

Oponentský posudek disertační práce **Mgr. Dity Strachotové**

Studium mechanismů produkce amoniaku u kvasinkových kolonií a tekutých kultur.

Disertační práce se zabývá vysoce aktuální vědeckou problematikou, kterou je studium interakce mezi buňkami eukaryotních mikroorganismů. Výběr tematiky disertace, spolu s elegantním přístupem vhodně kombinujícím moderní molekulárně biologické, biochemické a klasické mikrobiologické přístupy vedl k získání celé řady původních, a místy i nečekaných, výsledků, které značně rozšířily naše znalosti o úloze několika buněčných proteinů v mezibuněčné signalizaci. O kvalitě získaných výsledků svědčí i 2 publikace ve významných mezinárodních časopisech, z nichž v jedné je Mgr. Strachotová první autorkou.

Klasicky členěná předkládaná práce shrnuje výsledky osmiletého bádání navazujícího na výsledky získané v diplomové práci. Pět hlavních cílů práce je jasně definováno. Práce sice není příliš rozsáhlá, obsahuje však poměrně podrobný přehled současného stavu poznání dané problematiky, spolu s celou řadou vhodně zvolených citací. K této části bych měla tři podstatnější poznámky/dotazy. *Na str. 15 je citována práce Eilam et al. z roku 1990, která ukazuje snížení vnitrobuněčného pH po přidání glukosy. Tato práce však byla zcela ojedinělá a v pozdějších letech celá řada laboratoří publikovala své výsledky jasně prokazující, že po přidání glukosy dochází k aktivaci protonové ATPasy Pma1, vyššímu exportu protonů z buněk a s tím spojenému zvýšení pH cytosolu. Toto zvýšení pH cytosolu je naopak v disertaci ilustrováno obrázkem 4 na str. 26. Z jakého důvodu je citována práce Eilam et al. a ne práce pozdější, a proč se autorka nezamyslela nad nesrovnalostí údajů popisovaných na str. 15 a na str. 26? Na str. 20 se uvádí, že činnost Na⁺-ATPasy Ena1 je klíčová při růstu buněk v prostředí s alkalickým pH. Věděla by autorka proč, pokud není zároveň vysoká koncentrace solí alkalických kovů (což v běžných růstových médiích není)? Na str. 37-38 je zmíněno, že v respiračně deficientních kmenech byla popsána zvýšená exprese ATO1 a ATO3. Tyto kmeny ale nemohou růst na glycerolovém médiu, kde byl pozorován zvýšený export amonických kationtů závislý na přítomnosti obou genů. Jaká by mohla být souvislost mezi oběma jevy?*

Navazující obvyklá část Materiál a metody dokumentuje velkou šíří metodického záběru Mgr. Strachotové. Použitý materiál i metody jsou dobře popsány, snad jen leckde chybí citace na původní práce popisující použitý postup a někdy je pro disertační práci metodika popsána až příliš podrobně.

Kapitola výsledky je členěna do několika logických částí. Velmi oceňuji, že na začátku každé podkapitoly výsledkové části je stručně a přehledně uveden cíl, ke kterému popsané experimenty a jejich výsledky směřovaly. Výsledky jsou popisovány jasně a velmi vhodně jsou obrazově dokumentovány. Velmi dobře je také napsána závěrečná souhrnná diskuse. K výsledkům a diskusi bych měla několik dotazů:

Podle původních prací je alkalizace média patrná hlavně ve směru přítomnosti vedlejší makrokolonie, na obr. 11D a na obr. 12 se zdá, že alkalizace média nastává rovnoměrně kolem kolonií (?). Jak byly vybírány testované aminy? Byl také někdy testován triethanolamin?

K výsledkům změn pH kultury v tekutém médiu s glycerolem by mě zajímalo, zda autorka někdy provedla obdobné kontrolní pokusy s médiem obsahujícím glukosu?

K obr. 16, je rychlost růstu kmene s delecí sok2 na glycerolovém médiu stejná jako rychlost růstu rodičovského kmene (např. během prvních 30 hod kultivace)?

