

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Bc. Adolf Melichar

Název práce: Lokalizace GABA_B receptoru v dorzálním kochleárním jádře a sluchové kůře myši za fyziologických a patologických podmínek

Jméno a příjmení oponenta (včetně titulů): doc. RNDr. Jan Malínský, PhD.

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce

1. Rozsah práce a její členění

A	přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí	<input checked="" type="checkbox"/>
B	nevyrovnané, členění nelogické nebo rozsah některých částí nekoresponduje s jejich významem	<input type="checkbox"/>
C	uspokojivé, rozsah některých částí nedostačující	<input type="checkbox"/>
N	nedostatečné	<input type="checkbox"/>

2. Odborná správnost

A	výborná, bez závažnějších připomínek	<input checked="" type="checkbox"/>
B	velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (např. nejasnost výkladu, chyby v terminologii, nedokonalý popis metod nebo výsledků)	<input type="checkbox"/>
C	uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, s hrubými chybami	<input type="checkbox"/>

3. Uvedení použitých literárních a jiných zdrojů

A	adekvátní, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce	<input checked="" type="checkbox"/>
B	uspokojivé, s občasnými neobratnostmi (zejm. v umístění odkazů) nebo s celkově nižším počtem citací	<input type="checkbox"/>
C	s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, velmi málo citací, eventuálně rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu) nebo používání neadekvátních citací	<input type="checkbox"/>

4. Jazyk práce

A	výborný, práce napsaná čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických nebo pravopisných chyb	<input type="checkbox"/>
B	velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické nebo pravopisné chyby	<input checked="" type="checkbox"/>
C	uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické nebo pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné nebo nejednoznačné formulace	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, s četnými hrubými chybami	<input type="checkbox"/>

5. Formální a grafická úroveň práce

A	výborná, bez překlepů a chyb ve formátování	<input checked="" type="checkbox"/>
B	velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky, apod.	<input type="checkbox"/>
C	uspokojivá, s ojedinělými většími nedostatky (např. vynechání stránky, uvádění obrázků grafů nebo tabulek bez odkazů v textu) nebo s čtenějšími drobnými chybami	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, s četnými hrubými chybami	<input type="checkbox"/>

Slovní komentář k bodům 1. až 5.:

Práce standardního rozsahu je přehledně a účelně členěna a velmi pěkně graficky zpracována. Použité literární zdroje jsou citovány adekvátně a v dostatečném rozsahu. Autor si vytkl reálné cíle, které se podařilo splnit.

K odborné správnosti práce mám pouze drobné připomínky, které se vesměs týkají obrázků, resp. jejich popisu:

- Autor uvádí na všech mikroskopických snímcích měřítko, která vypadají napříč celou prací konzistentně a proto jsem je pro účely hodnocení práce považoval za směrodatná. S výjimkou obr. 19 se však v legendách k obrázkům navíc vyskytuje parametr „zvětšení“, který zjevně neodpovídá rozměru prezentovaných mikroskopických snímků. Např. v legendě k obr. 6 je uvedeno „Zvětšení 630x“, prezentované výřezy se však evidentně liší ve velikosti buněk, a tomu odpovídá i rozdíl ve velikosti měřítek v obou obrázcích. Bráno podle měřítek, skutečné zvětšení je cca 340x v případě obr. 6A a 560x v případě 6B. Rozdíly od správné hodnoty se u jednotlivých obrázků významně liší co do amplitudy i polarity – zatímco u obr. 7 je u obrázku zvětšeného 1100x uvedeno takřka shodné zvětšení 1000x, u obr. 8, který byl zvětšen pouze 150x, uvedeno zvětšení téměř trojnásobné - 400x. Výsledek je, zejména v tomto případě, kdy oba obrázky jsou prezentovány na jedné stránce, pro čtenáře velmi matoucí a rušivý. Hlubší analýzou nicméně lze dospět k tomu, co zde měl autor na mysli. Ježto se parametr „zvětšení“ vyskytuje v celé práci pouze v pěti různých hodnotách (1000x, 630x, 400x, 200x a 100x), soudím, že odkazuje na použitý objektiv a okulár mikroskopu. Vzhledem k tomu, že snímek byl pořízen jinou optickou cestou (mimo okulár), je tento údaj tak, jak je uveden, irrelevantní a přimlouval bych se za to jej napříště vypustit. Pokud by autor chtěl zmínit použitý objektiv, pak bych důrazně doporučoval uvést jak jeho zvětšení (např. 63x), tak i numerickou aperturu, neboť právě numerická apertura určuje výsledné rozlišení mikroskopického obrazu.
- Více pozornosti by autor též mohl věnovat označení fluorescenčních kanálů. Napříč celou prací je značně nejednotné, někde je uvedeno přímo v obraze (obr. 10), jinde pouze v legendě (obr. 11, 12 a další), někde zcela chybí (obr. 13).
- V kapitole 6.2.3 autor označuje jednotlivé fluorescenční kanály barevným rozlišením. Bez zdůraznění, že se jedná o falešné barvy, je nešťastné dalekou červenou oblast spektra (>650nm) označovat jako fialovou (str. 25, ř. ř. zdola). Na tomto místě stojí též za zmínku, že žádný z prezentovaných obrázků neobsahuje fialový kanál fluorescence, jeho uvedení v metodické části se tedy jeví jako zmatečné.
- V grafech je vyznačena statistická signifikance pomocí hvězdiček. Není však uvedeno, jakým pravděpodobnostním hladinám odpovídají jednotlivé symboly. V textu se navíc hovoří pouze o „signifikanci“, ne o míře signifikance; data jsou tedy interpretována pouze kvalitativně, ačkoli prezentována jsou semikvantitativně (tři třídy signifikance).
- K vyhodnocení lokalizace GABA_B receptoru je využíván netriviální algoritmus zahrnující předpoklad Cauchyho rozdělení („Lorentzovy distribuce“) měřených vzdáleností od manuálně definované hranice buňky. Je ponecháno na čtenáři, aby buď konzultoval s citovaným

