

Posudek práce

předložené na Matematicko-fyzikální fakultě
Univerzity Karlovy v Praze

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> posudek vedoucího | <input checked="" type="checkbox"/> posudek oponenta |
| <input type="checkbox"/> bakalářské práce | <input checked="" type="checkbox"/> diplomové práce |

Autor/ka: Peter Zalom

Název práce: Regulace vnitřního pH kvasinek – vliv vybraných transportních proteinů

Studijní program a obor: Biofyzika a chemická fyzika

Rok odevzdání: 2011

Jméno a tituly vedoucího/opponenta: RNDr. Aleš Holoubek, PhD.

Pracoviště: Oddělení buněčné biochemie, Ústav hematologie a krevní transfúze, 128 20 Praha 2

Kontaktní e-mail: holoubek@uhkt.cz

Odborná úroveň práce:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Věcné chyby:

- téměř žádné vzhledem k rozsahu přiměřený počet méně podstatné četné závažné

Výsledky:

- originální původní i převzaté netriviální kompilace citované z literatury opsané

Rozsah práce:

- veliký standardní dostatečný nedostatečný

Grafická, jazyková a formální úroveň:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Tiskové chyby:

- téměř žádné vzhledem k rozsahu a tématu přiměřený počet četné

Celková úroveň práce:

- vynikající velmi dobrá průměrná podprůměrná nevyhovující

Slovní vyjádření, komentáře a připomínky vedoucího/oponenta:

Tématem posuzované diplomové práce je studium regulace vnitrobuněčného pH v kvasinkách prostřednictvím pH-citlivé varianty GFP, pHluorinu. Hlavním zaměřením práce je, jak se na této regulaci podílí membránové transportéry jednomocných iontů. V teoretické části diplomant podává ucelený a přiměřený přehled témat z oblasti biochemie a biologie buňky týkajících se regulace vnitrobuněčného pH a jeho role při udržování vnitřní homeostáze kvasinkových buněk. Podává stručný přehled základních metod používaných pro zjišťování vnitrobuněčného pH kvasinek a věnuje se speciálně pHluorinu jako fluorescenční sondě, kterou buňky kvasinek vyrábějí samy vlastním proteosyntetickým aparátem. Věnuje se optimalizaci tohoto přístupu, snaží se najít a upozornit na případné systematické chyby, které mohou ovlivnit výsledky měření a jsou v pozadí rozptylu dosud publikovaných hodnot vnitrobuněčného pH kvasinek. Diplomant uvádí přehled publikovaných výsledků a následně je srovnává s vlastními. Měření provádí na dvou příbuzných modelových druzích kvasinek, *Saccharomyces cerevisiae* a *Zygosaccharomyces rouxii*. U druhého druhu kvasinek nebyly dosud publikovány srovnatelné výsledky měření vnitrobuněčného pH. V teoretickém úvodu bych ocenil alespoň zmínění základních elektrochemických principů používaných pro popis transportních dějů na biologické membráně právě proto, že se diplomant v další práci zaměřuje na téma, jaký mají na regulaci vnitrobuněčného pH vliv systémy přenášející přes membránu jednomocné ionty. V části věnované metodám jsou popsány používané kvasinkové kmeny, plasmidy, kterými byly tyto kmeny transformovány, způsoby jejich kultivace a vlastní provedení fluorescenčních experimentů. V experimentální části práce se diplomant nejdříve věnuje nezbytným korekcím kalibračních křivek na fluorescenční pozadí od jednotlivých složek kalibračního pufu a diskutuje jejich vliv na výsledky měření. Zabývá se vlivem typu plasmidu použitého pro expresi pHluorinu na vlastní měření, pro oba druhy kvasinek stanovuje odlišnou inkubační dobu a testuje vliv různých ionoforů na kalibrační měření. Dále se věnuje určování vnitrobuněčného pH pro oba studované druhy kvasinek za obdobných podmínek (dvě odlišná pH, přítomnost sodíku, nebo draslíku, dostupnost zdroje energie). Měl k dispozici mutanty s delecemi v proteinech pro přenos sodíku, takže může sledovat vliv těchto delecí na prováděné experimenty. Výsledky získané pro oba druhy kvasinek jsou v zásadě srovnatelné. Asi nejvýraznějším efektem způsobeným nepřítomností některého z přenašečů sodíku je relativní okyselení cytosolu v přítomnosti glukózy, což diplomant vysvětluje vlivem přenašečů sodíku na aktivitu hlavní protonové pumpy Pmalp. Z práce je patrné, že diplomant věnoval pozornost optimalizaci použitých experimentálních přístupů a potlačení možných systematických chyb. Prokázal schopnost pečlivě interpretovat získané výsledky. Svě výsledky diskutoval s ohledem na už publikované výsledky jiných i vlastní skupiny a provedl důkladnou literární rešerši. Diplomová práce je pečlivě zpracována, pouze s drobnými nepozornostmi při popisu výsledků experimentů, je napsána srozumitelnou angličtinou s minimálním množstvím chyb (proofed místo proved).

Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze:

1. Může fluorescenci pHluorinu přímo ovlivnit některá ze složek kalibračního pufu?

Práci doporučuji nedoporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

Navrhuji hodnocení stupněm: výborně velmi dobře dobře neprospěl/a

Místo, datum a podpis vedoucího/oponenta: