



## Ústav molekulární genetiky

Akademie věd České republiky

Ing. Juraj Sedláček, DrSc.  
vedoucí

Oddělení rekombinantní exprese  
a strukturní biologie

Posudek doktorské disertace Zbyňka Halbhubera

The PsbH protein: A small membrane protein of the Photosystem II as a model for structural and functional studies.

Disertační práce se týká jednoho ze základních systémů energetiky a metabolismu organismů rostlinné a bakteriální říše. Fotosystém II (PSII) je multi-podjednotkový systém zapojený do fotosyntézy probíhající za produkce kyslíku: Zachytává sluneční světlo a katalyzuje fotooxidaci vody na atmosférický kyslík. Systém je zakotven v tylakoidní membráně a zakotvení je zprostředkováno specifickými proteinovými složkami systému. Systémy rostlin, řas a bakterií nejsou zcela shodné, a např. deficiencie bílkovinné složky PsbH (předmětu zájmu disertanta) se u nich projevuje různě.

Struktura fotosystému II a jeho složek je ve světě předmětem intenzivních studií a pokud jde o rentgenostrukturní analýzy, několik z nich již poskytlo komplexní modely, byť s nižším rozlišením, kolem 3 Å. Vztahy struktury a funkce jednotlivých bílkovin fotosystému II by zřejmě lépe objasňovaly struktury s vyšším rozlišením. Pokud jde o bílkovinu PsbH, komplikace na cestě k jemnějším strukturám spočívají v tom, že se jedná o membránovou bílkovinu: Potíže zde obecně nastávají jak u rekombinantní exprese, tak u přípravy komplexních vzorků pro NMR a konečně i u krystalizace bílkoviny. Disertant v zásadě část těchto komplikací překonal a získal původní výsledky dobře publikované v mezinárodních žurnálech.

Disertant zvládnul přísun bílkoviny PsbH pro některé strukturní studie pomocí bakteriální exprese s použitím GST fúze. Studie rekombinantní exprese je mimořádně důkladná a akademicky zajímavá tvorba zkráceného produktu exprese je v ní vysvětlována na několik způsobů. Zde by se posuzovatel rád dotázal, zda byla brána do úvahy i možnost

abortivní terminace translace u "exotického" kodonu a zda bylo v této souvislosti uvažováno použití tRNAplus systémů exprese v *E. coli*.

Výpočty molekulární dynamiky se zdají být oprávněnou metodikou k získání údajů o strukturních prvcích zapojených do funkčních interakcí bílkoviny PsbH s lipidy. I když posuzovatel nemá expertní znalosti v tomto směru, rád by položil disertantovi několik otázek: Jaká je sekvenční homologie PsbH proteinu *Synechocystis* a použité analogické bílkoviny *Thermosynechococcus* (aminokyselinová sekvence není uváděna v obrázku na str. 21 disertace). Jde o výpočty s "all-atom force field" ? Co je kritériem stability proteinu v simulacích ?

Celkově je disertační práce výborná: Přináší nové poznatky v závažné vědecké problematice a "drží krok" s mezinárodním vývojem v oboru. Disertant publikoval důkladné a rozsáhlé původní práce v dobrých mezinárodních časopisech. Doporučují, aby se disertační práce Zbyňka Halbhubera "The PsbH protein: A small membrane protein of the Photosystem II as a model for structural and functional studies" stala základem udělení doktorské hodnosti Ph.D.

