



RNDr. Jaromír Lukavský, CSc.

Dukelská 135, 379 82 Třeboň, Tel.: 384721156, Fax: 384721136, E-mail: lukavsky@butbn.cas.cz

OPONENTSKÝ POSUDEK

na doktorskou disertační práci „Cyklin-dependentné kinázy zelených rias *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*“

Autor: **Mária Čížková**, Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Oddělení autotrofních mikroorganismů, Opatovický mlýn

Předkládaná doktorská disertační práce je příspěvkem ku poznání regulace buněčného cyklu u řas, které se dělí několikanásobným dělením (*Chlamydomonas* a *Scenedesmus*). V případě řasy *Chlamydomonas* se její pozornost se soustředila především na sledování schopnosti řasových cyklin-dependentních kináz komplementovat kvasinkové teplotně senzitivní mutanty, možnou úlohu genů *UVSX1* a *UVSX2* v regulaci buněčného cyklu v odpovědi na poškození DNA a zapojení vnitřních cirkadiálních hodin v načasování buněčného dělení. U řasy *Scenedesmus* studovala především regulaci a načasování reprodukčních procesů, změny v aktivitě cyklin-dependentní kinázové aktivity a pozornost také věnovala mechanismu načasování chloroplastového dělení s ohledem na vliv inhibice replikace DNA. Podrobně jsou tato témata shrnuta ve čtyřech publikacích, které jsou přiloženy na závěr disertační práce. Jedná se o publikace jak přijaté tak i zatím zaslané do výborných časopisů s vysokým impakt faktorem, jedna je rukopis. Všechny obsahují literární úvod, podrobné metody a výsledky a výsledky jsou diskutovány s výsledky jiných autorů. Kromě publikací prezentovala autorka své výsledky na mezinárodních konferencích.

Bohatý literární přehled je napsán jasnou a srozumitelnou formou, což ukazuje na sečtenost autorky, a také na fakt že se se studovaným tématem velice dobře obeznámila. Obsáhlý seznam literatury jen podtrhává odbornost autorky.

Ke str. 3 mám následující upřesnění. *Scenedesmus obliquus* je neprosto odlišný od *Scenedesmus quadricauda*. Poslední byl také nyní přejmenován na *Desmodesmus communis*. Důvodů je několik. *Desmodesmus communis* má nerozpadavá cenobia, buňky v cenobiu jsou drženy pohromadě vnější sporopolenivovou sítí se složitou strukturou. Rozmnožuje se pouze tvorbou autosporinních cenobií. *Scenedesmus obliquus* má tzv. rozpadavá cenobia, v kultuře se skládá povětšinou z jednotlivých oválných buněk. Také za určitých podmínek (nedostatek N, nízká teplota a světlo) tvoří někdy pohyblivé bičíkaté buňky, zoospory, snad fungují i jako gamety. Důvodů pro oddělení je více, struktura pyrenoidu i molekulárně-genetické (18S rRNA).

**DOKTORSKOU PRÁCI HODNOTÍM JAKO VÝBORNOU DOPORUČUJI
PŘIJMOUT K OBHAJOBĚ**

V Třeboni dne

RNDr. Jaromír Lukavský, CSc.

Oponentský posudok

na doktorandskú dizertačnú prácu Mgr. Márie Čížkovej: „Cyklín-dependentné kinázy zelených rias *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*“

Hoci je bunkový cyklus a jeho regulácia predmetom záujmu viacerých biologických vedných disciplín už niekoľko desaťročí, problematika nie je ani zďaleka podrobne preskúmaná a viaceré kroky priebehu a regulácie delenia bunky a jej organel ostávajú neprebádané a detailne nepochopené. Dôkazom je množstvo publikovaných prác z tejto oblasti, ktorých počet ani v súčasnosti podstatnejšie neklesá, a ktoré stále prinášajú nové, teoreticky závažné a prakticky významné poznatky.

Som rád, že do tejto množiny teoreticky aj prakticky prínosných prác na tému bunkový cyklus možno zaradiť aj posudzovanú prácu Mgr. Márie Čížkovej, presnejšie povedané, jednu publikáciu v tlači, dve publikácie (rukopisy) v recenznom pokračovaní a jeden rukopis publikácie pripravený do tlače.

Súbor prác má spoločnú úvodnú časť, „Literárny prehľad“, ktorý dokazuje, že autorka je dobre zorientovaná v skúmanej problematike a má veľmi dobrý prehľad o prácach v danej oblasti. Rozsah vykonanej experimentálnej práce a široká paleta metód, ktoré boli v práci úspešne využité zasa ukazuje, že autorka vie pracovať nielen s literatúrou, ale vie zvládnuť aj náročné experimentálne postupy. Interpretácia dosiahnutých výsledkov v stručnom súhrne každej práce zasa poukazuje, že doktorandka dokáže nové výsledky nielen získať, ale ich v kontexte známych literárnych údajov aj správne a prínosne interpretovať.

Za prínosné pre ďalší rozvoj poznania vo zvolenej oblasti skúmania možno považovať viacero zaujímavých výsledkov uvedených v predloženej práci, ako sú napr.: zistenie, že proteinkinázy *Chlamydomonas reinhardtii* CDKA1 a CDKB1 môžu komplementovať poruchu v regulácii priebehu bunkového cyklu mutanta *cdc-28-1N S. cerevisiae*; získanie prvých poznatkov o regulačnom prepojení medzi detekciou poškodenia DNA a priebehom bunkového cyklu u tohto modelového organizmu; dôkaz o vylúčení úlohy „cirkadiánnych hodín“ v bunkovom delení *C. reinhardtii* ako aj zistenie vzťahov medzi chloroplastovým a jadrovým delením u *Scenedesmus quadricauda*.

K práci nemám žiadnu závažnejšiu kritickú pripomienku, len niekoľko formálnych poznámok a otázok do diskusie.

- Oceňujem „široký záber“ predkladanej práce týkajúci sa regulačného prepojenia základného priebehu bunkového cyklu s ďalšími esenciálnymi bunkovými procesmi. Širšie zameranie však so sebou prináša aj riziko vo zvládnutí „optimálneho spracovania“ všeobecnej časti venovanej teoretickým poznatkom (literárny prehľad) o skúmanej problematike. Vo vzťahu k obsahu práce mohla byť do tejto časti zaradená aspoň stručná informácia o delení chloroplastu a jeho vzťahu k bunkovému cyklu a o vzájomnom vzťahu medzi poškodením DNA a priebehom bunkového cyklu (checkpoint).
- V základnej charakteristike druhu *C. reinhardtii* (str. 2) sa hovorí o odchylke od univerzálneho genetického kódu, správnejšie by bolo uviesť, že sa jedná o odchylku vo využívaní kodónov vo vzťahu k vysokému obsahu G-C párov.
- Na str. 3 sa uvádza odhad veľkosti jadrového genómu *Chlamydomonas* na 110 Mb s citáciou Merchant et al. (2007), v tejto práci je však uvádzaná veľkosť 120 Mb.
- Na str. 10 sa hovorí o ubiquitine ako o značke pre „zničenie“ proteínu v proteazome. Tvrdenie je pravdivé, ale doslovne v tejto podobe by vylučovalo možnosť, že „ubiquitinácia“ proteínu nemusí za každých okolností viesť len k degradácii proteínu, ale napr. aj k zmene jeho funkcie.
- V regulačnom prepojení poškodenie DNA – bunkový cyklus sa u *Chlamydomonas reinhardtii* zatiaľ ukazuje kontrolný bod v G2 fáze cyklu ako hlavný a esenciálny pri poškodení DNA (zatiaľ však stále len v štádiu „predbežných“ výsledkov), na rozdiel od kvasiniek *S. cerevisiae*, kde má dôležitú úlohu aj kontrola v G1/S. Mohli by tu zohrávať úlohu rozdiely v pomernom zastúpení homologickej rekombinácie a spájania nehomologických koncov reťazcov DNA (NHEJ) pri oprave poškodení DNA u *Chlamydomonas* a *Saccharomyces*, a ak áno, prečo ?
- Mohla by autorka povedať svoj názor na príčiny tak značných rozdielov v obsahu génov kódujúcich proteinkinázy s úlohou v regulácii bunkového cyklu medzi riasami a vyššími rastlinami ?

