



Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D. – **Katedra molekulární biologie a genetiky**
Tel: 387772229, E-mail: tomas.dolezal@prf.jcu.cz

Oponentský posudek na bakalářskou práci Anety Sládkové – Sledování dimerizace receptorů spřažených s G-proteiny pomocí dvoufotonové polarizační mikroskopie

Ve své bakalářské práci se Aneta pokusila aplikovat techniku dvoufotonové polarizační mikroskopie pro studium dimerizace vybraného G-proteinového receptoru. Jejím úkolem bylo upravit technikami molekulární biologie jeden z konstruktů, konstrukty transfekovat do buněk a sledovat jejich chování analýzou 2PPM. Samotná 35-stránková tištěná práce je z formálního hlediska v pořádku a splňuje nároky na tento typ prací. Našel jsem relativně málo chyb.

Než se pustím do kritiky práce, chtěl bych zdůraznit, že samozřejmě vidím účel experimentálně orientovaného bakalářského projektu v tom, že se student seznámí s určitou konkrétní problematikou hlouběji, než při běžné výuce, že si vyzkouší určité experimentální přístupy a jejich skutečnou aplikaci a že sepíše svou první vědeckou práci. A to vše práce Anety splňuje a tudíž byl účel jejího bakalářského projektu i přes některé nezmary naplněn. Rád bych, aby další kritika byla vnímána s tímto vědomím.

I když je z úvodu jasné, že se Aneta zabývala problematikou G-proteinové signalizace a přístupy studia proteinových interakcí, měl jsem občas pocit, že autorka ne vždy dobře ví, kam chce svůj text směřovat, co je smysl sdělení. Jako by především chtěla ke všem tématům, které se dotýkají její práce prostě něco napsat, využívajíc jako zdroj například učebnici Molekulární biologie buňky. To je zřejmě obecnější problém bakalářských prací, ale je to škoda, je dobré se již v bakalářské práci učit vyjádřit, co a proč chci něco sdělit. S tím zřejmě souvisí chybění citací mnoha originálních zdrojů. Obrázky mají někdy špatnou kvalitu (malé rozlišení), někdy jsou s českým, někdy s anglickým popisem, občas bez citace zdroje, to nesevřdí o přílišné pečlivosti. Aneta se celkem vyvaruje ve svém textu gramatických chyb, ale velmi rozptylující bylo její neustále zaměňování slov „fluorescentní“ a „fluorescenční“ – autorka libovolně používá jednu první výraz, pak druhý výraz, a to někdy i v jedné větě pro to samé (mimořádně, který výraz by se měl používat správně?).

Největší nedostatek práce vidím v pro mě poněkud nepochopitelné prezentaci metod a výsledků, kdy Aneta kompletně a podrobně popisuje metodiku přípravy neznačeného konstrukt mGluR1 a ve výsledcích pak k tomu napíše jedinou větu: „Přes vynaložené úsilí se konstrukt mGluR1 nepodařilo získat pomocí molekulárně-biologických metod. Byl proto získán jako dar od N. Lamberta...“ Toto se samozřejmě může stát a stává, ale proč tedy alespoň z části své vynaložené úsilí ve své práci autorka nedokumentuje? Buď bych svou práci zaměřil pouze na to, co ve výsledcích skutečně mám, nebo bych i nedokončené věci popsal, pokud chci ukázat, co vše jsem dělal. Mě by například zajímalo, v jaké fázi se Aneta zasekla a co tomu předcházelo – v diskuzi se zmiňuje, že nejspíše selhala ligace. Doporučuji tento problém nastínit při obhajobě.

K práci mám několik poznámek a otázek:

1. V úvodu: „*Naproti tomu membrány, které se účastní syntézy ATP (vnitřní membrány mitochondrií a chloroplastů) obsahují přibližně 75 % proteinů.*“ O dva řádky níže: „*Lipidové molekuly jsou menší než molekuly proteinů, takže buněčné membrány vždy obsahují více molekul lipidů než proteinů.*“ Jak to jde dohromady, nebo jak to autorka myslí? (chybí citace zdroje).
2. V úvodu: „*Membránové proteiny se značně liší strukturou a způsobem, jakým asociují s lipidovou dvojvrstvou. Z toho vyplývají jejich různé funkce.*“ Jaké různé funkce? Takto napsáno ta věta postrádá význam, proč to autorka zmiňuje, ale nerozvádí?
3. Na konci úvodu autorka popisuje možné chování značených proteinů při dimerizaci. Co možný případ, kdy je fyziologická dimerizace neznačeného proteinu narušena přítomností fluorescenční značky, tj. protein bez značky přirozeně dimerizuje, ale s ní je tato interakce narušena?
4. V metodice je uvedena teplota nasedání primerů 68°C, což se mi zdá pro uvedené primery příliš vysoko. Jak k této teplotě autorka došla a fungovala s ní PCR? (to je právě ta chybějící část ve výsledcích)
5. V metodice není uvedeno, z jaké templátové DNA byl množen PCR produkt uvedenými primery. Ačkoliv tuším, jak to asi bylo prováděno, tak, jak je to uvedeno, to nedává smysl (primery směřující ven, od sebe, z uvedeného kusu sekvence DNA). A jak dlouhý měl být PCR produkt?
6. Na str. 25 popisuje autorka extrakci DNA z gelu, ale píše „K extrakci DNA požadovaného produktu reakce PCR jsme použili kit QIAgen Plasmid Miniprep a následujícího postupu.“ Tento kit se nepoužívá na izolaci DNA z gelu.
7. Diskuze: „*Další možností je, že nedošlo k transfekci neznačeným konstruktem, což nelze snadno odhalit fluorescenční mikroskopií. V dalším průběhu práce se pokusíme zjistit, zda je neznačený protein mGluR1 přítomen v transfekovaných buňkách pomocí Westernovy detekce...*“ Jakým jiným způsobem by se dala ověřit exprese mGluR1 v buňkách a případně porovnat efektivita transfekce a stupeň exprese značeného a neznačeného mGluR1? (jen tak mimochodem, je tzv. western blot pojmenován po panu Westernovi?)

Přes uvedené nedostatky **doporučuji práci k obhajobě** s návrhem hodnocení zatím pouze na základě psané formy **VELMI DOBŘE**.

V Českých Budějovicích dne 12. 1. 2018

doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.