

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Jaromíra Zahrádky nazvanou:

„Fyziologické úlohy Na⁺/K⁺ antiporterů v kvasinkách“

Ve své doktorské disertační práci se Mgr. Jaromír Zahrádka zabývá studiem fyziologických úloh Na⁺/K⁺ antiporterů v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Genom kvasinky *S. cerevisiae* byl kompletně osekvenován v roce 1996 a patří k nejdůležitějším modelovým organismům eukaryotních buněk pro základní i aplikovaný výzkum. Těžiště práce spočívalo ve využití tohoto modelového organismu při výzkumu homeostase iontů alkalických kovů. Byla připravena celá série mutantních kmenů, které postrádaly v různých kombinacích geny kódující jednotlivé transportéry iontů alkalických kovů. U takto připravených kmenů pak byly charakterizovány základní vlastnosti a parametry a konečně byly kmeny využity pro studium úloh Na⁺/K⁺ antiporterů plasmatické membrány.

Výsledky práce Mgr. Jaromíra Zahrádky jsou členěny do sedmi částí, zahrnující pět publikovaných prací, jeden rukopis a jeden výsledek aplikovaného výzkumu. První publikace se zabývá studiem dvou nejvíce používaných laboratorních kmenů *S. cerevisiae*, BY4741 a W303. Mezi těmito dvěma kmeny byly pozorovány značné rozdíly v jednotlivých parametrech homeostase iontů alkalických kovů. V druhé a třetí publikaci byla detailně studována role transporterů Trk1 a Trk2 ve fyziologii buňky v prostředí s dostatkem i nedostatkem draslíku. Současně bylo objasněno, že delece genů *TRK1* a *TRK2* v médiu bez iontů K⁺ způsobí inhibici exportu iontů K⁺, na kterém se podílí všechny tři exportery (Ena, Tok1 a Nha1). Bylo zjištěno, že exportery Ena, Nha1 a Tok1 jsou inhibovány právě delecí *TRK1* a *TRK2*. Toto pozorování prokázalo vzájemný vztah mezi importery a exportery iontů alkalických kovů.

V rámci čtvrté publikace se Mgr. Zahrádka zaměřil na regulaci homeostase iontů alkalických kovů pomocí kvasničných proteinů 14-3-3. Bylo zjištěno, že proteiny 14-3-3 působí jako pozitivními regulátory (aktivátory) Nha1 antiporteru. Bylo prokázáno více míst interakce mezi 14-3-3 a Nha1 - jak na C-koncové hydrofilní polovině Nha1p, tak na transmembránové polovině. V rámci tohoto projektu absolvoval Mgr. Zahrádka krátkou zahraniční stáž, v rámci které převzal a do laboratoře Dr. Sychrové zavedl metodu pro měření interakcí proteinů *in vivo* (metoda BiFC – Bimolecular-Fluorescence-Complementation method). Pátá část zahrnuje rukopis připravený k odeslání. V rámci této publikace byla poprvé identifikována jedna z podjednotek kaseinkinasy (CK2) Cka1p coby nově identifikovaný pozitivní regulátor (aktivátor) Nha1p. V rámci šesté publikace byl studován lidský Na⁺/H⁺ antiporter NHAoc/NHA2, který je nutný pro správnou diferenciaci lidských osteoklastů. Na základě studie byly identifikovány tři aminokyselinové zbytky v sekvenci tohoto antiporteru, k jejichž záměně může v lidských buňkách docházet vlivem jednonukleotidových polymorfismů. U těchto aminokyselinových zbytků byla provedena cílená mutace a sledována transportní aktivita mutovaného proteinu. Bylo odhaleno, že i

samotná mutace v jednom ze tří identifikovaných zbytků může zásadně ovlivnit aktivitu transporteru a v lidském organismu může taková mutace stát za poruchami tvorby kostí.

Součástí předkládané disertační práce jsou i nepublikované výsledky projektu aplikovaného výzkumu, které zahrnují vývoj softwarové aplikace umožňující sledování změn vnitrobuněčného pH *in vivo* v reálném čase v jednotlivých buňkách v různém prostředí. Nově vytvořenou metodou byly ověřeny výsledky publikované v rámci druhé publikace, které prokázaly, že buňky postrádající *TRK1* a *TRK2* mají signifikantně nižší pH než buňky kmene BY4741. Výstupem projektu byl vznik software Ocellaris, který je v současné době ve formě funkční testovací verze, a na jehož dokončení a komercializaci se ještě pracuje.

Výrazným rysem této disertační práce je kombinace řady různých metod z oblasti molekulární biologie, biochemie, buněčné fyziologie a biofyziky chemie, navíc bylo navrženo několik nových metod: měření interakcí proteinů *in vivo* (metoda BiFC), měření velikosti buněk (CASY TT, Roche), aplikace pro automatické a snadné vyhodnocení dat a unikátní softwarová aplikace umožňující sledování změn vnitrobuněčného pH (Ocellaris). Tento komplexní přístup považuji za ideální.

Disertační práce Mgr. Jaromíra Zahradky je založena na pěti publikovaných článcích a jednom rukopisu, přičemž na čtyřech z nich je prvním autorem. Všechny publikace byly otištěny v prestižních mezinárodních časopisech včetně dvou publikací v *Biochim Biophys Acta*. To samo o sobě svědčí o významu a kvalitě výzkumu ve skupině školitele této práce. Doktorská disertační práce je psána česky, má standardní členění a k práci jsou dále přiloženy kopie jednotlivých publikací. Z formálního hlediska je vše v pořádku, výskyt překlepů je minimální. V práci je několik drobných formulačních nepřesností, ale ty nijak nebrání srozumitelnosti textu.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám pouze následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. Ve vaší práci byly identifikovány hned dva dosud neznámé pozitivní regulátory Nha1p. Jedním z nich jsou kvasničné 14-3-3 proteiny. Zajímavé je, že tato interakce nezávisí na fosforylaci, jak je u 14-3-3 proteinů časté. Mohl byste shrnout princip a výhodu metody BiFC (Bimolecular-Fluorescence-Complementation method), kterou jste interakci pozoroval? A jak si představujete interakci mezi 14-3-3 a Nha1p?

2. Expres *BMH1* je indukována přítomností soli, na rozdíl od exprese *NHA1*, avšak zdá se, že C-konec Nha1 proteinu je za solného stresu fosforylován na dvou místech pomocí Hog1 kinasy. Je známa detailní charakterizace této interakce, popřípadě další kinasy, které interakci mezi těmito proteiny ovlivňují? Jakou roli hraje fosforylace v tomto ději?

3. Aktivitu antiporteru Nha1p ovlivňuje i kaseinkinasa Cka1p. Je známo fosforylační místo pro kaseinkinasu Cka1p na Nha1p?

4. Můžete stručně vysvětlit princip těchto metod:

a) měření velikosti buněk pomocí CASY

b) měření relativního membránového potenciálu

c) měření vnitrobuněčného pH *in vivo* pomocí aplikace Ocellaris a její výhody oproti použití GFP?

d) metodu homologní rekombinace použitím Cre-loxP systému

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Jaromíra Zahrádky představuje cenný přínos ke studiu Na⁺/K⁺ antiporterů v kvasinkách. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v prestižních mezinárodních časopisech. Autor ve své disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Jaromíra Zahrádky více než vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.

V Praze 4. září 2013

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Oddělení Proteinových struktur
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.