V Praze, 15. září 2006





Biologické centrum  
Akademie věd České republiky  
IČO: 600 77 344      DIČ: CZ600 77 344  
**Branišovská 31, 370 05 České Budějovice**

---

Doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.

tel. 38 777 5533, fax. 38 531 0356

E-mail: vacha@jcu.cz

### **Oponentský posudek disertační práce**

**Název práce: „The PsbH protein: A small membrane protein of the Photosystem II as a model for structural and functional studies“**

**Autor: RNDr. Zbyněk Halbhuber**

Cílem práce, tak jak ji autor uvádí v úvodu, mělo být zavedení souboru metod pro studium malých membránových proteinů na pracovišti školitele. Tomu odpovídá i struktura předložené práce. Jedná se o soubor jednoho článku, u kterého je autor na prvním místě, jednoho krátkého sdělení a jednoho rukopisu. Práce je rozdělena do třech kapitol. Úvodu, kapitoly zabývající se expresním systémem a izolací proteinu PsbH a kapitoly charakterizující PsbH protein pomocí metod počítačové chemie. Články jsou v jednotlivých kapitolách doplněny o další metody, výsledky a jejich diskuse. Práce je napsána celá v anglickém jazyce avšak s množstvím chyb. Jako příklad může sloužit již první věta v úvodu předložené práce. Tento úvod je na disertační práci poměrně krátký, stručný a místy nepřesný (např. P680 není jeden chlorofyl) nebo zastaralý (např. již existuje krystalová struktura LHCI). Škoda, a nebo spíš proč se autor nepodílel na přehledném článku o PsbH proteinu vydaném jeho školitelem a kolegy z Třeboně v roce 2003? V té době jistě na své disertaci pracoval a měl tedy patřit mezi ty nejpovolanější v tomto oboru.

Asi nejcennějším na této práci je zavedení expresního systému pro malé membránové proteiny včetně metodik jejich izolace a purifikace na pracovišti v Nových Hradech (kapitola 2). Jedná se o metodu produkce nízkomolekulárních membránových proteinů pomocí jejich exprese v bakteriích *E. coli* jako fúzního proteinu s proteinem glutathion-S transferázou (GST). Tímto přístupem je možné zamezit některým vedlejším efektům, které

mohou nastat při expresi málo rozpustných membránových proteinů v expresních systémech. Jde o poměrně finančně náročný systém převzatý ze Švédska, a proto se asi nelze divit, že v některých pasážích vykazuje předložená práce známky nedostatku materiálu (pokusy o měření NMR). V této kapitole se vyskytuje i zajímavá část zabývající se vlivem různých lipidů na CD spektra a tedy konformaci studovaného lipid-protein systému. Tyto výsledky se pak znovu objevují v manuskriptu článku v kapitole 3.

Kapitola 3 shrnuje výsledky získané především pomocí metod počítačové chemie. Navržené modely struktury proteinu PsbH jsou zde porovnávány se získanými poznatky z měření na izolovaném proteinu. Úvodní pasáž této kapitoly by se však spíš hodila do kapitoly Úvod, popisuje totiž velmi obecně principy proteinové struktury a metod, které používáme k jejich zjištění.

Studium a profesní vývoj uchazeče jsem měl možnost sledovat od jeho počátků. Jedná se o schopného, poctivého a samostatného badatele, který podle mého názoru splňuje požadavky na absolventa doktorského studia a nositele titulu PhD. Vzhledem k tomu, že předložená práce splňuje zákonné podmínky pro získání titulu PhD, doporučuji tuto práci k přijetí a obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 10. října 2006



Doc. RNDr. František Vácha, Ph.D.

Otázky do diskuse:

- 1) Jaké další expresní systémy pro membránové proteiny byly popsány nebo se v praxi využívají?
- 2) Proč jste se nepodílel na přehledném článku o PsbH?
- 3) PsbH protein se pravděpodobně vyskytuje na okraji PSII komplexu. Znamená to, že by jeho struktura/funkce byla ovlivněna různým lokálním lipidovým složením v jeho okolí? Co by to znamenalo pro funkci fotosystému II?
- 4) Jak byl tvořen Ramachandranův plot na straně 50, když neznáte strukturu PsbH proteinu.

