



**Ústav fyzikální chemie
J. Heyrovského**

Dolejškova 2155 / 3, 182 23 Praha 8
IČ: 61388955, DIČ: CZ61388955
Telefon: 26605 3745
e-mail: sykora@jh-inst.cas.cz

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Dominika Pinkase

Mgr. Jan Sýkora, PhD.

Disertační práce Mgr. Dominika Pinkase s názvem: „Protektivní efekt kardiolipinu v membráně a další molekulární detaily mechanismu účinku surfaktinu“ je pečlivě vypracovaným spisem, který je přehledně členěn. V úvodu je názorně a důkladně nastíněna problematika ribosomálních i neribosomálních membránově aktivních peptidů, jsou přehledně uvedeny různé architektury jejich molekul a detailně shrnuty mechanismy jejich působení. V první části disertace je dále srozumitelným způsobem přiblížena problematika syntetických analogů pórotvorných antibiotik a na závěr zevrubně popsána struktura a mechanismus působení surfaktinu.

Po úvodu následuje metodická část, která je rovněž pečlivě vypracována. Jsou zde shrnuty všechny použité metody zahrnující širokou škálu experimentálních přístupů sahající od biochemických (izolace cytoplazmatických membrán a lipidů, atd.), biologických (kultivace bakteriálních kultur, příprava spórových konzerv, atd.) až po fyzikálně chemické (měření vodivosti planárních membrán, měření kinetiky lyze lipozomů, elektronová mikroskopie, atd.). Všechny experimentální metody jsou popsány v dostačujících detailech včetně způsobu zpracování naměřených dat, což usnadní případné opakování experimentů.

V další kapitole jsou shrnuty výsledky, které se týkají zejména působení surfaktinu na modelové lipidové systémy a živé mikroorganismy. Tato sekce je logicky uspořádána a naměřená data jsou přehledně prezentována jak v textové tak grafické podobě. Navazující diskuze potom obdržené výsledky zasazuje do souvislosti s již publikovanými daty a aktuální literaturou, přičemž data věcně interpretuje, aniž by se uchylovala k neobjektivnímu výkladu.

Disertační práce je zakončena stručným závěrem, který výstižně shrnuje nejdůležitější dosažené výsledky. Jedná se zejména o objasnění mechanismů, jimiž se mikroorganismus *B. subtilis* adaptuje na přítomnost surfaktinu, lipopeptidu s antimikrobiální aktivitou, jenž sám produkuje. Dále byl na modelových lipidových systémech a na živých organismech zdokumentován význam lipidu kardiolipinu jako důležitého faktoru při ochraně proti působení surfaktinu. Větší prostor je také věnován experimentální charakterizaci desintegrace lipidové membrány surfaktinem, zejména potom permeabilizaci způsobené tvorbou pórů. Vzhledem ke značné heterogenitě vzniklých porů se bohužel nepodařilo nalézt přesný molekulární mechanismus, jakým surfaktin intereaguje s buněčnou membránou. Nicméně už samotný popis obrovské různorodosti agregátů

surfaktinu na membráně, jež ji narušují ať už tvorbou pórů či solubilizací, je přínosný pro pochopení účinku tohoto lipopeptidu. V rámci práce je objevené i zjištění, že surfaktin v micelární podobě je méně účinný než jako monomer, neboť tento faktor je často přehlížen při studiu membránově aktivních amfifilních látek.

K práci bych rád vznesl následující dotazy:

1) Bylo by možné detailněji probrat možné příčiny vyšší odolnosti modelových membrán tvořených syntetickými lipidy vůči surfaktinu v porovnání s membránami tvořenými nativními lipidy? Tento zajímavý efekt není intuitivní vzhledem k vyšší variabilitě lipidového složení jak u SF+ tak SF- extraktů, která by mohla mít vyšší protektivní efekt proti působení surfaktinu?

2) Přítomnost kardiolipinu byla identifikována jako jeden z důležitých faktorů pro zpomalení účinku surfaktinu na biomembrány. V práci jsou zmíněny důvody jako zvýšení celkového negativního náboje membrány nebo omezení tvorby či efektivity vodivého komplexu. Kardiolipin přitom může indukovat tvorbu vysoce zakřivených membrán, v některých případech dokonce tvorbu invertované hexagonální fáze. Mohl by být i tento efekt spoluzodpovědný za ochrannou schopnost tohoto lipidu proti působení surfaktinu?

3) Měření vodivostí na BLM odhalila velice širokou distribuci sahající od jednotek pS až po desítky nS. Bylo by možné přibližně dovodit z naměřených hodnot vodivostí velikosti pórů? Dalo by se odhadnout, jaká vodivost by zhruba korespondovala velikosti póru, která byla zjištěna pomocí elektronové mikroskopie?

Celkově je třeba říci, že tato disertační práce má výbornou kvalitu jak po obsahové, jazykové tak i grafické stránce. Mgr. Dominik Pinkas jí pečlivě vypracoval a prezentované výsledky přinášejí nový a originální vhled do adaptace/tolerance *B. Subtilis* vůči antimikrobiálnímu lipopeptidu surfaktinu. Vysokou úroveň prezentovaného výzkumu dokazuje publikační aktivita Mgr. Dominika Pinkase. Obdržené výsledky související s předloženou disertací byly publikovány ve formě 3 příspěvků v impaktovaných časopisech, z toho jeden je prvoautorský. Mgr. Dominik Pinkas je navíc spoluautorem řady dalších publikací dokazující jeho široký vědecký záběr. To je mimo jiné dokumentováno širokou paletou experimentálních přístupů, které dokázal do hloubky ovládnout a aplikovat. Ty sahají od biologických přístupů až po náročné fyzikální experimenty elektronové mikroskopie a vodivostních měření spolu se sofistikovanými způsoby vyhodnocování výsledků zahrnující např. komparativní analýzu kinetik lyze lipozomů.

Z výše uvedených důvodů plně doporučuji tuto disertační práci k obhajobě.

V Praze dne 29. 8. 2024


Mgr. Jan Sýkora, PhD.