

Oponentský posudek Disertační práce Mgr. Kataríny Vaškovičové

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Název práce:

Changes in domain organization of the plasma membrane in the stress response / Změny doménového uspořádání plasmatické membrány v odpovědi na stres

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem fyziologické úlohy specifických domén v plasmatické membráně kvasinek - MCC/eisosomů. Zabývá se zejména úlohou těchto mikrodomén při odpovědi buněk na nedostatek glukózy při přechodu z exponenciální do post-diauxické/stacionární fáze růstu a také podstatou tvorby MCC/eisosomů v buňkách kvasinek. Autorka si stanovila šest jasně definovaných dílčích cílů, které naplnila v experimentální části práce. Bylo potvrzeno, že klíčová buněčná exoribonukleasa Xrn1 je za nedostatku glukózy sekvestrována v MCC/eisosomálních mikrodoménách. Dosažené výsledky ukazují, že tento reverzibilní jev je důležitý k regulaci metabolismu mRNA a k efektivní adaptaci buněk na nedostatek/přítomnost fermentativního zdroje uhlíku. Práce přináší také nové poznatky týkající se fyziologické úlohy proteinu Nce102. Bylo zjištěno, že při nedostatku glukózy je tento protein re-lokalizován z MCC/eisosomů do mikrodomén ve vakuolární membráně, kde by mohl hrát určitou roli v degradaci lipidových partikulí. Poslední část práce je věnována objasnění podstaty formování MCC/eisosomů v membránách kvasinek a bylo zjištěno pomocí úspěšné rekonstrukce podlouhlých eisosomů typických pro buňky *Schizosaccharomyces pombe* v membránách *Saccharomyces cerevisiae*, že morfologii eisosomů neurčuje složení plasmatické membrány, ale proteiny, které MCC/eisosomální domény tvoří. Dosažené výsledky práce byly publikovány ve dvou primárních publikacích v časopise *European Journal of Cell Biology*, u nichž je doktorandka první autorkou. Na základě předložených podílů na publikacích, se doktorandka u obou významně podílela jak na experimentální práci, analýze dat, tak také na jejich sepsování.

Práce má celkem 146 stran s 36 obrázky. Je psána čtivě v anglickém jazyce téměř bez pravopisných chyb (pokud mohu jako nerodilá mluvčí posoudit) či překlepů. Práce je rozdělena do devíti kapitol. Dotazy a připomínky k některým kapitolám uvádím zvlášť níže.

Úvod a Literární přehled (34 stran) je rozdělen do šesti hlavních podkapitol, které na sebe logicky navazují a ve kterých autorka dobře popsala i analyzovala dostupné současné poznatky o struktuře, složení, vzniku a úloze MCC/eisosomálních domén v nižších eukaryotech. Text je výstižně doplněn přehlednými obrázky. Autorka v této části prokázala rozsáhlou znalost literatury ve studovaném oboru, o čemž svědčí seznam více než 230 citací v závěru práce. Literární přehled obsahuje všechny důležité informace nutné pro porozumění experimentální části práce.

Připomínky a dotazy:

1. Do úvodu by bylo vhodné zařadit ještě více informací o struktuře jednotlivých studovaných komponent na aminokyselinové úrovni, jelikož se na např. strukturu/sekvenci Nce102/SpFhn1, Sle1/SpSeg1 odkazuje v dalších kapitolách Výsledků a Diskuze.
2. Je známo něco o 3D-struktuře jednotlivých komponentů tvořících MCC/eisosomy? Byly některé součásti těchto struktur např. krystalizovány? Jaká je struktura/aminokyselinové složení a konkrétní úloha BAR/F-BAR domén?

3. Mají studované proteiny, jež formují kvasinkové MCC/eisosomy své homology i v živočišných buňkách?
4. Co konkrétně (jaký typ stresu) znamená plasma-membrane stress v obrázku č. 6?
5. Je něco známo o úloze MCC/eisosomů v hyperosmotickém šoku v propojení se signální dráhou HOG, která je klíčová v odpovědi buňky na hyperosmotický stres?

V kapitole **Materiál a metody** (16 stran) jsou popsány všechny metody používané v experimentální části práce. Ze seznamu metod je patrné, že autorka si během disertační práce osvojila řadu mikrobiologických a molekulárně biologických postupů a mikroskopických technik.

