

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lydie Marešové „Úloha transportních systémů pro draselné kationty ve fyziologii *Saccharomyces cerevisiae*“

Předkládaná práce se zabývá studiem transportních systémů pro K^+ a jejich rolí pro udržení membránového potenciálu, důraz je položen na přenašeč *Kha1*. Menší část práce se zabývá heterologní expresí rostlinného přenašeče CPA2 v kvasince *S. cerevisiae*. Disertace vznikla ve Fyziologickém ústavu AV ČR a částečně ve spolupráci s Matematicko-fyzikální fakultou UK, kde autorka prováděla fluorescenční měření. Práce představuje obdivuhodný soubor konstruktů a transformovaných kmenů *S. cerevisiae* umožňujících definovat funkci a buněčnou lokalizaci studovaných proteinů. Práce je napsána velmi dobře s vysokou jazykovou úrovní. Grafická dokumentace je adekvátní a přehledně dokumentuje dosažené výsledky.

Po formální stránce je předložená disertace rozdělena standardně. Práce je uvedena **literárním přehledem** opatřeným instruktivním schématem draslíkových transportních systémů. Velmi pěkně zpracovaný a čtivý přehled poskytuje čtenáři dostatečný obraz o současném stavu znalostí transportu alkalických kationtů v kvasničné buňce v konfrontaci s obdobnými systémy vyšších organismů. Pouze v popisu transportního proteinu NSC1 na str. 22 autorka používá v souvislosti s nespecifickým iontovým kanálem NSC1 termín nízkoafinní iontový kanál. Vhodnější by bylo v této souvislosti použít termín rektifikující kanál o vysoké vodivosti (inward rectifying current), protože to, co autoři původního sdělení (Bihler et al. 2002) popisují, je kanál, který (1) v „nepřítomnosti“ vápenatých iontů vykazuje nezvykle vysokou vodivost, (2) chová se jako kanál s proměnlivou vodivostí a který (3) autoři dávají do souvislosti s nízkoafinním draslíkovým vstupem K^+ do buňky (K^+ uptake), který je možno pozorovat při delecích jiných transportních systémů.

Cíle práce jsou jasně formulovány, v následujícím textu jsou dosaženy a vznesené otázky jsou adekvátně zodpovězeny.

Metodická část je zpracována přehledně, chybí zde však popis použitých statistických metod. Při popisu metody na stanovení membránového potenciálu bych uvítal kalibrační křivku závislosti změn polohy maxima emisního spektra na membránovém potenciálu nebo alespoň kvantitativní údaj, jaké je maximum, jestliže extracelulární K^+ je rovno intracelulárnímu a jak se změní při zvýšení nebo snížení této koncentrace, tj. jestli se promítne depolarizace a hyperpolarizace závislá na K^+ v měřeném parametru. Tento údaj je důležitý při hodnocení kapitoly 5.10.

Výsledky jsou prezentovány přehledným způsobem a pečlivě dokumentovány, obrazová dokumentace je dobře srozumitelná. K uvedeným datům mám několik připomínek a otázek:

1. V obr. 5.6. je znázorněn růst transformovaných kmenů s promotory *KHAI* a *NHAI*, jak vypadá situace při použití silného promotoru *PMA1*?
2. Chová se membrána kvasinky jako „draslíková“ nebo „pH“ elektroda, tj. která vodivost určuje membránový potenciál (V_m) a v jakém rozmezí se V_m pohybuje?

Diskuse je poměrně stručná (10 stran), avšak dostatečná ke kritickému zhodnocení dosažených výsledků. V souvislosti s interpretací nálezů bych se rád zeptal:

1. Autorka předpokládá, že původně popsané fenotypové projevy mutace *Kha1* jsou pravděpodobně způsobené změnou metabolismu uracilu. Zajímalo by mne, jak je možno v této souvislosti interpretovat Ramírezem původně popsané zvýšení akumulace v K^+ v mutantech? Mění se obsah K^+ v buňkách během růstu?
2. Jaká je fyziologická funkce proteinu TOK, jehož delece nejvíce ovlivňuje membránový potenciál, přestože nemá žádný vliv na toleranci k vysokému K^+ (obr. 5.39) a ani neovlivňuje výstup z K^+ buňky (obr. 5.17)?
3. *Kha1* je uvažován jako antiport H/K, není možné uvažovat situaci, že reprezentuje H^+ kanál, už jenom proto, že je velmi málo závislý na K^+ ?

Závěr

Předložená disertace přináší nové a zajímavé poznatky o transportních proteinech *S. cerevisiae* a opravuje chybnou interpretaci některých dřívějších nálezů o transportu alkalických iontů u této kvasinky. Část nálezů byla publikována v časopise *Molecular Microbiology* a další dva rukopisy jsou v recenzním řízení. Autorka prokázala, že ovládá metody experimentální práce a má teoretické i praktické schopnosti k samostatné tvořivé vědecké práci. Předložená práce plně splňuje požadavky, které jsou kladeny na doktorskou disertační práci a proto doporučuji, aby Mgr. Lydii Marešové byl udělen titul „Ph.D.“ za jménem.

V Praze-Krči dne 16. 1. 2006

Doc. RNDr. Jirí Pácha, DrSc