

Posudek oponenta na disertační práci:

Mgr. Hany SOUKUPOVÉ:

**Genetická analýza
funkce Rab GDP disociačních inhibitorů u *Arabidopsis thaliana***

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie rostlin

a

Ústav experimentální botaniky AVČR, Laboratoř buněčné biologie

Praha 2006

Předložená disertační práce vychází z tradičního zaměření školitelské laboratoře na malé GTPasy a jejich úlohu v regulaci sekretorické dráhy u rostlin. Soustředí se na studium proteinů RabGDI, tedy inhibitorů disociace GDP z Rab-GTPasy, které uvolňují GTPasu ve formě s navázaným GDP z membrány cílového kompartmentu a zajišťují její návrat ke kompartmentu donorovému.

Přímým cílem práce bylo vyhledání inzerčních mutantů tří homologů RabGDI přítomných v genomu *A. thaliana* a jejich charakterizace. Pro RabGDI3 však vhodný inzerční mutant nalezen nebyl, proto byla práce zaměřena na zbývající dva homology, na přípravu a charakterizaci dvojitého mutantu *gdi1gdi2* a na přípravu jeho hybridů s reportérovými liniemi *secGFP* a *cyc::CBD::GUS* pro monitorování sekretorické dráhy a buněčného dělení v meristémech. Vzhledem k tomu, že RabGDI je vzdáleným paralogem „Rab escort proteinu“, který se podílí na geranylaci GTPas (a tím umožňuje jejich vazbu na lipidové membrány), bylo cílem práce též vyhledat mutantu s postiženou funkcí v procesu geranylace RabGTPas.

V úvodu autorka pečlivě a s přehledem zpracovala literární údaje a to ve velké šíři. Podala nejen jasný a obsažný přehled o biologickém významu a funkci malých GTPas a především o regulačních proteinech účastnících se jejich funkčního cyklu, ale také (někdy až příliš podrobné) popisy struktury některých proteinů - např. malých GTPas a jejich vazebných domén (str. 7-8). Zde autorka používá termín „ β list“ - zjevně z anglického „ β sheet“. V češtině je však tento typ sekundární struktury proteinů označován buď jako struktura „skládáního listu“ (Murray et al., Harperova biochemie, H+H, Praha 2002, str. 46), nebo také „ β -struktura“ (např. Alberts et al., Základy buněčné biologie, Espero Publishing, Ústí nad Labem 1998, str. 141), a případně také „ β -hřeben“ (Voet a Voetová, Biochemie, Victoria Publishing, Praha 1995, str. 163), ne však jako „ β list“.

Drobným nedostatkem literárního úvodu v mém výtisku práce je fakt, že tam chybí stránka 13.

Za literárním úvodem následují jasně a přehledně zformulované cíle práce.

Metodická i výsledková část jsou sepsány stručně, přehledně a jasně s uvedením všech údajů nutných pro pochopení či případné zopakování experimentů. Autorka udělala velký kus „mravenčí“ práce při genotypové analýze mutantů, při jejich křížení a následné analýze segregace. Bohužel, tato nutná práce neposkytuje na první pohled „vizuálně atraktivní“ výsledky. Tím více je třeba autorku za její precizní provedení ocenit. Velmi zajímavým zjištěním je fakt, že přes veškerou snahu nebyl při žádném křížení nalezen dvojitý homozygotní mutant *gdi1gdi2*. Autorka správně

vystihla závažnost tohoto zjištění a pomocí genetické i embryologické analýzy shromáždila důkazy o embryonální letalitě tohoto mutanta.

Opět - drobným nedostatkem metodické části v mém výtisku práce je fakt, že tam chybí stránka 36.

Velkým kladem práce je diskuse. Ta je zpracována s nadhledem, znalostí literatury a na základě přesné interpretace získaných výsledků. Autorka zde zdůrazňuje funkční redundanci AtGDI1 a AtGDI2 za obvyklých kultivačních podmínek. Transkriptomickou analýzou bylo zjištěno, že třetí paralog AtGDI3 je pylově specifický - má autorka nějakou hypotézu, proč ze tří genů pro GDI přítomných v *A. thaliana* je jeden exprimován pouze v pylu?

Závěry práce sestávají z osmi bodů a jsou presentovány jasně a přehledně.

V úplném závěru práce bych však velmi uvítala nástin perspektiv pro další studium regulačních proteinů malých GTPas - možná i s trochou „vědecké fantazie“, a také informaci o tom, jak a které výsledky byly či budou publikovány. Předložené materiály žádnou informaci tohoto typu neobsahují.

Přestože je práce zpracována pečlivě, vyskytují se v textu určité stylistické nepřesnosti, především anglicismy - např. používání podstatného jména ve funkci adjektiva a uvedeného bez pomlčky (*Gln* zbytek, *G3* smyčka, Rab protein, Rab rodina atd. - str. 8; Golgi specifická lokalizace - str. 12, atd. - některé další jsou vyznačeny přímo v textu). Některé věty nebo jejich části jsou poněkud šroubované - např. na str. 23: „ ... druhá skupina (*GG2*) se nalézá více exponovaná prostředí ...“. Po středníku má v textu následovat další věta, ne pouze větný člen (na str. 74 a 75 - viz v textu). Tyto drobnosti však nemají na celkové vyznění a posouzení práce žádný dopad.

Závěrem lze říci, že předložená disertační práce podstatně přispěla k hlubšímu poznání jedné skupiny proteinů regulujících funkční cyklus malých GTPas, proteinů GDI, a - jak sama autorka na závěr diskuse uvádí - „byl připraven obsáhlý výchozí materiál pro další funkční charakterizaci rostlinných proteinů regulujících RabGTPasy“.

Disertační práce Mgr. Hany Soukupové dle mého názoru plně odpovídá nárokům, kladeným na doktorskou práci, a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze dne 31.5. 2006

Doc. RNDr. Eva Zažímalová, CSc.