

MBU

Mgr. Ladislav Bumba, PhD.

Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů

Mikrobiologický ústav

Videňská 1083

142 20 Praha 4

Tel: 24106-2141

Fax: 24106-2152

E-mail: bumba@biomed.cas.cz

Posudek oponenta na magisterskou práci Jitky Kručinské nazvanou „Expression and purification of *Synechocystis ferrochelata*se from *Escherichia coli*“.

Magisterská práce Jitky Kručinské je předkládána v rozsahu 42 stran, a obsahuje velké množství přehledných obrázků, grafů a tabulek. Pod vedením Dr. Romana Sobotky z Mikrobiologického ústavu AVCR v Treboni se autorka zabývala produkcí rekombinantního enzymu ferochelatazy ze sinice *Synechocystis* v bakteriálním expresním systému *Escherichia coli* a purifikací tohoto proteinu ve formě vysoce aktivního enzymu. Ferochelataza se neřadí mezi proteiny nacházející se volně v cytoplasmě (či protoplasmě plastidů a mitochondrií), ale patří mezi tzv. membránově-asociované proteiny, kde navíc u fotosyntetických organismů, C-koncová část molekuly tvoří jeden hydrofobní transmembránový segment. Vzhledem k tomu, že masivní nadprodukce proteinů s výše uvedenými vlastnostmi v bakteriálním expresním systému patří mezi velmi obtížné úkoly, považuji výsledky získané a prezentované autorkou za mimořádně důležité.

Po formální stránce je práce členěna na 5 kapitol (Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion) včetně 4 stran odkazů na vědeckou literaturu. Toto uspořádání je velmi běžné pro publikaci získaných výsledků ve formě vědeckého článku v odborném časopise. Proto předkládaná práce na mě působí jako manuskript publikace, který po drobných úpravách by mohl sloužit jako podklad pro recenzní řízení k přijetí publikace do tisku.

Práce má dobře sepsanou úvodní kapitolu (11 stran), která je doprovázena vhodně vybranými schémata a detailně čtenáře seznamuje nejen s regulací biosyntetické dráhy tetrapyrólů, jež dále slouží pro syntézu molekul hemu a chlorofylů, ale i se strukturními a funkčními vlastnostmi jednotlivých isoenzymatických forem ferochelataz v prokaryotní říši a u fotosyntetických organismů.

Dále pak následují cíle práce, které jsou srozumitelně vytyčeny a odpovídají rozsahu magisterské práce.

V kapitole „Materials and Methods“ (7 stran) autorka popisuje a používá standardní metody molekulární biologie, standardní postupy pro nadprodukci proteinů v bakteriálním expresním systému *E. coli*, metody proteinové biochemie, jako např. purifikace proteinů pomocí chromatografických technik a jejich následné charakterizaci pomocí enzymových metod. Metody jsou detailně popsány a jejich použití je adekvátní pro tuto práci. Nicméně, popis měření ferochelatazové aktivity (str. 14) je příliš stručný (pouze 5 řádek) a vůbec nepopisuje následné vyhodnocování naměřených dat v srovnávacích grafech (Fig 3.3, str. 23 a Fig. 3.13, str. 32). Navíc autorka popis celé metody odkazuje na publikaci svého školitele, což dle mého názoru, si může dovolit v regulérním manuskriptu určeném pro publikaci v časopise, ale ne ve své magisterské práci.

V kapitole „Results“ (15 stran) autorka detailně a velmi srozumitelně shrnuje dosažené výsledky své práce. Autorka konstatuje, že samotná exprese ferochelatazy v buňkách *E. coli* není možná, pravděpodobně z důvodu nespecifické agregace proteinu. Z tohoto

