

Posudek práce

předložené na Matematicko-fyzikální fakultě
Univerzity Karlovy v Praze

- posudek vedoucího posudek oponenta
 bakalářské práce diplomové práce

Autorka: Bc. Kateřina Mudroňová

Název práce: Srovnání vybraných karbocyaninových fluorescenčních sond z hlediska jejich použitelnosti při měření změn membránového potenciálu kvasinek

Studijní program a obor: Fyzika, Biofyzika a chemická fyzika

Rok odevzdání: 2013

Jméno a tituly vedoucího/oponenta: Jan Krůšek, RNDr., CSc.

Pracoviště: Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.

Kontaktní e-mail: krusek@biomed.cas.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:

Předkládaná práce srovnává a kriticky hodnotí 6 redistribučních fluorescenčních sond k měření membránového potenciálu. V teoretickém úvodu je stručně sumarizována biologie kvasinek, principy fluorescence, membránového potenciálu a vnitrobuněčného pH. Popis principů fluorescenčního měření membránového potenciálu je orientován na použití redistribučních sond a metody synchronně skenované fluorescence. V experimentální části jsou vybrané sondy srovnávány z hlediska vhodnosti k měření v suspenzích kvasinek na spektrofluorimetru, kde je nejvhodnějším kvantitativním parametrem posun maxima fluorescence sondy po navázání na intracelulární proteiny. Napřed bylo v experimentech s albuminem, jako modelovým proteinem, se kterým sondy interagují zjišťováno, zda je posun maxima fluorescence po navázání na albumin dostatečný. Zejména byly zjišťovány podmínky pro měření synchronně skenované fluorescence. Přímou v experimentech na buňkách bylo zjišťováno, zda zkoumané sondy jsou substrátem MDR pump, kterými se kvasinky zbavují cizorodých látek. Byly porovnávány barvicí křivky kmenů kvasinek, které se buď přirozeně liší aktivitou pump, nebo byly pumpy inhibovány farmakologicky. Poslední část práce využívá zavedené metody a modely k měření závislosti membránového potenciálu na hodnotě pH suspenze kvasinek. Autorka prokázala, že kromě fluorescenční sondy diSC₃(3) je dobře použitelná k měření i sonda diSC₃(5). Obě sondy dávají kvantitativně shodné výsledky. Ostatní sondy jsou velmi silně odstraňovány z buněk působením MDR pump. Možná by byly použitelné právě ke studiu činnosti pump.

Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze:

Poněkud jsem postrádal podrobnější vysvětlení kalibrace, kterou byly údaje o posunu maxima fluorescence převáděny na hodnoty změny membránového potenciálu v mV. Bylo by možné podrobněji vysvětlit postup přepočtu od modelových spekter volné a vázané sondy k údajím o membránovém potenciálu v mV?

Při měření na kvasinkách kmene AD12 bez použití inhibitoru pump je barvení kvasinek většinou studovaných fluorescenčních sond velmi slabé. Nebyl problém získat na tomto kmeni kvasinek použitelné výsledky při měření vlivu vnějšího pH na membránový potenciál?

Domníváte se, že depolarizace buněk vyvolaná nízkými hodnotami pH suspenze souvisí s inhibicí H⁺ ATPasy, nebo jiným mechanismem?

Práci

doporučuji

nedoporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

Navrhuji hodnocení stupněm:

výborně velmi dobře dobře neprospěl/a

Místo, datum a podpis vedoucího/opponenta:

V Praze, 20.5. 2013

Jan Krůšek