

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Olga Hrušková
	Datum: 7.9.2011
Autor: Vítězslav Plocek	
Název práce: Lokalizace vybraných proteinů v průběhu vývoje kvasinkové kolonie	
Cíle práce Cílem práce bylo připravit kmeny <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nesoucí geny <i>FET3</i> , <i>PDR5</i> , <i>STL1</i> a <i>PHO89</i> fúzované s genem pro fluorescenční protein (GFP) a sledovat expresi a lokalizaci příslušných značených proteinů jak v buňkách, tak v kvasinkových koloniích v průběhu jejich vývoje.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? <u>ANO</u> NE Rozsah práce (počet stran): 150 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, <u>ANO</u> NE Je uveden seznam zkratk? <u>ANO</u> NE	
Literární přehled: Odpovídá tématu? <u>ANO</u> , ale mohl by odpovídat lépe NE Je napsán srozumitelně? <u>ANO</u> NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? <u>ANO</u> NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? <u>ANO</u> NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? <u>ANO</u> NE Kolik metod bylo použito? Přibližně 15 Jsou metody srozumitelně popsány? <u>ANO</u> NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? <u>ANO</u> NE Je dokumentace výsledků dostačující? <u>ANO</u> NE - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? <u>ANO</u> NE – co chybí, v čem je nedostačující?	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? <u>ANO</u> NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? <u>ANO</u> NE Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? <u>ANO</u> NE	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? <u>ANO</u> NE	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Obrazová dokumentace a grafická stránka práce je na velmi dobré úrovni. K textu mám však řadu kritických připomínek (viz níže).	

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. Velmi oceňuji experimentální stránku práce, a to jak z hlediska technického provedení (autor prokázal značnou zručnost, ale i trpělivost), tak z hlediska celkové koncepce. Příprava kmenů nesoucích značené geny byla náročná, zejména v případě umístění GFP mezi signální sekvenci a N-konec genu *FET3*. Analýza kolonií pomocí mikroskopie jednotlivých řezů, případně pomocí frakcionace a následné průtokové cytometrie není nikterak samozřejmou a jednoduchou metodou, ale výsledky dokazují, že autor všechny potřebné techniky velmi dobře zvládl. Práce vyniká značnou metodickou šíří a je evidentní, že autor získal široké experimentální zkušenosti. Diskuse navíc ukazuje, že o své práci hluboce přemýšlel. Výsledky jsou inovativní – např. v případě proteinu Pho89p byla jeho lokalizace v rámci kolonie studována poprvé.

Takto zajímavé výsledky by si však byly zasloužily mnohem lepší zpracování. Diplomová práce klade značné nároky na pozornost a trpělivost čtenáře, protože mnohé formální nedostatky komplikují orientaci v textu.

Otázky a připomínky oponenta:

Některé vybrané formální připomínky:

1. Jazyková úroveň anglické verze abstraktu je nevalná.
2. Autor téměř neustále používá laboratorní slang („stáčel jsem“, „falkona“)
3. Str. 15, str. 20 – říká se „sekretorický“, nebo „sekreční“?
4. Na str. 19 a 55 se vyskytují výkřiky „Error! Reference source not found“
5. Str. 37- „Primery pro C-terminální fúzi jsem navrhoval podle výrobcem doporučené literatury“. O jakého výrobce se jedná?
6. Nenašla jsem obrázek 15. Číslování obrázků od str. 56 dál je poněkud zmatené.
7. Na str. 51 a dál autor nepoužívá jednotné značení kmenů, které vytvořil. Bývalo by bylo dobré udělat souhrnnou tabulku kmenů, které byly ve studii použity.
8. Na str. 51 se náhle objeví „varianty B113 a B115“ a „bodová mutace S222P“, ale teprve o stránku dál se čtenář dozví, co uvedené symboly znamenají a že bodová mutace byla v GFP, nikoli v jiném proteinu.
9. Na str. 110 a dál je nejasné číslování grafů. O grafu č.1 nenacházím zmínku v textu a z popisky není jasné, ke kterému kmenu se graf vztahuje (předpokládám, že BY4742).
10. Na konci § 4.2.1.2. autor bez dalšího komentáře uvádí, že v závěrečné fázi sledování kolonií BY-Pdr5-GFP nebylo možno najít žádný GFP signál. Zelená barva na obrázcích 38 a 39 je tedy způsobena autofluorescencí?
11. Str. 120 – protein Fet3p zajišťuje příjem železnatých (ferrous), nikoli železných iontů.
12. Str.37, 42 – autor používá termín „transformace GFP“, přestože se zjevně jedná o vytvoření fúze.
13. Teoretická část obsahuje hezké kapitoly o měření pH v buňce, i když souvislost s vlastní prací je jen volná. Zato postrádám alespoň krátkou rešerši o genech, kterými se autor v práci skutečně zabýval. Tato mezera je sice částečně zaplněna během diskuse, ale pro čtenáře by bylo mnohem příjemnější, přečíst si o příslušných genech ještě před popisem experimentů a výsledků.

Otázky k výsledkům DP:

1. Jak si autor vysvětluje, že u kmenů nesoucích značené geny došlo ke změně fenotypu ve srovnání s rodičovským kmenem, pokud jde o vývoj kolonií na GMA (kap.4.1.4)? Jsou změny způsobeny pouze přítomností GFP?

2. Na str. 50 a 51 autor uvádí, že u kmenu BY-Fet3p-GFPi byla alkalizace velmi slabá. Nedalo by se z obr. 21 soudit spíš na to, že alkalizace byla posunuta v čase?
3. Obrázky 21 a 23 popisují zdánlivě stejný experiment, ale s poněkud odlišnými výsledky. Jedná se o běžně pozorované rozdíly v rámci jednoho typu experimentu, nebo jde o nějaký důležitější jev?
4. Populace buněk v rámci kolonie se liší mimo jiné velikostí vakuol. Je známo, proč tomu tak je?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: