

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Venduly Strádalové
**„STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF YEAST PLASMA
MEMBRANE DOMAINS“**

V předložené disertační práci se Mgr. Vendula Strádalová zabývá zajímavým a důležitým tématem, týkajícím se objasnění principů uspořádání plasmatické membrány kvasinek. Disertace vznikla pod vedením RNDr. Jan Malínského, PhD na Ústavu experimentální medicíny, AV ČR v Praze. Disertace má formu souboru čtyř publikací zveřejněných v impaktovaných časopisech, který je doplněn abstraktem (v anglickém i českém jazyce), přehledem literatury a diskusí. Podíl V. Strádalové na publikacích dokládá skutečnost, že je ve třech případech prvním autorem, jednou je na místě třetím. Konkrétní podíl na experimentech je krátce specifikován v kapitole 4.3. Disertace je sepsána v angličtině a obsahuje český abstrakt. Autoreferáty jsou psány v obou jazycích.

Po abstraktu shrnujícím hlavní cíle a výsledky práce je zařazen obecný úvod do problematiky (22 stran), uvedení základních cílů práce, shrnutí použitých metod (4.5 strany) a shrnující komentář ke každé ze čtyř presentovaných publikací (celkem 7 stran). Následuje diskuse získaných poznatků a závěry (celkem 5 stran). Poslední kapitolou zařazenou před vlastní publikace je rozsáhlý seznam primární literatury (11 stran).

V první převážně metodické práci v *Histochemistry and Cell Biology* autoři vypracovali vylepšenou techniku přípravy buněčných preparátů pro paralelní sledování buněčných struktur a imunodetekce vybraných epitopů elektronovou mikroskopií. Tato technika byla využita pro další studie na kvasinkových buňkách.

Druhá práce v prestižním časopise *Journal of Cell Science* prokazuje, že dříve identifikované MCC kompartmenty plasmatické membrány kvasinek (tj. kompartmenty, ve kterých lokalizují např. některé transportéry plasmatické membrány a jsou spjaty s tzv. eisosomy) kolokalizují s vchlípeninami plasmatické membrány (“furrow-like invaginations”), které byly známy z elektron mikroskopických pozorování. Autoři krom jiného prokázali, že přítomnost proteinů Pil1p a Nce102p, které jsou důležité pro tvorbu MCC/eisosomu je důležitá pro tvorbu „furrow-like“ struktur.

Třetí práce v časopise *Eukaryotic Cell* navazuje na práci předchozí a zabývá se podrobněji funkcí proteinu Nce102p při tvorbě MCC kompartmentů. Pomocí sekvenční analýzy autoři našli homologní proteiny jak v rámci genomu *S. cerevisiae*, tak u *Schizosaccharomyces pombe*. Autoři v této práci mapovali funkční domény Nce102p z hlediska tvorby MCC a navrhli model topologie Nce102p v plasmatické membráně.

Poslední, čtvrtá práce v *PloS ONE* vychází z dřívějšího pozorování, že MCC/eisosome kompartment nekolokalizuje s kortikálním ER. Pomocí kolokalizačních experimentů autoři ukázali, že MCC/eisosome, kortikální ER a místa endocytosy obsazují různé domény plasmatické membrány a navrhli hypotézu, že dynamická struktura kortikálního ER určuje místa, kde může docházet ke „komunikaci“ s cytolem. Autoři rovněž ukázali, že oblasti MCC/eisosomu jsou jedinými stabilními částmi plasmatické membrány a že by se mohly podílet na uspořádání kortikálního ER a tedy i na delimitaci míst pro endocytosu.

Vzhledem k tomu, že výsledky uvedené v disertační práci Mgr. Venduly Strádalové již úspěšně prošly recenzním řízením před zveřejněním v kvalitních časopisech, lze konstatovat, že

experimentální přístupy i dosažené výsledky jsou na výborné úrovni. Cíle uvedené v disertaci byly nepochybně splněny.

Otázky:

Literární přehled:

1) V kapitole 1.2.1. jsou popsány 3 domény identifikované v membráně kvasinek (MCC, MCP a MCT). Je něco známo o jejich vzájemné lokalizaci, případně o dynamice za různých růstových podmínek (např. zdroje živin...)?

2) V kapitole 1.2.2.2. jsou diskutovány změny lokalizace Can1p transportéru MCC domén v závislosti na membránovém potenciálu. Podle obrázku 8 k uvolňování Can1p z MCC dochází pouze za podmínek pH 5.5, zatímco pH 7 „brání depolarizaci pomocí FCCP“. Proč? Za podmínek vyššího extracelulárního pH (a tedy méně volných H^+ iontů) by naopak účinek FCCP z hlediska „zkratování“ membránového potenciálu mohl být vyšší. Je znám účinek samotného pH na uvolňování Can1p z MCC?

Experimentální část:

3) Ad otázka 2 – sledovali jste strukturu “furrows” v depolarizovaných buňkách a/nebo v buňkách v různém pH? Pokud ano, pozorovali jste nějaké změny?

4) Domníváte se, že transportéry, které lokalizují do MCC/eisosome/”furrows” struktur jsou aktivní z hlediska transportu? Tj. sledovali jste např. zda je Can1p funkční v buňkách s delecemi Pil1p nebo Nce102p? Jaký by mohl být význam pro lokalizaci transportérů do oblasti “furrow” vchlípenin? Laicky lze předpokládat, že kontakt s vnějším prostředím zde bude horší než mimo vchlípeniny a k endocytose dochází mimo tyto struktury.

5) Technika přípravy buněk pro imunodetekci byla vypracována na savčích buňkách (publikace 1). Bylo nutné při obdobné přípravě preparátů pro imunodetekci na kvasinkových buňkách odstraňovat buněčnou stěnu?

Závěr: Mgr. Vendula Strádalová jednoznačně prokázala schopnost vědecké práce. Výsledky obsažené v publikacích disertační práce patří mezi vynikající poznatky v oblasti buněčné biologie membrán. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném zakončení doporučuji udělit autorce titul PhD.

V Praze dne 10.8. 2012

Prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.