Celkové hodnotenie:

Autorka dizertačnej práce jednoznačne dokázala, že vie formulovať relevantný a aktuálny vedecký problém, je zorientovaná v literatúre, ktorá sa na tento problém vzťahuje a dokáže ho riešiť použitím náročných experimentálnych metód. Získané výsledky správne interpretuje v kontexte doterajších poznatkov. Práca spĺňa atribúty doktorandskej dizertačnej práce, preto

doporučujem, aby bola prijatá k obhajobe a po úspešnej obhajobe navrhujem udelenie vedecko-akademickej hodnosti Ph.D.

V Bratislave 28. 3. 2008



prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc.

**ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE
ODDĚLENÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY**

U nemocnice 1, 128 20 Praha 2

Tel. : 221977408

Fax : 221977371

email: haskovec@uhkt.cz

Oponentsky posudek

disertační práce Mgr. Márie Čížkové

„Cyklín-dependentné kinázy zelených riás *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*“.

Předložená práce se zabývá velmi aktuálním a z teoretického hlediska i velmi významným problémem studia průběhu buněčného cyklu u jednobuněčných zelených řas. Autorka si pro svůj výzkum vybrala velmi vhodný biologický model, tj. řasy rodu *Scenedesmus* a *Chlamydomonas*, které mají zajímavý fenomén - mnohonásobné dělení, které poskytuje více než dvě dceřiné buňky (za určitých podmínek může vzniknout až osm dceřinných buněk) po proběhnutí jednoho buněčného cyklu.

Práce je souborem celkem čtyř původních odborných článků publikovaných, přijatých do tisku nebo do tisku zaslaných, v mezinárodních impaktovaných časopisech, kterých je předkladatelka spoluautorkou, z nich na jedné jako první autorka. Společným jmenovatelem prací jsou otázky buněčného cyklu u řas *Scenedesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*.

Za nejvýznamnější výsledky považují především ty, které jsou prezentované v práci Sviežená et al., zaslané do *Plant Cell Reports*, týkající se možné úlohy genů *UVSX1* a *UVSX2* v rozpoznávání poškození DNA a zastavení buněčného cyklu u řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Dále pak výsledky z práce Hendrychová et al., která je v recenzním řízení v časopise *Protoplasma*, které naznačují úlohu proteinu *FtsZ* při dělení chloroplastů řasy *Scenedesmus quadricauda*.

Práce dále obsahuje krátký úvod, který stručně charakterizuje předmět práce a uvádí i místo vytvoření práce, podrobný a zasvěcený literární přehled do dané problematiky s rozsáhlým přehledem citované literatury. Za nejcennější považují shrnutí výsledků prezentovaných v publikacích v kontextu s výsledky publikovanými v odborné literatuře. V závěru práce jsou uvedeny kopie jednotlivých prací. Práce rovněž obsahuje prohlášení

vedoucího laboratoře dr. Zachledera o participaci autorky na publikovaných pracích, potvrzené podpisy ostatních spoluautorů

K práci nemám žádnou výhradu nebo kritickou připomínku, pouze dva dotazy, které se týkají výsledků uvedených v práci : 1. Zajímalo by mě, jestli uvedené proteiny UVSX1 a UVSX2 odpovídají proteinu p53 u savců? a 2. Jsou známy mechanismy, které chrání ať už nižší, nebo vyšší, vysokohorské rostliny před UV zářením?

Z formálního hlediska je práce na velmi dobré úrovni, i když jazykovou stránku nejsem schopen zodpovědně posoudit. Pouze bych si dovolil namítnout, že by práce mohla ještě obsahovat stručný souhrn pregnantně podávající získané výsledky. Vcelku ale považuji práci za velmi kvalitní. Za nejpodstatnější považuji především skutečnost, že výsledky studia byly publikovány, nebo přijaty do tisku, v několika odborných impaktovaných mezinárodních časopisech.

Závěr: Z práce je zřejmé, že autorka práce si osvojila moderní metody vědecké práce, získala řadu cenných vědeckých poznatků, které publikovala v mezinárodních odborných impaktovaných časopisech. Navíc, i způsob zpracování a interpretace výsledků nesporně svědčí o schopnostech autorky k další tvůrčí samostatné vědecké práci. Na základě těchto skutečností **doporučuji předloženou práci k obhajobě** a aby na základě úspěšné obhajoby byl Mgr. Márie Čížkové **přiznán titul PhD.**

V Praze 8.4.2008



RNDr. Cedrik Haškovec, CSc