

Posudek oponenta na diplomovou práci:

Bc. Marie Kolářová

obor Fyzikální chemie, PŘF UK v Praze

„Dynamic saturation optical microscopy using photoswitchable proteins“.

Ve své diplomové práci se Marie Kolářová zabývala využitím dynamické saturační optické mikroskopie (DSOM) k získání lépe rozlišených fluorescenčních obrazů různých vzorků. Metoda DSOM je založena na prostorovém sledování kinetiky přechodů mezi svítivými a nesvítivými stavy určitých fluoroforů a umožňuje obejít difrakční limit za účelem zvýšení prostorového rozlišení. Marie Kolářová se nejdříve zaměřila na charakterizaci vlastností fluorescenčních proteinů Dronpa a mutantní formy rsFastLime a potvrdila jejich použitelnost pro DSOM měření. Dále testovala závislost kinetiky přechodů mezi svítivými a nesvítivými stavy na intenzitě excitačního záření a tuto závislost potvrdila. V dalších experimentech Marie Kolářová sledovala fotostabilitu používaných fluoroforů, vliv intenzity aktivačního záření na intenzitu fluorescence či vliv excitační vlnové délky na rychlost přechodů mezi svítivými a nesvítivými stavy. Výsledky této zevrubné charakterizace Dronpy a rsFastLime poté využila k nastavení optimálních experimentálních podmínek pro získání vysoce rozlišených snímků značené membrány buněk kvasinek. Tyto snímky byly porovnány se standardními snímky pořízenými konfokálním mikroskopem. Toto srovnání ukázalo výrazně lepší (přibližně 2x) rozlišení DSOM snímků.

Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autorka získala řadu originálních poznatků a velmi dobře zvládla rozličné pokročilé metody fluorescenční mikroskopie a spektroskopie, ale i práci s kulturami kvasničných buněk. K formální podobě anglicky psané práce nemám žádné připomínky, práce má standardní členění, je

napsána přehledně, pečlivě, s minimálním výskytem překlepů a výsledky jsou názorně prezentovány. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury jsou také zcela adekvátní. Úroveň angličtiny je velmi dobrá (dle mého názoru).

K předkládané diplomové práci mám jen několik drobných otázek do diskuse:

1. Jaká byla velikost (průměr) fokusovaného laserového paprsku používaného k aktivaci či excitaci?
2. Od čeho je odvozen název „Dronpa“? Je to nějaká zkratka?
3. Fluorescenční chování Dronpy je závislé na acidobazické rovnováze protonizované a deprotonizované formy, přičemž deprotonizovaná forma Dronpy (stav B) vykazuje schopnost fluorescence a následného přechodu do zhasnutého stavu A2. Může různá hodnota pH v různých částech buňky ovlivnit výsledky měření v důsledku ovlivnění rovnováhy mezi A1 a B formami?
4. Je možné dosáhnout ještě lepšího rozlišení DSOM snímků, než kterého jste dosáhla ve své práci? Jestli ano, které z experimentálních parametrů na to budou mít největší vliv?

Závěrem konstatuji, že Marie Kolářová ve své diplomové práci splnila všechny vytčené cíle a demonstrovala schopnost samostatné vědecké činnosti. Předložená diplomová práce více než splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.

Doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta UK
15. května 2011