditelnost separovaných PCR produktů byla na některých obrázcích na hranici přijatelnosti, což může být ale způsobeno kvalitou tisku. Osobně bych dal též přednost fotografiím celých gelů, které dají lepší obrázek o průběhu PCR díky viditelnosti případných minoritních produktů. V tabulce 3.1. jsou uvedeny hodnoty generační doby a množství chlorofylu u jednotlivých mutantů a WT. Je zde, podobně jako v metodice konstatováno, že uvedené hodnoty jsou průměrem ze tří měření. Bez jakéhokoli dalšího statistického zpracování, aspoň uvedení směrodatné odchylky, či grafické znázornění všech měření, je tak jediným uvěřitelným výsledkem prodloužení generační doby u kmene s FeCh bez Cab domény (HemH-Stop). Fakt, že se nepodařilo detekovat FeCh bez Cab domény je překvapivý. Je otázkou nakolik může absence Cab domény ovlivnit sbalení proteinu a dostupnost epitopu použitého pro konstrukci protilátky. Pokusila se autorka detekovat zkrácený transkript? Ovlivňuje vložení stop kodonu nějakým způsobem expresi Zeo-kazety? Pokus s transformací kmene C1.8 konstruktem s mutací v Cab doméně je krásný. Snížení aktivity ferochelátázy u kmenů s mutacemi v Cab doméně celkem přesvědčivě podporuje navrhovanou regulační dráhu. Přesnější interpretaci bohužel ztěžuje fakt, že chybí jakákoli data k dynamice ztráty ferochelátázové aktivity po transformaci konstruktem s mutací. Není tedy jasné, nakolik může být aktivita FeCh u mutantů zbytková, tj. té ferochelátázy, která byla exprimována a inkorporována do membrán před transformací buněk, či zda je výsledkem pouze částečného snížení afinity mutované Cab domény k chlorofylu. Musím konstatovat, že práci by neuvěřitelně prospělo, kdyby obsahovala graficky znázorněný navrhovaný model regulace dráhy pro syntézu hemu. Doufám, že nám slečna diplomantka tento model uceleně představí při obhajobě. Diskuze je promyšlená, bohužel v ní chybí řada literárních odkazů. Např. hned v prvním odstavci autorka tvrdí, že organizmy, které syntetizují chlorofyl, mají Cab doménu na C-konci FeCh, bez uvedení jakékoli citace. Některá tvrzení jsou těžko přijatelná. Pokud dojde k poklesu aktivity FeCh o pouhých 35%, nemůžu přeci tvrdit, že vazba chlorofylu na nasedací místo v Cab doméně je určitě znemožněna, zvláště když předpokládám, že taková vazba je podmínkou aktivity enzymu. Zajímavá je myšlenka, že by chlorofyl mohl jako kofaktor stabilizovat dimér ferochelátázy. To by totiž mohlo vysvětlit proč všechny fotosyntetické eukaryotické organismy syntetizují hem v plastidu.

Celkově musím konstatovat, že se mi magisterská práce slečny Moniky Žuberové velmi líbí. A to i přesto, že Eva (viz. poděkování) zapomněla zkontrolovat pravopis v poděkování a popiscích obrázků. Promyšlené pokusy a pestrost metodického přístupu

vhodně doplňuje invenční diskuze. S radostí takovou práci doporučuji k obhajobě. Vzhledem k zásadní absenci literárních zdrojů nejen v metodice, a díky nemístné stručnosti popisu některých použitých metod však mé hodnocení osciluje mezi „výborným“ a „velmi dobrým“. Konečný verdikt vynesu až po prezentaci práce autorkou.

další otázky:

1. Jaká je vnitrobuněčná lokalizace jednotlivých kroků u eukaryot? Konkrétně u živočichů a hub, rostlin, řas, výtrusovců (Apicomplexa) a rozsivek?
2. Co je, dle Vašeho názoru, příčinou malé výtěžnosti PCR pro kontrolu integrace Zeo-kazety u Zeo kmenů?
3. Jak si vysvětľujete absenci exprese ferochelatázy u *E. coli*, která exprimuje vlastní FeCh?
4. Jak si vysvětľujete zbytkovou aktivitu po mutacích Cab domény?
5. Jak je to s regulací aktivity ferochelatázy u nefotosyntetických organismů?

V Českých Budějovicích 28.1.2006



Miroslav Oborník

Parazitologický ústav
Biologické centrum AV ČR
Branišovská 31
37005 České Budějovice