

## Posudek na diplomovou práci Kateřiny Voráčové

### *Isolation of intact plastids of the secondary alga Chromera velia and treatment of the alga with rifampicin*

Diplomová práce Kateřiny Voráčové se zabývá izolací chloroplastů z řasy *Chromera velia* a citlivostí této řasy na antibiotikum rifampicin. Autorka se zhostila zadaného úkolu pečlivě a s plným nasazením. Při jeho řešení si osvojila a modifikovala obvyklé metody, které se při izolaci plastidů řas nebo při testování toxicity látek používají, zvládla i metodiku přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii. Práce mne zaujala a považuji ji za dobrou a přínosnou, i když obě zvolená experimentální témata nakonec k pozitivním výsledkům nevedla. Práce je přesto cenná tím, že ukazuje významná úskalí, která experimentální práce s Chromerou přináší. Práce jasně dokazuje, že původní očekávání spojená s Chromerou jako možným modelovým organismem pro rychlé testování nových, např. antimalarických látek je třeba přehodnotit, přinejmenším do té doby, než se podaří nalézt spolehlivou metodu na rozrušení neobyčejně pevné a nepropustné buněčné stěny a izolaci skutečně intaktních a funkčních chloroplastů. Myslím, že je třeba vidět pozitivně i to, že si Kateřina na vlastní kůži vyzkoušela, že vědecká experimentální práce často vede do slepých nebo zatím neprostopných uliček, aniž bychom si tohoto bloudění sami byli dlouho vědomi. To, že se izolace chloroplastů nakonec ne zcela zdařila, se totiž zjistilo až v samém závěru práce, kontrolou stavu izolovaných preparátů na elektronovém mikroskopu. Nebýt této kontrolní metody, byli bychom zřejmě přesvědčeni, že získané izoláty jsou hledané chloroplasty. Následující kritické poznámky mají za cíl upozornit na nejasnosti nebo chyby, které ale zásadním způsobem nesnižují úroveň práce.

Po formální stránce je práce standardně členěna. Práce má 51 stran, včetně 21 obrázků, 1 grafu a cca 94 položek citované literatury. Na titulní stránce (ani nikde jinde) jsem ale nenašel, na jaké katedře byla práce vlastně řešena. Úvod přináší celou řadu zajímavých informací, zejména o posledním vývoji v oblasti výzkumu evoluce a diverzity fotosyntetických eukaryot. Osobně bych ale volil trochu jiné a podle mne přehlednější uspořádání jednotlivých částí úvodu tak, aby text lépe gradoval od obecných informací směrem k více specializovaným a k těm, které se týkají vlastní řešené problematiky, tady Chromery, jejího plastidu a testování antimalarik. Lepší řazení kapitol úvodu by tedy snad mohlo být: Tree of Eukaryotes – Endosymbioses – Alveolata – Photosynthetic chromalveolates – Malaria – Chromerida.

V metodické části jsou poměrně podrobně popsány použité metodické postupy tak, aby případný následovník mohl v práci snadno pokračovat. Přesto je tam několik nepřesností a opomenutí. Chybí bližší popis použitých přístrojů (Emulsiflex, sonikátor – od kterých firem, jaký model?). V práci se mluví o „Multiflexu“ – není to ale „Emulsiflex“? Autorka píše o  $f/2$  médiu, ale to není přesné, protože  $f/2$  značí jen množství a složení živin (N,P..) přidaných k základu, kterým v tomto případě byla umělá mořská voda (ASW), ale jindy tím základem může být i zcela jiný typ média. To by se mělo upřesnit. Chybí také odkaz na práci, kde je použité složení média (ASW a  $f/2$ ) popsáno. U popisu přípravy vzorků na TEM (str.19) mi není jasné, jak mohl být vzorek získaný jako pelet po centrifugaci při 45000 RCF po přidání glutaraldehydu znovu sedimentován, ale jen při 3000 RCF. Velmi nepřesně jsou popsány světelné podmínky, za kterých byly řasy pěstovány. V celém textu se uvádí hodnoty v desítkách mol/m<sup>2</sup>s. Správně by snad mělo být desítky mikromolů kvant/m<sup>2</sup>s. Vlastně celá kapitola 7.6 by asi měla být začleněna do 7.1, kde se o světelných podmínkách již jednou mluví.

Vlastní výsledky jsou popsány poměrně stručně, ale to snad není na závadu. Jen mne mrzí, že obrázky nebyly (snad z důvodu barevného tisku?) zařazeny přímo do textu kapitoly a

hlavně že nejsou větší a lépe komentovány. Například asi ta nejdůležitější část výsledků, tedy ono negativní zjištění z TEM, že izolované objekty nejsou chloroplasty není v textu výsledků téměř vysvětleno. Vlastní obrázky, které toto dokazují (č.14-21) jsou poměrně malé a chybí podrobnější vysvětlení, co na nich vlastně čtenář místo chloroplastů vidí a co je tím důkazem neúspěchu izolací. Při popisu pozorování bičíkatých stádií Chromery mi není zřejmé, zda 80% opravdu znamená, že bičíky mělo v okamžiku pozorování přes 80% všech buněk?

V části diskuze mne opět zarazil údaj o metodice získání tzv. „high speed pellet“ – dle literatury uvedené na str. 27 stačí k sedimentaci 3000 RCF po 5-15 min, tak proč bylo při vlastních izolacích použito 45000 RCF po 25 min? Pokud se opravdu použilo 45000 RCF, nemohlo toto vysoké přetížení způsobit poškození chloroplastů?

Konečně mi v diskuzi i závěrech schází – a to je otázka na autorku k obhajobě, zda si myslí, že se může někomu podařit intaktní chloroplasty připravit pomocí jiných metod? Existují vůbec ještě nějaké metody rozbíjení buněk, které by mohly být účinnější a vést k původnímu cíli? Pokud by se taková metoda vyvinula, má pak cenu ještě stále uvažovat o použití Chromery pro testování nových protiparazitických látek? A konečně poslední otázka – co víme o složení buněčné stěny/cytoplasmatické membrány Chromery, co způsobuje její mimořádnou pevnost a zda můžeme spekulovat o ekologickém významu této její vlastnosti?

Oceňuji, že autorka napsala celou práci v angličtině. Při tom se ale nevyhnula celé řadě překlepů a nesprávných tvarů, které mohly být odstraněny, pokud by práci před tiskem někdo po jazykové stránce korigoval. Nemá smysl zde uvádět všechna místa, kterých se to týká, jsou poznačena v mém výtisku práce, který rád autorce předám a vysvětlím.

Přes uvedené nedostatky a nepřesnosti vyhovuje práce Kateřiny Voráčové požadavkům kladeným na diplomovou práci. Doporučuji přijmout její práci k obhajobě a navrhuji hodnocení **velmi dobře**.

V Třeboni, 23.01.2011



prof. RNDr. Ondřej Prášil, PhD.  
MBÚ AV ČR, v.v.i.

**Posudek oponenta na magisterskou práci Kateřiny Voráčové nazvanou „Isolation of intact plastids of the secondary alga *Chromera velia* and treatment of the alga with rifampicin“.**

Magisterská práce Kateřiny Voráčové je předkládána v rozsahu 41 stran a pod vedením Doc. Ing. Miroslava Oborníka, Ph.D. se autorka zabývala izolací neporušených plastidů z řasy *Chromera velia* a účinností antibiotika rifampicinu na studovanou řasu. Řasa *Chromera velia* byla objevena a popsána jen nedávno a díky jejímu blízkému vztahu k parazitům z rodu apikomplexa se jeví jako zajímavý organismus pro základní výzkum.

Po formální stránce je práce členěna na 6 kapitol (Introduction, Summary and Aims of project, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion) včetně 7 stran odkazů na vědeckou literaturu a 2 stran obrazové přílohy.

Práce má dobře sepsanou úvodní kapitolu (15 stran), která čtenáře přehledně obeznámí s zařazením taxonu *Chromera velia* do biologického systému a taky stručně popisuje důležitost poznání zástupců kmene apikomplexa. Úvodní kapitola ještě obsahuje popis plastidů říše *chromalveolata* a taky popis samotné řasy *Chromera velia*.

