

Posudek dokorské disertační práce ing. Jany Prosecké „Physiological role of reactive oxygen species scavenging enzymes and methyl viologen resistance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“

Předložená disertační práce se zabývá aparátem chránícím sinice rodu *Synechocystis* proti neblahým účinkům „kyslíkových radikálů“. První část pojednává o charakterizaci mutantních kmenů specificky defektních v jednotlivých částech aparátu, které byly v rámci práce vytvořeny. Druhá část popisuje změny exprese vybraných genů vlivem stresových faktorů, které způsobují vznik reaktivních forem kyslíku, a to u výchozího kmene i zmíněných mutantů. Tématem třetí části je nalezení náhodných mutací, které propůjčují sinici *Synechocystis* zvýšenou odolnost k methyl viologenu, působícímu vznik superoxidových iontů O_2^- .

Práce dodržuje obvyklé členění a je přehledně uspořádána.

Kapitola „Introduction“ poskytuje bez zbytečných podrobností informace potřebné pro pochopení základních souvislostí ve vlastní práci. V některých místech však bylo možné citovat i novější práce. Z celkového počtu 136 citovaných publikací jich pouze 13 spadá do let 2007-2009, ačkoli se rozhodně nejedná o „mrtvý“ obor.

- Strana 4: Relativní závažnost oxidativního poškození DNA bych viděl spíše v tom, že na rozdíl od ostatních složek buňky ji lze jen těžko nahradit.
- Strana 5: Předpokládám, že „Mg-SOD“ je překlep v Mn-SOD. Mimochodem, řada sinic obsahuje Ni-SOD a Cu-Zn-SOD, jak je správně uvedeno až v Diskusi.
- Strana 6: Druhů sinic, u kterých byl rozpoznán alespoň jeden gen pro katalázu je už dnes zřejmě více (např. Bernroitner a kol., DOI: 10.1093/jxb/ern309).

Kapitola „Material and Methods“ popisuje postupy použité k dosažení výsledků práce.

- Strana 13: Podle jakého vztažného bodu je číslována pozice deletovaného úseku genu sodB (45-498)? Podle anotace k sekvenci z GenBank (accession number NC_000911.1) by měl enzym HindII štěpit 109 a 562 bp od počátku translace (na kódujícím řetězci).
- Strana 17: Proč byl pro normalizaci qRT-PCR používán obsah 16S rRNA? Pokud jediným měřítkem vhodnosti této veličiny byla její korelace s množstvím celkové RNA v reakci, nebylo by přesnější použít právě množství celkové RNA?
- Kapitola mlčí o původu mutantní linie katG. Objevuje se popis v nějaké pulikaci?

Kapitola „Results“ přehledně prezentuje dosažené výsledky.

- Strana 22: Jaký je rozdíl v provedení testu u zcela pravého dolního panelu obrázku 4.5 (WT, MV) oproti ostatním?
- Strana 26: Zkratka DCMU není vysvětlena.
- Strana 30: Proč jsou v tabulce 4.6 uvedena pouze přibližná čísla bez udání míry variability a také pouze hodnoty zvýšené? Snížení exprese přeci může také o něčem vypovídat. Např. u „WT (N₂)“ lze očekávat nižší exprese než při aerobním pěstování (souhlasně s obr. 4.14 A). Také je škoda, že mutanty nelze přímo srovnat – některé rostly jen v mikroaerobních podmínkách (nelze jinak?), jiné jen v aerobních.

Tento typ dat by dle mého názoru bylo názornější prezentovat např. jako sloupcový graf s chybovými úsečkami.

- Strana 32: Podle čeho byla vybrána intenzita jednotlivých stresů – koncentrace látek, teplota, intenzita osvětlení? Vliv jednotlivých působení na růstovou křivku se značně liší (obr. 4.15).
- Strana 33: Škoda, že pokus shrnutý v tabulce 4.8 nebyl opakován (?). Nepovažují také za šťastné skrýt data o genech, které nepřekonalu umělou hranici změny exprese na dvojnásobek, opět pouze směrem vzhůru. Prakticky tak zmizí např. profil exprese genu Slr1198, který je zmiňován v diskusi (str. 50).
- Strana 40: Co znamená hvězdička v tabulce 4.10?
Co je vyseto na (viditelně odlišných) horních třetinách misky na obrázku 4.17?
- Strana 46: Z grafu na obrázku 4.22 B to vypadá, že kmen MV-A roste mírně, leč statisticky velmi významně rychleji než kmen MV-4 (můj odhad založený na chybových úsečkách, tedy zřejmě směrodatných odchylkách). V tabulce 4.14 však má v obou případech MV-A delší dobu zdvojení. Proč?
- Strana 49: Troufnete si spekulovat, jaká je povaha aktivity, kterou vyvíjí Tpx po přidání t-BuOOH? Proč po 24 hodinách působení všech druhů stresu zachycených na obrázku 4.15 má kultura $\Delta tpx/\Delta katG$ nižší OD_{750} než pouze $\Delta katG$?

