

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DOKTORSKOU DIZERTAČNÍ PRÁCI

Mgr. MARTINA ŠTEFLA

„Studium modelových membrán, proteinů a protein-membránových interakcí pomocí různých fluorescenčních technik“

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Martina Štefla si kládla za cíl přispět pomocí fluorescenčních technik (převážně fluorescenčních mikroskopických technik) k hlubšímu pochopení úlohy lipidů v membránách a v interakcích mezi bílkovinami a lipidy. Práce je zaměřena na vývoj fluorescenčních metod aplikovatelných na modelové membrány, pomocí těchto metod k popisu dynamiky membrány, úlohou jednotlivých lipidů ve struktuře membrány a ke studiu interakcí protein – lipid.

První část doktorské disertační práce je věnována otázce, zda-li je fázorová analýza dohasínání fluorescence aplikovatelná pro studium organizace modelových membrán a proteinových struktur a zda fázorový diagram přináší nové pohledy k interakcím mezi lipidy a proteiny. Autor prokázal, že použití fázorové analýzy při měřeních v kyvetě je zcela komplementární metoda k dalším analytickým postupům. Fázorová analýza umožňuje jednoduchou kvantifikaci heterogenity vzorků a zjednodušuje přístup k procesům excitovaných stavů. Jsou popsány možné aplikace fázorové analýzy ke studiu vnitřní fluorescence proteinů, kdy pomocí této metody může být komplexní parametr, jako je dohasínání fluorescence, převedeny pouze do jednoho bodu. Vnější faktory jako vázání ligandu k bílkovině nebo denaturace bílkoviny způsobují změny v okolí jednotlivých amino kyselinových residuí a změny pozic fázorových bodů.

Ve druhé části doktorské disertační práce použil autor fázorovou analýzu k charakterizaci membránových nanodomén. Na základě získaných experimentálních dat bylo zjištěno, že kvalita dat pro určování membránových struktur pomocí přenosu energie je značně závislá na partičním koeficientu donorů a akceptorů. Dále se zjistilo, že membránové nanodomény jsou velice heterogenní co týče velikosti, rigidity a dynamiky a došlo k závěru, že tvorba nanodomén je převážně závislá na přítomnosti a množství sfingolipidů v membráně.

Ve třetí části práce je ukázáno, že při charakterizaci membránové interakce slabě vázaného proteinu prothrombinu z-scan FCS v kombinaci s vhodným matematickým modelem je pro analýzu velmi vhodná metoda k určování dynamiky slabě vázaného proteinu, i když je zřejmé, že protein je vázán na membránu. Laterální pohyb prothrombinu je dvakrát pomalejší, což zřetelně souvisí s mechanismem vazby.

V předložené práci Mgr. Martin Štefl použil široké spektrum biofyzikálních a biochemických metod. Bylo získáno velké množství výsledků, které byly publikovány v několika velmi kvalitních mezinárodních časopisech. Mám jen několik drobných připomínek k nepřesnostem a nejasnostem v textu.

Na str.30 rovnice (9) je asi chybně. Z rovnice (5), která je správně to nevychází. T_{r+nr} nemůže být součet života.

Na str. 31 metoda měření dob života metodou „time resolved“ je popsána trochu nejasně, není tam vůbec zmíněno, že je podstatné budit fluorescenci velmi krátkým impulsem světla.

Na str. 32 a doprovodný text ke článku IV

„sixth root of the donor – akceptor distance“ a „due to 1/6 power dependence“ je chybně – závislost je $1/R^6$ a ne $R^{1/6}$ nebo 6 odmocnina.

Na str. 44 komentář k obrázku 14 v textu – 6/8 je trochu zmatené. Teprve v článku je možné najít , že jde o 6M GdHCl a 8M močovinu.

Ke všem těmto drobným nepřesnostem došlo zřejmě při přepisování z článků.

Z formálního hlediska je disertační práce napsána velmi kvalitně, lze ocenit použitý styl založený na použití již publikovaných prací. Rád bych požádal autora o zodpovězení následujících otázek v rámci diskuse:

1) nerovnoměrné obarvení liposomů odráží rozdělení membrány na domény či jsou nějaké jiné důvody?

2) jsou nějaké informace , jak rychle působí cholera toxin na separaci jednotlivých fází lipidové membrány a jestli je tento proces reversibilní?

3) jsou známy možnosti využití aminokyselinového zbytku tyrosinu při detekci změn konformace a denaturace proteinů?

Závěrem lze shrnout, že autor prokázal schopnosti k samostatné vědecké činnosti. Doktorská disertační práce je na vysoké úrovni a proto doporučuji, aby Mgr. Martinu Šteflovi byl udělen titul PhD.

V Praze dne 31.10.2012

Ing. Jan Teisinger CSc