

## **Oponentský posudek na diplomovou magisterskou práci Bc. Markéty Foldynové**

Analysis of the role of PilA proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Práce Bc. Foldynové je zaměřena na výzkum funkce proteinů pilA v sinici *Synechocystis* sp. PCC 6803. Školitelem práce byl Ing. Roman Sobotka Ph.D. Práce je sepsána anglicky a obsahuje celkem 42 stran.

Ke studované problematice je přistoupeno komplexně. V první části byly zkonstruováno několik mutantů s odstraněnými jedné nebo více forem genu pilA. Získané mutanty byly charakterizovány pomocí absorpčních spekter, tendenci k agregaci a vybělování pigmentů. Zajímavým poznatkem byla zvýšená rezistence získaných mutant při pěstování na intenzivním světle. Dalším krokem bylo vytvoření mutanty s fúzním proteinem pilA1 označeným StrepII značkou. Pomocí imunodetekce byla provedena lokalizace proteinu v membránové frakci. Posledním krokem byla též purifikace proteinu pomocí chromatografie a charakterizace vnitřního disulfidického můstku v tomto proteinu. Z uvedeného výčtu vyplývá, že si autorka v průběhu práce musela osvojit množství technik a experimentálních postupů, od základních mikrobiologických a molekulárních technik, konstrukce mutantů, charakterizace kmenů, elektronové mikroskopie po izolaci a biochemickou charakterizaci proteinů. To je jednou z nejsilnějších stránek předložené práce.

Práce je napsána velmi dobrou angličtinou. V textu se samozřejmě vyskytují drobné chyby v jazyce, neobratnosti nebo překlepy, jejich množství je však poměrně malé. Velmi oceňuji i zdařilé typografické zpracování textu.

K uvedené práci mám několik menších poznámek či výhrad:

Podle jakého klíče byly vybrány formy pilA genu k mutaci? Proč zrovna formy 1 až 4 a ne třeba 6 až 11?

Proč byla dělána elektronová mikroskopie u WT a GT kmene a ne již u získaných mutantů?

Jedním z cílů práce byla analýza vlivu na metabolismus chlorofylu a ostatních pigmentů.

Změny pigmentového složení jsou však hodnoceny jen „od oka“ z absorpčního spektra. Domnívám se, že podstatně lepší by bylo stanovit obsah pigmentu v metanolovém extraktu buď spektrofotometricky a nebo pomocí HPLC. Z absorpčních spekter není příliš zřejmé jak jsou jednotlivé odlišnosti významné (rozdíly spekter mixotrofních kultur na obr. 4.5 jsou velmi malé navíc při autotrofním pěstování jsou odlišnosti opačné).

Absorpční spektra jsou navíc normalizována na stejný rozptyl při 730nm což u kmenů s tendencí k agregaci není příliš přesné. Nejsou zmíněny změny v obsahu fykobilinů. Agregace získaných mutant je ilustrována pomocí snímků kultur na Petriho miskách, na kterých toho není příliš vidět. Domnívám se, že lepší by byl obrázek ze světelného mikroskopu, který by mohl čtenáři lépe ukázat charakter agregace.

U mutanty pilA1/A2/A4- uvádíte větší tendenci k bleachingu a zároveň větší rezistenci k vysokému světlu. Jak to autorka interpretuje? Čím může být způsobena rezistence *pil4-* a *pilA1/A2/A4-* mutant k pěstování na intenzivním světle?

Čím je způsoben rozdíl v mobilitě pilA1 proteinu na obr. 4.12 a obr. 4.13?


Velikost PilA1-StrepII proteinu byla na základě mobility stanovena na cca 25kDa. Jaká je skutečná velikost proteinu pokud ho vypočítáme z aminokyselinového složení?

U zobrazeného 2D gelu se detekovaný pilA protein nezdá být umístěn pod naznačenými pásy fotosystému II.