Kapitola „Discussion“ podrobně rozebírá dosažené výsledky a porovnává je s literárními údaji.

- Strana 51: Vzhledem ke schopnosti H_2O_2 překonávat biologické membrány mi není jasné, jak by bylo možné zajistit specifické odbourávání exogenního či endogenního peroxidu.
- Teprve po pečlivém přečtení diskuse a metod se mi poddhalila část výsledků, které nebyly zahrnuty ve vlastní kapitole „Results“. Věřím, že to je škoda, protože mohly obsahovat užitečné informace. Navíc tajení negativních výsledků může vést k jejich opakování.

Přílohou práce je:

1. text článku z časopisu FEBS Journal (impact factor > 3), který je založen na originálních výsledcích této práce. Ing. Prosecká je první autorkou článku, splňuje tedy podmínku zveřejnění alespoň části výsledků.
2. rukopis shrnující další výsledky práce, odeslaný k publikaci v jiném časopise.

Přes výše uvedené připomínky doporučuji doktorskou disertační práci ing. Jany Prosecké k obhajobě.

Jiří Libus

Posudek doktorské disertační práce

předložené na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Autorka disertace: Ing. Jana Prosecká

Název disertace: Physiological role of reactive oxygen species scavenging enzymes and methyl viologen resistance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Doktorský studijní program: P1515 Molekulární a buněčná biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie a genetika

Rok odevzdání: 2010

Jméno oponenta: Mgr. David Kaftan PhD.

Pracoviště: Laboratoř nanobiologie, Ústav fyzikální biologie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Kontaktní e-mail: kaftan@ufb.jcu.cz

Práce předložená k posouzení pojednává na téměř sto stranách o fyziologické úloze enzymů deaktivujících reaktivní formy kyslíkových radikálů v sinici *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Kapitola 1. obsahuje na jedenácti stranách kvalitní úvod zpřehledňující vyčerpávajícím způsobem stav současného poznání o procesech geneze a detoxifikace reaktivních forem kyslíku v buňkách fotosyntetických organismů a svědčí o velmi dobré úrovni znalostí autorky. Cíle práce jsou ve třech bodech velmi stručně definovány v kapitole 2 jako 1) charakterizace mutantů s deaktivovanými enzymy jenž jsou klíčové pro detoxikaci kyslíkových radikálů, 2) studium expresních profilů genů jenž se účastní detoxikace kyslíkových radikálů a 3) identifikace genů zodpovědných za rezistenci proti methylviologenu jenž je významným faktorem generujícím superoxidový anion. Jednotícím prvkem vytyčených cílů je tedy studium fyziologické odpovědi buněk na stres způsobený kyslíkovými radikály u sinice *Synechocystis* sp. PCC6803 za použití experimentálních přístupů kombinujících biochemické, molekulárně biologické a biofyzikální metody, jenž jsou dopodrobna popsány v kapitole 3 (materiály a metody).

Výsledky měření, analýz a interpretace naměřených dat jsou popsány a komentovány na třiceti čtyřech stránkách výsledků a diskuze. Hlavní část výsledků je rozdělena na tři kapitoly jednotlivých podprojektů jenž tvoří základ posuzované práce. Následuje devíti stránková diskuze, závěrečné shrnutí na jedné stránce a seznam použitých citací. V poslední části disertace je přiložen jeden publikovaný článek a jeden hotový rukopis připravený k odeslání do časopisu:

Prosecká, J., Orlov, A.V., Fantin, Y.S., Zinchenko, V.V., Babykin, M.M., Tichý, M. (2009) A novel ATP-binding cassette transporter is responsible for resistance to viologen herbicides in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. FEBS Journal 276, 4001-4011.

Počet citací = 0, IF = 3.139

Prosecká, J., Tichý, M. (2010) *In vivo* role of the type II peroxiredoxin (AhpC) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803; gene expression during stress acclimation. Folia Microbiol. Accepted.

