

Oponentský posudek disertační práce

Autor: Mgr. Anita Župčanová

Název: Samoagregacia bakteriochlorofylových molekul

Význam tématu disertace v kontextu rozvoje oboru

Pochopení faktorů, které ovlivňují samovolnou agregaci bakteriochlorofylu *c* (isolovaného z bakterie *Chlorobium tepidum*) *in vitro* (respektive syntetických analogů bakteriochlorofylu) je bezesporu velmi aktuální téma, jednak pro pochopení mechanismů regulace velikosti agregátů v chlorozomech zelených sírných bakterií, jednak pro vývoj umělých světlosběrných systémů s potenciálem v různých aplikacích, včetně umělé fotosyntézy.

Teoretická část

V teoretické části autorka shrnula obecné informace o struktuře, složení a funkci jednotlivých komponent fotosyntetického aparátu aerobních (především PS II a PS I vyšších rostlin a sinic) a anaerobních fototrofů (purpurové a zelené bakterie). Přestože shrnutí informací o struktuře a funkci reakčních center a antén u odlišných typů fotosyntetizujících organismů je samo o sobě zajímavé (a poměrně dobře se čte), mám k této části několik připomínek:

a, Především informace o struktuře a funkci fotosyntetického aparátu aerobních fototrofů nemají vztah k studované problematice. Přímý vztah má v podstatě pouze kapitola 3.2. o struktuře a funkci fotosyntetického aparátu zelených bakterií, která má 9 stran. Uvedení zbývajících informací by se určitě dalo zdůvodnit, pokud by byly systematicky a konkrétně diskutovány strukturní a z nich plynoucí funkční rozdíly (nebo naopak podobnosti) fotosystémů uvedených organismů (například účinnost a dynamika přenosu excitační energie, její regulace apod.). Toto je však diskutováno (zmíněno) pouze okrajově a v obecné rovině. Poměrně značná část teoretické části tedy působí dojmem „vaty“.

b, Ze 102 citovaných prací jsou pouze 2 z posledních 5 let (1 z roku 2008 a 1 z roku 2011). Tato neaktuálnost vedla k tomu, že některé informace jsou poněkud překonané nebo nekompletní. Uvedené informace (především týkající se fotosyntetického aparátu vyšších rostlin) jsou rovněž v některých pasážích nevyrovnané (některé jsou hodně podrobné a další naopak velmi stručné a obecné nebo chybí).

Např.

Na str. 16, odst. 2.2. uvádíte „Antény mohou být považované za energetické cesty, v kterých jsou pigmenty prostorově a hierarchicky uspořádané tak, aby absorbovaná energie byla dopravená do RC. Pigmenty na okrajích komplexů absorbují záření kratších vlnových délek, které má však vyšší energii. Přenášají excitační energii na pigmenty s nižší energií absorbující při delších vlnových délkách.“ Toto tvrzení by bylo vhodné upřesnit, protože (přestože ve finální fázi opravdu dochází k lokalizaci excitační energie na chlorofylech s nejnižší energií excitovaného stavu) přenos excitační energie mezi jednotlivými spektrálními formami chlorofylu *a* v jednotlivých pigment proteinových komplexech a mezi nimi má složitější charakter (podle mých znalostí alespoň v rámci PS II, viz. například R.C. Jennings, R. Bassi, F.M. Garlaschi, P. Dainese, G. Zucchelli: *Biochemistry*, 32 (1993), 3203–3210; R. Croce and H. van Amerongen, *J. Photochem. Photobiol. B* 104 (2011) 142–153).

