

**Posudek na diplomovou práci Bc. Jiřího Hellera****Molecular characterization of selective proteins from plant photosystem II**

Diplomová práce Bc. Jiřího Hellera měla dva cíle. Prvním cílem bylo určení sekvence PsbR proteinu z hrachu a příprava konstruktů pro produkci rekombinantního proteinu PsbR z hrachu a špenátu. Tento cíl byl v rámci práce splněn. Druhým cílem bylo určení sekvence proteinů PsbX a PsbW z hrachu. Tento cíl, jak sám autor uvádí, nebylo možné vzhledem k optimalizacím v daném časovém úseku splnit.

Proteiny, kterými se předkládaná práce zabývá, jsou součástí proteinového komplexu fotosystém II, podílejícího se na biochemickém procesu fotosyntézy, která má zásadní význam pro život na Zemi. Proto jakékoliv poznatky o struktuře těchto proteinů a o jejich vzájemných interakcích přispějí k pochopení funkce tohoto významného komplexu. Věřím, že tato práce je k tomu základem a ve studiu uvedených proteinů se bude pokračovat.

Oceňuji, že je práce napsaná v anglickém jazyce. Chtěla bych však upozornit, že elektroforetické dělení v gelu se překládá „electrophoretic separation“ a ne „electrophoretic division“.

**Seznam připomínek:**

Práce působí jako by byla dokončována ve spěchu. Chybí např. editace obsahu - zarovnání jednotlivých kapitol i uvedených stránek, posun nadpisu v Obr. 2.

V dobře sepsaném teoretickém úvodu jsou v citacích uváděny špatné roky publikování: str. 8 Cerdán, 2008 má být 2009, str. 8. Raymond, 2008 má být 2004, str. 12 Thildholm, 2001 má být 2002.

V podrobné a přehledné metodice jsou v kapitole 4.1.2.3. uvedeny objemové jednotky v ml místo v  $\mu$ l. V kapitole 4.1.3.3. je elektrický proud pro SDS-PAGE v jednotkách A místo mA. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF je s jedním F, ne se dvěma jak uvádí autor.

Zpracování výsledků je, dle mého názoru, nejslabším článkem této práce. Tato kapitola by si zasloužila alespoň krátký úvod, působí jako seznam obrázků, ne všechny jsou slovně okomentovány, a bez prostudování celé kapitoly Metodika není čtenář prakticky schopen pochopit cíl a smysl předkládaných experimentů. Pro lepší pochopení celé práce by bylo také vhodné uvést sekvence fúzních proteinů a jejich molekulové hmotnosti.

V kapitole 5.1.1.2. autor uvádí, že pro přípravu konstruktů pMal-p2X a pMal-c2X muselo být optimalizováno množství vektoru, typ pufru a množství restriční endonukleázy, nikde však není uveden výsledek optimalizace.

Str. 52, Obr. 17: SDS-PAGE gel s expresí PsbR proteinu při třech různých teplotách. V textu pod obrázkem je však uvedeno, že jde o expresi HisPsbR. Expese byla indukována 1M IPTG, domnívám se, že indukce byla provedena 1 mM IPTG.

Str. 53, Obr. 19: V legendě je uvedena expese HisPsbR ve dvou různých vektorech, není však uvedeno ve kterých.

Str. 54, Obr. 20 patří dle mého názoru do kapitoly 5.1.2. a ne do kapitoly 5.1.3.

V kapitole 5.2.2. autor opět uvádí, že musel optimalizovat množství akrylamidu v separačním gelu pro SDS-PAGE a množství nanášených proteinů, opět však nikde neuvádí výsledky optimalizace.

Str. 57 a 58. Výsledky MS analýz. Pro čtenáře, který se neorientuje v této oblasti, není jasné, proč je část sekvence vyznačena červeně.

V diskusi autor diskutuje dosažené výsledky, avšak ani jeden z nich nekonfrontuje s již publikovanými výsledky. Na str. 65 chybí uvedení zdroje uvedených protokolů (Kuwabara and Murata, Berthold, Babcock and Yocumale).

V seznamu citované literatury není zachovaný jednotný formát. Některé časopisy jsou psané kurzívou (např. citace 3, 9, 12), jiné ne (např. citace 1, 2, 4). Uvádění počtu stránek je také nejednotné (př. citace 12: 263-269, citace 15: 1040-44). Internetová reference č. 12 patří do seznamu citované literatury.

Doplňující otázky:

1) Obr. 17, str. 52. V textu pod obrázkem uvádíte, že jste srovnával tři teploty 15, 30 a 37°C pro expresi PsbR proteinu a protein se exprimoval ve všech třech uvedených teplotách. V obrázku jsou červeně zakroužkovány pouze dva proužky, které reprezentují exprimovaný protein. Proč nejsou zakroužkovány všechny tři? A jste si jistý, že skutečně tyto proužky odpovídají tomuto proteinu? Chybí mi zde kontrolní bakteriální lyzát bez indukce expese. Jak také vysvětlíte, že proužky na membráně odpovídající proteinu PsbR po imunodetekci, která je daleko víc citlivější než Coomassie, jsou tak slabé (Obr.19)?

2) Na str. 57 a 58 uvádíte výsledky MS analýzy po štěpení proteinu různými enzymy (trypsin/chymotrypsin, pepsin, Arg-C) bez imunodetekce. Z metodiky plyne, že byly analyzovány vzorky z membrány, kde byly proteiny detekovány protilátkami. Jak to vysvětlíte?