důvodu, na expresi ferochelatózy byl použit systém využívající fúzní protein s proteinem glutathione-S-transferáza, což je efektivní nástroj pro produkci špatně rozpustných proteinů v *E. coli*. Autorka zkonstruovala několik expresních vektorů, porovnávala efektivitu nadprodukce proteinu jednotlivých konstruktů pomocí SDS-PAGE a měřením enzymatické aktivity buněčných lyzátů, analyzovala podmínky pro purifikaci proteinu a v neposlední řadě optimalizovala strategii purifikace sinicové ferochelatózy v *E. coli*. Musím ocenit, že autorka se nezalekla prvotních neúspěchů s expresí a purifikací tohoto enzymu a pokračovala v této práci až do úspěšného konce, který byl korunován získáním relativně čisté frakce vysoce aktivního enzymu. Jediným nedostatkem, kterého jsem si všiml, bylo ani ne tak přesné stanovení, ale spíše srovnávání enzymatické aktivity ferochelatózy v jednotlivých frakcích (a to jak v buněčných lyzátech, tak i v jednotlivých frakcích získaných z chromatografických kolon). Autorka porovnávala aktivitu a množství enzymu na základě pouhého odhadu koncentrace proteinu z SDS-PAGE gelu. Předpokládám, že jiná metoda se nedala použít, ale dá se opravdu říci, že rozdíly v enzymatických aktivitách jednotlivých frakcí nemohou být zkresleny z chybného odhadu koncentrace proteinu na SDS-PAGE gelu? Nicméně, text, obrázky, ale i legenda k obrázkům jsou na velmi dobré úrovni a tvoří kvalitní základ této práce.

Na 4 stranách „Discussion“ autorka logicky porovnává získaná data s recentní literaturou, dále se zabývá příčinami částečných neúspěchů ve své metodické části a dále diskutuje nad dalším využitím tohoto proteinu k detailnímu poznání biochemické dráhy syntézy tetrapyrólů a jejich vliv na regulaci proteinových složek účastnících se v bioenergetických procesech sinice *Synechococcus*.

Práci uzavírá kapitola „Conclusion“, kde autorka shrnuje získaná data, která odpovídají zadaným cílům a nárokům na magisterskou práci.

Dále musím ocenit, že celá práce je napsána v anglickém jazyce, což u magisterské práce není ještě u nás standardní záležitostí. Práce je psaná dobrou angličtinou, která by ovšem v některých částech potřebovala zásah nativně-anglického mluvčího, ale na druhou stranu představuje velmi dobrý standard vědeckého jazyka, a vyniká z hlediska dobré srozumitelnosti. Množství jazykových překlepů a nepřesností je vzhledem k rozsahu práce minimální.

Dále musím ocenit, že tato práce byla podpořena Studentskou grantovou agenturou PŘF JU (SGA 2008/007), což dále potvrzuje moje přesvědčení o vysoké kvalitě tohoto projektu.

Drobné poznámky:

- Chybí seznam zkratk
- V diskuzi se často používá aktivní průběh slovesa „I did, I observed, I checked“, lepší je použít pasivní průběh slovesa „was done“ atd.
- Str. 31, na vyjádření kalibrace gelové filtrace se používá graf, kde molekulové hmotnosti proteinu jsou semilogaritmičsky vyneseny k závislosti na retenčním času

Jako podklad pro diskusi mám k autorce následující dotazy:

- Na obr. 3.1 autorka ukazuje distribuci fúzního GST-FeCH v nerozpustné (membránové) frakci *E. coli*. Je všeobecně známo, že overexprimovaný protein v *E. coli* se také může nacházet v tzv. inkluzních tělískách, což jsou nerozpustné útvary nevhodně strukturovaného proteinu. Jaká je opravdová distribuce fúzního GST-FeCH mezi plasmatickou membránou *E. coli* a inkluzními tělísky?

- Obr. 3.2, není náhodou nízká enzymatická aktivita proteinu 49 způsobena pouze menší mírou exprese v buňkách E. coli?

- Je možné, že masivní nadprodukce enzymu vyžadující specifický neproteinový kofaktor (v tomto případě hem) může vést k nedostatku tohoto kofaktoru v buňce a tím případně i ovlivňovat aktivitu rekombinantního proteinu? Existují nějaká experimentální data i pro jiný enzym?

- Jakým způsobem a s jakou směrodatnou odchylkou jsou měřena a analyzována kinetická data? (křivka Obr.3.2, 3.4 nebo procenta Obr. 3.8, a nebo číselné hodnoty Obr. 3.8)

- Autorka se v Úvodu zmiňuje, že ferochelataza může vázat molekulu chlorofylu. Byla detekována přítomnost molekul chlorofylu na Flag-ferochelataze izolované ze *Synechocystis*? Případně je vůbec možné a případně jakým způsobem rekonstituovat molekulu chlorofylu do rekombinantního enzymu z E. coli?