**Posudek oponenta na doktorskou disertaci Zbyňka Halbhubera**  
**The PsbH protein: A small membrane protein of the Photosystem II as a model for structural and functional studies.**

Metody molekulární biologie a zejména stanovení molekulární struktury funkčních bílkovin a jejich komplexů mají významný podíl na velikém pokroku, kterého se v posledních desetiletích dosáhlo ve znalostech o mechanismu fotosyntézy. Objasnění podrobností ve struktuře fotosystémů a jejich reakčních center je toho nejlepším příkladem. Vedle jader těchto velikých komplexů je však v thylakoidní membráně celá řada malých bílkovin, z nichž některé mají pro funkci fotosystémů zásadní i když doposud nevyjasněný význam K nim patří nesporně také bílkovina PsbH (dále budu používat také anglický termín vžitý v literatuře, tj. PsbH protein), která již třicet let zaměstnává badatele okolo fotosystému II a s níž se již dříve někteří naši jihočeští kolegové aktivně setkali. Přestože PsbH obsahuje pouze jednu transmembránovou šroubovici a malou mimomembránovou doménu, je jeho přítomnost kritická pro správnou funkci fotosystému. Dr. Štys se zabýval prací s čistými proteiny LHClI a PsbH a jejich fragmenty a snažil se pochopit, jak jejich interakce s lipidy přispívají k architektuře thylakoidních membrán. Doc. Komenda kombinoval biochemické a molekulárně-biologické metody a zjistil, že u mutantů sinice postrádajících PsbH je narušeno skládání bílkovinného komplexu fotosystému II a jsou zbrzděny pochody v něm probíhající. Ačkoli oba nemálo přispěli k bližšímu poznání této bílkoviny, její přesná struktura a podstata její funkce ve fotosystému II nejsou dosud stále ještě jednoznačně objasněny. Není tedy divu, že když Dr. Štys chtěl svému doktorandovi, Zbyňku Halbhuberovi, nabídnout přitažlivé téma, při jehož řešení by mohl využít zkušeností několika badatelů z jihočeských fotosynteticky a membránově zaměřených pracovišť, jakož i jejich dobrého vybavení, a posílit tak řady studentů orientujících se na molekulárně biologická studia, padla volba na PsbH protein.

Tím ovšem bylo zadáno téma nejen přitažlivé množstvím nedořešených otázek, ale také nemálo obtížné pokud jde o nalezení a zvládnutí nejvhodnějších metodických přístupů. Podle mého názoru Zbyněk v této zkoušce dobře obstál a zanechal po sobě stopu, která bude pro další vývoj bádání na tomto pracovišti užitečná.

Prvým úkolem, který je při práci s malými membránovými bílkovinami vždy zkouškou vytrvalosti ale také otázkou štěstí, bylo získat jí dostatečné množství pro strukturní analýzy. Měření měla být provedena CD a NMR spektrometrií a ani jedna z těchto metod nevystačí s malými množstvími bílkoviny. Pro syntézu potřebného množství bílkoviny bylo třeba použít overexpresi genu *psbH* v buňkách *Escherichia coli*. Ten ale musel být vložen do plasmidového vektoru, jenž umožnil expresi fúzního proteinu PsbH s glutathion-S-transferasou (GST). Tak se předešlo komplikacím, provázejícím expresi většího množství hydrofobní bílkoviny v bakteriální buňce. GST kotva ale také posloužila pro izolaci produktu afinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným glutathionem. V principu se mohla kotva uplatnit také tak, že by se pro rentgenoskopickou strukturní analýzu použil přímo fúzní protein u něhož by hydrofilní složka snad umožnila krystalizaci a tak by se využilo postupu osvědčeného v obdobných případech. Vyzkoušení tohoto dobrého plánu však zabránila příměs neúplně fúzní bílkoviny vzniklé při overexpresi, které se nebylo možno zbavit.