Mezi další menší chyby textu patří: citace Kufryk et al 2007 neodpovídá seznamu citací, citace Komenda 2004 má zřejmě být Komenda et al 2004. V seznamu zkratk jsou zavedeny některé zkratky DMM, DM, OG, které pak již nejsou v textu použity (s výjimkou tab. 3.5). Zkratka *Ery* zavedená pro erythromycin je ve skutečnosti používána pro kazetu erythromycinové rezistence.

Celkově považuji předloženou práci za vysoce nadprůměrnou. Autorka jasně prokázala schopnost cílevědomé práce v laboratoři, zvládnutí řady experimentálních postupů, práce s vědeckou literaturou i schopnost zpracovat a kvalitně sepsat získané poznatky. Věřím, že po vyjasnění sporných bodů a zodpovězení položených otázek, nic nebrání abych mohl hodnotit podanou diplomovou práci jako VÝBORNOU.

V Třeboni 19.ledna 2009

  
Mgr. Michal Koblížek Ph.D.



Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Institut für Mikrobiologie  
und Molekularbiologie

Prof. Dr. Annegret Wilde

Gießen, 23.01.2009

### Examiner's report for the Master thesis of

**Bc. Markéta Foldynová**

**Title of thesis: Analysis of the role of PilA proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**

The work of Markéta Foldynová on the function of the main pili protein PilA and its isolation from cyanobacteria represents interesting new ideas. She has constructed several mutants or has used already existing mutants to analyze possible other functions of Pili proteins than the well demonstrated ones in motility and natural competence of transformation. Here, she has mainly concentrated on phenotypic alterations in aggregation and pigmentation of the cells. In addition, she has constructed a mutant expressing a Strep-tagged version of PilA1 in order to isolate this protein and to identify potential interacting partners.

The introduction is well written and summarizes the current understanding of pili structure and function in cyanobacteria in comparison to the pili apparatus in other bacteria. In section 1.3., where she reviews the literature on type IV pili in *Synechocystis* 6803 several of her statements are not supported by citations (e.g. diameter of the length of pili (p. 4), or function of *pilB1* and *pilT1* genes and phenotypes of the respective mutants (p. 6). On p. 8 Markéta Foldynová mentions the function of the IsiA protein as a dissipator of light energy. However, there exist many other publications concentrating on the function of IsiA as an additional antenna for photosystem I under iron limitation. This should have been mentioned.

Material and Methods are described precisely and comprehensibly. Minor points for criticism is description of SDS-PAGE (p. 15), where no methodological paper has been cited. For that reason she had to describe the method in more detail (e.g. C, T

of the acrylamide stock, content and pH of buffers). Methods for absorption spectroscopy and normalization of the spectra are missing.

The Results Section is built up logical and experiments are easy to follow. The quality of the figures is very good and experimental results are well described in the text and in figure legends. Concerning experiments my major concern is, that Markéta Foldynová often mentions a bleaching phenotype of the mutants. However, she did not explain or show measurements revealing the reason for this bleaching, as the chlorophyll content even raised in these mutants. So, phycocyanin and chlorophyll amounts have to be determined in absolute amounts. I have also some concerns on using absorption spectra of whole cells to quantify pigment concentrations, especially carotenoids. In the work it was mentioned that slime (or something similar) has been excreted into the medium. Such kind of substances may contribute to absorption, especially in the UV and blue wavelength region. Thus, conclusions on quantitative pigment amounts are very speculative. Pigments had to be measured in methanol extracts. Interestingly, this method was described in the M&M Section, but respective experiments are missing.

The described attempts to isolate the PilA1 protein using a Strep-tag are of high quality and show clearly that the method developed in this work is very useful for further identification of PilA1-interacting proteins. The conclusion that PilA1 is part of a high-molecular mass protein complex is a bit trivial, as it is well known that PilA1 forms the filament of the pilus. Thus, in my opinion the spots in BN-2D-PAGE could be also due to detection of the filament structures.

In conclusion, I would like to emphasize, that Markéta Foldynová has demonstrated convincingly that she is able to perform ambitious scientific work and describe and discuss her data in an appropriate way.

Rating: "good"



Prof. Dr. Annegret Wilde