

Statement of the Master thesis reviewer

Name of the student: Bc. Eva Sýkorová

Thesis title: Evaluation of negative stains for single particle analysis in electron microscopy

Supervisor: Ing. Zdenko Gardian, Ph.D.

Reviewer: RNDr. Radek Litvín, Ph.D.

Faculty of Science, University of South Bohemia
Institute of Chemistry and Biochemistry
Branišovská 1760
370 05 České Budějovice

and

Biology Centre of the Czech Academy of Sciences
Department of Photosynthesis
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Review of the master thesis “**Evaluation of negative stains for single particle analysis in electron microscopy**” by Bc. Eva Sýkorová.

The submitted thesis by Bc. E. Sýkorová aims to study alternative stains for use in single particle electron microscopy analysis of proteins. Four heavy metal stains have been tested as an alternative to the standard uranium acetate stain. The stains were tested on a sample of membrane-bound pigment protein complex purified from pea plant. 2D projections of stained proteins have been calculated and resolution has been evaluated based on the resolution metric from analysis software and also on the basis of quality assessment of the obtained structure in comparison to known 3D structure of the protein complex. The thesis is written in English. The thesis has fully adequate length of 50 pages with 17 pages dedicated to *Introduction* and 13 pages of *Results* and *Discussion*. This may be viewed as a bit light on results and discussion but may as well reflect the extent and quality (see below) of the introductory section and topic-specific results description. The thesis includes 102 high quality references which I praise highly.

In terms of format and style, the thesis is very nicely prepared, with clear writing, clean graphic design and no significant errors or omissions in technical quality. Figures and Tables are very well prepared and can serve as an example of excellent work. Figure and Table legends are precise and understandable. Potential printing issues associated with the need to present image analysis results have been avoided. If not for a few errors in English and small issues with references, the technical aspects of the thesis could be described as perfect. At the risk of being labeled as a pedant, I will point out a few errors. Chapter 4 (M&M) is twice erroneously referred to as “Section 2” (Introduction, p. 10, p.11). I have noticed a few issues with plural/singular use of verbs, e.g. p. 20 “PSI-LHCI complex *contain* approximately...” or on p. 24 “... data interpretation *deal* with the problem of ...”. The use of the symbol σ for “noise” (on p. 27) is not explained nor included in the list of abbreviations, I assume it has the standard physics meaning of standard deviation. References are mostly well formatted but there are some omissions. Ref. 52 has no pages

listed: “n/a-n/a” (same for ref. 100); refs. 53 and 60 do not have bold type for issue number; ref. 73 has a mangled symbol in one of the author’s name; and the style of page listing is not consistent as e.g. ref. 99 uses pp. “13319-23” but ref. 97 uses “4659-4665”. I believe also this list shows that the work is of very high quality if these are the worst errors I’ve been able to find.

The *Introduction* section very nicely covers the used method and its principles, properties of used staining agents and also provides a very good and succinct description of photosynthesis and the studied Photosystem I. The introductory section is surely the strongest part of the thesis. The *Introduction* is quite long as it is but I would welcome more developed description of the cryo-EM method. It is obvious the author is more than capable of providing that and had to restrain herself here. Obviously the thesis balance would be then skewed even more towards a review-type which was not the aim here. If I’m to criticize here, there are two minor points which the author probably took up from the literature. First, in the description of the theoretical resolution of a microscope (p. 6), the factor of 0.612 in equation (1) does not come from “astronomical self-luminous points” but rather from the properties of the Bessel functions used for solving diffraction patterns of point sources. Second, in the discussion of magnification (p. 7), the paragraph between equations (2) and (3) is too short to provide clear explanation. Both of these comments again show that there really is not much bad with *Introduction*.

The *Material and methods* section clearly and in sufficient detail covers most of the required topics and methods. The chapter names seem to be preliminary and should have been more precise (“Isolation”, “Sample identification” followed by “Sample preparation”). I struggled in the description of RELION analysis principle (p. 25) which is most likely my fault and not that of the student. The description seems to suffer from too much unexplained jargon. This section could be also served as part of the *Introduction* but I have no issue with it being here. As minor points, the section on electrophoresis method could use some reference and more detail on the method (p. 22) and there is a typo in the fluorescence spectrometer name “FLOUROLOG” (also p. 22). The author also mixes the use of space between value and unit. E.g. on p. 21 there is no space in 350mM KCl or -70°C but on the same page there are -70 °C and 0.5 mM NaEDTA. In summary, there are no major issues but it is visible that this section received less attention than the other parts of the thesis.

The *Results* section is again very professionally executed with no issues whatsoever. I would like to specifically point out beautifully rendered Figure 13 (p. 30) and Figure 15 (p. 32). On the other hand in Figure 14 (p. 31) the axes tick labels are a bit small and spectrum of Z5 is very small. Although otherwise everything is visible, the figure could use a bit more work.