softwarem, nebo se dovtípl, zda jsou zde lokalizovány jednotlivé fluorofory či je za „distribuci hustoty“ fluoroforů považována intenzita fluorescence v jednotlivých pixelech obrazu. Srozumitelnosti prezentovaných výsledků by též prospěla *explicitae* zmínka, že parametry „normalizovaná vzdálenost“, „pokles 80%-20%“ a „Lorentzova šířka“, jakkoli mohou být v tomto typu experimentu zaužívané, jsou bezrozměrné veličiny vztahující se k velikosti buňky (somatu?).

- Domnívám se, že termín „buněčná membrána“ má v češtině podobně jako v angličtině obecnější význam než „plasmatická membrána“, kterou měl patrně autor na mysli v úvodu kapitoly 4.1, kde mluví o „expresi receptoru na buněčné membráně“ (str. 14, 10. ř. shora). Navíc bych termín „expres“ v tomto případě určitě nahradil správnějším „lokalizace“.

Jazyk práce je jasný a srozumitelný, obsahuje pouze ojedinělé pravopisné či stylistické chyby, které mohly být odstraněny při pozorném závěrečném čtení práce. Za všechny uvedu např. shodu podmětu s přísudkem „Všechny typy sledovaných buněk... vykazovali expresi KCTD12 proteinu“ (str. 39 nahoře) či opakovanou formulaci s citací z úvodu práce “GABA_B receptor... Nachází se napříč celou CNS (Clark et al. 2000)” (str. 1, ř. 2,3), resp. “GABA_B receptor se vyskytuje napříč celou CNS (Clark et al. 2000)” (str. 1, ř. 13,14)

Autorovi se bohužel též nepodařilo vyhnout některým slangovým nebo nevhodně přejímaným výrazům: např. termín „měřítkový bar“ (str. 26, 2. ř. zdola) v češtině významově nenahrazuje zaužívané slovo “měřítko”, podobně slovo “outní” neznamena nic ani ve spojení “knock outní myši” (str. 31, 4. ř. shora), přestože je zřejmé, co zde měl autor na mysli. Pokud je mi známo, pro anglické označení „cartwheel cells“ dosud neexistuje adekvátní český termín. Je proto na místě používat buď původní anglický termín, nebo počestěnou podobu „cartwheel buňky“. Autor by si však měl vybrat pouze jednu možnost, jinak text působí matoucím dojmem; v práci jsem (mimo dvojjazyčný abstrakt) zaznamenal 5 výskytů prvního a 14 výskytů druhého termínu, a kromě toho i „cartwheel neuron“ (6x) a dokonce „cartwheel interneuron“ (1x). Stejněho druhu je opomenutí v české verzi abstraktu, kde není, na rozdíl od anglického ekvivalentu, vysvětlena zkratka VIP, nebo autorovo vysvětlení významu zkratky 5HT_{3A} v seznamu zkratk – ani termín „vasoactive intestinal peptide“, ani povědomost o tom, že chemický název serotoninu je 5-hydroxytryptamin, nepatří k běžné výbavě potenciálního čtenáře. Absence těchto vysvětlení tak zbytečně zužuje okruh potenciálních adresátů jinak velice hodnotné práce.

B. Obhajoba - dotazy k obhajobě

Náměty k diskusi:

1. Do jaké míry vypovídá normalizovaná šířka rozdělení intenzity fluorescence míře internalizace fluoroforu? Jak je zde odstíněn vliv morfologie buňky, např. relativní velikosti jádra vzhledem k cytoplasmě? (Motivací k tomuto dotazu je srovnání obr. 19A a 19B, z nichž ten druhý ukazuje optický řez buňkou s výrazně vyšším relativním zastoupením cytoplasmy)
2. Z jakého důvodu je distribuce GABA_B receptoru aproximována Cauchyho rozdělením (Lorentzovou distribucí)? Jak je to s prostupem proteinu do jádra?
3. Je popsán mechanismus, kdy se membránová lokalizace proteinů mění v závislosti na membránovém potenciálu. Je možné, že je lokalizace GABA_B receptoru, resp. KCTD12 proteinu regulována v odpovědi na částečnou depolarizaci plasmatické membrány? Existují studie zabývající se změnami klidového membránového potenciálu sluchových neuronů při tinnitu?

Stanovisko k opravě chyb v práci

– opravný lístek/oprava v textu ~~JE~~ / NENÍ podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / ~~NE~~

Navrhovaná celková klasifikace (ve standardní stupnici 1 až 4): **1**

Datum vypracování posudku: 22. 8. 2018

Podpis oponenta: