



ÚOCHB AV ČR

ÚSTAV ORGANICKE CHEMIE A BIOCHEMIE
AKADEMIE VED CESKE REPUBLIKY
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC

Posudek oponenta na diplomovou práci Jaromíra Zahrádky „Příprava a charakterizace plasmidu YEX-GFP-Nha1 a jeho využití pro studium proteinu Nha1 ze *Saccharomyces cerevisiae*“

Jaromír Zahrádka se ve své diplomové práci zabývá Na^+/H^+ antiporterem Nha1 z modelového organismu, kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Větší část práce je věnována úspěšné přípravě plasmidu (resp. několika plasmidů) pro expresi antiporteru Nha1 značeného na N-konci zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Diplomant exprimoval takto značený antiporter v kmenu *S. cerevisiae* BW31a. Tento kmen neobsahuje gen *NHA1* a umožňuje tedy studovat lokalizaci a aktivitu antiporteru Nha1 exprimovaného pouze z připraveného plasmidu.

Ve druhé části práce se diplomant věnoval delecii genu *NHA1* v genomu kvasinky *S. cerevisiae* BY4741. Tato část je sice menší co do rozsahu textu, ale nikoli co do rozsahu provedených experimentů, které probíhaly v rámci mezinárodního projektu TRANSLUCENT.

Práce Jaromíra Zahrádky navazuje na tradici studia membránového transportu ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Diplomant účelně využil některých molekulárních nástrojů, které byly již dříve vytvořeny v laboratoři Dr. Sychrové a sám připravil několik dalších – plasmidy, deleční kazetu, mutantní kmen *S. cerevisiae*. Jaromír Zahrádka si v průběhu práce musel osvojit řadu experimentálních technik: kultivace kvasinek za různých podmínek, molekulární klonování, fluorescenční mikroskopii, atomovou absorpční spektrometrii a další.

Práce je sepsána přehledně, dobře se čte. Vedle informačně bohatého Teoretického úvodu, jsem ocenila zejména část Materiál a metody. Jednotlivé postupy jsou popsány podrobně a v natolik praktickém duchu, že je každý může snadno zopakovat. Takovýto text pak může sloužit nejen jako podklad k obhajobě, ale zároveň jako cenná příručka pro další studenty a kolegy.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a výsledky experimentů, které vedly k naplnění těchto cílů, jsou dobře dokumentovány. Diplomant výsledky logicky interpretoval, diskutoval a přehledně shrnul. Za nejzajímavější výsledek osobně považuji fenotypové rozdíly mezi kvasinkami exprimujícími Nha1 s GFP buď na N- nebo na C-konci.

Je zřejmé, že Jaromír Zahrádka zvládl mnohá úskalí experimentální práce a poradil si s interpretací a sepsáním výsledků. Jeho diplomovou práci proto doporučuji k dalšímu řízení.

K práci mám několik drobných připomínek a dotazů.


Formální připomínky:

1. V teoretické části na straně 27 je model uspořádání ScNha1p v membráně. Pro čtenáře by bylo příjemné, kdyby byl ve Výsledcích nebo v Diskusi ukázán tento model znovu, ovšem s vyznačenými pozicemi mutací, které byly v rámci diplomové práce studovány.
2. Při popisu výsledků kapkových testů se autor zmiňuje o zjišťování schopnosti studovaných kmenů růst v přítomnosti NaCl o koncentracích větších než 0,3 M, ale neukazuje žádný odpovídající obrázek (např. str. 60). Důvodem je patrně skutečnost, že příslušné kvasinky za těchto podmínek již nerostly. Bylo by však vhodné do textu vložit poznámku „neukázáno“, aby čtenář po obrázku zbytečně nepátral.

Dotazy:

1. Překvapuje mě, že nově vytvořené plasmidy s dobrou restriční analýzou byly sekvenovány až na základě studia fenotypu kvasinek, které byly těmito plasmidy transformovány. Když už byl ale částečně charakterizován fenotyp i u kandidátů pYEX-GFP-Nha1 (2) a pYEX-GFP-Nha1 (6), nestálo by za to, dát tyto plasmidy taky sekvenovat a zjistit tak, které mutace nečekaný, nežádoucí fenotyp způsobily?
2. Proč nebyl použit kmen BW31a[pGRU1-Nha1] exprimující antiporter Nha1 s GFP na C-konci jako další z kontrol v kapkových testech (str. 66-67) a při měření výstupu kationtů alkalických kovů z buněk (str.68-69) ?
3. GFP na N-konci Nha1 pravděpodobně způsobuje problémy při průchodu antiporteru sekreční drahou. Může to souviset s tím, že transmembránová část antiporteru se nachází v jeho N-koncové části? Bylo by zajímavé a smysluplné zabývat se podrobněji vlivem extenze antiporteru na jeho sekreci, lokalizaci, případně sbalení, anebo byly podobné jevy už dostatečně studovány v jiných (podobných) systémech?

V Praze 14.5.2008



RNDr. Olga Hrušková-Heidingsfeldová, CSc.