Byl nějaký důvod proč v pokuse ilustrovaném na obr. 19D bylo počáteční pH nižší (4.5) než v ostatních pokusech (obvykle pH 5.0)?

Je možné nějak komentovat rozdíl v pozorovaných interakcích mezi proteiny Ato a v jejich distribuci v plasmatické membráně v práci M. Řičicové a v této disertaci? Je to důsledek odlišného metodického přístupu?

Nakolik korelují v práci popsané změny množství proteinů Ato1 až Ato3 s dříve skupinou získanými výsledky z analýzy změn exprese genomu, tedy s pozorovaným množstvím příslušné mRNA (microarrays, RT-PCR)?

Mohla by při značení proteinů fluorescenčními peptidy nastat situace, že např. negativní výsledek interakce Ato1-Ato3 nebo Ato2-Ato3 je důsledkem prostorového uspořádání při této interakci, které zabraňuje pozorování dohasínání či přenosu energie mezi donorem a akceptorem? Jak by bylo možné prokázat interakci jinými metodami?

Závěrem dva obecnější dotazy, na které si sama po přečtení disertace neumím odpovědět. Proč je pozorována alkalizace na glycerolovém médiu a ne na glukose či jiných bohatších zdrojích uhlíku? A pokud je uvažován antiportní mechanismus transportu amonných kationtů proti protonům v alkalické fázi vývoje kolonie proteiny Ato, který z těchto dvou kationtů je hnací silou transportu?

Mé otázky jsou námětem k diskusi a neměly by ubírat na celkové kvalitě předkládané práce. Autorka přistupovala k řešenému problému dobře teoreticky vybavena, byla schopna cíleně využívat celou řadu metod a získat v dané problematice mnoho nových poznatků. Znovu opakuji, že práce je napsána dobře, její kvalitu však poněkud snižuje opakované a hojně používání anglicismů a poněkud zanedbaná edice textu (např. nejednotné uvádění literárních zdrojů). Drobné nedostatky a nepřesnosti jsou uvedeny v příloze.

Závěrem mohu konstatovat, že podle mého názoru Mgr. Dita Strachotová plně prokázala své schopnosti k samostatné tvořivé vědecké práci v oblasti výzkumu a vývoje dle § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb., a tudíž doporučuji její disertační práci k obhajobě.

V Praze 9. srpna 2012

RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Fyziologický ústav AV ČR Praha

Příloha k posudku disertační práce Mgr. D. Strachotové:

Drobné překlepy, gramatické chyby a nesrovnalosti se vyskytují v celé práci, škoda, že autorka nevěnovala více času redakčním úpravám. Dále uvádím pouze ty, které pokládám za závažnější.

Již mnoho let existují závazná pravidla pro uvádění názvů genů a proteinů kvasinky *S. cerevisiae*. Tato pravidla by měla být dodržována.

Je proti pravidlům uvádět Ato1p protein apod. To „p“ již znamená protein, a pokud je u názvu uvedeno, nepřidává se již ani slovo protein nebo transportér nebo enzym a naopak. Vždy buď jen jedno, nebo druhé.

Není možné používat lomítka při popisu genotypu haploidního kmene (např. *ato1/ato2/ato3*), je to symbol vyhrazený pro popis genotypu diploidních kmenů.

Názvy genů vždy měly být psány vždy proloženě (jak je to např. správně v tabulce na str. 65 a nesprávně na str. 42).

V textu je opakovaně používán pojem prostá difuze nebo jen difuze i v případech, kde se zcela jistě jedná o tzv. usnadněnou/zprostředkovanou difuzi. To je z hlediska mechanismu a kinetiky transportu něco zcela jiného než prostá difuze.

Str. 31 - methylamonný kation –chybně napsaný vzorec (šestivazný dusík)

Str. 42 – genotyp BY4741 a BY4742 je uveden nepřesně, správně je až u popisu genotypu kmenů ze sbírky Euroscarf.