

### **Analýza struktury kvasinkové kolonie: peroxizomy a autofágie**

Předkládaná diplomová práce se zabývá, jako již tradičně v laboratoři školitelky, charakterizací biologie kolonií kvasinek a popisuje řešení tří odlišných, avšak vzájemně souvisejících úkolů. Ve dvou dílčích částech diplomové práce byl analyzován výskyt peroxisomů a průběh autofágie v obřích koloniích, zatímco ve třetí části byly testovány různé možnosti, jak využít TEM ke studiu ultrastruktury buněk přímo v koloniích.

**Literární úvod** (38 stran) shrnuje velmi pěkně vědecké poznatky o úloze „quorum sensing“, autofágie a peroxisomů v buněčné fyziologii. Literární přehled je jasně a logicky členěn, snad jen kapitola 2.1.1.3 je spíše součástí či podkapitolou 2.1.1.2. Také používání citací v nadpisech kapitol (např. 2.1.1.3 č. 2.2.4.1.2) by buď mělo být vynecháno nebo naopak použito všude. Navíc, není jasné, k jakým poznatkům se tyto odkazy vztahují, když v kapitole jsou uvedeny citace další. Na str. 29 by měla být u popisu autofagických drah uvedena alespoň nějaká citace. K části o autofágii bych měla dva dotazy:

- 1) *Je tabulka 1 převzata z knihy Autophagy? Pokud ano, proč není uvedena citace?*
- 2) *Trochu zavádějící se mi zdá výraz „izolační“ membrána. Bylo by možné objasnit, o co se jedná, a případně podrobněji popsat, pro mě velmi překvapivý, vznik membrány „de novo“ v cytosolu (jak se najednou a na jedno místo dostanou různé komplexy syntetizující jednotlivé složky membrán)? A jak vzniknou dvě dvojně vrstvy membrán nad sebou a jak se jejich konce spojí, aby vznikl váček s dvěma membránami? Z textu to není příliš jasné.*

Používaný **materiál a metody** jsou podrobně popsány na 19 stranách. Z přehledu metod je patrné, že autor zvládl řadu základních mikrobiologických a molekulárně biologických technik, navíc také TEM. Popis metod je velmi podrobný, chybí však např. složení médií s glycerolem či oleátem, která byla používána v mnoha pokusech (str. 77 a další) či citace na metodu měření produkce a stanovení uvolňovaného amoniaku (str. 64).

Kapitola **Výsledky a diskuse** má 50 stran a její součástí je 37 obrázků. První část popisuje pokusy o mikroskopickou analýzu kolonie, druhá se zabývá studiem výskytu peroxisomů v buňkách kolonií. V této části byly získány velmi zajímavé výsledky. K samotnému experimentálnímu postupu bych však měla jednu výhradu:

- 3) *Integrace kazety do lokusu TRP1 měla být ověřena alespoň PCR, když už ne Southern blotem, zvláště v případě, že, jak je uvedeno na str. 76, byly získány tři klóny, které se lišily fenotypem. Proč nebyla správná integrace ověřena?*

Při sledování autofágie byl konstruován kmen exprimující protein Atg8 od něhož se odštěpuje značka GFP. Konstrukt *ATG8-GFP* byl vložen do lokusu *TRP1*, ale správná integrace opět nebyla ověřena. Získaný kmen se navíc svým chováním (vytváření sektorů) lišil od kmene rodičovského (str. 81).

- 4) *Myslíte, že tato odlišnost mohla být způsobena rozdílem  $URA^+/URA^-$ ? Pokud ano, proč nebyla do lokusu *TRP1* rodičovského kmene vnesena kazeta bez *ATG8* ale s *URA3*?*
- 5) *U obr. 22, zvláště 22 D, se zdá, že exprimovaný GFP vyplňuje celou buňku i všechny větší organely. Je to při pozorování autofágie běžné?*

V závěrečné části práce byla prováděna řada pokusů pro analýzu struktury kolonií v transmisním elektronovém mikroskopu. Tato část je jistě velkým přínosem pro budoucí experimenty v laboratoři školitelky. Zdá se mi však poněkud zbytečné uvádět v této části různé obecné fixační postupy (str. 84, kap. 4.4.1.1 až 4.4.1.5), které by měly být uvedeny spíše v metodách, zvláště když není uvedeno, jak je autor konkrétně používal. U obr. 24, není jasné, proč je ukázána část b, když v doprovodném textu není vůbec komentována nebo proč případně nejsou v části b ukázány obdobné výsledky s mutantními kmeny používanými v části obr. 24a a c.

