

Oponentský posudek diplomové práce

Hana Kratochvílová: Vliv pH a iontové síly na strukturu a stabilitu cytochromu c

Předložená diplomová práce je pokračováním výzkumu cytochromu c, který probíhá na katedře biochemie, přičemž tentokrát je zaměřena na oblast extrémně nízkých hodnot pH, což je poměrně komplikované pole bádání. Autorka použila klasické spektrofotometrické metody, tedy absorpční, diferenční a derivační spektra, s perturbací vlivem pH a iontové síly.

Práce je členěna klasickým způsobem, přehled literatury je poměrně podrobný. Je však třeba konstatovat, že v práci je poněkud více překlepů (v práci jsem označil tužkou ty, které jsem postřehl) a nepříliš jasných formulací, než je běžné. Také k terminologii bych učinil několik poznámek. Na str. 28 se píše o β -otáčce, ovšem běžnější je v této souvislosti β -ohyb, na str. 30 je obrat „nábojové odpuzování“, patrně elektrostatické, na str. 59 (konec prvního odstavce) se píše, že „přítomnost redukované formy cytochromu c v roztoku je menší než 2,5%“. Odborněji by znělo „koncentrace“ nebo „obsah“ redukované formy. Rovněž formulace „kyselé indukovaná konformační změna“ (str. 63) nezní právě nejlépe.

K přehledu literatury bych dodal ještě dvě faktické poznámky. Je pravda, že technika derivační spektroskopie „je dobrým nástrojem ke studiu bílkovin“ (str. 19), ovšem čtvrtou derivaci už je nutno přijímat opatrně. Je nesmírně citlivá na nepatrné změny pološířky pásu. Tvrzení, že hydrofobní efekt je dán interakcí proteinu s molekulami rozpouštědla (str. 21, +6), není tak docela přesné. Především nejde obecně o jakékoli rozpouštědlo, ale o vodu, odtud název efektu, přičemž dnes se za hnací sílu tohoto efektu pokládá skutečnost, že hydrofobní struktura neinteraguje s okolní vodou a tím v ní vyvolává růst uspořádanosti. K osobnímu jménu Levinthal (Cyrus) (str. 23) bych upozornil, že „a“ v jeho jménu je krátké.

Potud poněkud delší zastavení nad některými detaily přehledu literatury. Nyní k výsledkům práce a k jejich diskusi. Zaměření práce na extrémně kyselé prostředí mělo přinést údaje, které by vypovídaly o tom, zda za těchto podmínek dochází k přechodu molekuly cytochromu c na *molten globule* (MG), a pokud ano, pak kdy. Odpověď je kladná; soudě dle výsledků porovnaných s údaji dalších autorů, by měla MG vznikat, a je zjištěna oblast pH, kde lze tento proces předpokládat, což je další přínos ke studiu stability molekuly cytochromu. Zatím nezodpovězené zůstává, zda je tento proces dvou nebo třístupňový, když druhou možnost naznačuje chování Soretova pásu. To bude zřejmě tématem pokračování tohoto výzkumu, který položil takové možnosti dobrý základ.

K práci mám několik dotazů:

1) Problémem extrémních oblastí pH, ať kyselé nebo zásadité, je skutečnost, že v molekule bílkoviny převažuje kladný nebo záporný náboj, a to mnohdy velmi výrazně, takže elektrostatické interakce nabývají mimořádně na významu. Je možné ze známého aminokyselinového složení cytochromu c alespoň odhadnout jaký by mohl být čistý náboj této bílkoviny v extrémně kyselé oblasti?

2) V metodách není uvedeno, za jak dlouho po přidání kyseliny s cílem nastavit požadované pH bylo měření provedeno. To souvisí s předchozím bodem, protože vlivem silné elektrostatické repulze mohou někdy nastávat v molekule bílkoviny postupné změny. Tato otázka tedy směřuje k možné kinetice konformačních změn molekuly, k nimž by mohlo docházet.

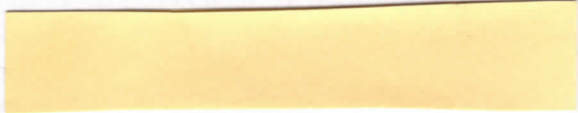
3) Na str. 52 je na obr. 22 znázorněn také parametr d , jak z textu plyne převzatý z jedné z předchozích diplomových prací. Otázka zní, o čem tento parametr vypovídá? O tom mohla být zmínka již v přehledu literatury. Podobné parametry, byly navrženy pro spektra čtvrté derivace, kde se však ukázalo, že použití je omezené obvykle jen na několik bílkovin. Na str. 60 je pak uvedeno, že „snižování parametru d odpovídá zvětšování relativního rozdílu mezi aromatickými chromofory (resp. jejich okolím) ...“ Mohla by autorka v rámci diskuse tuto formulaci podrobněji vysvětlit? O jaký relativní rozdíl jde?

4) Někdy se pro hlubší rozbor spekter navrhovalo použití faktorové analýzy, metody matematické, která rovněž někdy přinášela určité výsledky. Alespoň ve formě subspekter, jejichž další interpretace však zdaleka není prosta úskalí, což platí o řadě metod. Nebyl podobný pokus učiněn i v tomto případě?

5) Při zkoumání vlivu iontové síly je pro pH 7,0 použito hodnot tohoto parametru 0,457, 0,5 a 1 (str. 54), takže mezi prvními dvěma hodnotami není velký rozdíl. Jaký byl důvod volby těchto hodnot? Při měřeních v kyselé oblasti pak byla iontová síla 0,01, 0,5 a 1. Jak byly zvoleny tyto hodnoty iontové síly? Nenabízely by se spíše pravidelné násobky, tedy například 0,01, 0,1 a 1?

6) Tato otázka navazuje na pasáž z Přehledu literatury, kde se autorka věnuje vlivu solí na strukturu bílkovin a v této souvislosti se zmiňuje o proslulé Hoffmeisterově řadě a také o dělení iontů na kosmotropní a chaotropní, podle jejich vlivu na strukturu vody. Nutno poznamenat, že se údaje v literatuře dodnes liší, takže například ionty K^+ bývají častěji uváděny jako chaotropní. Nicméně shoda panuje v tom, že chování draselných a sodných iontů bývá výrazně odlišné. Naznačuje to například jejich hydratační entropie ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 298,15 K) kdy tato hodnota pro K^+ je +34, pro Na^+ -5. Proto se někdy navrhuje zkusit jak chlorid draselný tak sodný. Nebyl takový pokus učiněn? Možná by toto mohl být námět do budoucna.

Tyto otázky doplňují údaje uvedené v předložené práci, a některé mohou být námětem pro další výzkum. V každém případě práce splňuje všechny požadavky kladené na práci diplomovou a jako takovou ji doporučuji k přijetí.



Prof. RNDr. Vladimír Karpenko, CSc.

V Praze, 9. září 2009