Dále uvádíte, na str. 21, že proteiny Lhca1–4 vážou 2, respektive 3 molekuly karotenoidů (lutein a violaxanthin). Na předchozí straně 20 pak uvádíte „Z údajů vyplývá, že monomér LHCIII se skládá z troch α -špirál přestupujících přes membránu, přičemž dvě z nich jsou umístěny symetricky v naklonené poloze. Taktéž se podařilo identifikovat 12 molekul chlorofylů (7 molekul Chla a 5 molekul Chlb) a dva luteíny (Lut), (obr. 5).“ **Znamená to, že proteiny Lhcb1–6 nevážou violaxanthin, případně ještě jiné xantofyly?**

Rovněž další informace na straně 20 – 21 jsou částečně nekompletní (nekonzistentní) a mohou vést k některým mylným představám, především co se týká struktury (složení) PS II a PS I (super)komplexů *in vivo*. Například porovnání množství chlorofylů vázaných v LHC II a LHC I (poslední věta na str. 21) by mohlo vést k zavádějící představě o velikosti antén PS II a PS I *in vivo*. **Napadá vás proč (z hlediska lokalizace vnějšího světlosběrného komplexu PS II tvořeného produkty Lhcb1–3)?**

c, V teoretické části se rovněž vyskytují drobné formální nedostatky.

Např:

Několikrát je tečka před závorkou s citací (např. str. 10 poslední řádek, str. 16 předposlední řádek, apod.), chybí mezery za čárkou nebo před závorkou (str. 14, ř. 5 a 13), je čárka místo tečky (str. 21, ř. 12), nadbývá tečka a Obr.9 není v závorce (str. 33, ř. 2 a str. 34, ř.1) apod.

Několikrát (str. 8, 16 a 17) hovoříte o „Kalvin-Bensonovu cyklu“.

str. 16, ř. 13–14: „Elektrón z plastocyanínu (alebo z cytochrómu c_6) redukuje P700+.“ ***Opravdu se jedná o cytochrom c_6 ?***

str. 16, ř. 2 zdola: chybí index u CO₂

str. 21, ř. 5-6: „tvorené štyrmi génovými produktami Lhc1 (molekulová hmotnosť 22 kDa), Lhc2 (23 kDa), Lhc3 (25 kDa) a Lhc4 (22 kDa).“

Formulace v 5. větě na str. 21 „Prvú skupinu tvoria Lhca1 a Lhca3, ktoré majú vysokú afinitu k Chl *a*, čo sa odráža v ich Chl *a/b* pomere 4.0 / 5.9 (Croce 1998, Castelletti 2003).“ není jednoznačná. ***Znamená výraz 4.0 / 5.9, že poměr Chl *a/b* v Lhca1 a Lhca3 je v rozmezí 4,0-5,9 nebo 4,0, respektive 5,9? Proč používáte tečky místo desetinné čárky?*** Totéž u 7. věty na str. 21.

Str. 22, ř. 14 je překlep „fikobilinových“.

Str. 25, poslední věta. Závěrečná část formulace „V blízkosti molekuly BChl naviazaného na podjednotke L sa nachádza molekula karotenoidu, ktorá chráni reakčné centrum pred fotooxidáciou a zhášaním tripletných stavov primárneho donora.“ je nelogická.

Citace na straně 36 „Uehara (1991-1992) a Nozawa (1990-1994)“ jsou nestandardní a nekompletní, protože se ve všech případech jedná o týmovou práci.

V posledním odstavci na str. 36 a na str. 37 citace chybí, přičemž charakter informací by si je zasloužil.

Jedná se o drobnosti, ale je jich poměrně hodně.

Další dotaz k teoretické části:

Na str. 31 uvádíte, že vnější obal chlorosomů je tvořen monovrstvou MGDG (monogalactosyl diglyceridu). ***Opravdu je uvedený slovní název správný (přesný)? Má uvedený lipid „specifický strukturně-funkční“ význam i v thylakoidní membráně chloroplastů?***

Experimentální část - Cíle práce, Materiál a metody a Výsledky

Cíle práce jsou konkrétní a ambiciózní a z příložených publikací je zřejmé, že byly splněny.

Část Materiál a metody přehledně charakterizuje použitý materiál, postupy při izolaci a modifikaci bakteriochlorofylů a přípravě různých agregátů ve vodě a alkanech. Z uvedeného textu není však jasné, zda autorka vyvinula všechny uvedené metodiky, nebo zda byly v některých případech modifikovány již existující postupy, či převzaty hotové metodiky (pokud se jedná o modifikaci či převzetí metodik, tak by měly být uvedeny citace).

