



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ FAKULTA

Fyzikální ústav UK

Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2,

Czech Republic

Tel. (+420)-221911348

Fax (+420)-224922797

Email: gaskova@karlov.mff.cuni.cz



Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Studijní oddělení, doktorské studium  
Albertov 6  
128 43 Praha 2

V Praze dne 25. 7. 2012

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Dity Strachotové  
**"Studium mechanismů produkce amoniaku u kvasinkových kolonií a tekutých kultur".**

Mgr. Dita Strachotová vypracovala svoji disertační práci pod odborným vedením školitelky RNDr. Libuše Váchové, CSc. a školitelky-konzultanky prof. RNDr. Zdeny Palkové, CSc. Předkládaná disertační práce, která se zabývá vědecky aktuální tematikou - amoniakovou signalizací mezi kvasinkovými buňkami, je na vysoké úrovni jak po stránce vědecké, tak formální. Celá disertační práce, od samotného počátku a během tvůrčího procesu až po konečné písemné zpracování výsledků, odráží nesmírnou pečlivost, trpělivost a houževnatost autorky, kterými dosáhla vynikajících výsledků.

Hlavním cílem disertační práce bylo rozšířit znalosti o amoniakové signalizaci u kvasinek, což zahrnuje hledání příčin a důsledků produkce amoniaku u kvasinkových kolonií a tekutých kultur. Práce (177 stran včetně tří publikací) je členěna klasicky do tří hlavních kapitol. V teoretickém úvodu je nejprve velmi srozumitelně pojednán vliv pH na růst kvasinek, zejména růst v zásaditém prostředí, dále pak vnitrobuněčné pH kvasinek a jeho kontrola. Následuje výklad o plynných signalačních molekulách (např. oxid dusnatý), které slouží ke komunikaci mezi buňkami, s důrazem na amoniakovou signalizaci a diferenciaci kvasinkových kolonií. Výborně je zde pojednán jak vliv delece vybraných genů na signalizaci pomocí amoniaku u kvasinkových kolonií, tak role Ato proteinů v této signalizaci.

Velký rozsah kapitoly "Materiál a metody" (25 stran), která je přehledně sepsána, svědčí o celé řadě metod, které musela doktorandka v rámci své práce zvládnout. K této části mám jen jednu drobnou připomínku, týkající se fluorescenčních měření:

- Při popisu přístrojů, na kterých byla měření prováděna (spektrofluorimetr FluoroMax-P a invertované konfokální mikroskopy Microtime 200 a Leica TCS SP2 AOBS) by bylo dobré uvést rovněž pracoviště, na kterých se tyto přístroje nacházejí.

Kapitola "Výsledky a diskuse" (48 stran) shrnuje v šesti hlavních částech publikované i nepublikované výsledky, které významným způsobem přispěly k rozšíření znalostí o amoniakové signalizaci u kvasinek. Jednotlivé části jsou zaměřené na zodpovězení otázek vymezených v úvodu disertační práce, konkrétně: (a) možná existence další látek (kromě amoniaku) spouštějící vstup kvasinkové kolonie do alkalické fáze, (b) produkce amoniaku při aerobní kultivaci různých kmenů kvasinek *S. cerevisiae* v tekutém médiu, (c) možné vzájemné interakce Ato proteinů a (d) úloha transportu karboxylových kyselin v amoniakové signalizaci a diferenciaci kvasinkových kolonií. Autorkou zvolený způsob členění výsledkové části se mi velmi líbí. V úvodu každé kapitoly je podán stručný nástin problematiky a jasně definován cíl dané části práce; každá výsledková část je uzavřena samostatnou diskusí. Celá práce je pak zakončena souhrnnou diskusí a závěrem. V jednotlivých kapitolách je uvedeno velké množství kvalitních výsledků, které bezesporu svědčí o nezměrném pracovním nasazení doktorandky. Kvalita všech získaných výsledků je velmi vysoká a jen stěží je možné rozhodnout, který z výsledků je ten nejdůležitější. O kvalitě a významnosti výsledků předložené disertační práce svědčí rovněž skutečnost, že některé výsledky již byly publikovány ve dvou významných mezinárodních časopisech (*Environmental Microbiology* a *Biochim. Biophys. Acta*).

K práci nemám žádné kritické připomínky. Mám jen pár drobných dotazů a připomínek, které v žádném případě neubírají na kvalitě předkládané disertační práce:

- *Autorka použila v diskusi 1 (str. 70, 2. odstavec) slovní spojení "permeabilita NH<sub>3</sub> v membránách je nižší než permeabilita některých větších aminů..". Předpokládám, že měla na mysli: "permeabilita membrán pro NH<sub>3</sub> je nižší než permeabilita pro některé větší aminy..".*
- *Na obr. 22A, str. 85, je u obřích kolonií kmene ato1/ato2/ato3 (21. den vývoje) pozorován tmavý střed, který není patrný u divokého kmene BY4742. Možná je moje otázka pro experty z oboru úsměvná, ale ráda bych se zeptala, čím je způsoben?*
- *K obr. 22 mám ještě jeden dotaz. Produkce amoniaku, obr. 22B, je u ato1/ato2/ato3 kmene v porovnání s rodičovským kmenem snížena (na poloviční hodnotu - 12., 13. den), přesto však i u toho kmene je patrný nárůst produkce amoniaku během vývoje kolonií. Čím je dána produkce amoniaku u kmene s delecí ve všech třech genech pro Ato proteiny?*
- *Moje poslední poznámka k práci se týká fluorescenčních měření, která autorka prováděla, a odráží můj obdiv a chválu. Fluorescenční metody patří mezi nejcitlivější metody, které lze při studiu živých buněk použít. Jedná se však o metody nepřímé, tzn., že o buněčných procesech vypovídají nepřímo prostřednictvím změn fluorescenčních parametrů. Nejsou-li doplněny o všechny nutné kontroly (jak negativní, tak pozitivní) a není-li striktně dodržen experimentální protokol, může interpretace získaných fluorescenčních dat vést k artefaktům. Fluorescenční měření uvedená v disertační práci by mohly sloužit jako vzorový příklad perfektně provedených fluorescenčních experimentů!*

Závěrem s přesvědčením prohlašuji, že disertační práce Mgr. Dity Strachotové významně přispěla k rozšíření a dalšímu vývoji vědního oboru a tím přesvědčivě prokázala její schopnost k samostatné vědecké práci. Vřele doporučuji tuto disertaci přijmout jako podklad pro udělení vědeckého titulu PhD.

Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.  
Vedoucí oddělení biofyziky FÚ UK  
Matematicko-fyzikální fakulta UK