

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Mgr. Tomáš Groušl, Ph.D.

Datum: 1.9.2014

Autor: Bc. Zuzana Novosadová

Název práce: Autofagie a další procesy v koloniích přírodních kmenů kvasinek

### Cíle práce

- Vytvořit z dostupné literatury ucelený přehled o molekulárních mechanismech autofagie u kvasinek.
- Sledování produkce mitochondriálních proteinů u kmene *S. cerevisiae* BY4742 ve vývoji obřích kolonií i v kontextu kvasinkové komunikace.
- Optimalizace metody pro sledování produkce dusíku u divokého kmene *S. cerevisiae* BR-F.
- Konstrukce kmenů pro další studium procesů probíhajících v koloniích divokého kmene *S. cerevisiae* BR-F.
- Konstrukce kmenů pro studium autofagie u divokého kmene *S. cerevisiae* BR-F.

**Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?**  ANO  NE

Rozsah práce (počet stran): 109

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova?  ANO  NE

Je uveden seznam zkratek?  ANO  NE

### Literární přehled:

Odpovídá tématu?  ANO  NE

Je napsán srozumitelně?  ANO  NE

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?  ANO  NE

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?  ANO  NE

\* *chybí zřetelné rozlišení na původní práce a na přehledné práce (review)*

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole?  ANO  NE

Kolik metod bylo použito? 14 (*adekvátní množství vzhledem ke stanoveným cílům*)

Jsou metody srozumitelně popsány?  ANO  NE

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů?  ANO  NE

Je dokumentace výsledků dostačující?  ANO  NE - v čem jsou nedostatky?

\* *občasná nízká kvalita obrazové dokumentace*

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO  i NE – co chybí, v čem je nedostačující? \*

\* K experimentům monitorujícím produkci vybraných mitochondriálních proteinů při vývoji obřích kolonií kvasinky *S. cerevisiae* bude třeba provést dodatečné analýzy pro zpřesnění výsledků, jak uvádí sama autorka. Bude také třeba dokončit konstrukci dvojitého deletanta v *atg8* genu u divoké kmene BR-F, pro účely studia autofagie u této kvasinky.

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků?  ANO  NE

Jsou výsledky porovnávány s literaturou?  ANO  NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky?  ANO  NE

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné?  ANO  NE

**Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

Formální úroveň práce je dobrá. Teoretické části práce jsou vhodně doplněny ilustračními obrázky a schémata o dostatečné kvalitě. Některé obrázky ve výsledkové části, např. ty z mikroskopických pozorování, bohužel tuto kvalitu občas postrádají a tudíž se nedá dost dobře určit, zda odpovídají uváděnému textu (např. obr. 48 na str. 78). Celá práce, včetně anglického abstraktu, je, až na drobné chyby, napsána srozumitelně a gramaticky správně. Občas se vyskytuje špatné zalomení textu, jako např. na str. 77. Nicméně tyto drobné chyby nepovažuji za natolik zásadní, abych práci nedoporučil k obhajobě (viz dále).

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Autorce se podařilo splnit naprostou většinu z definovaných cílů.

V teoretické části práce autorka shrnuje dosavadní poznatky o procesu autofagie u kvasinky *S. cerevisiae*, s použitím relevantní a recentní literatury. Literární úvod je poté vhodně doplněn informacemi o diferenciaci kvasinkových buněk v rámci kolonií a amoniakové signalizaci mezi nimi. Tedy o problematiku, kterou autorka přímo řeší v experimentální části práce.

V experimentální části práce autorka docílila několika dílčích úspěchů. Podařilo se jí optimalizovat metodu měření amoniakové produkce pro divoký kmen BR-F. Tato metoda byla dále použita pro analýzu amoniakové signalizace u mikrokolonií této divoké kvasinky. Bylo ukázáno, že průběh amoniakové signalizace u divokého kmene BR-F probíhá obdobně jako v případě laboratorního kvasinkového kmene BY4742. Produkce amoniaku byla zároveň korelována se sledováním vybraných markerových proteinů, s pomocí fluorescenční mikroskopie na živých buňkách nebo s pomocí biochemických metod. Za tímto účelem se autorce podařilo vytvořit řadu fúzních konstruktů, ať už v rámci divokého kmene BR-F nebo také u laboratorního kmene BY4742. Byla ukázána korelace mezi expresí některých analyzovaných markerových proteinů, průběhem amoniakové signalizace mezi buňkami a stupněm diferenciaci kvasinkové kolonie.

V diskuzi, která odráží především metodologický charakter diplomové práce, autorka shrnuje dosažené výsledky a dává je vhodně do kontextu soudobé literatury. Zároveň rozebírá možné příčiny neúspěchu některých svých experimentů nebo také diskutuje případný rozpor svých

výsledků s již publikovanými daty.

Ačkoli autorka nesplnila bezzbytku všechny definované cíle, prokázala nezbytnou teoretickou připravenost pro řešení dané problematiky a zároveň experimentální zručnost při získání řady relevantních výsledků. Její práce bude přínosem, a jak sama píše, odrazovým můstkem, pro zkoumání diferenciací kolonií divokých kmenů kvasinek. S ohledem na výše uvedené, doporučuji diplomovou práci Zuzany Novosadové, "Autofagie a další procesy v koloniích přírodních kmenů kvasinek", k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

- V čem vidíte smysl diferenciací buněk v rámci kvasinkové kolonie?
- Za jakým účelem buňky/kolonie signalizují pomocí amoniaku?
- Jak si vysvětlujete pozorovaný rozdíl v produkci dvou různých mitochondriálních proteinů, Icl2 a Cyc2, v průběhu diferenciací kvasinkové kolonie? (*produkce Icl2 je s rostoucím časem kultivace indukována, zatímco produkce Cyc2 je spíše reprimována*)
- Jaké příčiny mohly, podle Vás, vést k neúspěchu při detekci fluorescenčního signálu u nově zkonstruovaného kmene GFP-Atg8?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

*Tomáš Svoboda*