



Ing. Roman Sobotka, Ph.D
Laboratoř fotosyntézy
Mikrobiologický ústav, AV ČR
Opatovický mlýn
379 81 Třeboň

sobotka@alga.cz

Posudek školitele na magisterskou práci BSc. Jitky Kručinské „Expression and purification of *Synechocystis ferrochelatase* from *Escherichia coli*“

Dlouhodobou prioritou laboratoře fotosyntézy MBÚ v Třeboni je studium regulace biosyntézy chlorofylu, nejrozšířenějšího pigmentu, jehož produkce na naší planetě se odhaduje na stovky miliónů tun ročně. Metabolismus chlorofylu je proto zkoumán poměrně intenzivně po řadu desetiletí, nicméně mechanismy, pomocí kterých buňka kontroluje množství syntetizovaného chlorofylu, zůstávají z velké části neznámé. Situace u fotosyntetických organismů je navíc komplikována faktem, že na stejné metabolické dráze jsou spolu s chlorofylem syntetizovány také ostatní tetrapyrolly jako je hem, sirohem, fytochromobilin či vitamin B₁₂. Očekává se tedy velmi komplexní a synchronizovaná regulace celé větvené dráhy biosyntézy tetrapyrolů. Výsledky naší laboratoře z posledních let naznačují, že enzym ferochelatáza, terminální enzym syntézy hemu, je jedním z klíčových hráčů v regulaci biosyntézy tetrapyrolů a to včetně syntézy chlorofylu.

Cílem magisterské práce Jitky Kručinské byla příprava protokolu pro expresi a purifikaci sinicové ferochelatázy z bakterie *Escherichia coli*. Aktivní rekombinantní enzym by byl neocenitelný pro pochopení jeho regulace včetně identifikace interagujících regulačních faktorů a pro objasnění struktury tohoto proteinu. V tomto bodě je třeba zdůraznit, že sinicová ferochelatáza, podobně jako rostlinná verze tohoto enzymu, je integrálním membránovým proteinem. Typické pro tento typ proteinů je zarputilá snaha vzdorovat úsilí experimentátorů o přípravu rekombinantní formy. V době přípravy projektu nebylo tajemstvím, že se několik laboratoří již pokoušelo exprimovat a purifikovat sinicovou ferochelatázu a to neúspěšně. Tedy nebylo pochyb, že půjde o nesnadný úkol a náš enzym v tomto ohledu nezklamal. Solubilizace ferochelatázy byla příkladně problematická. Nezbylo než testovat dlouhou řadu podmínek s cílem převést maximální množství enzymu do detergentu a zároveň udržet protein aktivní. Po získání uspokojivého výsledku, provázeného krátkodobým pocitem vítězství, přišly na řadu problémy s afinitní chromatografií, s odštěpením GST kotvy, se stabilitou enzymu a podobně.

Jsem nesmírně rád, že po všech peripetiích Jitka dosáhla významného úspěchu v podobě purifikované rekombinantní ferochelatázy a to včetně velmi zajímavého srovnání s nativním enzymem purifikovaným přímo ze sinice. Za tímto výsledkem je velké množství práce, a to řada experimentů – rozumějme slepých uliček, nebyla nakonec kvůli rozsahu do magisterské práce zařazena. Ačkoli z pohledu biochemika ještě nelze výslednou aktivitu či čistotu rekombinantního enzymu označit za definitivní, pevně věřím, že kýžených vlastností lze dosáhnout již jen mírnými modifikacemi Jitčina protokolu. Kromě tohoto hlavního výsledku Jitka připravila funkční vektor pro expresi rekombinantního ScpB proteinu, což také nebylo jednoduché. Pravděpodobně z důvodů značné toxicity rekombinantního ScpB

proteinu, testované pozitivní kolonie *E. coli* obsahovaly vždy jen vektor s bodovými mutacemi v inzertu. Nemutovaný vektor se podařilo získat až po řadě pokusů, a to pravděpodobně i s trochou štěstí.

Během tohoto projektu se naplno projevily Jitčiny silné stránky, zjevné již během bakalářské práce – pracovitost, zdravá zarputilost a psychická odolnost. Poslední vlastnost bych rád zdůraznil, protože je podle mého mínění pro vědeckou práci velmi důležitá, což zřejmě platí dvojnásob pro molekulárního biologa. Navíc je to vlastnost pro jednu každému daná. Zatímco pečlivost lze úspěšně trénovat, hodnocená studentka budiž příkladem; udržet si v laboratoři veselou mysl po půl roce zcela neúspěšných experimentů, to lze trénovat jen ztěží. Během magisterského studia Jitka udělala velký pokrok také jako experimentátorka, schopná porozumět do hloubky problému a připravit smysluplný experiment. V rámci svého magisterského projektu Jitka pracovala tři měsíce na Univerzitě v Sheffieldu ve špičkové laboratoři profesora Neila Huntera. Zde se Jitka bez jakýchkoli problémů zapojila do práce v mezinárodním týmu, mimo jiné díky své velmi dobré mluvené i psané angličtině a bezproblémové komunikaci se spolupracovníky.

Vlastní magisterská práce je zpracovaná na velmi dobré úrovni v anglickém jazyce a v podstatě odpovídá kostře vědecké publikace. Nemám pochyby, že dojde k uveřejnění těchto výsledků a Jitka získá impaktovanou publikaci. Jako školitel, který chronicky zapomíná chválit vlastní studenty, bych chtěl závěrem Jitce poděkovat a vyslovit konečnou pochvalu za celý čas od počátku bakalářského studia v Laboratoři fotosyntézy MBÚ. Jitce přeji mnoho úspěchů v doktorském studiu a mnoho štěstí v osobním životě. Příště se již v laboratoři sejdemé nikoliv jako školitel a studentka, ale jako kolegové.

Předloženou magisterskou práci doporučuji vřele k obhajobě.

V Třeboni 20.5. 2009

