

Posudek oponenta na diplomovou práci

x oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Ivan Barvík PhD
	Datum: 10. 9. 2017
Autor: Bc. et Bc. Kamila Riedlová	
Název práce: Zjišťování struktury pórotvorných kolicinů	
Cíle práce Prostudovat pomocí MD chování jednotlivých helixů CTD kolicinu U v lipidové membráně. Ověřit chování helixu H1 kolicinu U prostřednictvím experimentu – syntézy a studia v černých lipidických membránách. Porovnat chování H1 kolicinu U s chováním H1 ostatních pórotvorných kolicinů.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 186 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 1. MD 2. syntéza 3. experiment s BLM Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): V práci je bohatá obrazová dokumentace. S textem a jazykem by se na mnoha místech dalo dále pracovat. Text má ale tak impozantní rozsah (186 stran), že jistá časová tíseň byla asi nevyhnutelná.	

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Zjišťování struktury pórotvorných kolicinů v membráně je velmi zajímavé, aktuální a ambiciózní téma. Toto bádání by mohlo přinést informace využitelné medicínsky - při syntéze antimikrobiálních peptidů. V literatuře lze přitom nalézt jen velmi omezené množství výsledků, které jsou navíc často ve vzájemném rozporu. Není shoda ani na tom, zda kolicin v membráně je funkční ve formě monomeru či multimeru. Využití počítačového modelování (konfrontovaného s experimentem) je v danou chvíli určitě dobrá volba. V rámci této práce oba přístupy přinesly výsledky, které se zdají být ve shodě.

CTD kolicinu sestává z deseti helixů, které ve vodě vytváří kompaktní strukturu, jak dosvědčují krystalové struktury. V případě interakce s membránou přechází kolicin do otevřeného stavu, pro což existuje hned několik modelů. Autorka práce se proto rozhodla nejprve zkoumat chování jednotlivých helixů kolicinu U - zejména H1, u něž studovala i schopnost tvořit multimery, provedla srovnávací experimenty a simulovala H1 z mnoha dalších pórotvorných kolicinů. Následně studovala chování ostatních helixů kolicinu U v membráně a to jednotlivě nebo v určitých kombinacích. Získala přitom opravdu velké množství dílčích výsledků, které mohou v budoucnu významně přispět při skládání celkového obrazu. Zaznamenala schopnost H1 kolicinu U agregovat a tvořit postupně dimery, trimery a tetramery. U H1 některých kolicinů, jakož i u H2 a H3 kolicinu U zjistila aktivitu, kterou interpretovala jako pórotvornou.

Autorka práce si nepochybně velmi dobře osvojila metodu molekulárně-dynamických simulací. Naučila se využívat výpočetní klastry v UFCH JH a v superpočítačovém MetaCentru. Získala mnoho desítek trajektorií, výpočet každé z nich přitom trval (dle tab. 5 s. 51) od jednoho týdne až do cca. dvou a půl měsíců. Získaná data kvantitativně analyzovala několika způsoby a našla způsob jak značné množství výsledků přehledně prezentovat.

Hodnotím velmi pozitivně, že myslela i na budoucí studenty, a přílohou její práce jsou praktické rady a návody, jak postupovat při obdobných MD simulacích.

Otázky a připomínky oponenta:

1) Jak přesně probíhal postup při stavbě systému – vložení peptidu do lipidové membrány? Nejsm si jistý, zda jsem správně pochopil postup popsany na stranách 73-74. Bylo by možné znázornit obě alternativy graficky?

Osobně mám dobrou zkušenost s přístupem, který je zmíněný na následující straně 75. Tj. pomocí skriptu vymazat fosfolipidy a molekuly vody, které se překrývají s peptidem. Peptid a molekuly vody zafixovat a nechat zrelaxovat zbývající fosfolipidy. Je přitom možné toto provést pouze jednou pro různé počáteční orientace nejdelšího peptidu. Simulované systémy pro ostatní peptidy je pak možné získat zkrácením původního peptidu a mutacemi jednotlivých aminokyselin (s využitím VMD).

2) Samostatné peptidy odpovídající jednotlivým helixům kolicinu jsou umělé konstrukty. Do jaké míry mohou ovlivnit chování peptidů v MD simulacích v membráně N- a C- konce peptidů? Jejich přítomnost je asi nezbytná, kvůli následnému srovnání s experimentem. Ale pokud jde o to, dobrat se prostřednictvím MD na časové škále stovek ns toho, zda peptid, pokud by byl součástí proteinu, má či nemá tendenci setrvávat uvnitř membrány, nebylo by vhodné konce peptidů chemicky modifikovat?

3) Podle mého názoru by v případě „pórotvorné“ aktivity H2 a H3 mohlo jít spíše o známku toho, že pro některé peptidy s větším zastoupením polárních aminokyselin je výchozí pozice uvnitř hydrofobního jádra membrány energeticky krajně nevýhodná a simulace ukazují počátek jejich putování mimo membránu. Alternativně by tak šlo výsledky získané pro H2 a H3 interpretovat jako podporu pro model z obr. 7 p. 34 této práce, kde jsou H2 a H3 situované mimo membránu?

4) Schematické znázornění modelu kolicinu na s. 34 obr. 7 připomíná uspořádání monomerů iontových kanálů, které fungují jako tetramery. Vzhledem k jednomu z hlavních výsledků této práce – demonstrování schopnosti H1 tvořit tetramery, by možná bylo dobré zkusit výše zmíněný model prověřit pomocí MD simulací?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

x **výborně** velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: