

## Oponentský posudek na disertační práci Evgenije Kuznetsova MSc:

### Function and localization of the SUN family proteins in yeast populations

E. Kuznetcov předložil k obhajobě práci, která je podložena dvěma originálními publikacemi v časopisech s výborným impakt faktorem (3,23 a 4,56), na nichž je v obou případech prvním autorem i autorem naprosté většiny v nich uvedených výsledků. Tématem jeho primárního zájmu byly 4 proteiny z rodiny SUN proteinů, potenciálních glukonáz, o jejichž funkci v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* není dosud příliš známo.

V první publikaci se Evgenijovi podařilo ukázat, že 3 z těchto proteinů jsou nejen přítomny v buňce, ale i sekretovány vně buněk a to jak při jejich kultivaci v tekutém médiu, tak v případě růstu buněk ve formě kolonií. Zjistil také, že se jejich produkce a sekrece částečně liší podle toho, zda jsou buňky kultivovány za respiračních nebo fermentačních podmínek nebo v prostředí s různou koncentrací kyslíku. A dále, že delece příslušných genů vedou v některých případech ke změně citlivosti na různé toxické látky, opět v závislosti na kultivačních podmínkách.

V druhé publikaci se pak věnuje podrobné charakterizaci lokalizace Sun4 proteinu v buňce. K získání řady velmi zajímavých výsledků mu pomohla mimo jiné vtipná kombinace značení C a N konců proteinů značkami identifikovatelnými pomocí protilátek a současné značení 2 proteinů v jedné buňce různými značkami. Autorovi se podařilo prokázat, že Sun4 protein je lokalizován především v jizvách zrodu a to v závislosti na transkripčním faktoru Ace2. Dále zjistil, že jeho správnou lokalizaci v jizvě zrodu ovlivňují domnělé hydrolázy, Dse2 a Etg2, které s ním kolokalizují a vytvořil model toho, jak konkrétně jejich lokalizace a pravděpodobná interakce v oblasti jizvy zrodu vypadá. Model rovněž ukazuje, že orientace C a N konců studovaných proteinů může být v jizvě zrodu nebo jinde v buněčné stěně odlišná. Prokázal také, že další pravděpodobná hydroláza, Dse4 je rovněž lokalizována v oblasti jizvy zrodu, ale ne společně se Sun4p a že správná lokalizace proteinů Sun4 a Dse2 je závislá na funkci proteinu Aim44. Ze svých výsledků odvozuje, že by mohly tyto proteiny mít roli při výstavbě jizvy zrodu a při oddělování pupene od mateřské buňky.

Autor pro získání těchto výsledků připravil velké množství geneticky upravených kmenů (minimálně 38 nových kmenů *S. cerevisiae*), ověřil správnost těchto konstruktů a následně provedl velké množství imunofluorescenčních a proteinových analýz. Množství odvedené práce je úctyhodné. Zahrnovalo práci s plasmidy, konstrukci kmenů, izolaci proteinů z média, buněk a buněčných stěn, jejich identifikaci na gelech i imunofluorescencí a testy citlivosti k několika toxickým látkám. Je jasné, že se autor musel jistě potýkat s únavou z mnohokrát se opakujících postupů, které ovšem v závěru vedly k získání velmi zajímavých výsledků.

Vlastní disertační práce o rozsahu 153 stran je členěna do obvyklých kapitol, z nichž kapitola Introduction má 30 stran, kapitola Materials and methods 20 stran, kapitoly Results and discussion jsou spojeny a mají 39 stran. Uvedeno je téměř 140 referencí. Zařazeny jsou i 2 uvedené publikace.

V přehledu literatury se Evgenij zaměřil na geny a proteiny, které patří do SUN rodiny, a další proteiny, které později studoval a na charakterizaci typů jizev. Postrádala jsem ale základní údaje o komponentách buněčné stěny nebo o složení a struktuře buněčného septa, což by napomohlo kvalitnímu uvedení čtenáře do tématu. Z uvedeného by se například mohlo zdát, že proteiny SUN rodiny jsou jediné proteiny lokalizované v buněčné stěně. K této části mám několik výtek:

1/ Autor zde prezentuje řadu převzatých obrázků, u nichž však nikdy neuvádí zdroj, někdy ani nevysvětlí zkratky uvedené na obrázku, zcela nedostatečně vysvětluje schémata na Fig.18 a19.

2/ Nedodržuje úzus o označování genů kurzívou.

3/ Nejednotně uvádí označení  $\beta$ -glukanů nebo glukanáz (např. str. 17: b-glucosidase nebo beta-glucosidase, str.22:  $\beta$ -glucan).

4/ Na str. 25 uvádí, že delece genu *PSU1* je letální a zároveň, že deletanti jsou resistantní k 1,3- $\beta$ -glukanáze. Jak je to možné?

5/ Popis způsobu pučení u pseudohyf na str. 30 je nesprávný.

6/ Na Fig. 11 na str. 31 je uveden gen *ENG1* – podle textu je to gen *Schizosaccharomyces pombe*, ale na obrázku je *S. cerevisiae*.

7/ Str. 35 – není pravda, že *všechny houby* mají jednu jizvu zrodu.

8/ V této části stejně jako v části experimentální části občas chybí citace.