V části Výsledky jsou stručně zrekapitulovány hlavní výsledky publikací a uveden přínos autorky k uvedeným publikacím. Tato část je však velmi stručná: 4 strany, z toho 1 strana obsahuje pouze seznam uvedených publikací. Především mi chybí: 1, kritické shrnutí výsledků v souvislosti s aktuálním stavem poznání v dané oblasti (dvě publikace jsou z roku 2008, takže nějakým způsobem se znalosti posunuly); 2, uvedení a diskuze výsledků a hypotéz, které se do publikací nedostaly. Rovněž příložený autoreferát je poměrně stručný a obecný (hlavní část tvoří CtrlC – CtrlV Abstrakta uvedených publikací), bez jediného obrázku či tabulky.

Dotazy

Máte informace, zda a do jaké míry ovlivňují vámi studované modifikace bakteriochlorofylu c (určující mezery mezi vrstvami pigmentů) účinnost přenosu excitační energie v agregátech? Předpokládáte, že hlavní důvodem variability mezer mezi bakteriochlorofylovými vrstvami pozorovaná u nativních chlorosomů různých druhů je získání chlorosomů s různou světlosběrnou účinností?

Je známo, jakým způsobem (mechanismy) je regulována velikost chlorosomů, respektive účinnost přenosu excitační energie z chlorosomů přes FMO komplex do RC in vivo v důsledku krátkodobých (sekundy-minuty) a střednědobých (hodiny-dny) změn ozáření?

Přílohy - Publikace

Přílohou práce jsou 4 publikace ve velmi kvalitních časopisech (1x Photochemistry and Photobiology, 2x Photosynthesis Research, 1x Journal of American Chemical Society). Kolegyně Župčanová je 1x 1. a 1x 2. autor. Publikační činnost tedy jednoznačně splňuje nároky na obhajobu práce.

Závěrečné hodnocení

Soubor přiložených publikací pokládám za velmi kvalitní. Je samozřejmé, že ke kvalitě publikací přispěli školitel a další spoluautoři, nicméně podíl autorky je konkrétně doložen. Při obhajobě bych přivítal vyjádření na dotazy uvedené tučnou kurzívou.

Přes uvedené připomínky doporučuji disertační práci k obhajobě a po úspěšné obhajobě práce doporučuji udělit Mgr. Anitě Župčanové titul Ph.D.

V Ostravě 11.09. 2013



Doc. RNDr. Vladimír Špunda, CSc.
Katedra fyziky
PřF OU v Ostravě

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Anity Župčanové, doktorandky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s názvem „Samoagregácia bakteriochlorofylových molekul“

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium samoskladné agregace molekul *bakteriochlorofylu c* a jeho modifikovaných forem pomocí absorpční, fluorescenční a rentgenové spektroskopie. Téma práce tematicky zapadá do výzkumu skupiny prof. F. Váchy v Ústavu molekulární biologie rostlin Biologického centra v Českých Budějovicích. Tomu odpovídá i dobrá odborná úroveň práce a publikace. Podle mého názoru splňuje požadavky úspěšné disertace.

Práce má velmi dobrou grafickou úpravu, je vcelku přehledná. Obsahuje 66 stran textu, včetně 11 obrázků, na začátku je anotace a seznam publikovaných článků. Je psána ve zkrácené formě založené na souboru čtyř publikovaných článků. Podle mého názoru by mohly být některé části změněny a organizovány jinak, jak o tom pojednám dále.

