

Posudek oponenta na kandidátskou práci Mgr. Věry Ňuňukové: Biophysical studies of membrane transport proteins from Nramp/MntH family and their function.

Práce se zabývá studiem struktury a funkce vybraných transmembránových segmentů transportního proteinu MntH bakterie *E. coli*. Tento protein je zástupcem skupiny membránových transportérů, které zprostředkovávají sekundární aktivní transport dvojmocných kationtů jako je Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} a podobných fyziologických i toxických iontů v prokaryotických i eukaryotických buňkách. Mechanismus činnosti těchto transportérů není zcela prozkoumán, ale předpokládá se, že je poháněn spřaženým transportem protonů.

Výsledky práce jsou založeny na kombinaci zjišťování konformace studovaných proteinů metodami spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD) a vodivostních vlastností proteinů inkorporovaných ve fosfolipidové membráně metodou terčíkového zámku (patch-clamp).

Předkládaná práce je napsána anglicky s jen drobnými jazykovými nedostatky a má standardní členění. Úvod obsahuje přehled vlastností členů rodiny transportních proteinů Nramp-Smf-MntH, ke které patří studovaný transportér MntH a rozbor obecného problému, zda izolované transmembránové segmenty integrálních proteinů jsou vhodným modelem a v jakém prostředí je studovat. Z celkem jedenácti transmembránových segmentů studovaného proteinu byly na základě znalosti pozice funkčně důležitých aminokyselinových zbytků k experimentům vybrány segmenty S1, S3 a S6, jejich vybrané mutace, modifikace a kombinace. Zde jsem na str. 24 u obrázku helikální projekce transmembránových domén postrádal podrobnější legendu, zejména k barevnému kódování vlastností aminokyselin.

Část Materiál a Metody obsahuje, kromě stručného přehledu použitého materiálu, zejména popis použité metody terčíkového zámku v konfiguraci umělé dvojvrstvy vytvořené na hrotu skleněné mikoelektrody. Popis přípravy liposómů a měření spekter cirkulárního dichroismu jsou také poměrně stručné.

Výsledková část je systematicky členěna podle studovaných transmembránových segmentů a každá část obsahuje samostatnou kapitolu měření CD spekter v různě polárních prostředích a kapitolu věnovanou měření vodivostních vlastností proteinů inkorporovaných v umělé fosfolipidové membráně. Zvláštní pozornost je věnována vlivu přítomnosti iontů – zejména Mn^{2+} , na CD spektra a na vlastnosti iontových kanálů.

V Diskusi autorka porovnává naměřená data a snaží se je interpretovat jak z hlediska struktury jednotlivých částí, tak i z hlediska funkce celého transportního proteinu. Závěr shrnuje dosažené výsledky a kriticky posuzuje možnost jejich aplikace na celý protein. Seznam použité literatury je poměrně obsáhlý (147 položek). Práce je zakončena řadou doplňků s mnoha grafy. Podle mého názoru mohla být většina grafů bez potíží uvedena přímo ve výsledkové části aniž by to nadměrně práci prodloužilo a ubralo jí na srozumitelnosti.

Výsledky jsou založeny na velkém objemu experimentální práce a přinášejí zajímavé informace o chování a konformačních změnách krátkých amfifilních proteinů. Například naměření kanálotvorné aktivity relativně krátkých proteinů a vliv přítomnosti iontů Mn^{2+} na vznik a aktivitu kanálů je velmi zajímavé a zasloužilo by si podrobnější studii. Protože zatím není znám mechanismus, který vede

k formování, otevírání a zavírání těchto kanálů, zůstává sporné, zda změny chování kanálů v přítomnosti iontů Mn^{2+} ukazují, že protein obsazený iontem snáze formuje komplex s ostatními, nebo zda již zformovaný komplex mění propustnost pro ionty a zda to přímo souvisí i s aktivním transportem iontů.

K interpretační části práce mám dvě poznámky.

Tvorba pozorovaných vodivých kanálů je v této práci dávána do souvislosti s α -šroubovicovou konformací proteinu, zřejmě proto, že je to předpokládaná převládající struktura těchto částí v nativním proteinu MntH a i proto, že zastoupení této konformace narůstá v nepolárním prostředí a v kontaktu s membránou. Považuji za důležité připomenout, že řada oligomerních proteinů vytváří transmembránový pór i v konformaci β -skládaného listu (β -barrel) a dokonce v této konformaci stačí jen 9 aminokyselin k překonání membrány, na rozdíl od více než 20 aminokyselin potřebných v uspořádání α -šroubovice. Vzhledem k tomu, že CD spektra ukazují, že asi 30% proteinu přetrvává v konformaci β -skládaného listu i v kontaktu s membránou, nemůžeme vyloučit formování kanálu z β skládaných listů.

V otázce interpretace proudových měření kombinací různých proteinů se domnívám, že výsledek nepřítomnosti funkčních kanálů není neúspěch, ale může naopak být dokladem interakce proteinů blízké přirozenému stavu. Při kombinaci stejných proteinů dochází zřejmě k shlukování tak, že hydrofilnější části dohromady tvoří kanál, který v přirozeném stavu nevzniká, zatímco hydrofobní části molekuly směřují dovnitř membrány. Při kombinaci dvou různých proteinů mohou vznikat heterodimery a tím i konfigurace která je bližší přirozenému stavu. Vazebná místa pro ionty na interagujících transmembránových segmentech by měla být v jedné konformaci dostupná jen z jedné strany membrány a teprve po konformační změně by měla být dostupná z druhé strany. Protože dva transmembránové segmenty jsou jen velmi omezený model celého proteinu, nemůžeme předpokládat, že by k takové koordinované konformační změně docházelo. V této situaci by existence dlouhodobě otevřeného póru ukazovala, že konfigurace v dimeru je vzdálená přirozené situaci a je neslučitelná s transportní funkcí. Proto nepřítomnost kanálů ve smíšených vzorcích můžeme považovat za pozitivní výsledek.

Přiložené otázky nijak nesnižují úroveň předkládané práce. Autorka zvládla složité experimentální metody, prokázala schopnost samostatné vědecké práce a splnila požadavky kladené na disertační práci a proto si dovoluji doporučit předkládanou práci k dalšímu řízení.

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

V Praze 12.8.2010

