

Posudek práce

předložené na Matematicko-fyzikální fakultě
Univerzity Karlovy

posudek vedoucího posudek oponenta
 bakalářské práce diplomové práce

Autor/ka: **Bc. David Babuka**

Název práce: **Analýza zotavování membránového potenciálu kvasinek za stresových
podmínek vyvolaných protonoforem CCCP**

Studijní program a obor: Biofyzika a chemická fyzika [FBCHF]

Rok odevzdání: 2016

Jméno a tituly oponenta: Ing. Karel Sigler, DrSc.

Pracoviště: Mikrobiologický ústav AVČR

Kontaktní e-mail: sigler@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:

Název předkládané diplomové práce se poněkud liší od vlastní zpracovávané problematiky, protože ta se týká vlastního mechanismu acidifikace cytosolu kvasinek protonoforem CCCP. V obecné rovině se práce "vrací" k výzkumům prováděným v 80. letech, které se věnovaly existenci a možnému vlivu povrchového potenciálu buněk na transportní pochody přes plasmatickou membránu. Nové technické možnosti (využití pHluorinu jako indikátoru vnitrobuněčného pH, moderní spektroskopické techniky) umožnily diplomantovi přímo měřit rozsah vnitrobuněčné acidifikace po přidání CCCP. Analýzou křivek závislosti takto měřené acidifikace cytosolu způsobené CCCP při různých vnějších pH došel k závěru, že oproti všem dosud přijímaným údajům protonofor CCCP (jako lipofilní slabá kyselina) nepůsobí vyrovnání vnějšího a vnitrobuněčného pH, ale i při zásaditém vnějším pH vede k okyselení buněčného nitra a v podstatě aktivně transportuje protony do buněk proti jejich elektrochemickému gradientu, což je energizováno právě povrchovým potenciálem. Přitom se pK_a CCCP zvyšuje o 2,2 jednotky pH (na str. 31 se tvrdí, že se o tuto hodnotu pK_a snižuje).

Dalším údajem popsáním v práci je hodnota povrchového potenciálu zjištěná touto metodikou, která se podle autora pohybuje za různých podmínek od ~ -90 mV do ~ -130 mV, tj. v mezích srovnatelných s obecně přijímanou hodnotou difúzního membránového potenciálu kvasinek, který má ovšem opačnou polaritu.

Práce je velmi dobře napsána, výsledky jsou pečlivě a opakovaně dokumentovány a technických nedostatků nebo chyb je poměrně málo. Z hlediska stylu jsem na pochybách o správnosti použití laboratorního slangu ("výsledky jsou uváděny v triplikátech" nebo ne úplně nutných anglismů ("kompozice media" místo složení, "fluktuující složení" místo např. změny ve složení, „exprimace“, atd.). Překlepy a podobné nedostatky jsou velmi řídké. Po formální stránce tedy nemám výhrady. Otázkou zůstává podle mne interpretace výsledků, která nemusí být nutně tak jednoznačná, jak diplomant předestírá. Jak sám autor uvádí, tyto zajímavé a poněkud kontroverzní nálezy a jejich případnou obecnější platnost bude nutné potvrdit s dalšími protonofory, slabými kyselinami, a u jiných druhů buněk.

Nicméně práci hodnotím jako velmi dobrou až výbornou, a její inovativní charakter je přínosný v tom, že přináší nové otázky a přístupy k obecně přijímaným dogmatům.

Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze: nemám

1. Acidifikace cytosolu se zvyšuje s rostoucí koncentrací CCCP. To by bylo možné připsat např. vyššímu permeabilizačnímu účinku CCCP na kyselé vnitrobuněčné organely (vakuolární pH je kolem 5 – 5,5). Je možné tento mechanismus vyloučit?
2. Acidifikace cytosolu byla měřena při různých koncentracích CCCP a různých vnějších pH. Byl učiněn pokus měřit také její závislost na hustotě buněčné suspenze? Pokud ano, jaký měla průběh?
3. Cytosol kvasinek má poměrně značnou pufrací kapacitu, kterou ionty H^+ podle autora aktivně transportované do buněk ionoforem musí překonávat. Přitom bylo zjištěno, že odpověď pH_{in} na přídavek CCCP je velmi rychlá (< 3 s), tj. nejméně časově srovnatelná s čistě membránovým jevem - depolarizací membránového potenciálu po CCCP. Můžete toto komentovat?

Práci

doporučuji

nedoporučuji

uznat jako diplomovou/bakalářskou.

Navrhuji hodnocení stupněm:

výborně velmi dobře dobře neprospěl/a

Místo, datum a podpis oponenta:

Praha, 16.8.2016