

Posudek školitele na disertační práci RNDr. Zbyňka Halbhubera

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

Zbyněk Halbhuber pracoval experimentálně na své práci snad v nejhorším období jaké si doktorand může představit. Těsně po jejím zahájení se totiž celá laboratoř stěhovala do nových prostor na zámku v Nových Hradech, ty byl všeobecně nevybavené a některé klíčové přístroje, například spektrometr cirkulárního dichroismu, zůstaly v Českých Budějovicích. První klíčová kompetence, řečeno moderním slovníkem, kterou si Zbyněk osvojil, bylo vybavování laboratoří, objednávání chemikálií a uvádění přístrojů do chodu. Naštěstí pro molekulárně-biologickou část své práce našel Zbyněk asyl v Třeboni u Martina Tichého a Josefa Komendy. Školitel, tedy já, v té době býval nepřítomen zejména duchem, protože ho stěhování a vznik nového ústavu zaměstnávalo úplně jinak. Naproti tomu školitel ovšem neváhal dát doktorandovi ten nejsložitější úkol soudobé biochemie: ověřit a optimalizovat expresní systém pro membránový protein, vypracovat metodu jeho izolace, vypracovat metodu rekonstituce proteinu do membránových váčků, zjistit, zda protein nekrytaluje nebo zda jeho struktura je měřitelná pomocí NMR a na základě takto získaných poznatků vytvořit podklady pro model struktury proteinu. A pak samostatně sepsat disertační práci. Domnívám se, že Zbyněk ve všech krocích obstál.

Než začnu diskutovat dílčí výsledky, chtěl bych se vyjádřit k formátu práce. Jak už je dnes zvykem, práce je sepsána jako komentovaný soubor publikací. U práce podobné experimentální šíře a komplexní ambice jako je ta, kterou předkládá Zbyněk Halbhuber, se nejvíce projevuje rozpor mezi formou vědeckého sdělení a soubornou prací, vlastně svého druhu monografií, kterou by nakonec disertační práce měla být. Vědecké články v poslední době vznikají tak trochu salámovou metodou, kdy se autor snaží rozdělit popisovanou práci na co nejméně dílů. Není to, tedy alespoň u nás to nebylo, kvůli trvalému tlaku na co největší počet publikací. Problém jsme spíše zaznamenali na straně oponentů, kteří mnohdy o metodách použitých v práci věděli málo, o problematice membránových proteinů ještě méně, a o jejich strukturní analýze téměř nic. V nejlepším případě se dalo očekávat, že budou znát dobře alespoň jednu část problematiky, a s ohledem na to byly publikace sepisovány. Při sepisování disertační práce se pak kandidát dostal do obtížné situace, kdy ty nejpracnější experimenty, které nakonec byly největším přínosem práce, se třeba v publikacích neobjevily a bylo nutno je umístit do shrnutí. Práce je pak zákonitě koncepčně nevyrovnaná.

První kapitola práce je úvodem do problematiky. O jeho šíři je vždy možno polemizovat, vzhledem k tomu, že o fotosyntéze vycházejí tlusté monografie v celých sériích, cílem takové kapitoly nemůže být víc než prokázat, že kandidát se orientuje v terminologii a přečetl si základní články k tématu. To, myslím, osvědčil.

Obtíže se strukturou spisu se nejvíce týkají kapitoly 2. Jako část 2.1 Zbyněk zařadil publikaci v níž popisuje metodu exprese proteinu psbH, jeho izolace, purifikace a výměny lipidů a detergentů. Podobných expresních a izolačních systémů neexistuje na světě mnoho, maximálně dvě desítky, a málokterý dává dostatečné výtěžky pro studium proteinových struktur. Důvodem je především pracnost studia struktury membránových proteinů a nejistota výsledku. Nedávno jsem též zjistil, že existuje několik membránových proteinů používaných jako lékové molekuly, expresní systémy pro ně však zákonitě nejsou publikovány. Malá frekvence publikací pak vede k malému množství citací což ještě snižuje zájem vědecké komunity o práci s membránovými proteiny, přestože pro pochopení existence živé buňky jsou veledůležité.

Technické problémy se strukturou práce se projeví zejména v části 2.2 *Lipids* kde jsem to byl do značné míry já jako školitel, kdo naléhal na její rozšíření rozšíření. Všichni v Třeboni, na Nových Hradech a v Českých Budějovicích totiž tak nějak s membránovými proteiny pracujeme, izolujeme je a snažíme se o získávání stále stejných vzorků. Pokud se vzorek, třeba spektrálně, nechová tak, jako vzorky které běžně měříme, tváříme se, že izolace selhala a připravíme nový vzorek. Pod tlakem na výsledky se většinou neptáme co se stalo a proč je vzorek jiný než předtím, i když všechno včetně pigmentového složení je stejné. Jakmile ale připravujeme vzorek pro jakoukoliv metodu, která nám může dát informaci o detailech proteinové struktury na úrovni atomů, NMR spektroskopii nebo proteinovou krystalizaci, nemůžeme si luxus opakovaného připravování vzorků dovolit. Materiálu potřeba mnoho a izolace je drahá, vzorek je často izotopicky značený. V těchto metodách máme ambici vidět každý atom, přinejmenším tedy uhlíku, dusíku, kyslíku případně síry nebo fosforu. Pak zákonitě uvidíme i zdali jsou všech ve stejné poloze nebo v různých polohách, nemůžeme se smířit s nějakými směsmi mnoha různých složení a konformací. Nemůžeme se tedy smířit s přibližnou charakterizací vzorku a musíme pochopit a zvládnou opakované a reprodukovatelné uvedení vzorku do standardního stavu. U membránových proteinů to přesně řečeno znamená zavedení stabilní a reprodukovatelné metody izolace následované převedením do velmi dobře charakterizovaného prostředí detergentových micel nebo, ještě lépe, lipidových váček. Mělo by se to tak dělat vlastně vždycky.