Pro charakterizaci struktury zbývaly tedy pouze CD a NMR spektroskopie. Pro oba cíle bylo třeba PsbH protein z fúzního proteinu uvolnit rozštěpením a pak ho vložit buď do detergentových micel (NMR) nebo do membrány liposomových váčků (CD). Obé postavilo před Zbyňka opět nové úkoly. Že vpravování bílkovinných molekul do dvojné membrány liposomového váčku není jednoduchá úloha je všeobecně známé. Zbyněk vyzkoušel několik metod a s jednou posléze dosáhl cíle. Vyskytly se však potíže i s micelami v nichž byl PsbH solubilizován. Detergent, který byl výhodný pro předchozí (výše popsané) operace nevyhovoval svými vlastnostmi pro NMR měření a bylo ho třeba zaměnit. To se opět

uspokojivě podařilo teprve po mnoha zkouškách, když se k tomu použilo znovu fúzního proteinu. Ten byl během výměny ukotven na koloně s imobilizovaným glutathionem. Jako nejvhodnější pro měření NMR se po předběžných zkouškách ukázal oktylglukosid (OG) a použitelný byl také lauryldimethylaminoxid (LDAO).

Jak měření CD na PsbH vloženém v liposomech vytvořených ze čtyř lipidů vyskytujících se v thylakoidech, tak NMR měření na proteinu solubilizovaném v micelách nejvhodnějšího detergentu, tj. OG, se setkala se závažnými překážkami. Ani jedna z metod tak neposkytla v plném rozsahu ty výsledky, které se od nich očekávaly. Na odstranění zmíněných překážek by bylo třeba mnoho času, který pro práci Z. Halbhubera nebyl k dispozici. Proto se rozhodl použít těch výsledků měření, k nimž se dopracoval, pro podepření strukturních předpovědí z modelování molekulární struktury při použití molekulové dynamiky a se zřetelem na omezení vyplývající z experimentálních výsledků.

Popsal jsem trochu podrobněji postup/logistiku všech kroků Zbyňkovy práce, aby bylo jasné, jak rozmanité přístupy k problému si musel osvojit a kolik různých typů metod musel vyzkoušet a zvládnout, aby se dostal k cíli. Že ho v tomto cíli nečekala zasloužená odměna nových vzrušujících výsledků, ale řada dalších překážek to není jeho vinou a určitě k tomu nedošlo poněvadž by neměl vlohy pro experimentální práci nebo z nedostatku vytrvalosti. Je naopak třeba ocenit, že se na cestě plně nezdarů a nepředvídaných překážek nevzdal a udělal vše co se udělat dalo.

Doktorská disertace Z. Halbhubera se opírá o dvě publikace a jeden rukopis připravený k publikaci. Provází je text rozdělený také do tří kapitol. Prvá je úvodní shrnující obecné skutečnosti, známé o tématu z literatury. Druhá rozebírá podrobněji a komentuje některé části prvé z publikací, která je založena na prvé polovině Halbhuberových metodických výbojů, tj. popisuje overexpresi PsbH proteinu, jeho izolaci a další kroky přípravy materiálu pro měření. Třetí kapitola pak spolu s druhou publikací a rukopisem třetí publikace popisují různé pokusy o funkční charakterizaci PsbH proteinu jednak pomocí NMR a CD spektrometrie a pak také s využitím metod matematického modelování bílkovinné struktury. V této části se významně uplatnila možnost spolupráce s katedrou organické chemie na Univerzitě Jana Keplera v Linci, jakož i bohaté zkušenosti a vedení Doc. Ettricha na Ústavu fyzikální biologie Jihočeské univerzity.

Obsah a rozsah doktorské disertace Z. Halbhubera odpovídá plně všem pravidlům dodržovaným na Jihočeské univerzitě. K jejím kladům patří i to, že se kandidát rozhodl napsat i doprovodný text v angličtině, takže disertace má formu přístupnou i zahraničním čtenářům.

