



Oponentský posudok na dizertačnú prácu

Téma dizertačnej práce: Transportní mechanismy sekundárných metabolitů přes membrány rostlinných buněk

Autor: Mgr. Jan Kubeš

Doktorand vypracoval dizertačnú prácu, ktorej koncepcia vychádza zo všeobecných požiadaviek kladených pre tento typ záverečných prác. Práca má obvyklé členenie: je napísaná na 130 stranách s uvedením 228 literárnych zdrojov, pričom 15 strán príloh obsahuje 25 dodatkov vo forme obrázkov, grafov a tabuliek.

Zvolená téma práce je zaujímavá, nakoľko objasnenie mechanizmu transportu pre sekundárne metabolity cez plazmatickú alebo vakuolárnu membránu predstavuje prvý krok k identifikácii konkrétneho transportéru a jeho zapojeniu do metabolizmu a využitia danej molekuly rastlinou. Základom pre úspešnú identifikáciu a overenie totožnosti transportérov je práve poznanie mechanizmu transportu, a preto má dizertačná práca opodstatnený význam.

Hlavným cieľom predloženej práce bolo identifikovať možný spôsob transportu sekundárných metabolitov cez membrány *in vitro* kultúr liečivých rastlín. Práca je rozdelená do niekoľkých etáp, pričom sa zameriava na transport látok cez plazmatickú membránu do média a na intracelulárny transport cez vakuolárnu membránu. Môžem konštatovať, že práca je napísaná s prehľadom, a k jednotlivým cieľom doktorand podáva experimentálne dobre zdokumentované dáta. Jednotlivé ciele, ktoré boli v rámci dizertačnej práce vytýčené, a ktoré sú podložené experimentálnymi postupmi, boli aj splnené (odvodenie suspenzných kultúr *Genista tinctoria* a *Trifolium pratense*; elicitačné experimenty s následnou identifikáciou transportu; izolácie protoplastov a vakuol, a sledovanie ovplyvnenia mechanizmu transportu na úrovni absorpcie do vakuol). Výsledky práce sú doplnené zodpovedajúcimi grafmi a tabuľkami, pričom diskusia je napísaná zrozumiteľne a čítala sa mi celkom dobre.

Celkovo môžem zhodnotiť, že po formálnej aj experimentálnej stránke je dizertačná práca napísaná vecne, bez zjavných nedostatkov. I keď jazykovú korektúru som sa neodvážil vykonať, myslím že podľa mojej znalosti českého jazyka sa v práci chyby/preklepy/gramatické nepresnosti závažnejšieho charakteru nevyskytujú.

Pripomienky:

1. V teoretickej časti práci by som uvítal viac grafického materiálu, napr. schematické znázornenie transportných mechanizmov.
2. Nakoľko sa v práci vyskytuje veľa enzýmov, proteínov a pod., odporučil by som súbežné použitie klasifikačného zatriedenia podľa nomenklatúry EC: napr. chalkónsyntáza (CHS, EC 2.3.1.74), chalkónizomeráza (CHI, EC 5.5.1.6), a pod.

3. Faktické chyby: pojem 'tkanivové' kultúry sa používa pri živočíšnych systémoch, nie pri raslinách (str.12); označenie LPH je skorej chemického charakteru, prakticky sa používa pojem laktáza (str.26); nepoužívať pojem cukor, ale sacharid (str.30); pri technických parametroch centrifugácie udávať hodnotu v 'x g', nie v 'rpm' (napr. str.52).
4. Grafy 1.1. – 2.5. prípadne aj 3.1. – 4.5. by možno mali lepšiu výpovednú hodnotu pri znázornení vo forme Box-plotov (v kontraste ku klasickým stĺpcovým grafom).

Otázky do diskusie:

1. Vedeli by ste porovnať (aj s praktickými príkladmi) efektívnosť produkcie sekundárnych metabolitov pri použití kultúr 'hairy root' resp. 'adventitious root'? Aké sú výhody a nevýhody uvedených techník?
2. V kapitole o elicitácii sa zmieňujete o tzv. 'obecnom receptore' (str.17) – ide o kontakt medzi signálom (elicitorom) a príslušnou receptorovou štruktúrou bunky. O aký typ receptora ide, resp. čo sa o ňom predpokladá z molekulárneho hľadiska?
3. V práci spomínate zvýšenie biosyntézy sekundárnych metabolitov využiteľnej v praktickom merítke (str.14). Samozrejme, produkcia je často limitovaná nízkymi a variabilnými výťažkami. Aj napriek týmto limitáciám je v súčasnosti produkovaných rastlinnými kultúrami na komerčnej úrovni niekoľko sekundárnych metabolitov a proteínov – vedeli by ste ktorých (okrem Vami spomínaného taxolu a shikonínu)?
4. Pri farmakokinetických charakteristikách flavonoidov uvádzate absorpciu glukozidov cez SGLT1-transportéry enterocytov (str.27) – v tomto prípade ide o sekundárny aktívny transport. Boli v kontexte tejto problematiky študované aj pasívne transportné systémy (napr. GLUT-transportéry)?
5. Konštatujete, že určenie transportného mechanizmu pri izoflavónoch *Genista tinctoria* nepriniesol významné rozdiely medzi inhibovanými a kontrolnými vzorkami. Viete vysvetliť prečo (okrem potenciálneho prenosu pomocou ABC-transportérov)?
6. Konštatujete, že v dostupnej literatúre neexistuje práca, ktorá by sa zaujímala len o transport glykozidov izoflavónov do vnútra vakuoly. Identifikácia konkrétneho transportéru pre genisteín u *Trifolium pratense* by bola významným prínosom do problematiky – ako by ste to prakticky zrealizovali?

Výsledky dizertačnej práce Mgr. Jana Kubeša sú cenným prínosom z hľadiska štúdia transportných mechanizmov sekundárnych metabolitov cez membrány rastlinných buniek. Myslím si, že doktrand sa vysporiadal s danou problematikou dobre. Nakoľko dizertačná práca predstavuje prínos pre rozvoj odboru 'Farmakognosie a toxikologie přírodních látek', hodnotím ju kladne a odporúčam, aby bola v zmysle platných predpisov doktorandského štúdia na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové prijatá k obhajobe. Na základe uvedeného konštatovania navrhujem udelenie akademického titulu 'PhD.'.

V Bratislave, 29.11.2016

doc. PharmDr. Marek Obložinský, PhD.