



MINISTERIO
DE EDUCACION
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
Instituto de Recursos
Naturales y Agrobiología

Cordel de merinas, 40-52
37008 Salamanca.
Phone: +34 923 21 96 06
Fax: +34 923 21 96 09

**Review of the doctoral thesis
By Dr. Juan B. Arellano**

Title: „Structure and function of pigment-protein complexes of photosynthetic microorganisms“

Author: Ms. Herbstová, Miroslava

The main aim of the PhD thesis to be defended by Ms. Herbstová is to contribute to the understanding of the structural organization and function of several photosynthetic pigment-protein complexes from the red alga *Cyanidium caldarium* and the cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica*; two microorganisms with unusual pigment and protein composition that makes them of interest in the evolution of photosynthetic organisms. In order to achieve the PhD thesis goals, the author makes use of both biochemical techniques to purify the photosynthetic complexes and characterize their pigment/protein composition and biophysical and spectroscopic techniques to find out the supramolecular arrangement of the complexes and the ultrafast energy transfer processes taking place inside. The PhD thesis is presented in five chapters: an introduction section with a list of references (Chapter 1), three papers (Chapter 2–4) and a summary (Chapter 5). It is written in a precise and understandable English language and it contains 113 pages and 22 figures. The author's work has rendered three peer-reviewed papers, two of them already published in the prestigious journal BBA Bioenergetics and another submitted to Biophysical Journal, which gives us an idea of the grade of excellence of the present PhD thesis.

In the first paper (BBA 2010, Chapter 2), the author carries out a thorough biochemical approach to determine the location of the peripheral antennae PcbA, PcbB and PcbC in thylakoids from *Prochlorothrix hollandica*. By combining denaturing and non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis techniques and size-exclusion and analytical liquid chromatographies, the author reaches the conclusion that PcbA and PcbB are loosely bound to the photosystems and function as low light-induced mobile antennae, while PcbC is attached to photosystem I forming an antenna ring.



MINISTERIO
DE EDUCACION
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
Instituto de Recursos
Naturales y Agrobiología

In the second paper (submitted to Biophysical Journal, Chapter 3), the purified PcbC and PcbC-photosystem I complexes are used to investigate ultrafast energy transfer processes. Particularly, the characterization of the singlet-singlet energy transfer pathway between carotenoid and chlorophyll molecules is the main goal of this study. The most outstanding result is the fact that singlet energy transfer from the strongly allowed S2 excited state is marginal and that only the forbidden S1 excited state before relaxation (hot S1) is responsible for the excitation energy transfer to chlorophyll; a finding that notably differs from studies performed in other antenna complexes belonging to the same phylogenetic group such as the iron stress-induced cyanobacterial IsiA complex or the photosystem II inner antenna CP43, where the S2 state plays the main role in excitation energy transfer from carotenoid. Additionally, the author concludes that the S1 excited state of zeaxanthin in PcbC would play a role in quenching the excess of excitation energy based on the fact that the S1 energy level is below the one of the Qy state of chlorophyll *a*.

In the third and last paper (BBA 2007, Chapter 4), the author addresses several questions about the oligomeric state of photosystem I and II from *Cyanidium caldarium*, the location of the PsbQ' protein on the donor side of photosystem II and the arrangement of the peripheral antenna of Photosystem I under different light conditions. By means of single particle analysis and by comparing the particle's projection maps with the cyanobacterial and higher plant X ray models of photosystem II and I, the author is able to propose a model for the supramolecular organization of photosystem I and II in this red alga and to conclude that red algae are on the border between cyanobacteria and higher plant evolution.

During the time needed to complete her PhD thesis, the author has learned and put in practice several biochemical and biophysical techniques to achieve the main goals of her study. Her results are original, represent a significant progress in photosynthesis and will be of interest in the scientific community. In conclusion, the submitted PhD thesis fulfils the requirements for the doctoral thesis at the University of South Bohemia and I recommend it to be accepted.