O splnění ambiciózních úkolů se autorka disertace pokusila pod pečlivým dohledem svého školitele, je však zřejmé, že jak plánování experimentů, tak jejich bezchybné provedení a zprávnou a kritickou interpretaci dat zvládla nakonec zcela samostatně. Kvalita její práce je nakonec dobře demonstrována původním článkem publikovaným v renomovaném časopise; další článek jenž vznikl s hlavním přispěním autorky disertace je připraven k zaslání do časopisu. K práci samotné nemám žádné zásadní připomínky ani námitky. Volba tématu práce a její význam jsou aktuální, odborná úroveň práce je vynikající. Formulace cílů práce i metodika zpracování jsou originální a grafická, jazyková a formální úroveň je také vynikající. Jak úvodní text tak vlastní články doplňující disertaci jsou napsány velice dobrou angličtinou. O několika drobných nalezených nedostatcích formálního charakteru jsem informoval autorku a není nutné je zde uvádět. Doporučuji proto předloženou práci k obhajobě.

Otázky pro obhajobu a náměty do diskuze:

Analýza divokého kmene ani žádného z mutantů nevykazovala zvýšenou úroveň peroxidace lipidů jako odpověď na stres superoxidem generovaným methyl viologenem. Přesto však autorka uvádí vznik lipidových hydroperoxidů jako nebezpečný stav pro funkčnost enzymů fotosyntetického a respiračního elektron transportního řetězce, neboť jsou situovány v thylakoidní membráně. Autorka nepodává k tomuto zjištění, které považuji za rozpor, žádné vysvětlení. Prosím o komentář k výše zmíněným pokusům a objasnění, zda dle názoru autorky má peroxidace lipidů závažný fyziologický význam či zda je možno považovat jeho negativní vlivy *in vivo* za marginální.

Buňky mutantů *ΔahpC* rostly podstatně pomaleji než divoký kmen a to jak za přítomnosti kyslíku, tak i v mikroaerobním prostředí. Autorka uvádí na straně 27, že mutantní buňky nebylo možné kultivovat při optické hustotě menší než 0.2, ale nevysvětluje zcela jednoznačně souvislost mezi rychlostí růstu, minimální optickou hustotou, intenzitou osvětlení v husté kultuře. Prosím o upřesnění. Které z karotenoidů byly hlavní příčinou zvýšené absorpce v krátkovlnné oblasti viditelné části spektra u buněk mutantů *ΔahpC* kultivovaných v přítomnosti atmosférické koncentrace kyslíku? Byly buňky kultivovány pouze v kontinuálním světle jak vyplývá z popisu materiálů a metod (proč?), nebo byly provedeny také pokusy ve střídavém režimu světlo-tma?

Při indukci oxidativního stresu pomocí přidání methylviologenu nedošlo u mutantu *Δtpx* k předpokládanému zvýšení exprese genu *lilA* v ostrém kontrastu s přidáním H₂O₂ nebo kultivace při vysokém světle (pokus je prováděn za stresujících nefyziologických intenzit světla mnohokrát překračujících saturaci fotosyntetického aparátu sinice). Jako vysvětlení nabízí autorka zvýšenou destabilizaci RNA. O jaký typ genově specifické destabilizace se zde jedná a na jakém základě je tato hypotéza předložena? Může být intenzita oxidativního stresu způsobeného přidáním methylviologenu o tolik vyšší a jeho charakter natolik odlišný od stresu vysokou ozářeností, že se navíc projeví specifickou nepřítomností RNA stres indukujícího genu *lilA*?

Mgr. David Kaftan PhD.



V Nových Hradech, 3. března 2010

PID: 061001305



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích	
Datum: 1-1-04-2010	Č. jednací: 06/0428/10
Počet listů:	Počet příloh:

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Katedra experimentální fyziky, Přírodovědecká fakulta, tř. 17. listopadu 1192/12, 771 46
Olomouc

Oponentský posudek na disertační práci s názvem

„Physiological role of reactive oxygen species scavenging enzymes and methyl viologen resistance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803“

vypracovanou Ing. Janou Proseckou

Formální stránka disertační práce

Předložená disertační práce je napsána v anglickém jazyce, má 65 označených stran, obsahuje 32 obrázků, 20 tabulek a přes 150 citací uvedených v seznamu literatury. Práce je založena na 2 vědeckých pracích, z nichž 1 byla publikována v kvalitním recenzovaném zahraničním časopise a jedna je ve formě rukopisu v recenzním řízení. Disertační práce je rozdělena do jednotlivých kapitol podle standardního členění formou vědeckého článku. Celkově lze hodnotit, že práce je po formální stránce kvalitně zpracována s minimálním množstvím chyb a překlepů.

