

Oponentský posudek

doktorské disertační práce Mgr. Aleny Koukalové

Disertační práce „Studium lipidových membrán v nanorozlišení pomocí fluorescenční detekce jednotlivých molekul“ Mgr. Aleny Koukalové je prezentována ve zkrácené verzi, která zhuštěnou formou podává základní informace o osobním příspěvku autorky k pěti přiloženým publikacím. Tři práce již byly publikovány, jedna je v závěrečné fázi recenzního řízení a jedna ve fázi rukopisu připraveného k odeslání k recenzi. Na třech z těchto publikací je A. Koukalová první autorkou. Z předložené práce je evidentní, že autorka musela zvládnout celou škálu metodických přístupů fluorescenční mikroskopie a spektroskopie. Problematika membránové struktury je nahlížena z mnoha úhlů pohledu, což dále zvyšuje atraktivitu práce.

Po formální stránce se jedná o velmi kvalitně zpracovanou práci. Je psána dobrou, srozumitelnou angličtinou s minimem překlepů. Odborně jsem velmi ocenil stručný a obsažný úvod práce, který čtenáři podává základní informace jak o objektu zájmu, tak o použitých metodách jeho zkoumání. Přes evidentní fyzikální náročnost zvolených přístupů je jejich stručný popis podán pouze s nezbytným minimem matematických vzorců a fyzikálních schémat a zůstává tak čitelný i pro širší odbornou veřejnost. K úvodu do problematiky funkčních membránových mikrodomén mám jen následující drobnou výhradu:

Na str. 18 je jako historicky první literární zmínka o účasti laterálních heterogenit biologických membrán v biologické funkci membrány citována klasická práce Karnovsky et al., 1982. Zde bych rád autorce připomněl též obr. 2 „Mobility restraint mechanisms“ z Nicolsonovy práce z r. 1976, kde autor diskutuje možné lokální výjimky z homogenní laterální distribuce membránových komponent, zejména proteinů, zahrnující jak separaci lipidů či agregaci integrálních membránových proteinů, tak i tvorbu větších laterálních heterogenit za účasti s membránou asociovaných struktur, např. cytoskeletálních komponent (Nicolson GL 1976, *Biochim Biophys Acta* 457(1):57-108). Podobně byly jako zřejmé funkční membránové laterální heterogenity výslovně uváděny např. lipid-proteinové komplexy dýchacího řetězce na vnitřní membráně mitochondrií anebo synapse na plasmatické membráně neuronů již při formulaci modelu fluidní mozaiky (Singer and Nicolson 1972, *Science* 175(4023):720-731).

Prezentované výsledky jsou rozděleny do tří částí, věnovaných po řadě membránové aktivitě polyenového antibiotika didehydroroflomycinu, velikosti a uspořádání nanodomén v modelových lipidových membránách a specifickým úlohám modelových lipopeptidů v úvodních krocích membránové fúze. Ve všech částech této kapitoly autorka přináší původní vědecké nálezy; kvalita velké části z nich byla již ověřena nezávislými oponenty v recenzovaných časopisech. Lehce na škodu je pouze fakt, že výsledky jednotlivých studií jsou diskutovány jen odděleně, a to jak ve výsledkové části, tak ve shrnutí. Chybí tak jasné odůvodnění motivace, proč byly studie sloučeny do jedné práce. Při absenci generální diskuse práce jako celek působí poněkud roztržitým dojmem.

Celkově se však jedná o kvalitní práci, která rozhodně splňuje kritéria pro udělení doktorské hodnosti. Doporučuji proto, aby Mgr. Aleně Koukalové na základě předložené disertační práce byl udělen titul PhD.

Na autorku práce nemám doplňující otázky. Nicméně, následující náměty by mohly inspirovat diskusi po skončení obhajoby:

1. Nanodomény pozorujete jak v membránách, které cholesterol obsahují, tak i v těch, které cholesterol neobsahují (obr. 14) a říkáte, že jejich uspořádanost odpovídá L_d fázi. V cholesterol obsahujících membránách bude tedy okolí těchto nanodomén v L_o fázi? Pojem „liquid ordered phase“ byl zaveden před cca 30 lety pro popis uspořádanosti lipidových membrán obsahujících cholesterol, které se chovají jako viskózní kapalina, ve které cholesterol zvyšuje uspořádanost acylových řetězců okolních lipidových molekul, aniž by současně významnou měrou snižoval jejich mobilitu (Ipsen, J. H., G. Karlstrom, O. G. Mouritsen, H. Wennerstrom, and M. J. Zuckermann. 1987. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta.* 905:162–172). Autoři této práce uzavírají, že v tomto ohledu „cholesterol představuje unikátní druh molekuly, jejíž funkce v membránách pravděpodobně není nahraditelná jinými biochemickými látkami“. Máte představu o uspořádanosti membrány mimo Vámi pozorované nanodomény v membránách, které cholesterol neobsahují? Vzhledem k tomu, co bylo řečeno výše, bych očekával, že budou výrazně uspořádanější, patrně v gelové (S_o) fázi? Nebude taková membrána jako celek křehká?
2. Ve druhé publikaci, v části „Implications for the raft theory“ (str. 115) říkáte, že Vámi pozorované L_d nanodomény „z hlediska velikosti a fyzikálních vlastností...se zdají být dobrým modelovým systémem pro buněčné rafty“. Jak tomu rozumět, když rafty byly definovány jako L_o struktury bohaté na cholesterol? Navíc, pokud jde o nanodomény pozorované v DOPC/SM membránách, nebyl by problém s jejich dynamikou a pohyblivostí (viz předchozí otázka), shlukováním, a tedy biologickou funkčností? Mimochodem, při předpokládaném pokrytí ve výši 55% plochy membrány, které předpokládáte, by vzdálenost jednotlivých nanodomén od sebe navzájem byla necelé tři (!) nanometry – znovu, jak si v takovém uspořádání představit pohyb? A lze v případě takto strukturovaného okolí v jeho případě ještě mluvit o fázi, pokud by byla pouze několik fosfolipidových molekul široká?
3. Vysvětlíte experiment na obr. 3A v páté publikaci (str. 189) – proč je karboxyfluoresceinem značená GUV membrána v čase $t=10$ min známkou spojení LUV a GUV membrán? Proč by měl být karboxyfluorescein distribuován nejprve především podél GUV membrány?

V Praze, 9. 11. 2018

doc. RNDr. Jan Malinský, PhD.

Ústav experimentální medicíny AV ČR

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4