

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

Mgr. L. Marešová předložila práci, která byla vypracována ve dlouhodobě velmi úspěšně pracující laboratoři Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR. Téma její práce úzce navazuje na dosavadní výsledky laboratoře. Úkolem disertantky bylo podrobně charakterizovat transportní systém Kha1, který v kvasinkové buňce hraje pravděpodobně spíše minoritní roli, ale o němž dosud byly jen kusé informace. Vzhledem k tomu, že studium genomu *Saccharomyces cerevisiae* pokročilo do fáze intenzivního studia funkce kódovaných proteinů, jedná se o téma značně aktuální.

Jak dokazuje předložená práce, věnovala se Mgr. L. Marešová tématu s velikou pílí a zadaný problém řešila z nejrůznějších úhlů pohledu a různými přístupy. Podařilo se jí proto i přes značně nevýrazné fenotypové charakteristiky kmenů *S. cerevisiae* s delecí genu *KHA1*, který kóduje sledovaný transportér alkalických iontů, prokázat důvody, proč v publikaci dokonce v tak prestižním časopise jako je *Journal of Bacteriology* dospěli autoři ke špatné interpretaci svých výsledků a podařilo se jí získat o tomto přenašeči nové přesvědčivé poznatky. Prokázala, že se nejde o transportér zprostředkávající transport přes plasmatickou membránu, ale že jeho funkcí je podíl na regulaci homeostáze alkalických iontů v cytosolu a uvnitř organel. Přiblížila se také ke zjištění, že přenašeč je lokalizován v membráně Golgiho aparátu. Velmi důležité je i zjištění, že protein Kha1 je zřejmě schopen plnit svou funkci poměrně nezávisle na dalších přenašečích draselných kationtů.

Předložená práce o rozsahu 166 stran (bez vložených příloh) má standardní členění. Přestože je rozsáhlá a přináší pro čtenáře spoustu informací, je celá napsána velmi přehledně a čtivě. Příložený jsou i už vyšlá publikace, jež zahrnuje výsledky prezentované v první, hlavní části předložené práce, a rukopisy dalších dvou zaslaných publikací.

V kapitole Literární úvod (30 stran) autorka velmi přehledně ukázala, že se v zadané problematice i v širší oblasti membránového transportu iontů u *S. cerevisiae* velmi dobře orientuje. O tom, že prostudovala spoustu odborné literatury svědčí seznam citací o rozsahu 19 stran.

Kapitola Materiál a metody (26 stran) pak dokladuje, že Mgr. Marešová zvládla řadu metodik mikrobiologických, biochemických, molekulárně biologických a využila ve spolupráci s pracovištěm na Matematicko-fyzikální fakultě i biofyzikální metody. Použité metody plně odpovídají řešené problematice.

Kapitola Výsledky je nejrozsáhlejší částí práce (celkem 63 str.). Její tři části spolu těsně souvisejí, neboť u všech je základem problematika Kha1 systému. Autorka musela vynaložit značné úsilí k dosažení pozitivních výsledků při charakterizaci tohoto transportního systému, to však zhodnotila následně velmi úspěšně v dalších dvou tématech, kde se podařilo získat nové vědecké poznatky poněkud snáze. Zde se jí podařilo zjistit důležitou, dosud nezjištěnou roli Tok1 kanálu při udržování membránového potenciálu a ukázat, že rostlinný transportér z *Arabidopsis thaliana* AtChx17 je schopen komplementovat fenotypové projevy delecí *KHA1* genu a má tedy pravděpodobně obdobnou funkci jako Kha1 protein. Navíc to svědčí o konzervativnosti tohoto typu přenašeče a tudíž o jeho důležitosti pro buňky. Na základě svých experimentů se autorce podařilo připravit podklady pro 3 publikace.

Autorka celou řadu svých zjištění komentuje a diskutuje už v této kapitole. Vlastní kapitola Diskuse je proto už relativně stručná a diskutuje pouze ty záležitosti, na které se v předchozích kapitolách nedostalo.

Je třeba velmi ocenit vytrvalost autorky při mnoha experimentech, které zpočátku práce nepřinášely žádné zajímavé výsledky. Práce tak názorně ukazuje, že bez značné dřiny a rutiny se mnohdy vědecké poznávání neobejde.

