

## Oponentský posudek na diplomovou práci

**Bc. Markéta Andršová (2012)**

### **Charakterizace a funkční analýza genu *IST2* v kvasince *Saccharomyces cerevisiae***

Diplomová práce Markéty Andršové byla vypracována v Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. pod vedením Dr. Hany Sychrové. Jedním z hlavních směrů výzkumu tohoto týmu je studium transportních systémů kvasinek pro kationty alkalických kovů.

Práce si kladla za cíl objasnění úlohy proteinu Ist2 v toleranci buněk *Saccharomyces cerevisiae* ke zvýšené koncentraci solí v médiu a jeho podílu při regulaci vnitrobuněčné homeostáze iontů.

Prvním krokem bylo ověření některých faktů uváděných v literatuře o významu a funkci proteinu Ist2. Za tímto účelem byl zakoupen kmen CEN.PK a tentýž kmen, v němž byl gen *IST2* nahrazen auxotrofním markerem *URA3*. Jeho přítomnost zlepšuje růst buněk a může tedy zkreslovat změny fenotypu vyvolané delecí sledovaných genů. Autorka se proto pokusila připravit stejný deleční kmen, v němž by byl *URA3* nahrazen jiným markerem. Opakované pokusy o nahrazení genu *IST2* markery *LEU2* nebo *KanMX* bohužel nebyly úspěšné a plánovaný deleční kmen se nepodařilo připravit. Většina experimentů v této práci však byla prováděna v laboratorním kmeni BY4741 a od něj odvozených kmenech s delecemi genů pro transportéry kationtů.

V těchto kmenech autorka nahradila gen *IST2* markery *LEU2* a/nebo *KanMX* a poté markery odstranila rekombinací využívající *cre/lox* systém. Získala tak 4 nové kmene bez genu *IST2*, u nichž dále sledovala a porovnávala jejich fenotyp především ve vztahu k toleranci buněk vůči zvýšené koncentraci různých solí v médiu. Fyziologické parametry jednotlivých kmenů sledovala pomocí kapkových testů, měřením růstových křivek, vnitrobuněčného pH a měřením membránového potenciálu. Také měřila vnitrobuněčný obsah sodíku plamenovou emisní spektrometrií.

Autorce se podařilo potvrdit výsledky z literatury o vlivu delecce *IST2* na zvýšenou toleranci kvasinkové buňky k vyšší koncentraci NaCl a KCl a zjistila nové poznatky o tomto fenotypu v přítomnosti LiCl. Dále získala řadu informací z porovnávání kmenů se současnou absencí importních systémů pro draslík.

Vymizení sledovaného fenotypu bylo ověřeno zpětným vnesením genu *IST2* v plazmidu do buněk. Konstrukce plazmidu s funkčním genem *IST2* byla jedním z dalších výsledků této práce.

Kromě experimentálních výsledků autorka vyhledala ve volně přístupných databázích všechny homologы genu *IST2* v dalších kvasinkových druzích a porovnála jejich podobnost.

Diplomová práce Markéty Andršové je klasicky členěna. Náplň i rozsah jednotlivých kapitol odpovídají jejich určení. Práce je napsána logicky a srozumitelně, pouze v některých pasážích se vyskytuje přemíra zbytečně složitých souvětí. Také anglický abstrakt by zasloužil menší jazykovou korekturu. Cíl práce je jasně formulován. Metodická část je dostatečně podrobná a přehledně sepsaná. Experimentální část velmi dobře ilustruje výsledky experimentů. Diskuse je věcná a dostatečně podrobná. Citace jsou zapsány správným způsobem a jejich výběr i počet rovněž ukazují na vysokou kvalitu diplomové práce. Grafická úprava textu je pěkná a počet překlepů minimální.

K diplomové práci Markéty Andršové mám několik dotazů a připomínek:

V přehledu kmenů (str. 31) chybí kmen BYT3, který byl použit při neúspěšném pokusu o delecii *IST2*. Jeho genotyp je však uveden alespoň v experimentální části práce (str. 47).

Z obr.10 na str. 54 je zřejmé, že kmen CEN.PK je daleko citlivější ke zvýšené koncentraci NaCl než kmen BY4741. Je známo více o snížené toleranci CEN.PK vůči solím, případně o rozdílné aktivitě jeho transportérů ve srovnání s jinými kmeny?

Je škoda, že se nepodařilo připravit z kmene CEN.PK deletant *IST2* s jiným markerem. Tušíte, co bylo příčinou tohoto neúspěchu? Nebylo možné využít kmen CEN.FE1-2A a pouze odstranit marker *URA3* nebo ho vyměnit za jiný? Nezkoušeli jste potlačit vliv *URA3* přidávkem zvýšeného množství uracylu do média u kmenů bez *URA3*?

V literárním přehledu uvádíte, že protein Ist2 obsahuje C-koncovou doménu, díky níž se může vyhnout klasické sekreční dráze. Je tato doména přítomna i u Vámi nalezených homologů genu *IST2*? Existují i další proteiny s podobnou doménou?

Máte nějakou teorii o mechanismu působení proteinu Ist2, případně co se děje v jeho nepřítomnosti?

Je nebo bude tato práce nebo její část součástí nějaké publikace?

Uvedené připomínky jsou jen formálního charakteru a nijak nesnižují kvalitu práce. Předložená diplomová práce Markéty Andršové po všech stránkách vyhovuje podmínkám na takovouto práci kladeným a doporučuji ji k obhajobě.