Salamanca, 18th June 2010

JBArellano

Dr. Juan B. Arellano

CSIC Researcher





MINISTERIO
DE EDUCACION
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
Instituto de Recursos
Naturales y Agrobiología

Comments:

The introduction section (Chapter 1) gives an overall view of photosynthesis. The introduction is well written, but it is difficult from its reading to anticipate what the PhD thesis will be about. One has to go to chapters 2–5 to know the motivation and main objects of the present PhD thesis. The introduction should have been more focused on the state-of-the-art of supramolecular arrangement of photosynthetic complexes and should have explained why the two selected photosynthetic microorganisms are relevant for the better understanding of the evolution of photosynthetic organisms.

In Chapter 2, the carotene and chlorophyll peaks of Fig. 6 inset have identical kinetic properties, relaxing with biexponential kinetics with characteristic times of 1.3 and 8.4 μ s. Is the experiment performed under aerobic or anaerobic conditions? Aerobic conditions could explain the presence of the fastest decay rate. Apart from this matter, it is very relevant that both carotene and chlorophyll have identical kinetic properties, suggesting that the bleaching peak ascribed to chlorophyll (672 nm) represents the interaction peak between chlorophyll and carotene. Has the author investigated further this issue?

Chapter 3 shows very interesting results about the carotenoid-to-chlorophyll singlet energy transfer. The author concludes that S2 pathway is marginal in PscC, when the carotenoid in the PcbC and CP43 is the same. Interestingly, the S2 pathway accounts for 30% of the energy transfer in the latter complex. What is the reason for such a difference? In this chapter, there are some results classified as supporting information that it is not available in the PhD Thesis. This information should have included in this chapter.

In Chapter 4, the location of PscQ' between PscV and PscU is based on previous results by Enami *et al.* (1998). Although this task is not trivial at all, the removal of some of the extrinsic proteins with selected buffers containing high concentrations of NaCl or CaCl₂ or reconstitution experiments with the purified extrinsic proteins could have given some hints about the location of PscQ'. Did the author try to run this type of experiments? In the same chapter, the projection maps of photosystem I show some heterogeneity in the particle size, no matter the experimental conditions, high light or low light. Is this heterogeneity due to a natural distribution in the thylakoid membrane of *Cyanidium caldarium* or is it a consequence of the isolation method? Did the author try to use milder detergents or a combination of detergents to keep the integrity of the supramolecular arrangement of photosystem I?



UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE
ALBERTOV 6, 128 43 PRAHA 2

Oponentský posudek dizertační práce doktorandky Mgr. M. Herbstové na téma "Structure and Function of Pigment-Protein Complexes of Photosynthetic Microorganisms"

Předložená dizertační práce je sepsána v moderním stylu, tj. těžištěm jsou tři odborné články doktorandky uveřejněné v letech 2007 až 2010 ve vědeckých periodikách *J. Phys. Chem.* a *Biochim. Biophys. Acta*, což jsou velmi renomované časopisy s vysokým impaktním faktorem. Krom toho je Mgr. Herbstová spoluautorkou dalších dvou publikací z roku 2009 a 2010 a osmi prezentací na sjezdech a konferencích. Její publikační činnost je tedy rozsáhlá. Pobývala i na zahraniční stáži (2008 a 2009) v ústavu: Institute for Natural Resources and Agrobiolgy, Salamanca ve Španělsku, kde studovala oligomerní stavy fotosyntetických pigmentoproteinových komplexů.

Úvod práce – 42 stran – včetně citací a s několika názornými obrázky či schémata, které autorka sama sestavila, je sepsán dobrou kultivovanou angličtinou, přehledně, výstižně a srozumitelně. Doktorandce se podařilo shrnout dosavadní informace o lokalizaci a základních principech fotosyntézy, jakož i fotosyntetických pigmentech a membránových komplexech, které tvoří v thylakoidech fotosyntetický aparát.

Tato kapitola je zakončena vytyčením cílů práce a seznamem použitých citací. Referencí je 193 a z toho více než 60% jsou publikace z posledního desetiletí. Svědčí to nejen o pečlivosti autorky, ale i o aktuálnosti tématu.

