

Oponentský posudek na diplomovou práci Lenky Beranové:

Studium funkce bakteriálních transportérů dvojmocných iontů

Cílem předložené práce je v podstatě vývoj a optimalizace fluorescenčních metod sloužících ke studiu membránového transportního proteinu MntH bakterie *E. coli* pro transport dvojmocných kovových iontů (Me^{2+}). Tento protein patří k rodině transportních proteinů Nramp/MntH, které nalézáme u bakterií, kvasinek, rostlin i živočichů. Jelikož dvojmocné kovové ionty jako železo, mangan, měď nebo zinek mají svoji nezastupitelnou úlohu v důležitých metabolických drahách a zároveň ve vyšších koncentracích mohou působit nepříznivě, má studium jejich toků základní význam pro pochopení adaptace buněk k měnícím se životním podmínkách i pro pochopení některých patologických procesů (poruchy metabolismu železa) na úrovni mnohobuněčných organismů. Diplomová práce se tedy věnuje zajímavému a aktuálnímu tématu s možností dalšího využití.

Teoretická část podává v přiměřeném rozsahu přehled základních poznatků o studovaném systému v návaznosti na charakterizování transportu látek přes biologické membrány a biologické role dvojmocných kovových iontů a jejich transportérů u různých druhů organismů. Také jsou zde uvedeny základní experimentální metody používané ke studiu transportních vlastností proteinů z rodiny Nramp/MntH. V metodické části práce jsou popsány postupy pěstování bakteriálních buněk pro fluorescenční experimenty, použité bakteriální kmeny, metody barvení buněk fluorescenčními sondami, přístrojové vybavení a základní způsoby fluorescenčních měření, které byly použity ke sledování transportních procesů na membráně.

Část věnovanou výsledkům a diskusi lze rozčlenit na dva díly, na díl věnovaný fluorescenčním metodám umožňujícím měřit transport Me^{2+} dovnitř buňky přímo a na díl, kde je tento transport měřen nepřímo prostřednictvím sledování vnitrobuněčné koncentrace protonů. Předpokladem přímých měření koncentrace dvojmocných iontů uvnitř buňky je úspěšné obarvení bakteriálních buněk sondou citlivou na příslušný typ iontů, v tomto případě sondou fura-2. Fluorescenční odezva této sondy k jednotlivým iontům byla ověřena měřeními emisních spekter sondy v pufru při různých koncentracích iontů, byly charakterizovány základní způsoby odezvy k různým kovovým iontům. Pro barvení bakterií byly v zásadě použity dvě metody, barvení elektroporací krátkými pulsy a barvení acetoxymetylerem fluorescenční sondy. Byly optimalizovány základní parametry elektroporace tak, aby v ideálním případě byly buňky dostatečně obarveny bez výrazného ovlivnění jejich fyziologického stavu. To se však i přes testování odlišných protokolů nezdařilo, ať už z důvodu přítomnosti sondy pouze v periplasmatickém prostoru nebo poškození integrity plasmatické membrány při elektroporaci. Také barvením acetoxymetylerem sondy se nedosáhlo uspokojivého výsledku, ani v případě sféroplastů s redukovanou buněčnou stěnou, kde pravděpodobně nedošlo k dostatečnému rozštěpení molekul sondy buněčnými esterázami. Další práce se proto soustředila na měření základních enzymatických charakteristik, jako jsou K_m a v_{max} , transportéru MntH sledováním vnitrobuněčné koncentrace protonů prostřednictvím fluorescenční varianty GFP citlivé k pH, pHluorinu. Tato zavedená metoda byla testována k použití pro určení vlivu cílených bodových mutací na funkci transportéru. Bylo prokázáno zvýšení citlivosti metody při měření za vyšších teplot. Byly změřeny aktivační energie transportu protonů indukovaného Cd^{2+} pro mutanty zajímavé z hlediska vztahu struktury a funkce transportéru MntH. Na závěr jsou prezentovány první odhady pro aktivační energie transportu protonů indukovaného Mn^{2+} .

Pro přečtení práce mám na diplomanta několik doplňujících dotazů a formálních poznámek:

1. Zajímalo by mě, v jakých hladinách se pohybují fyziologické koncentrace dvojmocných kovových iontů v bakteriálních nebo jiných buňkách? Jak odpovídají tyto vnitrobuněčné hladiny kovových iontů prahům citlivosti fluorescenční sondy fura-2?
2. Na str. 41 se píše, že v cytosolu obarvených sféroplastů je přítomna nejen fura-2, ale ve stejné či vyšší míře i nerozložená fura-2-AM. Fluoreskuje acetoxy-metylester sondy fura-2 méně než vlastní sonda? Jak tedy vypadá jeho fluorescenční spektrum, posouvá se směrem k delším vlnovým délkám? Mění se nějak fluorescenční odezva sondy fura-2 v přítomnosti proteinů nebo jiných vnitrobuněčných struktur? Byl pozorován vývoj spektra obarvených sféroplastů v čase?
3. Na str. 48 se píše, že počáteční pH, předpokládám, že uvnitř buňky, vzorků se lišilo jak pro jednotlivé kmeny, tak pro jednotlivé pokusy. Byly rozdíly mezi jednotlivými mutantami statisticky významné? Počítá se při výpočtu změny koncentrace protonů, vzorec [2] na str. 28, nějak s pufrační kapacitou cytosolu? Závisí tato pufrační kapacita na pH?
4. Na str. 48 se píše, že protein nesoucí mutaci H211Y byl za pokojové teploty neaktivní. Nebylo by správnější napsat, že aktivita tohoto proteinu nebyla za pokojových teplot použitou metodou měřitelná? Zvláště když se vzápětí bere v úvahu možnost ovlivnění enzymatických charakteristik K_m a v_{max} touto mutací a závislost transportu protonů na teplotě se používá k výpočtu aktivační energie pro tuto mutaci.

Celkově je práce velmi pečlivě a přehledně zpracována, jen bych doporučil sjednotit styl písma v oddílu Literatura. Diplomantka prokázala důkladné porozumění použitým metodám fluorescenční spektroskopie. Aktivně se seznámila s příslušnými postupy použití fluorescenčních sond v buněčné biologii, byla schopná je optimalizovat a cíleně měnit, což je základní předpoklad úspěšné práce v této oblasti. Zároveň se jí podařilo skloubit fyzikální přístupy a metody s jejich biologickým použitím, osvojila si biologické základy řešeného problému a potřebné základní mikrobiologické a biochemické laboratorní techniky.

Na závěr lze říci, že prezentovaná diplomová práce splnila svůj základní cíl, tj. optimalizovat a testovat použití fluorescenčních metod pro studium funkce bakteriálních transportérů dvojmocných iontů. Diplomantka zadaný úkol řešila samostatně a ve více než dostačující míře prokázala svoji schopnost aplikovat biofyzikální základ na řešení biologických či biochemických problémů. Doporučuji proto práci hodnotit stupněm **v ý b o r n ě**.

RNDr. Aleš Holoubek, PhD.
Laboratoř biologie kvasinkových kolonií
Přírodovědecká fakulta UK
Viničná 5, 128 44 Praha 2

V Praze 22. 5. 2007