V části 2.2 své práce Zbyněk popisuje jak zavedl a používal metodu rekonstituce proteinu do lipidových váčků a jaké byly výsledky těchto rekonstitucí. Signály měřené pomocí cirkulárního dichroismu byly poměrně anomální a není to poprvé, co jsme je pozorovali. Myslím si, že vysvětlení molekulární podstaty lipid-proteinových struktur které se projevují těmito anomálními signály, by konečně objasnilo jak vzniká grana a stroma v thylakoidních membránách. Krystalizaci takových struktur není možno očekávat a proto jsme si mnohé slibovali od NMR spektroskopie. Bohužel se nakonec ukázalo, že v NMR spektru se dá analyzovat jen ta frakce molekul, která není vázána na lipidy. Opět jsme se tedy nedozvěděli nic bližšího, což vedlo i k tomu, že publikace těchto výsledků je poměrně obtížná. A to přesto, že o klíčovém významu těchto výsledků jsem hluboce přesvědčen.

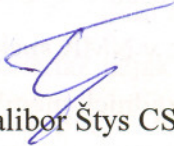
V třetí části jsme se pak, se silnou podporou skupiny doc. Ettricha na Nových Hradech, snažili vytěžit maximum z toho mála strukturálních informací které jsme měli. Výsledky prvních výpočtů potvrdily pozorování poměru šroubovicové a neuspořádané struktury z cirkulárního dichroismu i z NMR spektroskopie. Při přechodu od struktury v detergentové micelle ke strukturám bližším reálnému stavu v rekonstituovaných lipidových váčcích jsme se museli obejít bez výsledků NMR spektroskopie, objekty takto vzniklé jsou totiž tak veliké, že v NMR spektru nejsou vidět. Další komplikací jsou anomální lipidy přítomné v thylakoidních membránách pro něž nejsou známy parametry potenciálového pole pro výpočty metodou molekulové dynamiky. Jak se nakonec ukazuje, i parametry pro vápenaté ionty které používáme místo hořečnatých, nejsou úplně odpovídající tomu, co víme o jejich interakci s fosfátovými skupinami. A těch je na membránách mnoho. Práce Zbyňka Halbhubera nám umožnila nahlédnout celou šíři této problematiky, můžeme však pouze konstatovat, že je před námi obrovský objem práce než dosáhneme výsledků, které budou pro vysvětlení struktur thylakoidních membrán skutečně relevantní. Jen doufám, že budeme schopni získávat dostatek kvalitních doktorandů kteří v práci budou schopni pokračovat.

Z prvních ohlasů od těch, kteří práci v průběhu psaní četli a komentovali, jsem se ujistil v tom, že při její šíři nelze vyhovět všem. Zejména u třetí kapitoly si Zbyněk vyslechl poznámky v celé šíři od přílišné technické detailnosti až po triviálnost a konstatování učebnicových pravd. Domnívám se tedy, že kandidát vypracoval práci výjimečně samostatně a kvalitně a že každá její část přináší nové a unikátní vědecké poznatky. K nim dospěl bez možnosti navázat zásadně na předchozí projekty rozvíjené v místních laboratořích, naopak na jeho práci dnes řada doktorandů i vědeckých pracovníků navazuje. Práci vypracoval za technicky velmi obtížných podmínek, pracoval ve čtyřech laboratořích,

v Nových Hradech musel sám instalovat přístroje a laboratoř rozběhnout, dále pracoval v Třeboni a v Českých Budějovicích, vzorky pro NMR spektroskopii a vlastní měření prováděl na Univerzitě Jana Keplera v Linci. Ze všech laboratoří získal vynikající reference o své samostatnosti a schopnosti se rychle naučit nové techniky.

Na úplný závěr bych chtěl říci, že Zbyněk již stačil osvědčit to, co v akreditačních materiálech vždy uvádíme jako cíl doktorského studia, tj. připravenost k vedoucí práci ve vědeckých a výzkumných laboratořích. Právě takovou práci už totiž téměř dva roky úspěšně dělá ve Státním zdravotním ústavu v Kladně. Domnívám se tedy, že Zbyněk splnil požadavky kladené na studenta doktorského studia v míře mnohem vyšší než většina jiných jejichž obhajob jsem se v různých rolích účastnil. Doporučuji tedy jeho práci k obhajobě jako vynikající.

V Nových Hradech 10. 10. 2006


RNDr. Dalibor Štys CSc.