Práci hodnotím jako průměrnou, doporučuji ji k obhajobě a navrhuji stupeň hodnocení *Dobře*.

V Brně dne 15.1.2013



Ing. Blanka Pekárová, Ph.D.

## Posudek na magisterskou práci Jiřího Hellera Molecular characterisation of selective proteins from plant photosystem II

Předložená práce se zabývá sekvenováním, klonováním a expresí tří malých, málo studovaných proteinů Photosystému II u vyšších rostlin. Jedná se o proteiny PsbR, PsbW a PsbX. V práci byla určena sekvence PsbR hrachu. Část psbR genu hrachu a špenátu odpovídající maturovanému proteinu byla zaklonována do různých expresních vektorů přičemž rozumná míra exprese byla dosažena pouze při expresi PsbR jako fúzního proteinu s GST, což pravděpodobně souvisí s tím, že PsbR je membránový protein. Práce je psána anglicky, angličtina je srozumitelná s přijatelným množstvím chyb.

Práce je členěna tradičně, literární úvod je dobře a přehledně zpracován, literatury o studovaných proteinech opravdu není mnoho, takže i množství referencí je přiměřené (citace 11 má přehozená křestní jména a příjmení).

Cíle práce jsou definovány až příliš stručně. Teprve v diskusi je objasněno, že důvodem pro klonování je overexprese proteinů za účelem krystalizace a důvodem pro sekvenování genu z dalšího organismu je zvýšení šancí na úspěšnou krystalizaci.

Materiálu a metodám je věnována téměř polovina magisterské práce. Odpovídá to tomu, že práce je metodicky poměrně široká. Na druhou stranu, popisovat složení jednotlivých ligačních reakcí nebo izolaci plasmidu pomocí mini kitu je zbytečné.

Největší připomínky mám ke kapitole Výsledky. Jedná se převážně o soubor agarózových a polyakrylamidových gelů s popsáním pořadím vzorků, který místy spíše připomíná pracovní deník než průvodce tím co a proč bylo děláno a co má být z příslušného obrázku patrné.

Sledování textu je tak místy poměrně náročné a řadu věcí si tak čtenář musí domýšlet.

Uvedu dva příklady:

1. Hned první obrázek výsledků (n. 13) ukazuje PCR amplifikaci psbR genu. Templátem je pravděpodobně cDNA. Velikost psbR je kolem 420 bp, produkt na obrázku má ale jen kolem 300 bp a nad obrázkem je uvedeno, že očekávaný produkt má mít 296 bp. Jedná se tedy zřejmě o amplifikaci pouze části genu odpovídající maturovanému proteinu, předpokládá se znalost čtenáře, že maturovaný psbR má mít 99 aminokyselin, což by odpovídalo.
2. Výsledky hmotnostní spektrometrie PsbR z na proužku vyříznutém z polyakrylamidového gelu (separace tylakoidních membrán hrachu) str. 57. Uvedena je sekvence nematurovaného PsbR s částmi označenými červeně – pravděpodobně sekvence nalezených peptidů – to vše 4x, zřejmě pro různé varianty štěpení a vzorky PVDF membrán před a po imunodetekci. Tento experiment je v potom v diskusi shrnut do jedné věty, že sekvence maturovaného PsbR hrachu byla určena pomocí hmotnostní spektroskopie. Autor zřejmě předpokládá, že pokud nebyl nalezen žádný peptid, který by pokrýval N-terminální část proteinu, je pravděpodobné, že tato část není součástí maturovaného peptidu. Působilo by přesvědčivěji, pokud by bylo poukázáno na to, že takto by měl maturovaný PsbR z hrachu 99 aminokyselin a přesně by odpovídal ostatním maturovaným PsbR.

Kromě PsbR se autor zabýval určením sekvence PsbW a psbX z hrachu. Zde neuspěl, neboť nebyl schopen příslušné geny amplifikovat degenerovanými primery. Překvapuje mě, že pro určení sekvence nevyužil dostupných databází, především EST dat hrachu (např. <http://www.gabcsfl.org/>). Jak psbR tak psbW jsou tam snadno dohledatelné. Sekvence části psbX hrachu je dokonce v GenBank, AAL50314 jako ultraviolet-B-repressible protein.

Předložená práce Jiřího Hellera splňuje požadavky na magisterskou práci kladené. Autor nashromáždil odpovídající množství dat a seznámil se s řadou experimentálních technik. Jako problematické však vidím zpracování těchto dat. Magisterskou práci Jiřího Hellera doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení známkou dobře.

Na autora mám následující otázky:

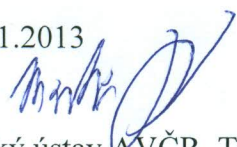
1. Z jakých důvodů byl pro genomiku bobovitých vybrán jako modelový organismus *Medicago truncatula*.

2. Porovnejte sekvenci PsbR z EST databáze hrachu:

<http://www.gabcsfl.org/>

s vaší sekvencí. Obě dedukované proteinové sekvence nematurovaného proteinu se liší jednak celkovou délkou (pozice N-terminálního M - MASSVMASLSLKPT..... , jednak záměnou jedné aminokyseliny (P za Q). Na základě podobnosti se sekvencemi PsbR z příbuzných organismů navrhněte, který M je N-terminální a zda výše uvedená mutace je důsledkem rozdílu mezi oběma hrachy nebo zda k mutaci mohlo dojít například při klonování PsbR.

V Třeboni, 15.1.2013

Martin Tichý   
Mikrobiologický ústav AVČR, Třeboň