

## **Oponentský posudek na disertační práci Václava Šloufa s názvem „Protein Control over Carotenoid Spectroscopy and Functions“**

Jde o velmi zdařilou a mimořádně kvalitní práci, která vyniká pečlivostí úpravy a neobvyklým a velmi osobitým přístupem. Je vidět, že autor si dal na textu opravdu záležet. Také rozsah práce je mimořádný – celkový rozsah je 240 stran textu, vše psáno skvělou angličtinou, téměř bez překlepů nebo chyb. Po formálních a úvodních částech disertace následuje úvod do tematiky v rozsahu přes 75 stran. Ten začíná krátkým esejem o autorově vnímání smyslu a významu vědy a postavení biofyziky. Přiznávám, že je to poprvé, co jsem se s podobným textem v disertaci setkal a autora si za to velmi cením. V odborné úvodní části pak autor stručně přibližuje problematiku fotosyntézy, ale záhy se soustředí již na hlavní téma své práce – fotosyntetické pigmenty, zejména karotenoidy a jejich optickou spektroskopii. V druhé kapitole úvodu pak podává přehled o použitých experimentálních metodách, tedy především o časově rozlišené pikosekundové absorpční spektroskopii. Zde opět oceňuji kapitolu „Frequently Asked Questions“, ve které autor podrobně vysvětluje podstatu několika přístupů používaných v časově rozlišené spektroskopii. Práce může dobře posloužit dalším studentům pro seznámení s problematikou.

Základ následujících dvou oddílů disertace tvoří celkem šest jednotlivých vědeckých článků. Rozdělení do dvou oddílů zdůrazňuje tematickou spojitost mezi články. Přestože většina článků již vyšla a jsou tedy dostupné ve formě pdf, autor je předkládá ve formě rukopisu s jednotnou grafickou úpravou obrázků. Toto považuji za dobré rozhodnutí. Práce končí shrnutím a závěrem.

Těžiště práce tvoří šest článků (z toho pět již publikovaných ve velmi dobrých časopisech – včetně prestižního PNAS). Celkový IF časopisů, kde bylo pět článků již publikováno je úctyhodných více než 22. Pozoruhodné je, že V.Šlouf je prvním autorem pěti ze šesti článků, které do disertace zařadil. Vedle toho je spoluautorem dalších dvou již vyšlých článků, které ale nejsou součástí disertace. Všechny články mají obdobnou strukturu – na různých izolovaných světlosběrných komplexech je pomocí metody časově rozlišené absorpční spektroskopie studován přenos excitační energie mezi karotenoidy a chlorofyly, většinou v časové oblasti 0,5 – 10 ps. Naměřená data jsou pak analyzována metodou globálního fitování. Výsledkem je kvantitativní popis drah přenosu energie mezi karotenoidy a chlorofyly. I když metodický přístup je vždy obdobný, každý článek je originál – naměřená data jsou pokaždé velmi podrobně analyzována a diskutována do nejmenších detailů. Autor tím prokázal velkou znalost literatury v oboru. Každý článek přináší skutečně originální a nová data o mechanismech přenosu a disipace energie, nejde o potvrzení již známých poznatků jinými postupy. To, že všechny články mají podobnou strukturu je důkazem dobré a úspěšné koncepce laboratoře školitele, prof. Polívky, který se pikosekundové spektroskopii karotenoidů věnuje po celou svoji profesní kariéru a patří mezi světovou špičku v tomto oboru.

### **Hodnocení diplomové práce:**

Práci jsem si přečetl s potěšením, i když to čtení nebylo snadné a vyžadovalo značné soustředění. Výsledky práce přinesly několik zcela nových poznatků a byly již publikovány ve velmi kvalitních časopisech, kde prošly náročným recenzním řízením. Velmi oceňuji hloubku přístupu autora ke studovanému tématu v celé jeho šíři, jeho analytické a kritické schopnosti a dovednost získané poznatky přehledně a jasně zpracovat a sdělit.

### **Dotazy a připomínky**

1. Lze rhodopsinové systémy opravdu považovat za plnohodnotnou fotosyntézu? Pokud ne, tak proč?
2. Hlavní téma práce je vliv proteinů na vlastnosti karotenoidů. Může tomu ale být i obráceně? Ovlivňují (ve fotosyntetických komplexech) karotenoidy ty funkce, které jsou hlavní doménou proteinů? Například přenos elektronů mezi kofaktory?
3. Diskuse o elektronických přechodech karotenoidů na str. 12-14 mi není zcela srozumitelná. Například nevím, jaký je rozdíl mezi hladinami Sn a Sm... Věť: „the predicted doubly-excited character of the ICT state added to its Bu<sup>+</sup>-related ionicity is achieved very elegantly in that the ICT state is the S1 (Ag-) state.“ nerozumím ani po několikerém přečtení. Může mi to autor vysvětlit?
4. Může mi autor ozřejmit odvození rovnice 1.3?

