

**Posudek oponenta na doktorskou dizertační práci Venduly Strádalové:
„STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF YEAST
PLASMA MEMBRANE DOMAINS“.**

Doktorská práce Venduly Strádalové je založena na 4 pracích publikovaných v impaktovaných časopisech. Impakt faktor těchto časopisů se pohybuje v rozmezí 4.0-6.3. Publikace tedy prošly oponentským řízením. Oponenti těchto časopisů odvedli dobře svou práci a úlohou oponenta bude tedy shrnout práci jako celek. Je třeba konstatovat, že práce představuje krásně ucelený a konzistentní celek, kde jednotlivé publikace na sebe navazují a skládají dohromady představu o struktuře, která si zaslouží pozornost jako modelový příklad. Jde o nehomogenitu v laterální distribuci lipidů a proteinů v cytoplazmatické membráně kvasinek, která je navíc stabilní v čase a pozorovatelná jako invaginační struktura, o které se dlouho ví a jejíž význam nebyl znám. Autorce se spolu se spolupracovníky podařilo tuto strukturu známou jako „furrow-like invaginations“ kolokalizovat s membránovým kompartmentem MCC, určit protein, jehož C-koncová část je zodpovědná za formování těchto invaginací, dále určit, že oblasti klathrinem zprostředkované endocytózy, kortikální cisterny ER a MCC domény jsou nepřekrývající se struktury a dále, která z těchto struktur řídí formování struktur ostatních. Tato velmi zásadní zjištění byla umožněna špičkovými přístupy fluorescenční konfokální mikroskopie, pomocí TEM a metodou mrazového leptání spolu s vývojem metody fixace preparátu pro TEM, která umožnila pozorování membránových struktur zbavených artefaktů. Upřímně řečeno, málokdy se podaří vystavět disertaci na takto uceleném základě. Autorka přitom vycházela ze zkušeností pracoviště výborně technicky vybaveného a z tématu, které je pracovišti dlouhodobě zkoumáno, což se ukazuje v citacích jejích předchůdců, kteří/které se tématu MCC domén věnovaly.

MCC jako modelová struktura v membráně kvasinek, která je dobře definovaná a v čase stabilní, je myslím téma, které bude velmi moderní do budoucna vzhledem k obtížím a nejasnostem, které provází výzkum raftů u modelových vyšších eukaryot. V práci je postup od vývoje metody fixace přes výzkum organizace furrow-like invaginations až k rozšíření zájmu na související cytoplazmatické struktury a endocytózu téměř učebnicový a i pro čtenáře neorientovaného v problematice je velmi přehledný.

Práce je psána anglicky, dobrou angličtinou, grafická úprava práce je standardní, práce má minimum překlepů a nebudí dojem práce psané „pro formu“, případně pouze pro oponenta. Má formu komentáře k publikacím a je vybavena nutnými náležitostmi jako jsou Úvod, Metody, vlastní komentář k publikacím a Diskuse. Úvod začíná membránami a jejich složením, ale brzo se věnuje nehomogenitám v membráně odporujícím Singer-Nicholsonovu modelu homogenní membrány nejprve na obecné úrovni, pak se věnuje raftům a samozřejmě strukturám v cytoplazmatické membráně kvasinek. Tato část je velmi kvalitní, bohatě vybavená recentními odkazy a obrázky. Dále jsou krátce představeny použité metody – jak metody související s mikroskopií, tak pokročilá metoda umožňující určit lokalizaci intramembránových domén membránového proteinu *in vivo*. Jsou krátce představeny

publikace ve formě velmi dobře čitelných rozšířených abstraktů dokumentovaných klíčovými obrázky. Následuje diskuze. Autorka měla štěstí, že v diskuzi mohla pojednat témata svých prací vcelku, což jí umožnila sevřenost tématu. Diskuze je nazvána „GENERAL DISCUSSION AND PERSPECTIVES“ a svému názvu nezůstává nic dlužna. Vlastní výsledky zasazuje autorka do kontextu ostatních recentních publikací, které zkoumají vztahy MCC-eisozom-endocytóza-ER buďto na stejném modelu nebo u hub obecně. V diskuzi autorka naznačuje, která témata považuje za perspektivní a tudíž se jim (snad) bude ona sama nebo výzkumná skupina věnovat. Následují příložené publikace. Práci hodnotím jako celek jako velmi kvalitní a doporučuji, aby byla přijata jako podklad k obhajobě jako doktorská práce.

K autorce mám následující otázky:

1. Vzhledem k tomu, že je výzkum MCC velmi slibný, zajímalo by mě, na co se výzkumná skupina, ve které pracujete, zaměří v budoucnu. Téma je paralelně sledováno dalšími skupinami.
2. Vyjádřete se k nápadu, zda by bylo funkční vyvinout systém in vitro, který by v minimálním provedení (lipozomy nebo „supported lipid bilayers“ z lipidů kvasinek např. se zabudovaným proteinem Nce102) umožňoval podrobněji studovat vlastnosti MCC oblasti.
3. Hodláte se dále věnovat výzkumu topologie Nc102, třeba použitím jiných přístupů? Je zřejmé, že objasnění topologie by pomohlo představit o přesné úloze tohoto proteinu v organizaci MCC.

V Praze dne 21.8.2012

doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc
Katedra genetiky a mikrobiologie PřFUK, Praha