



Biologické centrum  
Akademie věd České republiky  
**ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE ROSTLIN**  
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.

**Oponentský posudek doktorandské disertační práce**

Název práce: „Proteolytic maturation and degradation of the Photosystem II D1 protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803“

Autor: Stanislava Kuviková

Předložená práce se zabývá problematikou štěpení proteinu D1 reakčního centra fotosystému II. Tento protein patří svojí funkcí k nejvýznamnějším částem komplexu fotosystému II, a tudíž je jeho studiu ve světě věnována velká pozornost. Z tohoto hlediska lze konstatovat, že se jedná o velmi aktuální téma.

Práce je podána ve formě tří článků publikovaných v recenzovaných časopisech, jednoho rukopisu připraveného k publikaci a jedné kapitoly v knize, k nimž je napsán úvod, cíle práce, výsledky a diskuse a seznam použité literatury. U jedné práce je autorka na prvním místě, u dvou na druhém, u ostatních je mezi dalšími spoluautory. Práce je napsána v anglickém jazyce, má 95 stran, 25 stran původního textu. Po jazykové stránce je práce vyhovující, počet chyb a překlepů je minimální.

Kvalita práce je již předem garantována skutečností, že čtyři uvedené práce prošly úspěšně recenzním řízením a vyšly tiskem v renomovaných vysoce impaktovaných časopisech, nebo jako kapitola v knize. Práce je tématicky velmi ucelená a skládá se ze dvou částí. První část se zabývá problematikou post-translačních úprav prekurzoru proteinu D1 a přináší nové, velmi zajímavé výsledky jak z pohledu funkce C-terminálního štěpeného konce při tvorbě fotosystému II a jeho odolnosti proti fotoinhibici, tak i z pohledu vlastních mechanismů post-translačních úprav. Druhá část se zabývá funkcí FtsH proteasy nejen při degradaci podjednotky D1, ale i ostatních základních podjednotek tvořících fotosystém II.

Je zřejmé, že během své práce zvládla autorka široký rozsah metod a získala značné množství výsledků a to i ve spolupráci se zahraničními pracovišti. Předložená práce odpovídá z hlediska odborného i formálního nárokům kladeným na disertační práci a proto ji doporučuji k přijetí.

V Českých Budějovicích dne 30. května 2006

Doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.



## „Proteolytic maturation and degradation of the Photosystem II D1 protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803“

Dizertační práce Mgr. Stanislavy Kuvikové se zabývá rychlým metabolickým obratem proteinu D1 reakčního centra fotosystému 2 (PS2). Tento protein je nositelem téměř všech redoxních komponent účastnících se přenosu elektronů v PS2, je tedy klíčovou složkou PS2 z hlediska jeho funkce. Z téhož důvodu je však zároveň složkou nejvíce ohrožovanou (a také nejvíce poškozenou) reaktivními vedlejšími produkty a meziprodukty fotochemických dějů, probíhajících v PS2. Zachování funkce PS2 za fotoinhibičních podmínek se do značné míry kryje s udržením fungujícího proteinu D1. Poškozený protein D1 je důmyslným sledem dějů odbourán a v komplexu PS2 nahrazen novou kopií. D1 tak patří k proteinům s nejrychlejším metabolickým obratem. V jeho životním cyklu samozřejmě hrají jednu z hlavních rolí proteasy, a to jak při jeho degradaci, tak i při vkládání nové kopie do komplexu PS2. Tato práce se zabývá právě úlohou proteasy v cyklu degradace a resyntézy proteinu D1 v sinici *Synechocystis* PCC 6803.

Práce je sepsána na 95 číslovaných stranách. Je členěna způsobem ne zcela standardním, který však nejlépe vyhovuje jejímu obsahu. Skládá se ze tří článků publikovaných v odborných časopisech, jednoho článku k publikaci zasláního a jedné kapitoly monografie, opatřených společným úvodem, který stručně, ale systematicky a v přiměřeném rozsahu uvádí do studované problematiky i ne zcela specializovaného čtenáře. Část „Results and discussion“ pak obsahuje souhrn výsledků uvedených v těchto článcích, doplněný o několik dodatečných výsledků, a diskusi, odkazující v jednotlivých svých tématech na odpovídající příložené články a samozřejmě na relevantní práce jiných autorů. Následuje seznam citací použitých v těchto propojujících kapitolách, jejichž počet i použití v textu svědčí o dokonalém přehledu autorky o zpracovávaném tématu. Nejen články samotné, ale i ostatní části jsou psány v angličtině (a pokud mohu posoudit – v dobré angličtině) a práce je tedy i jako celek k dispozici mezinárodní vědecké veřejnosti.