6) Mohl by autor ukázat obr. 27, případně i 28, a okomentovat pozorované rozdíly mezi alkalizující a nealkalizující kolonií? Pro laika jsou ty rozdíly obtížně postřehnutelné.

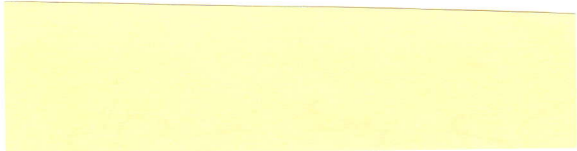
7) Na str. 102 je uvedeno, že kmeny s mutacemi *ctt1* a *sod1* nemají sníženou produkci amoniaku s poznámkou "data neuvedena". Měřil produkci amoniaku v těchto kmenech autor sám? Pokud ano, je škoda, že údaje neuvedl, pokud ne, měl by být uveden zdroj informace.

V závěrečné zajímavé kapitole o analýze struktury kolonie pomocí TEM (str. 110 a další) je škoda, že není vůbec uvedeno, o který kmen, z mnoha v práci používaných, se jedná. K této části bych měla dotaz týkající se obr. 47 na str. 118.

8) V textu k obrázku se mluví o strukturované stopce, v popisu obrázku o plodnici. Co je vlastně na obrázku?

Celkový dojem z diplomové práce je velmi dobrý, práce je napsána hezkým, čtivým způsobem. Jediné, co bych mohla vytknout, je hojné používání anglicismů např. „tři Ato proteiny“ místo tři proteiny Ato, ESR geny, CVT dráha atd., či velmi zvláštní překlady do češtiny typu „sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza“ namísto správného „elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného“. To, že práce zřejmě byla sepsána v krátkém časovém období a tedy pod tlakem, se projevilo řadou drobných nepřesností v textu, z nichž některé uvádím v příloze k tomuto posudku. Nicméně všechny mé výhrady a dotazy by neměly zpochybnit vysokou kvalitu předkládané práce a chtěla bych závěrem konstatovat, že autor prokázal své schopnosti k tvořivé vědecké práci, a proto navrhuji, aby diplomová práce byla hodnocena jako výborná.

V Praze, 17.května 2006



RNDr. Hana Sychrová, DrSc.  
Fyziologický ústav AV ČR, Praha

## Příloha k posudku diplomové práce L. Štěpánka

- Citace v textu nejednotné, někdy *et al.* (str. 4), někdy *et al.* (str. 15 a dál)
- EDTA je buď kyselina anebo sůl kyseliny a musí být uveden i příslušný kationt
- Místo RNÁZA by mělo být RNáza
- Chybí zkratka b používaná v textu pro buňky
- Bylo by třeba sjednotit acetát (viz EDTA) a octan (viz UAc)
- Na str. 18 nesmyslné jednotky 10 nM/l (?)
- Výraz plazmatická H<sup>+</sup>-ATPáza je nesprávný, je to ATPáza plasmatické membrány
- (plazma je úplně něco jiného a navíc ve fyzice)
- Popisek k obr. 3 na str. 27 mluví o barvách, ale v obrázek je černobílý
- V obr. 4 chybí označení nejdůležitější organely – vakuoly
- Citace Vellai *et al.* **in** Levine **a** Klionski – buď oboje česky nebo oboje anglicky
- Odkud je převzato schéma na str. 52?
- Není náhodou kmen BY4742 met<sup>-</sup>?
- Mezi číslicí a jednotkou někde mezery jsou (49,12 g str. 61), někde nejsou (6,4g str. 60) – mělo by být vždy s mezerou
- Kapitola 3.2.4 vypadá jako zkopírovaná odjinud bez patřičné úpravy formátu odstavce
- V kapitole 3.2.7 by měla být uvedena rychlost a doba centrifugace
- Mělo by být sjednoceno psaní tisíců otáček (mezery): 4000 ot/min, str. 65 vs. 13 000 ot/min, str. 66
- Tvrzení, že „SKL je signální sekvence selektivně transportovaná do peroxisomů“ na str. 74 je nesmysl, transportován je protein, který tuto sekvenci obsahuje
- Chybí konec popisku k obr. 16
- U obr. 17 je popisek nejasný – PCR amplifikace PCR (?)
- U obr. 19 by bylo dobré uvést, že tak vznikl plasmid AUT7GFP
- V citacích je chybně Icícova (str. 132) a u citace Řičicová, přijato do tisku by měl být uveden název časopisu