Práce se mi velmi líbila, její formální zpracování je na vynikající úrovni, autorka mu věnovala mimořádnou pozornost. Přesto mám několik připomínek a dotazů:

1/ Bylo použito i připraveno velké množství různých kvasinkových kmenů a plasmidů – opravdu je všechny autorka sama konstruovala?

2/ Některé metody byly využity ve spolupráci s kolegy z jiných pracovišť, což je vždy v příslušné kapitole zmíněno. Domnívám se však, že autorka mohla těmto kolegům poděkovat i v úvodním poděkování.

3/ Jaký je v současné době stav rukopisů zaslaných k publikaci?

4/ Na několika místech lze nalézt drobné formulační nepřesnosti – např. str. 10-meiotické dělení není sporulace, str. 11- genom *S. cerevisiae* je větší než je uvedeno – při sekvenování nebyly zahrnuty repetitivní sekvence pro rRNA, buňky kvasinek není vhodné označovat jako kvasničné (str. 17 i jinde).

5/ Zajímalo by mne, co je metoda terčového zámku (str. 22)?

6/ Str. 26: uvádí se, že protein Nhx1 se podílí na regulaci transportu endosomálních váčků, především regulací jejich vnitřního pH. Vstup K⁺ do váčků pomocí přenašeče Nhx1 by je ale alkalizoval, ale jak se píše na str. 16, váčky směrem k vakuole by měly mít snižující se pH – není zde rozpor?

7/ Tabulka na str. 4.2 na str. 43 není dobře přehledná – není jasné, zda výsledné kmeny jsou diploidní nebo jde o spory získané z diploidů vzniklých křížením uvedených kmenů - to čtenář pochopí až následně v kapitole Výsledky. Dále: kmen KKB11c - jde údajně o sporu z křížení B31-*kha1* a BW31 – ale oba kmeny jsou stejného párovacího typu (Tab. 4.1).

8/ Str. 65: má autorka nějaké vysvětlení pro to, že mexický kmen W303 s přerušným genem *KHAI* se choval jinak, než kmen používaný v jejich laboratoři, přestože se jedná o kmen se stejným genovým pozadím?

9/ Str. 99 - Proč autorka v experimentech sledujících regulaci exprese Kha1 proteinu pomocí indukce exprese β -galaktosidázy za promotorem *KHAI* genu používala médium o pH 6,8 - tak je dělána většina stanovení - když optimální pH pro tento test je pH 7,0 - 7,2, což ostatně dokazují i obrázky, kdy šlo o tytéž kultivační podmínky pouze s rozdílným pH (6,8 a 7,0) - 1. obr. a 3. obr. od konce na Obr.5.29. Tyto experimenty ve světle diskuze k nim se zdají i trochu zbytečné - autorka zde zpochybňuje jejich vypovídací hodnotu vzhledem k tomu, že zároveň vypovídají o expresi z příslušného promotoru ale jsou ovlivněny i možná měnící se aktivitou enzymu za různých kultivačních podmínek.

10/ Str. 113 - domnívám se, že nelze u výsledků na Obr. 5.37 říci, že delece *TOK1* genu neovlivňovala citlivost k hygromycinu, ale pouze, že ji nezvyšovala.

11/ Výsledky s měřením membránového potenciálu u kmenů s delecí *tok1* autorka komentuje opatrnými formulacemi, přičemž z přiloženého rukopisu publikace plyne, že nebyly dělány žádné další typy pokusů. Nicméně soudě podle chybových úseček se zdá, že měření byla ještě vícekrát opakována - proto to opatrně vyjadřování, je tomu tak?

Svémi připomínkami a dotazy nijak nechci zpochybnit nesporně vysokou kvalitu práce, jenom dokazuji, že jsem práci pozorně přečetla.

Závěr: Předložená práce dokazuje, že Mgr. Marešová plně zvládla zadané téma, že je schopna samostatně řešit a vyřešit vědecké problémy, odpovídajícím způsobem je zhodnotit a prezentovat. Práce přináší nové vědecké poznatky a uvedené drobné výtky nijak nesnižují její vědeckou hodnotu. Potvrzuje tedy předpoklady autorky k samostatné vědecké práci. **Plně tedy doporučuji, aby její práce byla přijata jako podklad pro udělení vědecké hodnosti Ph.D.**

V Praze 17.1.2006

doc. RNDr Blanka Janderová CSc