Hlavní výsledky této práce lze shrnout do několika bodů:

- Potvrzení rozdílné citlivosti k fotoinhibici u dvou forem D1 ze sinice *Synechococcus* sp. PCC 7942 i při jejich expresi v sinici *Synechocystis* PCC 6803, a přinejmenším částečné vysvětlení tohoto jevu nahrazením Asn359 jinou aminokyselinou.
- Potvrzení dvoustupňového mechanismu odštěpení C-koncového peptidu, překvapivé nalezení hned dvou odpovídajících míst prvního štěpení za zbytky Ala a možné vysvětlení jednostupňového štěpení u vyšších rostlin, kde všechny Ala C-koncového peptidu následují za Pro, v kteréžto pozici nejsou možným místem štěpení ani ve studované sinici.
- Důkaz nezbytnosti proteasy FtsH pro *selektivní* degradaci proteinu D1, a tím i možnost opravy komplexu PS2 namísto jeho výstavby *de novo*.
- Potvrzení závislosti vkládání nové kopie D1 do komplexu PS2 na předchozím (či souběžném?) odbourání kopie poškozené.
- Proteasa FtsH hraje důležitou roli nejen při odbourání proteinu D1, ale i některých dalších podjednotek PS2 (D2, CP47, PsbI, PsbH).

K dosažení těchto výsledků bylo využito široké spektrum metod, od ryze (bio)chemických (izolace z biologického materiálu, elektromigrační, imunochemické a chromatografické metody, elektrochemické měření aktivity PS2), přes kultivaci sinic až po hmotnostní spektrometrii či molekulárně biologické postupy cílené mutagenese. I když nepředpokládám, že autorka vlastníma rukama vyzkoušela naprosto všechny použité techniky, svědčí to o její vysoké kvalitaci pro další vědeckou práci.

Při hodnocení takovéto dizertační práce má oponent velmi zjednodušenou úlohu – publikace jejích součástí v časopisech jako jsou *Biochim. Biophys. Acta*, *J. Biol. Chem.* nebo *Photochem.*



*Photobiol. Sci.* svědčí o její vysoké kvalitě i o tom, že velmi důkladným oponentním řízením vlastně již prošla. V textu jsem skutečně neshledal žádná věcná pochybení a nezbývá mi, než se uchýlit k připomínkám spíše formálním.

Z nich za „nejzávažnější“ považuji to, že na 55 stránkách s vloženými články odkazuje pouze jediné heslo v obsahu, „Enclosed Papers“. Vzhledem k tomu, že v textu se často odkazuje na konkrétní články, měla být v obsahu také hesla „Paper I“ atd., aby čtenář nebyl nucen trávit čas neustálým prolistováním nebo nemusel do svazku vkládat velké množství záložek.

Další připomínky se týkají zkratk, které by měly být vysvětleny při prvním výskytu (např. iD1 není) a uvedeny v seznamu zkratk. Pokud některé zkratky autorka považuje za obecně známé, jako NADP, a neuvádí je v seznamu, neměla by uvádět ani např. ATP. Tyto dvě zkratky se poprvé vyskytují v témže odstavci, pouze NADP je zde však vysvětleno.

Rodová jména organismů by při prvním výskytu neměla být zkracována (*A. thaliana*).

V seznamu citované literatury jsou často používány nestandardní zkratky periodik, někdy i pokaždé jiné (např. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*) a nejednotně formátované.

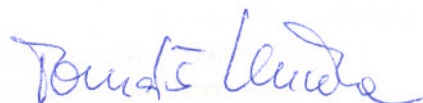
Dalšími drobnostmi jsou pak již jen překlepy (*stain* místo *strain*, podmět v jednotném a přísudek v množném čísle či naopak, jednou *centre* a jindy *center* atd.) či typografické chybičky (občas pomlčka místo spojovníku, např. *light — harvesting*).