Experimentální část textově i fotografickou dokumentací dostatečným způsobem popisuje získané výsledky. Přesto ale i k ní mám určité připomínky:

1/ Některé obrázky z imunofluorescenčních pokusů jsou příliš malé, není na nich dobře vidět, to, co je v textu popisováno – např. Fig. 1 na str.83 - lokalizace budding-within-birth scar není dobře vidět. Některé obrázky jsou řazeny jinde, než by měly být, což čtenáři komplikuje četbu (např. Fig.1G pravá strana na str. 83 - mělo být až u textu na str. 87). Obrázek dokumentující výsledky s kmenem s delecí genu *AIM44* chybí ( v publikaci je).

2/ Autor uvádí, že zavedl novou metodu vizualizace proteinů buněčné stěny. Je škoda, že nerozvedl, v čem je tato metoda nová.

3/ Některé chyby v textu matou čtenář, protože neodpovídají obrázku – např. na str. 65, 3. řádek shora – slovo *medium* (nepatří tam), na str. 67, 3. řádek shora - chybí část věty ... remained constant....to neodpovídá obrázku, v publikaci věta pokračuje... its level began to decrease from the 24<sup>th</sup> h onwards.

4/ Proč nejsou uvedeny některé výsledky? Viz str. 90, kde je uvedeno o lokalizaci Dse2p-HA v nepřítomnosti Dse4p nebo Sun4p, že : not shown. V publikaci ale příslušné obrázky jsou.

Za nevhodné řešení považuji rozčlenění diskuse na krátké úseky (celkem 10 krátkých diskusí) za jednotlivými kapitolami výsledků. Myslím, že toto práci neprospělo, uvažování o interpretaci výsledků to dost znepřehlednilo. Navíc většina těchto dílčích diskusí je hlavně opakováním konstatování výsledků případně s jednověťmi domněnkami o možné interpretaci. Citace z literatury se objevují v počtu 8 pouze v jedné této diskusi, po jedné citaci v dalších 3, ve zbytku žádné citace nejsou. V disertační práci bych předpokládala nějaké podrobnější úvahy, doložené buď údaji z literatury, případně úvahami, které vedly v průběhu práce k volbě dalších experimentů nebo návrhy dalšího možného pokračování studia složení a výstavby jizvy zrodu v budoucnu.

Velká škoda je, že autor bohužel nevěnoval sepsání práce dostatečnou pozornost, nebo mu moc nezáleželo na čtenáři. O tom svědčí např. špatné číslování kapitoly 5 a následujících kapitol – to snad ani tolik nevádí, čtenáře to příliš nemate. O nepozornosti ale svědčí i naprosto zbytečné překlepy, např. cytogenesis místo cytokinesis (str. 28, opakovaně), pseudohyphae místo pseudohyphae (str. 30), glucanese, gluconase místo glucanase (např. str. 31). Český abstrakt a autoreferát jsou se spoustou chyb v češtině – autor pracoval spolu s českými kolegy. Proč je nepožádal o korekturu těch několika stránek textu? Autor se také neobtěžoval přečíslovat některé obrázky po jejich převzetí z publikace (str. 84: Fig. S1, str. 92: Fig.3 G a H, str.93: Table S1). Str. 96, Fig.6 – Nadpis obrázku:“ Co-

localization of Dse2p and Dse4p“ neodpovídá výsledku – jak autor zjistil, Dse2p a Dse4p nekolokalizují. Dovoluji si také upozornit, že autor nestudoval v programu Genetika, buněčná biologie a virologie, jak uvádí na titulní straně, ale v doktorském studijním programu Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie.

K práci mám ještě několik dotazů, včetně metodických:

1/ Str. 51 – obsahuje médium GMA agar? Proč se přidávalo 0,05% glukosy?

2/ Str. 59 – při centrifugaci při max. 2000g - opravdu se stočí buněčné stěny? Neusadí se i nerozbité buňky? Bylo to nějak ověřeno?

3/ Str. 60 – proč se dělala předinkubace s toxickou látkou? Proč v tomto případě bylo kultivováno 6 kolonií na misku, jinde se o tomto způsobu kultivace nepíše.

4/ Máte nějakou argumentaci proti podezření na možnost, že označené proteiny by mohly být lokalizovány odlišně než proteiny neoznačené?

5/ Máte nějakou představu o tom, jak by se vámi studované proteiny mohly konkrétně účastnit remodelace buněčné stěny, jak několikrát v diskusi uvádíte? Mohou být tyto proteiny vně buňky nějak aktivní? Ví se, co hydrolyzují? Viz str. 28, kde uvádíte, že existují 2 skupiny hydroláz – k jaké skupině patří protein Dse2?

6/ Proč jsou v názvu práce „kvasinkové populace“? Při práci s kvasinkami vesměs nepracujeme s jedinou buňkou. Stačilo by: Function and localization of SUN family proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.

**Závěr:** K textu disertační práce mám tedy poměrně dost výhrad. Doporučovala bych proto autorovi do budoucna věnovat sepsování dalších prací především po formální stránce větší pozornost. Nicméně autor získal dostatek experimentálních výsledků umožňujících sepsání dvou hodnotných publikací přijatých v časopisech s velmi dobrým impakt faktorem, přičemž je v obou prvním autorem. Svoji bezesporu usilovnou experimentální prací získal velmi zajímavé výsledky v dosud málo prozkoumané oblasti studia vývoje kvasinkových buněk. Doporučuji proto, aby po úspěšné obhajobě sloužila tato práce jako podklad pro udělení titulu PhD.

V Praze 19.8.2016

Doc. RNDr. Blanka Janderová CSc.