Na rozdíl od jednoznačně kladného hodnocení věcné podstaty veškeré výzkumné práce vykonané v rámci doktorského studia a obsahu disertace, je můj úsudek o její formální stránce méně příznivý. Publikace, o něž se disertace opírá, jsou nepochybně i po formální stránce bezchybné a byly uveřejněny v dobrých časopisech po důkladném recenzním řízení. Kapitoly doprovodného textu však nesou známky toho, že disertace byla psána v časové tísní a nebyl čas ani na pozorné přečtení napsaného textu. Je v něm proto více překlepů, jazykových chyb a také nejasně formulovaných vět nebo odstavců, než je hodnotnému obsahu přiměřené. Vzhledem k tomu, že kandidát nebude dále publikovat v tom oboru, jehož se práce týká, nevypočítávám jednotlivé formální chyby podrobně a poskytnu Z. Halbhuberovi jen několik obecných připomínek soukromě. Musím ale také vytknout, že doprovodný text nesleduje zcela jasný a přísně dodržovaný rozvrh. Zejména v obecném úvodu je někdy obtížné odlišit citování obecných skutečností učebnicového charakteru od nových výsledků převzatých ze současné původní literatury.

Jsem přesvědčen, že všechny formální nedostatky, které by Z. Halbhuberovi bylo možno vytknout, nemohou zpochybnit to, že jeho disertace je svědectvím zodpovědného a odvážného přístupu k zadanému tématu a že jasně prokazuje jeho schopnost samostatné vědecké práce. Doporučuji ji proto bez váhání k obhajobě.

Poněvadž jsem se vyhnul výčtu formálních chyb v textu a protože je vhodné poskytnout kandidátovi možnost při obhajobě osvědčit i schopnost odborné diskuse, uvádím dále několik otázek, na něž bych chtěl znát názor kandidáta. Poněvadž nemám bezprostřední zkušenosti přímo z oboru, jemuž je práce věnována, bylo by bývalo takových dotazů mnoho, ale já se omezím na závěr rukopisu posledního článku, jehož je Z. Halbhuber spoluautorem. Zdá se mi, že jeho závěry shrnují podstatnou část nových zjištění a výsledků k nimž se Zbyněk, částečně se školitelem a spoluautory, dopracoval.

(1) V úvodu závěru se konstatuje, že výsledky obrážejí snahu porozumět v podrobnostech molekulární úloze, kterou má PsbH protein v utváření lipidových domén v thylakoidních membránách. Přitom jediná experimentální data, jež se v průběhu práce získala, pochází z měření získaných CD a NMR spektrometrií. Dále se konstatuje, že ani jedna z těchto metod nepřinesla zcela jasné odpovědi na zadané otázky. Zajímá mne, co se mohlo v daném směru od těchto metod očekávat a jaké byly hlavní příčiny toho, že se toto očekávání nenaplnilo.

(2) Vzhledem k mé malé zkušenosti v tomto oboru, nerozumím také následující větu, kterou ocituji v originále: „... the experiments indicated that the interaction of the PsbH protein with the lipid bilayer is only partly specific.“ Co rozhoduje o tom a jaký význam má, je-li tato interakce více či méně specifická?

(3) Molekulárně dynamické výpočty naznačily, že PsbH protein je stabilní v lipidové dvojné vrstvě a že lipidové molekuly vytvářejí poměrně stálé interakce s PsbH. Dále se píše: „We thus may conclude that there is a fair basis for the hypothesis that the PsbH protein organizes a lipid domain in the thylakoid membrane which may be one of the bases for specific incorporation of other proteins in the particular position in the complex.“ Zajímá mne, jak tento závěr plyne z předchozích premis.

(4) O srovnání strukturních znaků PsbH vyplývajících z této práce a z rentgenometrického stanovení, které publikovali Loll a spolupracovníci v loňském roce se píše: „The comparison of the two structures, free and bound, indicates the potential of the PsbH N-terminus structural switch in formation of the Photosystem II structure and its regulation.“ Uvítal bych podrobnější vysvětlení významu tohoto tvrzení.

Třeboň, 16.10.2006

Dr Ivan Šetlík