

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Věry Ňuňukové

**Biophysical studies of membrane transport proteins from Nramp/MntH family and their function**

Disertační práce Mgr. Ňuňukové popisuje studie zabývající se strukturou membránového přenašeče divalentních iontů MntH. Vzhledem k obtížím s izolací kompletního proteinu autorka pracovala s peptidy, jež odpovídají vybraným transmembránovým segmentům. U nich potom analyzuje sekundární strukturu pomocí CD spektroskopie a sleduje vodivost pomocí metody patch-clamp v závislosti na složení okolního prostředí a přítomnosti dvojmocných iontů.

Práce je psaná anglicky, nicméně vliv mateřského jazyka autorky je dosti patrný a některé pasáže jsou hůře srozumitelné. Teoretický úvod je logicky řazený a autorka postupuje od membránových přenašečů obecně přes uvedení rodiny Nramp až k popisu významu jednotlivých transmembránových helixů. Za slabší část úvodu považuji obrázky, které jsou většinou převzaté a jejich popisky jsou často nedostatečné (viz níže). Metodická část popisuje širokou škálu experimentálních metod, z nichž je patrné, že práce vyžadovala multidisciplinární přístup, není však jasné, které metody používala autorka sama. Výsledková část je souborem CD spekter a záznamů z patch-clampu se stručným komentářem, kde autorka systematicky sleduje vliv okolního prostředí na strukturu jednotlivých TM helixů. V diskuzi potom autorka demonstruje, že má slušný přehled o současné literatuře týkající se studované problematiky. Postrádám ovšem zamyšlení nad přesností používaných metod a diskuzi z hlediska terciální, popř. kvartérní struktury proteinu. Přílohy k práci tvoří obrázky dalších CD spekter, ovšem bez jakéhokoliv komentáře člověku, který není expertem na CD spektroskopii, příliš nepomůžou. Více bych ocenil např. kopie autorčinych publikací nebo srovnání sekvencí DMT1 s MntH, což by bylo nápomocné při čtení kapitoly 1.4.2 (s.23), kde je popisován význam jednotlivých reziduí DMT1.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

Prosím o vyjasnění, které experimenty dělala autorka osobně, kde musela vypracovat metodiku a kde použila již vypracovanou metodiku. Jaký byl její podíl na publikacích?

s.10 – Jak mám rozumět výrazu „weakly cation-selective ion channels“?

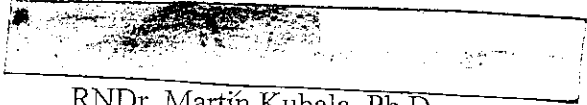
s.16-19 – V jakých buněčných membránách se nacházejí jednotlivé přenašeče rodiny Nramp?

s.19 – Obr. 1.4 má nedostatečný popisek. Proč jsou některá rezidua v kolečku, jiná ve čtverečku a další v trojúhelníčku? Na základě čeho byla některá rezidua umístěna do TM

- helixů ? Jaký je význam segmentu, který je označen jako CTM a který vypadá, že je částečně zanořen do membrány ?
- s.21 -- HFIP jsem nenašel v seznamu zkratk
- s.23, konec předposledního odst. -- Autorka uvádí, že TMS6 má strukturu helix-loop-helix. Je zde nějaká podobnost sekvence s jiným přenašečem divalentních iontů  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázou ze sarko(endo)plazmatického retikula (SERCA), jejíž TMS4 tento motiv také obsahuje ? Dále poukazuje na dva konzervované histidiny. Může zde být nějaká podobnost s histidinovou kotvou využívanou v afinitní chromatografii pro specifickou vazbu dvojmocných iontů ?
- s.24 -- Obr. 1.5 má nedostatečný popis. O který protein se jedná ? Proč jsou některá rezidua v kolečku, jiná ve čtverečku, atd. ? Proč mají různé barvy ?
- s.28 -- Co znamená  $\rho$  v rovnici (2) ?
- s.30, 2.ř. -- Autorka často uvádí jen „manganese or magnesium“ (chybí „cations“).
- s.30, 26.ř. -- Uvedení rychlosti centrifugace 14000 rpm bez uvedení značky centrifugy a typu rotoru neumožňuje reprodukovat experiment. Standardní je uvádět přetížení v násobcích g.
- s.34 -- Jaký byl způsob detekce v HPLC ?
- s.34 -- V převzatém obrázku 2.3. zůstal nevhodný text.
- s.37-39 -- Autorka usuzuje na to, že sekundární struktura TMS1 souvisí s tím, v jaké fázi je lipidová membrána. Zkoušela udělat nějakou teplotní závislost ?
- s.40 -- Autorka komentuje změny v sekundární struktuře po navázání iontů, např. větší podíl  $\alpha$ -helixů o 2%, nižší podíl  $\beta$ -strandů o 5%, atd. Jsou tyto změny signifikantní (s přihlédnutím k tomu, že peptid má 28 reziduí a tudíž změna o 1 reziduum odpovídá změně asi o 4%) ?
- s.42 -- Autorka usuzuje, že TMS1 tvoří v membráně oligomery. Zkoušela dělat nějakou koncentrační závislost ? Očekává se, že celý MntH tvoří oligomery ?
- s.51 -- Proč byl His211 v TMS6 mutován právě na Arg nebo Ala ?
- s.60 -- Proč jsou zelené body ve Fig. 3.15 A a C fitovány přímkou ?
- Z biologického hlediska nejzajímavější mi přijdou směsi různých TMS, autorka proměřovala ale pouze směsi 1+3 a 1+6. Proč nebyly vyzkoušeny i kombinace 3+6 nebo 1+3+6 ?

Studium struktury proteinů je velmi obtížné a to zvláště u transmembránových proteinů. Často vyžaduje multidisciplinární přístup, jak demonstruje i předložená práce a je zřejmé, že zavádění nových metodik je spojeno s řadou těžkostí. Proto práci i s uvedenými výhradami **doporučuji k obhajobě.**

V Olomouci, dne 12.8.2010

  
RNDr. Martiín Kubala, Ph.D.