

Posudek práce

předložené na Přírodovědecké fakultě JU

- posudek vedoucího posudek oponenta
 bakalářské práce diplomové práce

Autorka: Bc. Eliška Trsková, BSc.
Název práce: Mechanism of Photoprotection in Photosynthetic Proteins
Studijní program a obor: Genetika a genové inženýrství
Rok odevzdání: 2015

Jméno a tituly oponenta: RNDr. Milan Durchan, CSc.
Pracoviště: odd. fotosyntézy, ÚMBR BCAVČR; Úst. fyziky a biofyziky PřF JU;
Branišovská 1760, budova C, 37005 Č. Budějovice
Kontaktní e-mail: durchan@umbr.cas.cz

Odborná úroveň práce:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Věcné chyby:

- téměř žádné vzhledem k rozsahu přiměřený počet méně podstatné četné závažné

Výsledky:

- originální původní i převzaté netriviální kompilace citované z literatury opsané

Rozsah práce:

- veliký standardní dostatečný nedostatečný

Grafická, jazyková a formální úroveň:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Tiskové chyby:

- téměř žádné vzhledem k rozsahu a tématu přiměřený počet četné

Celková úroveň práce:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Slovní vyjádření, komentáře a připomínky oponenta:

Základem diplomové práce Elišky Trskové je jednak pokus vylepšit izolaci anténních komplexů *Chromera velia*, která již byla publikována (např. Tichý 2013, Bína 2014), jednak pokus o další charakterizaci nefotochemického zhášení fluorescence *in vivo*, které je u tohoto organismu velmi zajímavé, jak ukázaly některé práce z posledních let (např. Kotabová 2011, Durchan 2014).

Obsah formálně splňuje veškeré požadavky na diplomovou práci.

Textová část je přehledně členěna: zahrnuje úvod, obecnou charakteristiku problému rozdělenou třemi kapitolami, z nichž první uvede antény, druhá nefotochemické zhášení a třetí pak vlastní organismus *Chromera velia*; v dalších kapitolách pak rozvíjí metody, vlastní výsledky jsou součástí kapitoly 6, v závěru je rozsáhlá diskuse výsledků. Text je psán velmi dobrou angličtinou (i když některá slova bych asi nepoužil v odborném textu; kolik nul má trilión?). ($2 \cdot 10^{12} \text{ t CO}_2$) V dnešní době ale překvapí poněkud slabší grafika (např. obr. 4 na str. 7, chlorofyl by stálo za to "namalovat" v lepším rozlišení), určitě lze na internetu najít lepší abs. spektrum karotenoidů než to v obr. 5 atd. atd.

Ohledně tiskových chyb jsem váhal mezi „přiměřeným počtem“ a „četným“, protože obzvláště u obrázků a jejich legend jsem objevil řadu závažných překlepů: matoucí číslování obrázků např. v 5.11 (obr. 23 na str. 23, obr. 24 na str. 24), několikeré wavelenght místo wavelength, number „to“ místo „two“ (obr. 18), KDa místo kDa (str. 31), obr. 23 na str. 32 má špatnou popisku Exc. Místo Abs., na obr. 27 je vše - i osa x i y je v nanometrech; v obr. 27 jsou milisekundy.

Literární přehled zahrnuje 65 citací, z nichž více jak polovina je z posledních pěti let.

Odborná úroveň práce je velmi dobrá. V části týkající se izolace antén je dost možná autorka až příliš skromná, pakliže hodnotí některé postupy jako spíše neúspěch. Pokud se nepodařilo, dle např. přiložených spektrálních charakteristik, vyizolovat kvalitní antény, resp. pokud antény byly horší než po gelové filtraci (Tichý 2013), pak i negativní výsledek je výsledek, pokud víme, že tudy cesta nevede, resp. pokud máme výstupy popsání v Diskusi, jak a co zlepšit v dalších pokusech. Nicméně jako hlavní výsledek překládané diplomové práce považuji část 6.4 a 6.5.

Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze:

1. Co znamená náhlá změna pH 9,5 v 6.1 na str. 25 šestý den? V textu není příliš jasné, zda jste změnila kyselost Vy či zda šlo o vývoj pH v kultuře, resp. bylo by dobré popsat, jak se vyvíjelo pH v průběhu kultivace.
2. Na obr. 15 popisujete dvě různé izolace. V diskusi na str. 38 popisujete, na co byly tyto dvě izolace použity. Trochu mne překvapuje, že nemáte v práci spektrální charakteristiky z obr. 15B. Možná je v práci poněkud nejasné, proč na část 6.3.3 byly použity celé thylakoidy a ne již rozdělené zóny z 15B, zóna F2. Můžete toto nějak komentovat? Kolikrát byla provedena izolace podle 15B?
3. Dotaz z opt. spektroskopie: Zóna F1 je zjevně na obrázku 15 zelenější. V závěru textu 6.2.1 však stojí, že z absorpčních spekter je více obou karotenoidů v zóně F1 (zóna F2 je hnědá). Mohla byste při obhajobě demonstrovat rozdíl spekter z obr. 16? Není to jen větší rozptyl světla na vzorku?
4. Dotaz k HPLC (str. 35): oproti publikaci Tichý (2013) mne překvapuje relativně malý sloupec v obr. 18B u chlorofylu, proto se ptám, jak byly započítány molekuly, které na chromatogramu máte mezi 24. a 25. minutou, byly započítány do chlorofylu? O jaké molekuly jde?? Zeaxanthin máte u 16,5 min, jaké další molekuly zde mohou být??
5. Koncentrace vzorku při fluorescenci *in vivo*: v části 5.10 mne překvapila poslední věta, není zde překlep?
6. U řady obrázků (např. obr. 25) mi není jasné, proč byla použita excitační vlnová délka 455 nm. Pro antény je naprosto klíčovou charakteristikou přenos excitační energie z Ixf-1

na chlorofyl. U 455 nm ještě je, bohužel, nenulový ext. koeficient chl a. Lépe by bylo měřit minimálně o 30 nm do červené, kde už chlorofyl neabsorbuje. 485 nm kontra 515 nm, resp. změřit excitační fluorescenční spektrum chlorofylu.

