



# INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

Academy of Sciences of the Czech Republic

## Oponentský posudek na diplomovou práci Ivany Ferčíkové

### Produkce fluorescenčně značených Ato proteinů u vybraných mutantních kmenů a u divokých kmenů kvasinky *S.cerevisiae*

Diplomová práce Ivany Ferčíkové vznikla v Laboratoři biologie kvasinkových kolonií pod vedením Doc.Palkové a navazuje na projekty, které jsou zaměřeny na amoniakovou signalizaci mezi koloniemi. Konkrétním cílem práce diplomantky bylo vytvoření nových intragenově značených divokých i mutovaných kmenů, které by produkovaly Ato přenašeče fúzované s fluorescenčními proteiny GFP či RFP z místa na chromozómu. Vzhledem k tomu, že bez této přípravné fáze by nebylo možno dále úlohu Ato proteinů studovat, považují toto téma za významné a užitečné.

Diplomová práce je dobře zpracovaná a má všechny potřebné formální náležitosti. Práce je napsána v českém jazyce a doprovází ji krátký anglický abstrakt. Práce je členěna standardním způsobem a pouze bych doporučil, aby cíle práce byly zdůrazněny v samostatné kapitole. Metodická část je dostatečně podrobná a obsahuje potřebné detailní informace pro případné opakování experimentů. Uvedené metodiky korespondují s cíly práce.

V bohatém literárním přehledu se autorka podrobně věnuje dostupným informacím o struktuře plazmatické membrány, transportním systémům kvasinek, koloniím, biologickým hodinám a technice intragenového značení pomocí fluorescenčních proteinů. Přehled je srozumitelný a obsahuje řadu ilustrací a recentních odkazů. Metodická část zahrnuje zejména techniky potřebné k přípravě poměrně velkého množství nových intragenově značených kmenů produkujících GFP či RFP fúzní proteiny z chromozómů.

Je nepochybné, že diplomantka ve své experimentální práci zvládla řadu moderních molekulárně biologických, biochemických a cytologických technik. Vytvořila všechny navrhované kvasinkové kmeny (celkem 18 nových stabilních intragenově značených kmenů). Analýzou fluorescenčního obrazu buněk různých kmenů a z různých míst kolonií zejména zjistila, že produkce Ato proteinů koreluje s různou schopností kmenů přepínat do alkalické fáze a produkce amoniaku a tudíž, že Ato proteiny se zřejmě účastní amoniakové signalizace jako exportéry amonných iontů.

K práci mám několik málo spíše formálních připomínek:

Poměrně dost překlepů.

V metodách zcela chybí popis mikroskopu a zařízení, kterým byly mikrofotografie pořízeny.

V popisu výsledků bych preferoval použití trpného rodu.

Prezentace mikrofotografií není standardní – výřezy nejsou stejně velké, fluorescenční obrazy nedoprovází komplementární obraz buněk dle Nomarského (DIC). Doporučil bych montáž jednotlivých obrazů. Umožňuje přehlednější popis a srovnání. Doporučil bych též lepší zpracování např. pomocí programů Photoshop či Illustrator.

Špatné umístění (za konec věty) i formát citací v textu (různý formát referencí) – vhodnější nastavení použitého programu.

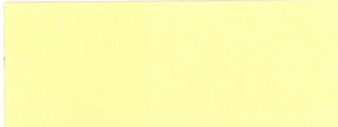
Neúplné citace – např. Čáp (2004), Kleiner (1981,1985).

K práci mám následující otázky:

- 1) Co si myslíte o fluorescenčním obrazu přenašečů uvnitř buněk. Píšete, že se jedná nejspíše o vázky související se syntézou. Máte pro tento názor nějaké poklady? Nejedná se spíše o degradaci fůzních proteinů? Proč se domníváte, že lze kvantifikovat produkci proteinů na základě intenzity fluorescence?
- 2) Bylo pro pozorování testováno použití osmoticky stabilizovaného pufru či alespoň syntetického média?
- 3) Byla ověřena správná integrace GFP či RFP kazet v buňkách divokých kmenů?
- 4) Víte jaký je rozdíl v působení inhibitorů proteáz AEBSF a PMSF?

Závěrem konstatuji, že ve své diplomové práci Ivana Ferčíková prokázala, že je schopna zpracovat dostupné informace o řešeném problému a využít je při samostatné vědecké práci. Vzhledem ke kontinuitě projektů řešených na školícím pracovišti lze nepochybně očekávat, že dosažené výsledky budou součástí či spíše východiskem kvalitních publikací. Vzhledem k množství i kvalitě získaných výsledků práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou „výborně“.

V Praze dne 17.9.2007



Ing. Jiří Hašek, CSc.  
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.