Obecné poznámky a doporučení:

- Práce má dobrý a obsáhlý literární úvod (31 stran) týkající se fotosyntézy. Tento text je poněkud mnohaslovný a dal by se výrazně zkrátit v části pojednávající o oxygenní fotosyntéze (str. 10-22), která není tématem práce, a soustředit se na anoxygenní proces. Naopak mi v úvodu chyběla hlubší úvaha o „umělé“ fotosyntéze, částečně zmíněny jsou umělé membrány (str. 35-36).
- Cíle práce jsou popsány přehledně v bodech.
- Metodika je uvedena ve zkrácené formě, která dostačuje (5 stran).
- Není mi jasné, proč je seznam literatury uveden před kapitolou Výsledky.
- V případě výsledků mne překvapila jejich stručnost (4 strany). Nejsou uvedeny obrázky s grafy a tabulkami, které jsou citovány v textu. Čtenář je odkázán na obtížně čitelné obrázky v přílohách. Tady bych předpokládal rozšíření výsledků, tzn. uvedení několika citovaných a významných obrázků z publikovaných prací přímo v textu a příslušnou diskusi k jejich interpretaci. Ilustraci výsledků práce by to výrazně prospělo.
- Práce by měla obsahovat i přehledné závěry odpovídající cílům.
- Na konci dizertační práce mi chybí životopis, který vždy doporučuji.
- Text je napsán ve slovenštině, přestože je založen na publikovaných člancích v recenzovaných zahraničních časopisech. To je, podle mého názoru, „handicap“ práce.

Jazykové a technické poznámky k rukopisu:

- V textu jsem našel velmi málo překlepů. Z hlediska gramatického nemohu hodnotit, protože ve slovenštině platí jiná gramatická pravidla než v Čj. Nicméně a přesto, že je práce psána ve slovenštině, rozhodně bychom neměli užívat odborné názvy „modifikované“ do národních jazyků, například „Kalvin-Bensonův cyklus“ nebo „tylakoid“.
- Doporučil bych číslování a pořadí kapitol podle schématu IMRAD, tzn. pro příklad 1. Úvod s dělením do tří úrovní; 2. Cíle; 3. Výsledky (a diskuse); 4. Literatura; 5. Přílohy; atd.
- Doporučuji psát práci v 1. osobě jednotné vzhledem k prohlášení doktorandky na začátku práce, nebo v trpném rodě (pasivu) ve tvaru např. *bylo analyzováno, analyzovalo se*; abychom se vyhnuli množnému číslu.

Odborné dotazy a požadavky na autorku do diskuse:

1. Shrnout nejdůležitější výsledky a závěry práce v úvodním představení práce.
2. Úvahy ohledně funkce komplexu 2. fotosystému:
 - Jaké jsou důležité funkce a vlastnosti redukční strany PSII – myšleno z hlediska rychlosti přenosů elektronů, měření fluorescence, vazby herbicidů, nepříznivých vlivů prostředí a možnosti jejich sledování?
 - V čem spočívá paradox fotosyntézy, týkající se rychlosti světelných a temnotních reakcí?
3. Jak se klasifikují fototrofní mikroorganismy podle organizace a zastoupení pigmentů v jejich světlosběrných anténách?
4. Může být bakteriochlorofylová molekula funkční s atomem zinku místo hořčíku?

Závěr

Předloženou disertační práci Mgr. Anita Župčanová prokázala, že uspokojivě zvládla dané téma doktorské disertační práce z hlediska teoretického i experimentálního. Jako oponent ji doporučuji k obhajobě a v souhrnu bych ji neoficiálně ohodnotil stupněm „velmi dobře“.

V Třeboni 21. září 2013



Doc. RNDr. Jiří Masojídek, CSc.

Laboratoř řasových biotechnologií, Mikrobiologický ústav AVČR v.v.i. v Třeboni
Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

SLOVENSKÁ AKADÉMIA VIED

Ústav molekulárnej biológie

Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava 45

Tel.: 02 5930 7418, Fax: 02 5930 7416, E-mail: imrich.barak@savba.sk



OPONENTSKÝ POSUDOK

dizertačnej práce Mgr. Anity Župčanovej na tému: „**Samoagregácia bakteriochlorofylových molekúl**“