5. Na str.23 se diskutuje Dexterův mechanismus přenosu energie, ale ten je formálně popsán až na další straně – navíc si myslím, že v rovnici 1.8 chybí znaménko „-“.
6. Na str.30, při popisu tzv. trychtýřovitého způsobu přenosu energie v anténách se píše „there are exceptions that do not follow the funnel concept because in some cases the energy of the acceptor may be slightly lower than that of the donor“. Tento případ se mi ale zdá zcela v souladu s trychtýřovitým způsobem – nebo se mýlím? Nemělo to být obráceně?
7. str.31 – zmiňuje, že skutečný počet pigmentů na protein je u acpPC antén patrně nižší nežli vyplývá ze stechiometrických měření. Znamená to, že měření koncentrace pigmentů a proteinů jsou nepřesná, nebo jsou pigmenty navázány jinam než na acpPC?
8. Stále nevím, jak si mám představit Intramolecular Charge Transfer (ICT) stav. Můžete mi jej přiblížit? Co to je „hot S1/ICT“ stav? Proč bývá (je) ICT stav vždy energeticky vyšší než stav S1? Proč umožňuje existence ICT stavu tak účinný přenos energie z karotenoidu na (b)chlorofyl?
9. V souvislosti s ICT stavy se chci zeptat, zda se tento stav také podílí na zhášení energie ve fykobilisomech karotenoidem hydroxyechinenonem (hECN). V práci Tian et al., 2011, se totiž ohledně mechanismu zhášení fluorescence v tzv. OCP proteinu uvádí, že „...the quenching is most likely caused by charge transfer between APC(660)(Q) and the OCP carotenoid hECN in its activated form.“ Tomu jsem nerozuměl. Nyní, po přečtení disertace bych usuzoval, že půjde o ICT stav, ale opět si neumím představit, jak takové zhášení funguje. Navíc, zde by mělo jít o intermolekulární přenos náboje. Dokážete mi tento mechanismus vysvětlit? (*Tian LJ, van Stokkum IHM, Koehorst RBM, Jongerius A, Kirilovsky D, van Amerongen H (2011) Site, Rate, and Mechanism of Photoprotective Quenching in Cyanobacteria. J Am Chem Soc 133: 18304-18311*).
10. Můžete shrnout, jaké je rozmezí hodnot účinnosti přenosu energie mezi různými typy pigmentů (car – (b)chl, (b)chl – (b)chl, phycobilin – chl), se kterými se setkáváme v anténách fotosyntetických (mikro)organismů?
11. Sekce 4, str. 105 – jak z naměřených dat víme, že akceptorem energie z S2 stavu karotenoidu je Qx stav chlorofylu a. Proč to není Qy pás?
12. Sekce 6, str. 148-9 – proč nebyla přítomnost ICT stavů potvrzena také změnami absorpce v oblasti nad 1000nm, jako v sekci 5 (Fig.5-4, str.132) nebo v Sekci 7 (Fig.7-8, str.189)?
13. Jaká je funkce proteinu PufX?
14. Sekce 7 – jaký je rozdíl mezi komplexy LH2, LH4 a LH3?

**Závěr:**

S potěšením mohu konstatovat, že předložená práce Mgr. Václava Šloufa je vysoce kvalitní, převyšuje srovnatelné práce, přináší nové, originální a již publikované výsledky. Jednoznačně doporučuji její přijetí k obhajobě a udělení titulu Philosophiae doctor.



V Třeboni 7.12.2013

prof. RNDr. Ondřej Prášil, Ph.D.  
MBÚ AVČR Třeboň

## Review of the PhD thesis by Mgr. Václav Šlouf entitled Protein Control over Carotenoid Spectroscopy and Functions

The thesis by Václav Šlouf deals with diverse aspects of carotenoid photophysics in various light-harvesting complexes, with emphasis on carbonyl carotenoids and their peculiar charge transfer state. Most of the studied complexes can be found in organisms performing standard "electron" photosynthesis, however, one interesting light-harvesting complex consisting of a single carotenoid is used in a "proton" photosynthesis.

