

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce Mgr. Barbory Pomahačové

„Heterogenní exprese ABC transportéru v *Catharanthus roseus* (L.) G. DON“

Zájem o surovinové zdroje biogenního původu pro účely farmaceutické výroby je stále aktuální. Většina terapeuticky účinných látek se získává z rostlinného materiálu izolací, protože jejich příprava syntézou či semisyntézou je značně finančně náročná či komplikovaná. Využití biotechnologických metod založených na kultivaci rostlinných buněk *in vitro* je jednou z možností pro produkci terapeuticky významných látek. Optimalizace transportu na mezibuněčné či vnitrobuněčné úrovni může teoreticky vést ke zvýšení produkce sekundárních látek v kulturách *in vitro*.

Předložená disertační práce je zaměřena na studium transportních charakteristik berberinu v *Catharanthus roseus* na vakuolární i buněčné úrovni, přípravu transgenní tkáňové kultury *C. roseus*, ověření exprese transgenů a analýzu změn transportních charakteristik vybraných terpenových alkaloidů.

V obsáhlé kapitole „Teoretická část“ autorka uvádí informace o rostlině *Catharanthus roseus*, hlavních obsahových látkách a jejich biosyntéze. Podrobně je vysvětlena i kompartmentace biosyntézy, transportní mechanismy a strategie zvyšování produkce sekundárních látek.

Kapitola „Materiál a metody“ přináší popis rostlinného materiálu, chemikálií, přístrojů, včetně podrobného popisu izolace protoplastů a vakuol, izolaci genomové DNA a celkové RNA, stanovení alkaloidů, transformace buněk *C. roseus* a metodiku hybridizace.

Získané výsledky jsou shrnuty v tabulkách a grafech a vhodně okomentovány. Mnohé výsledky přinášejí cenné poznatky, z nichž uvádím:

- transport berberinu v suspenzní kultuře *C. roseus* nevykazuje závislost na ATP
- příprava transgenní kultury *C. roseus*
- důkaz transgenů CjMDR1 v cRNA a i genomové DNA u transgenních liniích *C. roseus*
- zjištění statisticky signifikantního potenciálu linie MDR pro akumulaci ajmalinu a tetrahydroalstoninu

Disertační práce o rozsahu 172 stran je doplněna seznamem 312 literárních odkazů, převážně nejnovějších publikací. Slohově je práce přehledná a srozumitelná, jen větší počet neopravených chyb a překlepů (str. 16, 24, 29, 35, 41, 51, 56, 58, 59, 60, 61, 67, 92, 94, 99, 121) trochu kazí dojem z výsledného zpracování této experimentálně náročné práce.

K práci mám následující připomínky:

- na str. 64 u tabulky č. 2 chybí nadpis

- citace č. 227 a 228 jsou duplicitní, v citacích č. 237, 261 a 294 jsou překlepy

- na str. 105 uvádíte v textu odkaz na graf č. 20, pravděpodobně se jedná o obrázek č. 20

Otázky:

- str. 21 - můžete uvést příklady, které rostlinné tkáňové kultury produkují více sekundárních metabolitů než intaktní rostlina
- str. 43 - mohla byste upřesnit, které flavonoidy mají inhibiční efekt na ABC transportéry
- str. 57 - znáte i jiné metody zvyšování produkce sekundárních látek v kulturách *in vitro* kromě genového inženýrství
- str. 105- předpokládám, že ke sterilizaci LC media jste používala autokláv, jaký tlak byl nastaven

Posuzovaná práce splňuje všechny požadavky kladené na doktorské disertační práce. Doporučuji, aby byl Mgr. Barboře Pomahačové na základě úspěšné obhajoby disertační práce přiznán akademický titul „doktor“ (PhD).

V Hradci Králové

Doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

9.8.2009



-