Kapitoly 2, 3 a 4 jsou již uveřejněné publikace a prošly tudíž – vzhledem k významnosti daných vědeckých časopisů – náročným recenzním řízením.

První dva články/kapitoly se věnují studiu sladkovodní zelené oxybakterie *Prochlorothrix hollandica*, a to jednak jejímu specifickému světlosběrnému aparátu. jednak úloze karotenoidů ve světlosběrné anténě, tzv. Pcb komplexu a komplexu Pcb-fotosystém I.

Čtvrtá kapitola, třetí publikace, pojednává o dalším, tentokrát z evolučního hlediska zajímavém organismu. Je to ruducha *Cyanidium caldarium*, která představuje zřejmě vývojový stupeň mezi sinicemi a chloroplasty eukaryontů.

Všechny výsledky v těchto pracích jsou originální, zajímavé, získané evidentně na základě experimentů, které byly promyšleně, pečlivě plánovány a využívaly řady biochemických metod v kombinaci s metodami spektroskopickými, či elektronovou mikroskopií včetně analýzy obrazu (tzv. single particle image analysis).


V poslední kapitole je souhrn celé práce. Je výstižný a dokazuje, že vytyčené cíle práce byly zcela splněny.

Připomínky a dotazy:

1. Str. 14, ř. 19 zdola: citace Mustardy and Garab 2003 chybí v seznamu referencí.
2. Str. 16, 7. ř. shora: galaktolipidy (MGDG, DGDG) nelze řadit mezi nepolární lipidy.
3. Ráda bych Mgr. Herbstovou požádala, zda by nás mohla informovat o současném stavu znalostí o oligomerizaci/oligomerech jednotlivých fotosystémů u eukaryontů, prokaryontů, event. u přechodových vývojových forem autotrofních organismů.
4. Práce je téměř bez chyb a překlepů. Pokud jsem vůbec nějaké našla, seznámila jsem s nimi, event. s dalšími, zcela marginálními, poznámkami autorku osobně.

Závěrem bych ráda konstatovala, že Mgr. Miroslava Herbstová v předložené dizertační práci prokázala svoji schopnost a připravenost k samostatné vědecké činnosti dle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a proto doporučuji přijmout její práci k obhajobě.

V Praze, dne 20. 6. 2010


Prof. RNDr. D. Sofrová, CSc.

Posudek doktorské disertační práce

předložené na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Autorka disertace: Mgr. Miroslava Herbstová

Název disertace: Structure and function of pigment-protein complexes of photosynthetic microorganisms

Doktorský studijní program: P1511 Fyziologie a imunologie

Studijní obor: 1511V Fyziologie a vývojová biologie

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

Posuzovaná práce shrnuje na více než sto stranách výsledky několikaletého výzkumu struktury a funkce pigment-proteinových komplexů fotosyntetických mikroorganismů. Disertace je napsaná velmi přehledným způsobem. Úvodní kapitola obsahuje na čtyřiceti dvou stránkách základní shrnutí fotosyntetických procesů se zaměřením na podstatu dějů závislých na světle. Podrobně popisuje strukturu fotosyntetických membrán v bakteriálních buňkách a v chloroplastech řas a vyšších rostlin. Autorka se detailně věnuje struktuře a funkci obou fotosystémů, ATP syntázy, komplexu cytochromu b_6f , funkci elektronových přenašečů a roli kofaktorů při přenosu nábojů, zachycování a přeměně světelné energie. Větší část první kapitoly pojednává o struktuře a funkci jednotlivých typů světlosběrných antén. Velmi oceňuji přítomnost originálních obrázků doprovázející text.

Zbylé tři kapitoly obsahují po jednom publikovaném článku:

Z. Gardián, L. Bumba, A. Schrofel, **M. Herbstová**, J. Nebesářová and F. Vácha (2007) Organisation of Photosystem I and Photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: Encounter of cyanobacterial and higher plant concepts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1767, Issue 6, Pages 725-731.

Počet citací = 6, IF = 3.835

M. Herbstová, R. Litvín, Z. Gardián, J. Komenda and F. Vácha (2010) Localization of Pcb antenna complexes in the photosynthetic prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1797, Issue 1, Pages 89-97.

