



Mgr. Ladislav Bumba, PhD.

Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens

Institute of Microbiology

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

Tel: 241 062 016

E-mail: bumba@biomed.cas.cz

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Dominika Pinkase s názvem „Protektivní efekt kardiolipinu v membráně a další molekulární detaily mechanismu účinku surfaktinu“.

Předložená disertační práce se zabývá mechanismy, kterými bakterie *Bacillus subtilis* odolává toxickým účinkům vlastního produktu surfaktinu, cyklického lipoheptapeptidu s výraznými povrchově aktivními vlastnostmi. Surfaktin je znám svou schopností narušovat bariérovou funkci membrán, avšak detaily tohoto procesu, a především ochranné mechanismy producenta nejsou dosud uspokojivě objasněny. Téma práce je aktuální a přináší příspěvek k pochopení mechanismů bakteriálních adaptačních strategií. Autor systematicky zkoumá vliv lipidového složení membrány na její permeabilizaci surfaktinem. Výzkum je dobře navržen a využívá kombinaci experimentálních technik, včetně měření kinetiky úniku fluorescenčních sond z lipozómů, kapilární elektroforózy, molekulární dynamiky, hmotové spektrometrie, elektronové mikroskopie a elektrofyziologických měření. Autor odhaluje význam použití různých rozpouštědel (DMSO vs. voda) v zásobních roztocích surfaktinu a jeho vliv na účinnost permeabilizace. Dále je detailně analyzován vliv různých lipidových složení membrán na jejich odolnost vůči surfaktinu. Zvláštní pozornost je věnována roli kardiolipinu, který se ukazuje jako klíčový faktor v ochraně membrány před účinky surfaktinu.

Formálně je práce členěna do kapitol Cíle práce, Literární přehled, Materiál a Metody, Výsledky, Diskuze a Závěr spolu se seznamem použité literatury. Cíle disertační práce jsou jasně vytyčené a v souladu s rozsahem práce. Nicméně, zařazení kapitoly Cíle práce před Literární přehled není obvyklé a je vhodnější tuto kapitolu umístit až po seznámení čtenáře s řešenou problematikou, tj. minimálně za kapitolu Literární přehled. Kapitola Literární přehled je velmi dobře napsána a seznamuje čtenáře s obecnými informacemi o struktuře a složení lipidických membrán, mechanismech resistance vůči antibiotikům, a struktuře a funkci antimikrobiálních látek cílící na buněčnou membránu. Jednou z nich je i cyklický lipoheptapeptid surfaktin, kterému je dále věnována velká pozornost a je hlavním objektem výzkumu. Kapitola Materiál a Metody detailně popisuje informace o použitých chemikáliích a pracovních postupech. Výsledková část práce popisuje výsledky experimentů, které jsou více či méně součástí tří vědeckých prací, jež

prošli recenzním řízením a jsou publikovány v respektovaných mezinárodních časopisech. Na jedné z nich (BBA-Biomembranes) je autor prvním autorem a na dalších dvou pracích (BBA-Biomembranes a Scientific Reports) je spoluautorem. Autor je dále spoluautorem minimálně dalších 13 vědeckých prací, které nejsou součástí této práce. Nicméně ale dobře dokumentují jeho odbornou expertízu a široké zapojení do vědecké komunity. V kapitole Diskuze jsou získaná data porovnána s výsledky dalších relevantních studií. Kapitola Závěr stručně, ale výstižně shrnuje získané poznatky.

Disertační práce je napsána v českém jazyce, velmi čtivou formou a s minimem překlepů a gramatických chyb. Práce se dále vyznačuje velmi dobrou grafickou úpravou, včetně obrazové dokumentace. Nicméně, moji nejzásadnější připomínkou k celé práci je samotná prezentace dat v grafech. Většina datových řad v grafech je prezentována pouze jako jedno měření bez uvedení standardní chyby měření, a zároveň chybí i informace o případném počtu opakování jednotlivých měření. Na druhou stranu je třeba zmínit, že určitá kvantifikace dat je uvedena v Tabulce V1 (str. 53). Nicméně detailní pohled na data v tabulce odhaluje, že pro jednotlivé koncentrace surfaktinu existují pouze dvě sady parametrů (amplituda, poločas a Hillův koeficient), kde navíc jejich hodnoty jsou mezi sebou značně rozdílné (např. pro koncentraci surfaktinu 10 μM , SF+, jsou hodnoty poločasu 31 oproti 935, a hodnoty amplitudy 8 proti 69). Znamená to, že výsledná data jsou získána pouze z těchto dvou měření, a výsledné kinetické parametry jsou získány průměrováním těchto hodnot?

I přes tyto kritické připomínky, práci lze hodnotit jako velmi kvalitní, přinášející nové poznatky do oblasti mikrobiální biochemie a membránové biologie. Autor prokázal schopnost kritického myšlení, dovednost v experimentálním provedení i schopnost interpretovat výsledky. Závěrem lze konstatovat, že výsledky práce jsou originální a dle mého názoru, splňují požadavky pro získání akademického titulu PhD. Přeji autorovi hodně úspěchů v dalším vědeckém snažení a předloženou práci doporučuji jako podklad k obhajobě doktorského titulu.

Otázky k obhajobě:

- Molekula surfaktinu je charakterizována přítomností mastné kyseliny. Jaký má vliv délka mastné kyseliny na aktivitu surfaktinu?
- Surfaktin je standardně uváděn jako rozpustný v organických rozpouštědlech. Z jakého důvodu byl zásobní roztok surfaktinu použitý pro experimenty rozpouštěn v 10 mM NaOH?
- Kinetika lyze lipozomů v měřeních je charakterizována jak hyperbolickou, tak i sigmoidální křivkou. Jaké jsou důvody pro tak zásadní změny v kinetice lyze lipozomů?

- Přežívání bakteriálních buněk po vystavení surfaktinu bylo monitorováno pomocí fluorescenčního barvení s propidium jodidem. Bylo přežívání buněk také sledováno pomocí počítání životaschopných, na plotnách rostoucích, buněk (CFU counting)?
- Hmotnostní spektrometrie v zásadě slouží jako analytický nástroj a není primárně určen pro kvantifikaci dat. Jakým experimentálním přístupem bylo stanoveno množství surfaktinu na povrchu bakteriálních buněk?
- Měření na černých lipidových membránách ukázalo, že hodnoty vodivosti pro surfaktinový kanál se pohybují mezi 100-200 pS, což teoreticky naznačuje přítomnost spíše menšího kanálu (s průměrem ~1 nm) než toho, co byl pozorován v elektronovém mikroskopu (s průměrem ~6 nm). Je možné tyto rozdíly nějakým způsobem vysvětlit?
- poslední a spíše spekulativní otázka: Jakým způsobem přispívá přítomnost kardiolipinu k ochraně membrány před účinkem surfaktinu?

V Praze, 5.9.2024

Mgr. Ladislav Bumba, PhD.