Závěrem svého posudku konstatuji, že předkládaná magisterská práce dosahuje vysokých kvalit, a to především i zásluhou dokonalého zázemí ve školitelské laboratoři. Práce prozrazuje vysokou píli, pečlivost a tvůrčí invenci autorky, která se jeví být v budoucnu vyzrálou a velmi produktivní tvůrčí vědeckou osobností. Autorce k práci z celého srdce blahopřeji, a přeji mnoho úspěchů nejen v další tvůrčí vědecké práci ale i v osobním životě. Z výše uvedených důvodů dle čl. 3 Studijního a zkušebního řádu BF JU **doporučuji** přijmout práci k obhajobě s hodnocením **výborně**.

V Praze dne 25.5.2009

Mgr. Ladislav Bumba, PhD.



Zbyněk Halbhuber, Ph.D.
Nad Safinou II 365
25242 Vestec u Prahy

Posudek magisterské práce BSc. Jitky Kručinské:

Expression and purification of *Synechocystis* ferrochelatase from *Escherichia coli*

Metody molekulární biologie jsou dnes obecně používány ve výzkumu proteinů zcela rutinně. Nejinak tomu je i v oblasti rostlinné fyziologie a při studiu klíčových energetických procesů na zemi – fotosyntéze a dýchání. V obou případech se také jedná o procesy, kdy dochází k přenosu elektronu z různých molekul na jiné za značných změn redoxních potenciálů. U fotosyntézy, tedy v procesu přenosu energie fotonu na elektron a posléze až v anabolickém procesu glukoneogeneze, je jednou z klíčových molekul chlorofyl. U dýchání je to hem. Objektem magisterské práce Jitky Kručinské je enzym ferochelatáza, který katalysuje vazbu dvoumocného železa na protoporfyrin IX a tím tvorbu protohemu IV. Jedná se o enzym nezbytný pro existenci všech živých organismů. U organismů fotosyntetizujících navíc kompetuje o protoporphyrin IX s dalším enzymem, který syntetizuje chlorofyl. Krom této kompetice se ferochelatáza pravděpodobně podílí na regulaci této dráhy syntézy chlorofylu. Všechny tyto poznatky Jitka pěkně a logicky uvedla v úvodu práce. Navíc je poznat, že uvažovala i v širších souvislostech, kdy správně přemýšlí o nutnosti celý systém dobře nastavit, aby nedocházelo při zmíněných oxidačně-redukčních pochodech k tvorbě rozličných reaktivních kyslíkových forem, které následně zatěžují organismus oxidačním stresem. Jako klíčové pro další poznání této části metabolické dráhy hemu a okolních regulací je nutnost přípravy dostatečného množství aktivní ferochelatázy, což bylo i cílem této práce. Získání membránového či na membránu asociovaného proteinu rekombinantní expresí je téměř vždy výzvou. Zde byl tento fakt ještě umocněn tím, že se jedná o enzym, který má smysl studovat pouze v aktivní formě.

Celkově je úvod práce napsán výtečně a dá čtenáři dostatečný vhled k studovanému tématu.

K tomu bych se chtěl pouze zeptat, jestli jsou známy nějaké další regulační mechanismy (např. nějaký transkripční faktor, jako u lidské FeCH) vlastní ferochelatázy resp. studované plastidové formy?

Metodická část se logicky prolíná s částí výsledků. Jitka to vyřešila přehledně zdůrazněním optimálního postupu, který vyplynul z její práce. Jitka použila tři vektory, které zaklonovala do *E. coli*. Dva vektory připravila sama s použitím komerčních plazmidů. Ve všech případech byla ferochelatáza připravena jako fúzní protein s glutathion-S transferázou (GST). Tento přístup částečně pomohl vyřešit rozpustnost proteinu, leč nastolil další problém a to nějaké stérické

oslabení vazby na afinitní nosič. Zde Jitka prokázala invenci a pečlivost při testování rozličných detergentů, pufrů, iontové síly a elučních časů, kdy nakonec našla téměř optimální purifikační podmínky.