The *Discussion* is comparatively the weakest part of the thesis in terms of content. While there is nothing particularly bad about the text present, this section is quite short (5 paragraphs, 1.5 pages) and in several places the author could have been more elaborate. On the other hand the discussion length is certainly a function of the results obtained and available published information to discuss with.

Finally, the *Conclusion* section (p. 43) is comparatively long with respect to *Discussion* and could have been shortened for a more succinct chapter providing better overview of the thesis.

Overall, it is obvious that the student mastered the required demanding techniques from protein purification to electron microscopy, sample preparation, and image analysis and interpretation. I believe it would be beneficial to include in the thesis experimental section an analysis of another standard protein complex. There are two reasons – first, evaluation of any new method on one test case is almost never enough to show that the method works (or doesn’t work, for that matter). Second, the chosen Photosystem I is a notoriously difficult protein complex to analyze in negative-stained electron microscopy. As a suggestion, the used sucrose gradient also contained Photosystem II (zone 6, Figure 13), which would provide a convenient, large, well characterized protein complex, much easier to analyze by the single particle method. Inclusion of a second sample would strengthen the analysis of stain suitability and influence on resolution. In

terms of formal requirements on master theses, more data would provide bulkier *Results* and *Discussion* sections which would help balance the thesis better. On the other hand, this is rather a suggestion to the thesis supervisor than to the student and it is also possible that the work load would then be too high to enable finishing the thesis in reasonable time.

In conclusion, it is my opinion that the submitted master thesis by Bc. E. Sýkorová fulfills all criteria required of such work and **I recommend the thesis for the defense.**

Questions to the student, to be answered during the defense:

Q1) You have used nitrate salts of lanthanides. Given that the standard uranium stain is an acetate form, would it be possible to use acetates or some other salts of lanthanides? What kind of result would you expect then?

Q2) The staining solutions you've used have wildly varying pH values between 1.0 and 5.0. What would you say about the influence of different pH values on suitability for staining protein complexes and membrane protein complexes specifically?

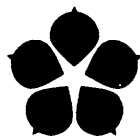
Q3) You mention, at the end of discussion, that different pH could be tried in the staining procedure. I understand that the staining solution is deionized water plus the intended salt which determines the pH. How would you change the pH of the staining solution? Is it possible to include a buffer in the solution? Which would you use?

Q4) You have standardized the staining time to 10 s. Do you think it would change the results if you used longer or shorter time? What is the interaction of stain concentration and staining time? i.e. can you lower the stain concentration and compensate by increasing the staining time? Does the staining effect depend on temperature during the staining process?



RNDr. Radek Litvín, Ph.D.

In České Budějovice, 18 May, 2018



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Eva Sýkorová

Název práce: Evaluation of negative stains for single particle analysis in electron microscopy

Školitel práce: Zdenko Gardian

Oponent práce: Ladislav Bumba

Pracoviště opONENTA: Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	3
grafická úprava textu a obrázků	0-3	2

* Nehodící se škrtněte

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovuje, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální a (2) Věcné požadavky, u experimentálních prací i (3) Věcné požadavky experimentálních prací, u prací v cizím jazyce i (4) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
Formální požadavky – body celkem		

(2) VĚCNÉ POŽADAVKY

výstižnost formulace cílů práce a jejich splnění	0-3	3
schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	2
úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	1
logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
úplnost popisu použitých metodik	0-3	3
experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	2
aktuálnost použitých metod	0-3	3
přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	1
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		

(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

jazyková a stylistická úroveň	0-3	2
-------------------------------	-----	---

CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)

48/51²

0-51³

² Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práce, 51 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

³ Zadejte počet přidělených bodů.

Komentář oponenta:

Diplomová práce se zabývá testováním využití alternativních kontrastních činidel k vizualizaci proteinových komplexů v transmisní elektronové mikroskopii a jejich použití pro trojrozměrnou rekonstrukci pomocí částicové analýzy. Práce popisuje přípravu a vizualizaci fotosyntetického PSI-LHCI komplexu pomocí negativního značení za použití čtyř alternativních kontrastních činidel na bázi hafnia (Hf), gadolinia (Gd), europia (Eu), a samaria (Sm) a porovnává jejich vlastnosti s běžně používaným, nicméně v budoucnosti pravděpodobně již „legislativně nepodporovaným“, uranyl acetátem. Výsledky naznačují, že vlastnosti uranyl acetátu jako kontrastního činidla jsou lety prověřeny, a chlorid hafný a nitrátové soli testovaných lanthanoidů nejsou vhodné pro negativní barvení proteinových komplexů a jejich trojrozměrnou rekonstrukci pomocí částicové analýzy.

Práce má 50 stran včetně odkazů na literaturu (102 referencí) a je standartně rozdělena na Úvod, Materiál a Metody, Výsledky a Diskuzi.