Tyto úkazy se však v práci vyskytují spíše v množství neobvykle malém a nijak její hodnotu nesnižují. Práce rozhodně – a s rezervou – splňuje nároky na práci dizertační a vřele ji doporučuji k dalšímu řízení.

Na autorku mám pouze následující otázku:

Znamená nález dvou možných míst primárního štěpení C-koncové extenze proteinu D1 možnost třístupňového děje, nebo podle Vašeho názoru příslušná proteasa rozpoznává buď jen jedno či druhé místo?

Praha 8. 6. 2006



RNDr. Tomáš Kučera, Ph.D.  
katedra biochemie,  
Univerzita Karlova v Praze,  
Přírodovědecká fakulta  
128 00, Praha 2



## Posudek na disertační práci Stanislavy Kuvikové „Proteolytic maturation and degradation of the Photosystem II D1 protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803“

Předložená disertační práce pojednává o detailním mechanismu degradace D1 proteinu fotosystému II (PSII) za účasti proteáz a o roli C-konce D1 proteinu v tvorbě stabilního komplexu PSII. Práce je založena na výsledcích publikovaných ve třech renomovaných mezinárodních časopisech (*J. Biol. Chem.*, *Biochim. Biophys. Acta*, *Photochem. Photobiol. Sci.*) a jedné práci, která je v současné době v recenzním řízení časopisu *FEBS Letters*. Již tento fakt je vizitkou mimořádně kvalitní vědecké práce.

V úvodní části práce je podán přehled studované problematiky. Autorka se nejprve zabývá strukturou PSII, a to zejména u sinic, protože právě sinice jsou používány jako modelový materiál ke studiu D1 proteinu. V další části přehledu problematiky je pozornost soustředěna na proteolýzu D1 proteinu. Tato rešeršní část práce je založena na autorčiných detailních znalostech nejnovějších prací a může sloužit jako základ přehledového článku. Text snad mohl být jen více strukturován.

Cíle práce jsou jednoznačně definované a kryjí se s tematikou publikovaných článků. Úkolem bylo charakterizovat funkci C-konce D1 proteinu u sinice *Synechocystis* PCC 6803, specifikovat místo odštěpení C-konce po jeho inkorporaci do membrány a zjistit úlohu proteázy typu FtsH v zachování funkčního PSII.

Práce shrnuje dosažené výsledky ve dvou hlavních kapitolách. Posuzování věcné stránky této části je velmi usnadněno, neboť se obsahově kryje s recenzovanými publikacemi autorky, uvedenými v příloze práce. Výsledková část je napsána jasně a velmi srozumitelně. Za nejvýznamnější považuji zjištění, že proteáza typu FtsH je důležitá v uvolňování D1 a dalších podjednotek PSII z membrány a že toto uvolnění D1 je synchronizováno s inkorporací nově syntetizovaného proteinu D1. Tato rychlá výměna chrání další proteiny PSII před oxidativním poškozením.

K práci mám následující dotazy:

- V pracích prof. Barbera je poukazováno na velkou podobnost mezi transmembránovými segmenty proteinu PsaB (vnitřní anténa PSI) a transmembránovými segmenty D1 s CP43. Bylo někdy publikováno, že by PsaB nebo část PsaB odpovídající D1 proteinu vykazovaly vyšší rychlost reparační tak, jak je tomu u D1 proteinu? Jak je to vůbec s reparační proteinů PSI v případě oxidativního stresu?
- D1 protein je syntetizován v podobě pD1 proteinu s koncovým řetězcem, jehož odstranění je nutnou podmínkou vývinu kyslíku na donorové straně PSII. Mění se nějakým způsobem D1 protein v případě odpojení Mn klastru pod vlivem stresových faktorů jako je např. vysoká teplota nebo vysoká acidita lumenu?

Závěrem konstatuji, že práce je napsána výbornou angličtinou a obsahuje minimum formálních nedostatků. Troufám si tvrdit, že se jedná o vynikající práci, což ostatně platí pro všechny, které vznikají pod vedením doc. RNDr. Josefa Komendy, CSc. **Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.**