Počet citací = 0, IF = 3.835

M. Durchan, **M. Herbstová**, M. Fuciman, Z. Gardian, F. Vácha and T. Polívka (2010) Carotenoids in energy transfer and quenching processes in Pcb and Pcb-PS I complexes from *Prochlorothrix hollandica*. *Journal of Physical Chemistry*, accepted.

Všechny články, které autorka zahrnula do své disertace představují vysoce kvalitní práce. Dvě z nich zkoumají strukturálně funkční vztahy fotosyntetických komplexů u sinice *Prochlorothrix hollandica*. Autorka zde studovala strukturu světlosběrných komplexů a fotosystémů s pomocí elektronové mikroskopie a zcela samostatně použila biochemické a biofyzikální experimentální přístupy pro studium světlosběrné funkce Pcb anténních komplexů. Jistě není pochyb o tom, že převážná část výsledků byla změřena a vytvořena autorkou disertace. Přesto bych uvítal formální vyjádření o jejím procentuálním příspěvku v jednotlivých člancích včetně popisu metod, které pro jednotlivé projekty zajišťovala.

K práci samotné nemám zásadní připomínky ani námítky. Odborná úroveň práce, metodika zpracování a grafická, jazyková a formální úroveň jsou vynikající. Texty publikovaných článků jsou psány velice dobrou angličtinou. Překvapující je proto množství formálních nedostatků v úvodním textu, především chyb v angličtině. Jsem si ale jist, že autorka na své další, jistě úspěšné vědecké dráze získá potřebné znalosti i v tomto směru. Doporučuji proto předloženou práci k obhajobě.

Otázky pro obhajobu a náměty do diskuze:

Práce věnující se lokalizaci Pcb antén v sinici *Prochlorothrix hollandica* předkládá pro mne neuspokojující vysvětlení absence fotosystému 2 ve vzorcích solubilizovaných membrán. Na základě níže uvedených pochybností lze jen obtížně přijmout autorčiny závěry o interakci (nedetekovaného) fotosystému 2 s anténami PcbA a PcbB. Znamená neschopnost solubilizovat fotosystém 2 to, že ho v buňkách kultivovaných za nízkého světla opravdu mnoho není (tato domněnka je jen částečně podpořena prací Burger-Wiersma a spol., kde uvádí poloviční rychlost vývoje kyslíku a téměř dvojnásobný poměr fotosystému 1 ku fotosystému 2 proti buňkám rostoucím na vysokém světle), nebo je lokalizován do buněčných kompartmentů, které byly ztraceny při izolaci tylakoidních membrán? Nebo jak autorka tvrdí na straně 68, avšak bez předloženého důkazu, je větší či menší část populace fotosystému 2 přítomna v malém, ale dostatečně měřitelném množství v tylakoidních membránách, které ale autorka nebyla schopna solubilizovat pomocí dodecyl maltosidu? Ve světle starší práce autorů Miller a Burger-Wiersma z roku 1988 se nabízí další možné vysvětlení které souvisí s následující otázkou. Na straně 68 popisuje autorka neúspěšnou extrakci fotosystému 2 za použití zwitterionického detergentu při solubilizaci buněk. Byly solubilizovány celé buňky nebo mechanicky homogenizované buňky? Jaké další detergenty byly testovány při solubilizaci fotosystému 2 z izolovaných tylakoidních membrán? Prosím tímto autorku o poskytnutí dat, které by tyto problémy vyjasnily. Autorka zjistila vysokou aktivitu fotosystému 2 v intaktních buňkách pomocí parametru F_v/F_m změřeného z chlorofylové fluorescence. Byly provedeny další analýzy, které by mohly napovědět, jaký je například stochiometrický poměr fotosystému 2 a 1 v živých buňkách? Jaké metody by šlo použít k lokalizaci fotosystémů 2 v buňkách *Prochlorothrix hollandica*?



Mgr. David Kaftan PhD.

V Nových Hradech, 20. června 2010