K metodické části bych měl opět pouze drobnější doplňující otázky.

V případě, že bylo třeba srovnat aktivitu proteinů z různých izolací, jak byla stanovena koncentrace proteinů?

Závěrečné dočištění je prováděno pomocí filtrace přes 0,22 μm filtry, jsou používány dva typy filtrů SpinX a Rotalibo, je pro to nějaký důvod?

V poslední době opět došlo k vylepšení in vitro expresních systémů, myslíte, že by použití takového systému mohlo být vhodné právě pro protein jako je ferochelatáza?

V metodické části bych uvítal schéma optimalizované purifikace pro větší přehlednost, leč to je jen pocit oponenta a tak to netřeba komentovat.

Výsledková část je poutavě napsána, tak jak Jitka postupně narážela na problémy a řešila je. Jitka postupně testovala všechny tři konstrukty a optimalizovala purifikaci. Nezbytnou součástí bylo i měření aktivity. Zajímavá je téměř nulová aktivita enzymu v přítomnosti His tagu v případě jednoho konstruktů a naopak snížení aktivity v případě konečného izolátu ferochelatázy oproti pouze rozštěpenému fúznímu proteinu. Nakonec se podařilo izolovat téměř čistou a aktivní ferochelatázu. Gelová chromatografie dále prokázala formování dimeru i v případě rekombinantního proteinu tedy ve shodě s proteinem z přímé izolace ze sinice. V poslední části je ukázána příprava pravděpodobného regulátoru ferochelatázy - proteinu Scp a tím i navržen další směr studia a to propojení s fotosyntézou.

Je možné, že v případě konstruktů s His tagem, by další purifikace vedla k obnovení enzymatické aktivity?

Omezení vazby FeCH-GST na glutathion je podrobně vysvětleno, předpokládáte podobnou stérickou zábranu i u slabší vazby na anti-GST?

Na obr 3.3 A a B je rozdílná aktivita u 2% Tritomu (A) a 0% SDS (B). Čím je tento rozdíl způsoben? Pro větší přehlednost bych uvítal shrnutí izolace včetně výtěžků v tabulce. Všechny postupy jsou, ale logicky vysvětleny a tak se opět spíše jedná o pocit oponenta.

Zdařilá diskuze dovysvětluje a propojuje všechny nalezené poznatky. Myslím, že k tomu není třeba nic dalšího dodávat.

Nakonec krátké hodnocení formální stránky práce. Práce je členěna jak má být a jednotlivé kapitoly jsou vyplněny tím čím mají být. Oceňuji typografickou střízlivost při členění nadpisů a hlavně opravdu pěkné a samovysvětlující popisky u obrázků. Drobné chybičky, jako občas nejednotné mezery mezi odstavci, překlepy, členy, předložky, rádkování se samozřejmě najdou, ostatně jako u většiny takovýchto prací a to i v případě rodilých mluvčích. V několika případech jsem našel i nepřesnosti v citacích (rok, jméno). Jediná věc co bych jako oponent uvítal by byl chybějící seznam zkratk a jejich jednotné používání. Leč i u tohoto je třeba dodat, že jakákoliv zkratka je v případě prvního použití připojena k plnému názvu.

Žádná ze zmíněných drobností, ale nijak neovlivňuje pochopení textu a i celkový povedený vzhled magisterské práce.

Celkově je tato magisterská práce výborná a Jitka splnila co se od ní jako od studenta v magisterském studijním programu očekává. Tedy práci s literaturou, samostatné uvažování, plánování, zodpovědný a pečlivý přístup k experimentu. Navíc jsem si jist, že pod vedením Dr. Sobotky u Jitky došlo k značnému rozvoji analytického myšlení. Dalším kladem je, že část práce byla financována z vlastního SGA grantu, což značí, že si Jitka osvojila i další pilíř vědecké činnosti.

Práci proto bez váhání doporučuji k úspěšné obhajobě a hodnotím ji stupněm výborně.

V Praze 24.5. 2009

Zbyněk Halbhuber, Ph.D.

A handwritten signature in dark ink, consisting of stylized initials 'ZH' followed by a long, sweeping horizontal line that extends to the right edge of the page.