

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Marie Olšinové nazvanou: „The effect of peptides derived from protein transmembrane domains on membranes“

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce Mgr. Marie Olšinové bylo studium biofyzikálních dějů, které se podílejí na regulaci organizace biologických membrán, konkrétně vlivu transmembránových peptidů na vlastnosti lipidové dvojvrstvy. Jedná se o téma zajímavé a aktuální vzhledem ke stále nedostatečnému pochopení těchto interakcí. Výsledky práce lze rozdělit na tři části. V první se autorka věnovala vývoji fluorescenčních značek umožňujících studium vlastností membrán, v druhé části se zaměřila na výběr lipidů, které by umožnily optimální studium transmembránových peptidů, a třetí část je věnována biofyzikální charakterizaci modelových membrán s transmembránovými peptidy.

Disertační práce Mgr. Marie Olšinové má bez příloh 102 stran, je psána anglicky zkrácenou formou, tedy jako komentovaný soubor publikací doktorandky. Komentáře jednotlivých publikací jsou dostatečně detailní a zahrnují i obrázky prezentující klíčové výsledky. Celkovým rozsahem se tak tato disertační práce blíží pracím psaným klasickou formou. V teoretickém úvodu autorka popisuje základní vlastnosti buněčné membrány a modelových membrán a dále principy metod fluorescenční spektroskopie, které byly v práci použity. Následují cíle práce, experimentální část založená na čtyřech publikacích (tři z nich již byly publikovány), závěr a přehled citované literatury.

První publikace se týká charakterizace molekulárních rotorů na bázi fluoroforu BODIPY. Molekulární rotory obsahují jak elektron-donorovou, tak i elektron-akceptorovou skupinu a lze je použít jako sond pro studium membránové fluidity. To však vyžaduje, aby elektronová excitace rotoru způsobovala dostatečně velkou konformační změnu doprovázenou změnou kvantového výtěžku. V rámci této studie bylo připraveno několik variant molekulových rotorů s BODIPY lišících se počtem alifatických řetězců a byla provedena detailní charakterizace jejich fluorescenčních vlastností včetně určení jejich umístění v membránách různého složení. Na základě získaných dat bylo konstatováno, že připravené látky lze použít ke studiu struktury (fluidity) membrán. Nicméně díky nejednoznačné lokalizaci sond v heterogenní membráně a vlivu lipidového složení na dobu života excitovaného stavu je toto využití omezeno na membrány s jednoduchým či přesně daným složením.

V druhé publikaci byla studována tvorba a vlastnosti lipidových nanodomén v modelových membránách prostřednictvím metod FCS, FLIM-FRET a Monte Carlo simulací. Tvorba nanodomén byla indukována prostřednictvím β -podjednotky proteinového komplexu toxinu

cholery. Tato studia ukázala existenci nanodomén, které nejsou díky své velikosti detekovatelné pomocí standardních mikroskopických technik.

Třetí část výsledků je tvořena dvěma publikacemi, které se zabývají interakcemi periferních a transmembránových peptidů s lipidy. Nejdříve byl vypracován postup pro určení orientace peptidů v lipidové dvojvrstvě metodou TDFS (Time dependent fluorescent shift) s využitím sondy Laurdan. V poslední publikaci se pak autorka věnovala studiu vlivu přítomnosti transmembránových peptidů na vlastnosti membránových lipidů. Jako modelový systém byl použit peptid LW21 a fosfolipid DOPC. Následně byl studován vliv peptidu na dynamiku lipidů. Bylo zjištěno, že přítomnost peptidu snižuje mobilitu lipidů a tím zvyšuje viskozitu membrány. Pro molekulární interpretaci byly následně provedeny MD simulace. Získané výsledky ukázaly, že molekuly lipidů nespécificky a transientně interagují s povrchem α -helikálního peptidu, což má za následek již zmiňované zvýšení viskozity membrány a redukci laterální difuze membránových komponent.

Práce je psána srozumitelnou angličtinou s minimem překlepů a z formálního hlediska je zcela v pořádku. Mgr. Marie Olšinová je první autorkou dvou ze čtyř publikací, které tvoří jádro disertační práce. Předložená disertační práce tak jasně ukazuje, že Mgr. Marie Olšinová získala značné zkušenosti v celé šíři metod fluorescenční spektroskopie a jejich využití při studiu fyzikálně-chemických vlastností biomembrán.

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Marie Olšinová představuje cenný přínos nejen ke studiu interakcí transmembránových peptidů s lipidy, ale i k vývoji a využití metod fluorescenční spektroskopie pro studium vlastností biomembrán. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, většina výsledků již byla publikována. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Marie Olšinové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.

V Praze 12. dubna 2018

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Katedra fyz. a makromol. chemie
Přírodovědecká fakulta UK, Praha

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. Proč byl vybrán právě BODIPY pro přípravu molekulárních rotorů? Většina připravených derivátů (Obr. 13, Tabulka 1) vykazovala velmi nízké kvantové výtěžky. Můžete uvést nějaké další vhodné fluorofory, které by se daly pro tento účel využít.

2. Napadá Vás, jak by se dal vyřešit problém s preferenční lokalizací BODIPY rotorů do oblastí membrány s vyšší fluiditou?
3. V druhé části výsledků hovoříte o přípravě nanodomén pomocí „cross-linkingu“. Pod tímto pojmem si představím chemické zesíťení, tedy kovalentní spojení různých molekul či skupin pomocí vhodných činidel. Vy jste ale využila β -podjednotku proteinového komplexu toxinu cholery. Jak přesně dochází ke vzniku nanodomén? Nejedná se zde spíše o velmi silnou nekovalentní vazbu lipidů na povrch proteinu?
4. Jedním z hlavních závěrů publikace č. IV je, že nespecifické a **transientní** interakce annulárních lipidů s povrchem transmembránového peptidu ovlivňují viskozitu membrány a laterální difuzi membránových komponent. To se ale poněkud liší od klasického pohledu na annulární lipidovou vrstvu integrálních membránových proteinů, kde se předpokládá, že tyto lipidy interagují s povrchem proteinu **velmi silně** a proto je jejich mobilita značně omezena. Můžete tento rozdíl komentovat a vysvětlit na jakém základě předpokládáte, že interakce annulárních lipidů s TMD jsou transientní?