

Oponentský posudek na diplomovou práci Michaely Vrbové : „Role signální dráhy HOG MAPK při osmotickém stresu u *Saccharomyces cerevisiae*“.

M. Vrbová předložila práci v rozsahu 77 stran, z toho 20 str. přehledu literatury, 18 str. metodických, 18str. prezentujících experimentální výsledky, 4 str. diskuze a 7 str. seznamu citované literatury.

V práci se zabývala problematikou ovlivnění míry translace a exprese konkrétních genů při osmotickém stresu u původního rodičovského kmene *S. cerevisiae* a dvou mutantů v genu *HOG1*. Sledovala polysomální profily aktivně translatovaných mRNA krátce po vystavení buněk osmotickému stresu a po 30 minutách jeho trvání a dále mikročipovou technikou indukci a represí transkripce genů v takto opůsobených buňkách. Experimenty realizovala v zahraniční laboratoři, kde měla možnost využít potřebné technické vybavení. Jejím důležitým příspěvkem kromě manuální laboratorní činnosti byla práce spojená s vyhodnocováním výsledků.

V Přehledu literatury autorka uvádí čtenáře do problematiky nejdříve stručným výkladem potřebných pojmů a dále uvádí dosavadní znalosti o HOG-MAP kinázové kaskádě, její regulaci a znalosti o proteinech a genech, které jsou aktivovanou drahou ovlivňovány. Kapitola svědčí o tom, že autorka prostudovala potřebnou, většinou recentní literaturu a přehledným způsobem ji zpracovala.

Několik drobností k této kapitole:

1/ Kapitoly 3.3.6. a 3.3.9. týkající se glycerolu jsou ne zcela vhodně včleněny mezi kapitoly o HOG dráze.

2/ Str.14 - tvrzení o malé molekule, která difunduje po buňce ve funkci druhého posla pro uváděné kaskády pokud vím není správné, v uvedených kaskádách jde spíše o interakce mezi zúčastněnými proteiny.

3/ Na str. 20 jde o přehlédnutí v textu – jedná se o dráhu regulující párování, jak je uvedeno u obrázku, ne o dráhu pseudohyfálního růstu.

4/ V seznamu literatury jsem nenašla citaci Propt et al., 2005.

Autorka při experimentální práci využila velmi náročných metodik a v kapitole Materiál a metody tyto metodické postupy velmi kvalitně didakticky vysvětlila. Je škoda, že zde nebo při nejbližší příležitosti v experimentální části neuvedla charakteristiku kmene *hog1-as*, tu se čtenář dozvídá až při čtení diskuze.

Opět drobné připomínky: počítačové programy bych nezahrnovala mezi přístroje, proč se do agaru přidává metanol v různém množství?, kap. o RNA extrakci: „Centrifugace: 12000g...“, centrifuguje se co?

Experimentální část uvádí v podstatě jeden typ rozsáhlého experimentu, realizovaného ovšem vícekrát opakovaně se 2 kmeny, při němž byly izolovány polysomální frakce a následně RNA, použitá autorkou následně k mikročipové analýze transkriptomu. Výsledkem je řada získaných dat, která jsou původní a hodnotná. Jejich prezentace ovšem někdy čtenáře nutí k mírně detektivní analýze. Proto následuje několik mých dotazů pro ujasnění přečteného:

1/ Proč byl testován AS inhibitor na médiu s 1M NaCl, když experimenty byl prováděny na médiu s 0,4M NaCl?

Co autorku opravňuje k tvrzení, že AS inhibitor je specifický? Domnívám se, že uvedený experiment pouze prokazuje, že inhibitor ovlivňuje adaptaci na zvýšený osmotický tlak.

2/ Z Grafu 2 ani z Grafu 4 neplyne, že by po 30 minutách stresu mutant *hog1Δ* obnovoval translaci, jak autorka vyvozuje. Stejně tak ani rodičovský kmen wt se nezačíná zotavovat po 6 minutách (Graf 4).

3/ Výčet genů u nichž došlo ke zvýšení transkripce v Tabulce 7, Obr. 17 a Grafu 5 si neodpovídá. Autorka neuvedla jasně, že v tabulce a na obrázku se jedná o geny s různou mírou vzestupu transkripce. Navíc některé geny uvedené v Grafu 5 jsem nenašla ani v Tab.7 ani v Obr. 17. Kolik genů celkem tedy autorka detekovala?

Proč jsou uváděny pouze výsledky získané z času 6 min. po osmotickém šoku, když autorka uvádí, že sledovány byly také časy 2 minuty a 30 minut a navíc čas 6 minut už považuje za dobu, kdy začíná zotavování se buněk?

Obdobně u výčtu genů, jejichž transkripce byla snížena: Tab. 9 uvádí výčet genů se snížením více než 2x, v Grafu 7 jsou pak porovnány jiné geny s menším snížením – není jasné o kolik genů a v jakých hladinách exprese celkově šlo.

4/ Proč byla jako referenční použita RNA z rodičovského kmene (ta byla ale zřejmě připravena někým jiným?) a ne RNA příslušného kmene z času 0. minut stresu?

5/ Jak autorka zjistila ze stanovených polysomálních profilů intenzitu translace konkrétních mRNA, což uvádí na str.61?

6/ Str. 64 – Graf 7 – jde opravdu o translaci?

Diskuze je celkem krátká a do značné míry opakuje výsledky uvedené v experimentální části. Srovnání svých výsledků s literárními údaji už autorka v podstatě provedla v experimentální části. Postrádám pouze byť krátké shrnutí představy o tom, co se děje v buňkách s poruchou funkce Hog1 proteinu při osmotickém stresu na buněčné úrovni, které mohlo být provedeno na základě získaných dat a literárních údajů uvedených v literárním přehledu.

Ještě několik obecnějších připomínek:

1/ Práce více popisuje, někdy opakovaně, co se dělalo, méně už a někdy až příliš pozdě, proč se to dělalo. Např. výsledková kapitola je uvedena pasáží nazvanou Projekt – vlastně popis experimentu. Není ale uvedeno, proč byly používány právě zvolené 2 mutantní kmeny, to se čtenář dozví až v diskuzi.

2/ Autorka vícekrát zvolila formulace nevhodné do odborné práce – pro příklad: str. 55: „translace se rozbíhá, ale trvá to mnohem pomaleji“, str.56: „replikace“ ve smyslu opakování experimentu, str. 57: „translace se dává do pořádku“, str. 68: „nejprve napíší geny“.

3/ V seznamu literatury chybí mezerníky mezi čísly stránek; názvy časopisů jsou v nezkrácené podobě, což není obvyklé ani doporučeno pro sepisování diplomové práce.

Závěr: Předloženou práci M. Vrbová dokázala, že je schopna nastudovat a patřičně prezentovat literaturu na zadané téma, je schopna experimentálními postupy získat nová hodnotná data a ta odborně prezentovat. Doporučuji proto, aby její práce byla přijata jako práce diplomová.

V Praze 22.5.2007

doc.RNDr. Blanka Janderová CSc.