Faktická stránka disertační práce

Hlavním cílem dané disertační práce je studium reakce na oxidativní stres u modelového organismu sínice *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ve středu zájmu disertační práce bylo prozkoumat odezvu tohoto modelového systému pomocí experimentálních technik spadajících do oblasti molekulární a buněčné biologie.

První část disertační práce (strany 1–12) je věnována přehledu dané problematiky, kde se autorka zaměřovala převážně na podrobnou charakterizaci jednotlivých reaktivních forem kyslíku, antioxidační vlastnosti některých enzymů a regulační mechanismy proti oxidativnímu stresu. Lze konstatovat, že přehled dané problematiky je zpracován velmi kvalitně a přehledně.

Část disertační práce popisující získané výsledky (strany 13–23) je rozdělena do 3 tématických kapitol věnovaných charakterizaci kmenů bez některých enzymů antioxidačního cyklu, expresi genů účastnících se v ochranných procesech proti oxidativnímu stresu a tvorbě spontánních mutantů odolných proti methylviologenu. V první části byla provedena kompletní charakterizace kmenů bez superoxid dismutázy, thioredoxin peroxidázy a alkyl-hydroperoxid reduktázy. V druhé části byla studována exprese genů za normálních růstových podmínek a během působení různých stresových faktorů jako je vysoké světlo, nízká teplota, vysoká salinita nebo působení methylviologenu. V třetí části věnované tvorbě spontánních mutantů odolných proti methylviologenu se autorka zaměřila na charakterizaci a lokalizaci dané mutace.

V části věnované diskuzi se pak autorka věnuje fyziologické roli některých enzymů vykazujících antioxidační aktivitu a odolnosti sínice *Synechocystis* sp. PCC 6803 vůči působení methylviologenu.

Na základě výsledků prezentovaných v disertační práci a vědeckých publikací spojených s disertační prací lze konstatovat, že po faktické stránce má disertační práce kvalitní úroveň a je bezesporu velkým přínosem k objasnění procesů spojených s odpovědí organismu na oxidativní stres.

Otázky k disertační práci

K předložené disertační práci mám několik otázek a prosím Ing. Janu Proseckou o jejich zodpovězení.

1) Ve své disertační práci se autorka zmiňuje o mechanismu působení methylviologenu ve fotosystému I. Je zde uvedeno, že oxidovaná forma methylviologenu slouží jako akceptor elektronu z fotosystému I, zatímco redukovaná forma poskytuje elektron na molekulární kyslík za současné tvorby superoxidového aniontového radikálu. Může autorka vysvětlit, zda-li některý z kofaktorů ve fotosystému I je sám schopen redukce molekulárního kyslíku.

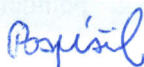
3) V celé práci je nesprávně používán výraz kyslík namísto výrazu molekulární kyslík. Výraz kyslík se mnohem častěji používá pro atomární kyslík (O), zatímco dvouatomová molekula kyslíku se označuje jako molekulární kyslík (O₂).

4) Obdobně v celém textu je nesprávně používáno označení pro superoxidový aniontový radikál O₂⁻. Superoxidový aniontový radikál je svou podstatou současně aniont a radikál a tak jeho správné označení je O₂^{•-}.

Závěr

Na závěr lze konstatovat, že disertační práci Ing. Jany Prosecké lze po formální i faktické stránce hodnotit pozitivně. Je vidět, že autorka pracovala systematicky po celou dobu svého studia a že má v oblasti odpovědi biologického systému na oxidativní stres hluboké znalosti. Disertační práce obsahuje nové a kvalitní výsledky základního výzkumu a svou kvalitou může odpovídat nárokům na disertační práci. Je snad jen škoda, že sama práce obsahuje řadu výsledků, které se neobjevily v žádné z příložených publikací. Svou publikační činností však autorka dokázala, že je schopna tvůrčí vědecké práce, která přispěje k objasnění reakce biologických systémů na oxidativní stres. Disertační práci Ing. Jany Prosecké proto doporučuji k obhajobě.

V Olomouci, 1. března 2010



Doc. RNDr. Pavel Pospíšil, Ph.D.
Oddělení biofyziky
Katedra experimentální fyziky
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci