

Posudek oponenta na práci Mgr. Terezy Dolejšové Objasnění vlastností a struktury pórtvorné domény kolicinu U bakterie *Shigella boydii*.

Předkládaná práce je napsána česky v plné formě a opírá se o výsledky čtyř publikací, které jsou uvedeny v příloze. Práce má standardní členění, 137 stran, 242 citací a zabývá se studiem vlastností jednoho z rodiny kolicinů-bakteriálních toxinů, které cílí na jiné bakterie. Společným znakem různých kolicinů, které jsou podrobně z různých hledisek srovnány v literárním přehledu, je využívání interakce s různými receptorovými strukturami na povrchu membrány, jako prvního stupně k napadení buňky. I translokace kolicinů do cytosolu cílové buňky neprobíhá samostatně, ale v interakci s Tol-Pal nebo Ton-B systémy. Část kolicinů působí po translokaci jejich N-terminální domény do buňky toxicky v cytoplasmě, například jako nukleázy. Jiná část kolicinů vytváří v membráně iontově vodivý pór, který cílovou buňku ničí depolarizací. Studovaný kolicin U je pórtvorný a k translokaci využívá proteinů Tol, Omp nebo lipopolysacharidy.

Cíle práce jsou stanoveny jasně.

Práce je metodicky velmi bohatá a využívá celou řadu technik. Základem jsou molekulárně biologické metody exprese, izolace a purifikace proteinů. Druhý blok metod je soustředěn kolem měření aktivity iontových kanálů v umělých lipidových membránách BLM. Na přípravu membrán a vlastní měření elektrické aktivity navazuje široké spektrum postupů měření a vyhodnocování jednotlivých aspektů činnosti kolicinu jako je měření napěťové závislosti aktivity, změny vodivosti, závislosti na koncentraci iontů, selektivity, velikost pórů a podobně. Změny vodivosti kanálů za různých podmínek a vznik vodivostních substavů byly vyhodnocovány formou histogramů amplitud a šumové analýzy z naměřených proudových záznamů. Funkčnost připravených přirozených i mutovaných variant kolicinu byla ověřována i pomocí zonového testu přímo na kmenu bakterií *E. coli* 5K. Spolu s přípravou kolicinu U, mutovaného v různých významných aminokyselinách, bylo použito biotinylace k objasnění transmembránové topologie kolicinu v okamžiku, kdy je vytvořen vodivý pór.

Autorka ukázala, že kolicin U v umělých membránách vytváří iontové kanály definované vodivostí. Aktivita i vodivost póru závisí na vloženém membránovém potenciálu. Nejlépe rozlišitelné vodivostní stavy jsou patrné v situaci, kdy se kolicin zabudovává do umělé membrány ze strany, která má kladný potenciál a opačná strana je polarizována záporně, což je orientace, která odpovídá přirozené situaci toxinu vnikajícímu do buňky se záporným membránovým potenciálem. Proud roste s koncentrací iontů ve roztoku, ale vodivost kanálu se při vyšších koncentracích saturuje. Závislost aktivity kanálů na koncentraci přidaného kolicinu ukazuje, že funkční jednotkou je monomer, i jedna molekula kolicinu U vytváří funkční kanál a nedochází k významné tvorbě komplexů. Kanály mírně preferují průchod kationtů. Vodivost kanálů závisí i na fosfolipidovém

složení membrány. S rostoucím zastoupením záporně nabitých fosfolipidů současně roste vodivost kanálu a objevuje se vodivostní substav s nižší vodivostí. Vytvořené kanály bylo možno blokovat klasickým blokátorem draslíkových kanálů TEA a puforem TRIS. Blokáda pravděpodobně vyvolávala rychlá zavření kanálu, která nebyla individuálně rozlišena pro omezený frekvenční rozsah aparatury a proto byla pozorována jako snížení vodivosti kanálu. Vnitřní průměr kanálu byl odhadován na základě změn proudu v přítomnosti neelektrolytů různé velikosti v roztoku. Na základě velikosti molekul arabinózy a glycerolu, které výrazně snižovaly vodivost kanálu autorka odhadla průměr póru na 0.7-1 nm. Za velmi důmyslnou považuji techniku určení geometrie rozložení molekuly toxinu na základě detekce expozice částí polypeptidového řetězce do trans roztoku pomocí biotinylace specifických míst přidáním steptavidinem. "Zachycení" póru v otevřeném stavu je vynikajícím dokladem o rozložení částí řetězce kolicinu v membráně v otevřeném stavu.

Stanovené cíle práce byly splněny a byla získána řada cenných originálních výsledků. Aktuálnost tématu, přiměřenost použitých metod a hodnotu výsledků dokládá i to, že již byly publikovány v časopisech, kde prošly náročným recenzním řízením a snesou mezinárodní srovnání. Autorka prokázala schopnost samostatné tvořivé vědecké práce a proto doporučuji, aby práce byla přijata k obhajobě a autorce byl udělen titul Ph.D.

V Praze dne 3.10.2022

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Otázky a poznámky:

Zjištění, že kanál kolicinu U má výrazně nižší vodivost, než by odpovídalo odhadnutému průměru póru není příliš překvapivé. Iontová vodivost je silně ovlivněna průběhem elektrických polí v kanálu, které nenabíjí neelektrolyt nezaregistruje. Kromě toho neelektrolyt nemusí kanálem procházet, ale může interagovat jen s ústími kanálu a proto nemusí správně detekovat nejužší místo selektivního filtru kanálu. Přesnějším měřítkem je měření pomocí nabitých organických molekul, kde se detekuje přímo průchod kanálem. S rostoucí velikostí molekuly se snižuje schopnost projít kanálem a rozměr kanálu se odhaduje z velikosti největší molekuly, která je ještě schopna kanálem procházet. Výsledky jsou ale vždy jen odhady, protože kanály mohou mít nepravidelné tvary a pak záleží na orientaci a tvaru procházející částice.

Při působení na buňky jsou navázání a translokace kolicinu často spojeny s přítomností specifických povrchových látek jako receptorů a Tol proteinů na cílové buňce. Při měření na černých lipidových membránách jako modelu musí kolicin zajistit zachycení na membráně a translokaci sám. Nemohly by být kinetika a vodivostní vlastnosti kolicinu U v přirozených membránách ovlivněny trvalejší interakcí s některým vazebným partnerem v membráně?

Vzhledem k tomu, že translokace kolicinu U membránou a otevírání kanálu je silně závislé na transmembránovém potenciálu, je pravděpodobné, povrchový potenciál membrány může mít výrazný vliv na kinetiku kanálu. Vzhledem k tomu, že jste používala roztoky o velmi různých iontových koncentracích (0.1M až 1M), je pravděpodobné, že u membrán s výrazným záporným nábojem může mít vliv i různé stínění povrchového náboje ionty. Také hodnota pH roztoku bezprostředně u membrány může záviset na náboji na membráně a koncentraci iontů v roztoku.