The thesis is based on five papers in high-impact scientific journals, including PNAS, and one manuscript in preparation. The candidate is the first author of five of these pieces and a co-author of two additional papers. Thus the list of papers alone already suggests this is an exceptional thesis. The first good impression is confirmed by reading the whole thesis. It contains an informative introduction in which the state of art in the field of research is well described together with the necessary background for understanding the reported results by non specialists. In addition, principles of the used experimental methods and data evaluation are explained as well. I appreciate that in chapter 2.2.4 Václav dedicated his time to explain several questions, which are usually not directly addressed in scientific literature, but their understanding may require a lot of thinking for somebody who is new in the field.

The unifying idea of all the papers forming the thesis is that the protein has often a crucial role in determining the photophysical properties of the carotenoid molecule in light-harvesting complexes. In other words, protein does not form only a scaffold, which maintains the pigments in proper distances and orientations, but also tunes their properties. While some of these interactions are well known, new interesting examples are described in the papers included in the thesis. The candidate was studying this tuning in the most detailed way for the LH1 complexes of purple bacteria. It started from the observation of carotenoid content modification in the presence of oxygen, have continued through the proposal of protein-induced change of carotenoid isomerization, which lead to its conformation with an active  $S_1/ICT$  state, and finished by identification of two tyrosines probably responsible for this mechanism.

The whole thesis has been obviously completed with a great care. The text is clearly and scholarly written in a very good English and figures are of high quality. The only mistake I have encountered is in the formula 2.5 where the " $\hbar$ " should not be divided by 2 providing the formula is in SI units. In the equation 1.3 it is not described what " $\tau_t$ " is, although one can deduce it from other formulas.

I have few questions that should be addressed by the candidate during the defense:

- 1) On page 24, spin selection rules governing the Forster mechanism of energy transfer are mentioned and it is concluded that "energy transfer processes involving a change in spin multiplicity ...are... realm of the Dexter mechanism". Are there any spin selection rules applicable to the Dexter mechanism of energy transfer and the three processes mentioned on the top of the page 25?
- 2) After reading chapter 2.3 (pages 61-64) one can be left with an impression that global fitting by sum of exponentials is applicable only for a parallel decay model, while sequential models use a different strategy. Is that so? Can you explain the main difference between the model based on parallel decay and sequential decay in terms of the formula used for fitting?
- 3) On page 158 and elsewhere in the text it is discussed that prolongation of the conjugated system, which is connected with conversion of spheroidene to spheroidenone, improves the singlet oxygen scavenging ability of the carotenoid. While I have no doubt that this conversion is important for improving the energy transfer efficiency from carotenoid to BChl molecules via the ICT state, I am missing a convincing evidence for an increased ability to quench singlet oxygen. I could not find energy of the spheroidene triplet state in literature, so

I estimated it from an energy of the  $S_1$  state of the linear carotenoid with 10 conjugated bond ( $13\ 000\text{-}14\ 000\ \text{cm}^{-1}$ ) and from the fact that the  $T_1$  level has half the energy of the  $S_1$  state. In this way calculated energy ( $1\ 430\text{-}1\ 540\ \text{nm}$ ) is well below the energy of singlet oxygen ( $\sim 1\ 270\ \text{nm}$ ) and should thus ensure an efficient quenching of singlet oxygen even if we take into account a possible role of thermal energy ( $\sim 200\ \text{cm}^{-1}$  at room temperature). Of course, prolongation of the conjugation will lead to further decrease of the  $T_1$  level of spheroidenone, but this does not necessarily mean that it will be a better quencher of singlet oxygen. Is there any other evidence, except the difference in triplet state energies, which would prove the proposed higher singlet oxygen scavenging ability of spheroidenone compared to spheroidene?

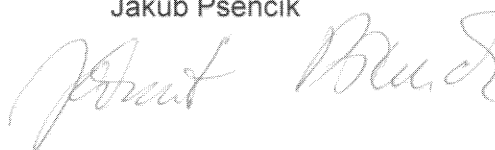
4) On page 168, there is a sentence saying that "activation of the  $S_1$ /ICT state .... also slightly increases the energy of the  $S_1$ /ICT state". From other papers I remember energetic schemes, where the activation of the  $S_1$ /ICT state decreases the energy of the transition (e.g. Zigmantas et al., J. Phys. Chem. A 105: 10296-10306, 2001). Does the modification of energy levels depend on the type of photosynthetic complex?