Kapitola Úvod (15 stran) čtenáře detailně seznamuje s principy elektronové mikroskopie, přípravou vzorku, vlastnostmi kontrastních činidel pro negativní barvení a v krátkosti, se strukturou fotosyntetických komplexů. Tato kapitola sice detailně popisuje vlastnosti uranyl acetátu a hafnia, nicméně úplně chybí popis zbývajících tří lanthanoidů použitých v této studii.

Materiál a Metody (9 stran) jsou popsány velmi „úsporně“, a v některých pasážích chybí detailní informace o postupu a koncentracích jednotlivých složek, které umožňují nezávislé zopakování experimentu. Např. jaké množství thylakoidních membrán bylo použito pro sacharózový gradient, doba inkubace s detergentem, jaké množství proteinu bylo nanášeno na SDS-PAGE, koncentrace polyakrylamidu v gelu, jaké roztoky byly použity pro barvení a odbarvení gelu, typ přístroje pro „glow discharge“ apod. Nicméně, největší slabinou kapitoly Materiál a Metody je popis „Single particle analysis“. Tato subkapitola je psána tak, že čtenáře sice seznamuje s principy softwaru RELION, ale vůbec nepopisuje vlastní zpracování získaných dat. Navíc, obr. 11 je převzat z jiné publikace, namísto toho, aby autorka ukázala svá data. Tato subkapitola by měla být součástí Úvodu a jako taková v kapitole Materiál a Metody, dle mého názoru, nesplňuje formální požadavky na diplomovou práci.

V kapitole Výsledky (10 stran) jsou získaná data detailně popsána a nechybí biochemická, biofyzikální a mikroskopická charakterizace PSI-LHCI komplexu. Nicméně detailnější popis částicové analýzy s větším počtem jednotlivých tříd „class averages“ (a ne pouze s jednou vybranou), případně i grafem FRC pro rozlišení, je vhodnější pro prezentaci získaných dat.

V Diskuzi (2 strany) jsou získaná data konfrontována s již publikovanými daty a vzhledem k negativním výsledkům a chybějící literatuře na použití nitrátových solí použitých lanthanoidů, je diskuze velmi krátká.

Celkově na mne diplomová práce působí velmi dobrým dojmem a myslím si, že autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, orientaci ve vědecké literatuře a velkou odvahu při své práci, která přinesla ve větší míře negativní výsledky. Dále pak musím ocenit, že celá práce je napsána v anglickém jazyce s minimem gramatických a stylistických chyb. Autorce upřímně gratuluji k diplomové práci a i přes výše zmíněné nedostatky považuji práci za výbornou a vřele doporučuji k obhajobě.

Dotazy k obhajobě:

Mezi lanthanoidy patří více než 10 prvků. Podle jakého klíče byla vybrána použitá kontrastní činidla?

Proč se na testování alternativních kontrastních činidel používal PSI-LHCI komplex? Nebylo by vhodnější použít stabilní proteinový komplex, např. feritin apod.? PSI-LHCI snadno podléhá degradaci a navíc obsahuje detergentovou obálku, která určitým způsobem ovlivňuje kvalitu negativního značení. Dají se získaná data na membránovém komplexu PSI-LHCI transponovat i na značení rozpustných proteinových molekul?

Je dlouhodobě známo, že přítomnost sacharózy ve vzorcích proteinů ovlivňuje kvalitu negativního značení. PSI-LHCI komplex po separaci v sacharózovém gradientu obsahuje přibližně 0,5 M sacharózu.

Byla sacharóza odstraněna při přípravě vzorku pro EM?

Pokud ne, myslíte, že odstraněním sacharózy můžete přispět k vylepšení vlastnosti negativního značení?

Figure 19, velikost PSI-LHCI částice se dramaticky liší u vzorků GdN a HfC oproti UA. Čím si to vysvětlujete?

Drobné chyby:

Anglická gramatika (at 435 nm wavelength místo with 435 nm wavelength), str. 22

I místo We (prohlašujete, že jste práci vypracovala samostatně), případně použít rod trpný complexes were separated, str. 30

Typografické chyby:

např. 50 mM místo 50mM, str. 21

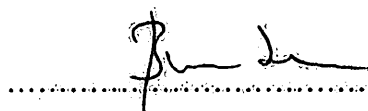
4×10^{-7} místo $4x10^{-7}$

β DM, 1.5% w/w concentration, raději použít molární koncentrace, str. 21

Zkratky HfC, GdN, EuN, SmN, raději použít pouze Hf, Gd, Eu, Sm, další písmeno je zbytečné, str. 24

Závěr: Práci d o p o r u č u j i k obhajobě a navrhuji známku výborně

V Grenoblu, Francie, dne 21.5.2018



podpis