Připomínky a dotazy:

1. Pro lepší přehlednost a zjednodušení by seznam a složení médií mohly být ve zvláštní podkapitole.
2. V Tab. 2 je uvedeno 44 nových kmenů, připravených v předkládané práci. Všechny jste konstruovala sama?
3. Čím si vysvětlujete rozdílné doby dosažení post-diauxické fáze (spotřeba glukózy) u divokého kmene Y410 a dalších použitých kmenů, např. Y568?
4. Ve kterých experimentech jste používala izolaci proteinů popsanou metodu 1 a ve kterých metodu 2? Co rozhodovalo o jejich použití?
5. Při všech uvedených mikroskopických pozorováních byly buňky imobilizovány? Proč?

Kapitola **Výsledky** má 55 stran včetně 29 obrázků a je rozdělena do třech hlavních podkapitol podle studované problematiky. Obsahuje jak výsledky obsažené v publikacích, tak také dosud nepublikované výsledky, které autorka během studia získala. Navržené experimenty a použité metody jsou vždy dobře zdůvodněny. Popisy pokusů, obrázků i získaných výsledků jsou výstižné. Všechny výsledky jsou graficky dobře zpracovány.

Připomínky a dotazy:

1. V práci je uvedeno, že lokalizace Xrn1 v MCC/eisosomech je specifická pro nedostatek glukózy. Při nedostatku jiných nutrientů (např. zdroje dusíku) zůstává v cytosolu?
2. Jak vypadá struktura Xrn1, Nce102 a dalších studovaných proteinů na aminokyselinové úrovni? Neovlivňuje značení fluorescenčními proteiny jejich funkci? Co může být signálem pro jejich re-lokalizaci v rámci buňky? Samotná struktura nebo vazba na nějaký protein?
3. Jak byly v kap. 5.2.2 získány procentuální vyjádření výskytu Nce102-GFP v mikrodoménách ve vakuolární membráně?
4. Můžete detailněji popsat signály detekovaných proteinů ukázaných na obr. 25 a 27?
5. Můžete popsat postup analýzy intenzity fluorescence I_M/I_C proteinů např. Pil1-GFP na obr. 31D? Jaký software jste využívala?

Kapitola **Diskuze** má 12 stran. Autorka dobře diskutuje všechny dosažené výsledky s ohledem na výsledky známé z literatury. Autorka si pokládá nové otázky, které vyvstaly na základě jejích výsledků, navrhuje možná řešení, jak na ně odpovědět, což svědčí o jejím zájmu o danou problematiku.

Připomínky a dotazy:

1. V úvodu (str. 18) je uvedeno, že Nce102 je esenciální pro stabilizaci eisosomech. Pokud za nepřítomnosti glukózy dochází k jeho re-lokalizaci do membrán vakuol, co se stane s eisosomech, které jsou za těchto podmínek důležité pro sekvestraci Xrn1? Expres

homologu Nce102 - proteinu Fhnl je za aerobních podmínek snížena (str. 18). Jak je tedy stabilita MCC/eisosomu za nedostatku glukózy zachována?

2. Jakým způsobem/mechanismem se dostane Nce102 z plasmatické membrány do vakuolární? Můžou zde hrát roli některé proteiny potřebné pro endocytózu? Nebo se jedná o nově syntetizované molekuly, které jsou rovnou směřovány do vakuolární membrány?
3. Je známo jaký typ vazby je mezi proteiny v MCC/eisosomech? Bylo by možné poskládat tyto domény *in vitro*?

Závěrem bych chtěla konstatovat, že disertační práce Mgr. Vaškovičové přináší řadu nových velmi zajímavých poznatků ve fyziologii nižších eukaryot a ukazuje nové možné mechanismy adaptace buňky na změny ve vnějším prostředí. Dle mého názoru předložená dizertační práce zcela prokazuje schopnosti kandidátky k tvořivé vědecké práci v oblasti výzkumu a vývoje, splňuje vytyčené cíle a také všechny předepsané podmínky, dle § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb., a tudíž doporučuji tuto disertační práci k obhajobě.

V Praze, dne 29. listopadu 2019

Mgr. Olga Zimmermannová, Ph.D.

Oddělení membránového transportu

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Videňská 1083

142 20 Praha 4 - Krč

Tel. +420 241 062 557

E-mail: olga.zimmermannova@fgu.cas.cz