

Posudek oponenta na diplomovou práci

Davidu Gücklhorna

obor Biofyzikální chemie (NBIOFYZD), Přírodovědecká fakulta UK, Praha

„Sledování permeabilizace membrány na jednotlivých lipidových vezikulech - vývoj metody“.

Diplomová práce Davida Gücklhorna se zabývá vývojem metody dvojité fluorescenční permeabilizační eseje jednotlivých lipidových vezikulů (DLSGA) a její využití pro výzkum mechanismu zabudovávání fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF2) do membrán a následné tvorby membránových pórů. Pro simulaci buněčné membrány byly využity elektroformované gigantické unilamelární vezikuly (GUV) s kontrolovaným lipidovým složením. K hlavním výsledkům práce patří nové zjištění, že dimery FGF2 jsou schopny efektivně tvořit stabilní membránové póry a k jejich tvorbě a zabudování do membrány nejsou nutně zapotřebí jeho vyšší oligomerizační stavy. Byla též mimo jiné odhadnuta velikost membránového póru.

Práce je napsána v anglickém jazyce na dobré jazykové a grafické úrovni, je srozumitelná, s malým počtem typografických chyb. Má délku 57 stran a obsahuje 120 citací. Experimenty byly dělány pečlivě, interpretace dat je rozumná, cílů práce bylo dosaženo.

K obsahu a formě práce mám následující připomínky a postřehy:

- Česká a anglická verze abstraktu si zcela neodpovídají. V 3. odstavci jsou zmiňovány TIRF a FCS experimenty. Z anglické verze vyplývá, že nejde o data získaná v rámci této práce, z české verze toto nevyplývá.
- Úvod obsahuje poměrně hodně informací, které mají nízkou relevanci k předložené práci a se zavedenými pojmy se nikde dále nepracuje (např. zhášení fluorescence, FRAP, FRET, vliv teploty, fosforescence, zpožděná fluorescence, atd. (např. oddíly 2.4-2.6).
- U rovnice 7 chybí reference. Rovnice v uvedené formě neplatí, pro vysoké teploty vychází kvantový výtěžek větší než 1.
- V úvodní kapitole o mikroskopii je podrobně popisováno optické rozlišení mikroskopu, ale ve výsledkové části se s těmito pojmy dále nijak nepracuje. Zdroj rovnic 11-16 není zjevný. V tomto kontextu jsem nenašel ani velikost zobrazovaných GUV. V mikroskopických obrázcích chybí měřítko.
- V obr. 13 chybí rozlišení typu membrán pro panely A-C a D-F.
- V legendě obr. 14 není explicitně uvedeno, že se jedná o převzatá data.
- Hustota běžných globulárních proteinů se liší od hustoty vody. Pro výpočet velikosti póru by proto bylo vhodnější v rovnici 17 použít místo hustoty vody publikovanou hustotu proteinů (např. ref. 10, str. 367). Velikosti póru pak vyjde o něco menší.
- Zásadní citace pro teoretický úvod [1] je neúplná a má nejspíše i nesprávné autory. Drobné závady jsou u citací [15] a [100].

K předkládané diplomové práci mám následující otázky:

1. Je známo, že laterální struktura membrány (tvorba domén, raftů, apod.) ovlivňuje děje, které na ní probíhají. Kromě lipidového složení je ovlivněna i teplotou, která moduluje i protein-proteinové interakce. Dá se tedy očekávat, že teplota ovlivňuje dynamiku tvorby FGF2 pórů a jejich charakter. Jsou výsledky získané za pokojové teploty relevantní i pro fyziologickou teplotu 37C?
2. Z kolika nezávislých opakování byly určeny hodnoty uvedené v tabulkách 6 a 7 a jaké jsou typické standardní odchylky těchto hodnot? Čtenář tyto údaje potřebuje pro posouzení signifikance naměřených rozdílů. To samé platí pro sloupcové grafy v obr. 15 a 16.

Závěrem konstatuji, že předložená práce Davida Gücklhorna přináší řadu nových poznatků o formaci FGF2 membránových pórů a splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Doporučuji proto práci přijmout k obhajobě.

prof. RNDr. Petr Heřman, CSc.
MFF UK, Praha
6. září 2022