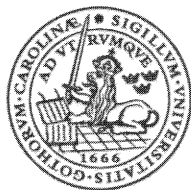
5) Do you have any experimental evidence for your belief (page 2) that humankind can do better than a bacterial colony?

Finally I conclude that the candidate did a great piece of scientific work and proved that is able to contribute significantly to the development in the field. The thesis in my opinion fulfills all the criteria and requirements for being accepted as a ground for awarding Mgr. Václav Šlouf with the title PhD.

In Prague, December 13, 2013

Jakub Pšenčík





**LUND**  
UNIVERSITY

## DEPARTMENT OF CHEMICAL PHYSICS

### Report on the PhD thesis titled "Protein Control Over Carotenoid Spectroscopy and Functions" by Václav Šlouf

First of all I would like to congratulate Václav and his supervisor Prof. Tomáš Polívka with the great thesis. It is based on six papers, five of which are already published in the acknowledged international journals and I am sure that the sixth one will be published soon. I enjoyed reading the introduction, which can be a good starting point for the new students to familiarize with the field and I am planning to use Václav's thesis in this capacity. I also appreciated Václav presenting his scientific philosophy. I think more people in the beginning of their academic carrier should have a courage to do this.

The main theme of the scientific work presented in the thesis is analyzing how protein environment affects and tunes the properties of imbedded pigments, in this case – carotenoids. I agree with the author that there is tremendous amount of information to learn in this area. Václav and co-authors present a strong evidence that some light-harvesting proteins force carotenoid spheroidenone into s-trans configuration and in this way sustain the high light-harvesting efficiency and improve photoprotective properties. The important step forward, which was attempted in the third and eighth section of the thesis, will be unraveling exact mechanisms employed by the protein to achieve the fine tuning of the pigment properties.

Some questions and comments.

#### Introduction section

1. Where are the pheophytins in the table of photosynthetic pigments?
2. The particle in the box is used as a useful model system to infer about spectroscopic properties of carotenoids. It would be nice see a short elaboration on what would be the dependence of the electronic transition energies in the carotenoids on the conjugation length.
3. When discussing about energy relaxation in carotenoids, conical intersections are often considered, however they are not mentioned in the introduction. Could some words be said about this phenomena in the context of carotenoids?
4. Considering the energy funneling effect in photosynthetic systems, I wonder if it is always straightforward. For example where are the RC electronic states in respect of the LH1 band in bacterial photosynthetic units?

#### Section 3

5. I think the evaluation of accuracy of the estimated values for the electric field and energy shifts would be appropriate. Since xanthorhodopsin is a transmembrane protein the pigments inside the protein in vivo will feel the transmembrane potential.

---

**Address:**  
Chemical Physics  
Lund University  
P.O. Box 124  
S-221 00 Lund, Sweden

**Goods:**  
Chemical Physics  
Chemical Center  
Getingevägen 60  
S-22241 Lund, Sweden

**Phone:**  
+ 46 (0)46 222 4739  
**Fax:**  
+ 46 (0)46 222 4119

VAT No. SE202100321101

**E-mail:**  
donatas.zigmantas@chemphys.lu.se

It seems that it would be appropriate to evaluate this potential and its possible effect on electrostatic interactions inside the protein.

Also, isn't  $|\cos(x)| \leq 1$  always true (page 82)?

Section 4

6. I am wondering if the Chl-a - Car triplet-triplet energy transfer efficiency could be estimated from triplet-minus-singlet spectrum? This would gain important information.

Section 8

7. In this manuscript there is a claim that you demonstrate that spheroidenone ICT/S1 effect is not only found in Rh. Sphaeroides. However, it seems redundant, because you have already shown in the previous section (published paper) that this effect is active in Roseobacter sp.

Concerning analysis of the evolution of the RC-LH1 time-resolved spectra. In some of your EADS, e.g. Figure 6-4 (2.5 ps) and Figure 7-4 (3.8 ps), there is some decrease of the BChl signal in the near IR in the range of 20 % (so not so "slight" as claimed on the bottom of page 154). It would be interesting to learn what this decay corresponds to.

Overall, I have no reservations that this thesis fulfills the requirements of the PhD work in any country or any university and should be accepted for the defense.

Sincerely yours,  
Donatas Zigmantas



December 13, 2013

Associate Professor  
Department of Chemical Physics  
Lund University  
[donatas.zigmantas@chemphys.lu.se](mailto:donatas.zigmantas@chemphys.lu.se)