7. Poměr F_v/F_M je u fluorescence in vivo nezvykle nízký. A následné zhášení q_0 je velké. Nemůže být temnotní vzorek (vysoká F_0) redukován chlorospiračními či jinými procesy na úrovni plastochinonů?

Práci

doporučuji

nedoporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

Navrhuji hodnocení stupněm:

výborně velmi dobře dobře neprospěl/a

Místo, datum a podpis oponenta:
České Budějovice, 22. května 2015



Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Eliška Trsková, BSc.

Název práce: Mechanism of photoprotection in photosynthetic proteins

Posudek vypracoval: RNDr. Roman Kouřil, PhD. (Katedra Biofyziky, UP Olomouc)

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací metod izolace nativních světlosběrných antén z řasy *Chromera velia*. Postupně byly testovány a optimalizovány izolační metody jako metoda ultracentrifugace na sacharózovém gradientu, izoelektrická fokusace a iontově výměnná chromatografie. Izolované světlosběrné komplexy byly podrobeny biochemické analýze zaměřené na jejich charakterizaci z hlediska pigmentového a proteinového složení. Na izolovaných světlosběrných komplexech byla následně studována schopnost indukce nefotochemického zhášení. *In vitro* experimenty byly doplněny měřením nefotochemického zhášení *in vivo*.

V teoretickém úvodu práce se diplomantka zaměřila na rozbor problematiky. Detailně se věnuje popisu procesu fotosyntézy, složení fotosyntetického aparátu, problematice nefotochemického zhášení u různých organismů a popisu studovaného organismu, řasy *Chromera velia*. Je škoda, že se v závěru teoretické části nepodařilo diplomantce lépe vystihnout cíl práce v kontextu s již publikovanými výsledky.

Následuje podrobně zpracovaná část Materiál a metody, kde se diplomantka věnuje popisu použitých metod. Z výčtu metod je zřejmé, že si diplomantka musela osvojit širokou škálu experimentálních metod, což hodnotím velice kladně.

Část Výsledky a Diskuse je logicky členěna. Naměřené výsledky jsou detailně popsány a diskutovány.

Připomínky: v textu práce se vyskytly drobné nepřesnosti nebo stylistické chyby

- V textu práce není jednotný styl v užívání zkratk opakujících se termínů. Některé zkratky jsou v textu definovány na více místech nebo nejsou v dalším textu práce používány. Např. zkratka CHL je opakovaně definována na str. 17, 18, 26, 43.
- Str.3: „... is used during CO₂.“ Správně by mělo být: „... is used during CO₂ fixation.“
- Str. 4: „Stroma contains **inner** thylakoid membranes ...“. Vynechal bych slovo „inner“, protože nerozlišujeme „inner“ nebo „outer“ thylakoidní membrány.
- Str. 6: špatný formát zkratk „Qa and QB“.
- Str. 12: „... a maximum level of fluorescence **in dark** is observed (F_M).“ Parametr F_M neodráží maximální fluorescenci ve tmě, ale během saturačního pulzu aplikovaného na vzorek adaptovaný na tmu.

- Str. 25: v legendě obrázku č. 14 chybí informace o zobrazené chybě měření.
- Str. 25: v legendě tabulky č. 1 chybí popis „t double“.
- Str. 33: chybný výraz pro výpočet parametru NPQ.

Dotazy:

1. Můžete vysvětlit následující tvrzení (str. 7) ? „... For instance, their excited lifetimes in dilute solutions can be up to three orders of magnitude longer than the rate of energy transfer, moreover their energy of first excited state is equivalent to the energy of almost six ATP molecules, which makes them possible to drive the processes ending with accumulation of ATP“.

2. Na str. 14 uvádíte, že u mutantu bez PsbS proteinu nedochází k indukci rychlé komponenty NPQ. Dochází u tohoto mutantu k indukci pomalejší komponenty NPQ?

3. Na str. 15 uvádíte, že u většiny zelených řas se nevyskytuje PsbS protein. Znáte nějakého zástupce zelených řas, kde se PsbS vyskytuje?

4. Z průběhu fluorescenční indukce měřené *in vivo* (obr. 26) je zřejmá nízká hodnota maximálního kvantového výtěžku fotosystému II (F_v/F_M). Proč je tato hodnota tak nízká? Jak si vysvětlujete výrazné zhášení fluorescence pod hodnotu F_0 během fluorescenčního indukčního jevu?

5. Bylo při indukci F_M pomocí saturačního pulzu dosaženo saturace? Byla saturace fluorescence během pulzu kontrolována?

6. Jakým způsobem lze vysvětlit počáteční pokles fluorescence u izolovaných CLHc proteinů při pH 7.6 před aplikací HCl (obr. 28)?

Závěrem konstatuji, že práce je na velmi dobré úrovni a je přínosná pro další experimentální práci. Práce splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě. Navrhuji hodnocení stupněm výborně/velmi dobře.

V Olomouci dne 22.5.2015

Podpis:



RNDr. Roman Kouřil, PhD.