Predložená doktorandská práca sa zaoberá s mimoriadne zaujímavou problematikou týkajúcou samoagregáciou bakteriochlorofylových molekúl. Ciele práce sú jasne definované a ich splnenie si vyžadovalo zvládnuť paletu hlavne biofyzikálnych metodík. Tieto ciele jednoznačne vychádzali z potrieb dlhodobo stanovenými vo výskumnom zameraní vedeckého kolektívu školiteľa Prof. RNDr. Františka Váchu, PhD. Ciele práce, na prvý pohľad, sa zdajú byť veľmi jednoduché lebo sa týkajú hlavne vyvinutia metodiky na modifikáciu postranných reťazcov Bchl *c* transesterifikáciou a sledovanie vplyvu zmeny postranného reťazca, vplyv zmeny prostredia a vplyv nepolárnych rozpúšťadiel na priebeh agregácie bakteriochlorofylu *c* (Bchl *c*). Vzhľadom na komplexnosť problematiky doktorandka musela detailne prepracovať široké spektrum prístupov a metodík ako absorbčnú a fluorescenčnú spektroskopiu, röntgenovú spektroskopiu – SAXS, MXS a spektroskopiu cirkulárneho dichroizmu. Môžem konštatovať, že ciele práce boli jednoznačne úspešne splnené k čomu určite v nemalej miere prispel vysoký vedecký štandard výskumu školiteľa a jeho kolektívu ako aj ďalších spolupracujúcich laboratórií.

Práca je napísaná v slovenskom jazyku na veľmi dobrej úrovni, čo sa týka formálnej aj obsahovej stránky. Literárny úvod je veľmi prehľadne spracovaný s dostatočným množstvom citácií a s vhodnými obrázkami. S touto časťou možno vyjadriť veľkú spokojnosť a je jasné, že autorka je v danej problematike veľmi dobre zorientovaná. Ďalšie časti práce sú vypracované vo veľmi úspornom formáte asi aj vzhľadom na to, že doktorandka priložila výtlačky štyroch svojich publikácií. Oceňujem, že v časti výsledky autorka zhodnocuje výsledky každej zo svojich štyroch publikácií ako aj presne definovaného jej vlastného príspevku k jednotlivým výsledkom. Trocha mi tu chýba všeobecná diskusia k celkovému významu výsledkov a súhrn práce, ktoré sú len veľmi heslovite naznačené vo výsledkovej časti.

Čo sa týka formálnej stránky tak nemám ďalšie zásadné pripomienky. Niektoré výsledky už boli publikované v štyroch karentovaných článkoch s impakt faktormi od 2,2 až po 9,9. Doktorandka je prvou autorkou jedného z uvedených článkov.

Práca plne spĺňa požiadavky kladené na doktorandské práce.

K uvedenej práci mám len niekoľko pripomienok resp. otázok. Samozrejme, práce tohto rozsahu majú väčšinou preklepy a chyby, ktorým sa nevyhlo ani v tomto prípade. Taká najviditeľnejšia je napríklad, že strany 72, 73 a 74 sú identické.

Mám nasledovné otázky na doktorandku:

1. Ako sú upravené resp. diferencované membrány fotosyntetických baktérií na väzbu chlorozómov? Sú nejaké špecifické fosfolipidové domény?
2. Vzhľadom na to, že bakteriochlorofylové molekuly sa samo agregujú, v čom vidíte najväčší problém vyriešenia kryštálovej štruktúry chlorozómu v komplexe s proteínmi? Sú známe štruktúry niektorých proteínov respektíve ich domén, ktoré sú v kontakte s BChl *c* komplexom? Aká je možnosť alebo v čom spočíva obtiažnosť získania ternárnej štruktúry týchto chlorozómov s FMO komplexom pomocou kryo-elektrónovej mikroskopie?
3. Ako by mohli pomôcť vaše štúdie mechanizmu agregácie BChl *c* v závislosti od modifikácie jeho bočného reťazca na štrukturálne štúdie chlorozómu?

Práca Mgr. Anity Župčanovej spĺňa všetky predpoklady, kladené na kandidátske dizertačné práce a preto ju plne doporučujem prijať ako podklad pre udelenie hodnosti *philosophiae doctor* v odbore doktorandského štúdia: biofyzika.

V Bratislave, 13. septembra 2013



RNDr. Imrich Barák, DrSc.
oponent