

Posudek habilitační práce :

RNDr. Radek Šachl, Ph.D.

Membrane at the nanoscale – molecular insights by fluorescence microscopy

První funkční model membrány Singera a Nicholsona jako tekuté mozaiky lipidů a proteinů obsahoval lipidové molekuly bez náznaku jejich laterální heterogenity. Ta byla v podobě lipidových raftů eukaryotních buněk prokázána daleko později. Zároveň byla heterogenita z čistě fyzikálně-chemických důvodů předpokládána a dokázána u syntetických lipidů v modelových membránových systémech. Dynamika a velikost takových domén se u živých buněk sleduje obtížně. Podobné struktury, které jsou fyziologicky významné, se tvoří dokonce i u bakterií, jejichž buňky jsou řádově menší. Výzkum domén je u nich samozřejmě ještě hůře experimentálně přístupný. Na druhé straně i membrány bakterií by měly být sledovány v submikro- a nanometrové škále – tím spíše, že se větší lipidové domény do plochy jejich membrány prostě „nevejdou“. Vzhledem k tomu, že jsem se zabýval chladovou adaptací bakteriálních membrán, nelze si než postesknout, jak by bylo vynikající mít možnost pozorovat laterální heterogenitu lipidů přímo na živých buňkách bakterií. To, co můžeme sledovat dnes, je spektrum lipidů a obecné charakteristiky tekutosti membrány nebo pohyblivost jednotlivých lipidů. Je pro nás ale nedostupná adaptace na úrovni membránové heterogenity a domén, které předpokládáme a které jsou možná pro regulaci zásadní.

První téma habilitační práce Radka Šachla vychází z toho, že informace o velikosti domén a jejich dynamice zatím nezahrnovaly domény v nanometrové škále. Předkládaná habilitační práce uvádí novou metodu založenou na kombinaci měření FRET a simulaci metodou Monte Carlo, která je schopna vůbec poprvé dokázat existenci domén v nanometrové škále, uvažovat jejich pohyb, zkoumat, zda se domény tvoří korelovaně v obou polovrstvách, na jakých vlastnostech lipidů záleží tvorba domén u gangliozidů, jak ovlivňují tvorbu domén proteiny, které se na gangliozidy vážou.

Druhé téma habilitační práce se týká přímého určování počtu oligomerů ve funkčním proteinovém membránovém póru. U proteinů, které tvoří při oligomerizaci póry v membráně, je samozřejmě počet oligomerů zásadní. Počet se někdy může měřit přímo - například na elektronmikroskopických snímcích - nebo nepřímo, třeba při měření vodivosti jednotlivých pórů v systému BLM (Black lipid membranes). Dosud ale chyběla metoda, která by na jednom vzorku lipidových vesikulů dokázala jednoznačně potvrdit že právě daný počet monomerů v oligomeru zodpovídá za vznik funkčního póru, který se u daného membránového váčku projeví zvýšenou propustností membrány. Radek Šachl uvádí zcela novou metodu založenou na FCS, která, a opět jde o vědeckou prioritu, koreluje propustnost daných vezikulů s počtem proteinových oligomerů integrovaných do jejich membrány.

Co se týče **aktuálnosti práce** – v obou oblastech, které tvoří náplň práce, je vysoká vědecká konkurence. Vzhledem k tomu, že jakákoli data o lipidových heterogenitách se dají

korelovat s fyziologickými ději – například s přenosy signálu - je detailní výzkum domén nutný. Totéž platí i o oligomerizaci pórotvorných proteinů, kam patří mnoho bakteriálních exotoxinů jako virulenčních faktorů. Samotné hodnocení **vědecké původnosti** jednotlivých prací, které tvoří habilitační práci, je celkem jednoduché proto, že obě metody vyvinuté autorem jsou principiálně novými metodami. Vycházejí z pokročilých technik pěstovaných na autorově pracovišti a jako nové metody už v předložených článcích prokázaly použitelnost a přinesly velmi zajímavá a v mnoha ohledech i prioritní data. Mají potenciál, aby na jejich základě vznikaly metodické úpravy, vylepšení vhodná pro další modelové a v budoucnu třeba i živé experimentální systémy.

Samotná práce je velmi přehledná a dobře čitelná. Ve zvláštních kapitolách na začátku jsou uvedeny principy nových metod a potom následuje uvedení jednotlivých článků a jejich vybraných výsledků. Práce uvádí výsledky celkem 14 autorových článků a zahrnuje bez použité literatury 46 stran. Popisy jednotlivých článků jsou bohatě ilustrované grafy, schémata a tabulkami. Také zahrnují analýzy výchozí situace, které byly nutné pro MC simulace - například lokaci donorů a akceptorů versus polohy „registrovaných“ a „anti-registrovaných“ domén, pohyb domén, distribuce donoru a akceptoru v doménách. Musím se přiznat, že pro mě právě takové analýzy před provedením experimentů byly nejzajímavější. V experimentální biologii se podobné analýzy možností často dělají až ex post po dosažení výsledků. Leckdy by designu experimentů pomohla taková analýza ještě před jejich provedením.

Samotné práce autora byly recenzovány kvalifikovanými recenzenty v časopisech, které mají velmi slušný IF. Pokud mám posuzovat **původnost textů habilitační práce**, které by se teoreticky neměly rovnat textům v publikovaných článcích, jsem z toho vždy trochu na rozpacích. U původních článků podobného typu velmi záleží na formulacích a texty článků po revizích představují dlouho hledané optimum - alespoň pokud vycházím z vlastní zkušenosti. Habilitační práce Radka Šachla je velmi poctivá v tom, že uvádí jednotlivé články tak, aby byla srozumitelná i jejich východiska i výsledky. Formulovat texty tak, aby se vůbec nepřekrývaly s texty původních publikovaných článků, je proto těžké a v dané habilitační práci tomu určitě byla věnována značná energie. Proto nemám nejmenší problém s originalitou textu habilitační práce a doporučuji tuto práci k obhajobě jako habilitační práci.

V Praze 8.2.2022

Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.
Oponent habilitační práce