Dále pak následují cíle práce, které jsou srozumitelně vytyčeny a odpovídají rozsahu magisterské práce.

V kapitole „Materials and Methods“ (5 stran) autorka popisuje kultivační podmínky pro pěstování studované řasy. Dále detailně popisuje různé (EmulsiFlex, Sonikace, Enzymem) způsoby rozbíjení nakultivovaných buněk a následnou izolaci plastidů pomocí sacharózového a perkolového gradientu. Obsah jednotlivých zón z gradientů byl identifikován pomocí elektronové mikroskopie a až na jednu záměnu zalévacího média pryskyřice/agar při přípravě vzorku je celý postup přípravy vzorku pro TEM hezky popsán. Nicméně popis samotné mikroskopie chybí. Dále autorka popisuje metody barvení DNA plastidu fluorescenčními barvičkami a aplikaci antibiotika rifampicinu na řasu *Ch. velia*.

V kapitole „Results“ (4 strany) autorka srozumitelně shrnuje dosažené výsledky své práce. Výtku by jsem ale měl k podkapitole LIGHT INTENSITY, SALINITY AND FLAGELLATES, která sama o sebe působí bezcílně a její význam je jasný až po přečtení následující podkapitoly RIFAMPICIN APPLICATION. Přehlednější by bylo tyto podkapitoly sloučit.

Na kapitolu „Results“ logicky navazuje kapitola „Discussion“ (5 stran) kde autorka vysvětluje důvod použitých metod získaných z recenzní literatury a také se zabývá příčinami částečných neúspěchů ve své metodické části.

Práci uzavírá kapitola „Conclusion“, kde autorka stručně shrnuje získaná data a konstatuje, že rozbíjení buněk řasy *Chromera velia* je velice problematické a také účinek antibiotika rifampicinu na studovanou řasu není nijak vysoký. I když výsledky nepůsobí moc optimisticky, jsou hodnotné a jistě budou použité k dalšímu studiu řasy *Chromera velia*.

Dále musím ocenit, že celá práce je napsána v anglickém jazyce, což u magisterské práce není standardní záležitostí. Práce je psaná dobrou angličtinou, která by ovšem v některých částech potřebovala zásah rodilého anglického mluvčího, ale na druhou stranu představuje dobrý standard vědeckého jazyka a vyniká z hlediska dobré srozumitelnosti.

Formální nedostatky:

- Chybí seznam zkratk
- V práci se často používá aktivní průběh slovesa „I did, I prepared, I used“, lepší je použít pasivní průběh slovesa „was done“ atd.
- V textu se používá slovo Multiflex, což je jen slangový název přístroje EmulsiFlex a proto by měl být spíše použit formální název EmulsiFlex.
- Obrázky v příloze jsou moc malé a tmavé, což zvláště u fotek z mikroskopu dost zamrzí.

Jako podklad pro diskusi mám k autorce následující dotazy:

- Autorka píše o problematické separaci vzorku rozbitých buněk řasy *Ch. velia* na diskontinuálním gradientu. Byla odzkoušena separace vzorku i na kontinuálním gradientu? Existují nějaké další metody rozdělení vzorky rozbitých buněk na jednotlivé frakce?
- Na fotkách z elektronového mikroskopu (například obr 14.) je vidět, že část zalitého vzorku z pryskyřice „vypadlo“. Dalo by se vypadávání vzorku předcházet?
- V závěru práce se píše o problematickém rozbíjení buněk *Ch. velia*. Kolik procent buněk v jedné izolaci se vlastně povedlo rozbít?
- Proč při problematickém počítání pohyblivých flagelát v Bürkerově komůrce nebyl vzorek pro zjednodušení práce zafixován.
- Byl projev rifampicinu na kulturu sledován jen počítáním buněk? Jsou i jiné metody?

Závěrem svého posudku konstatuji, že předkládaná práce splňuje kritéria kladená na magisterskou práci. Tuto práci proto **doporučuji** k obhajobě a navrhuji její ohodnocení známkou 2.

V Českých Budějovicích dne 19.1.2011

Ing. Zdeno Gardian, Ph.D.

