

## Posudek oponenta na diplomovou práci

xx oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Irena lichá, CSc
	Datum: 29. 8. 2018
Autor: Bc. Bich Nguyen Thi Ngoc	
Buněčná lokalizace rezistentních proteinů Vga(A)LC a Msr(A) prostřednictvím fluorescenční mikroskopie v různých kmenech <i>Staphylococcus aureus</i> a <i>haemolyticus</i>	
<b>Cíle práce</b> Cílem práce bylo sledovat buněčnou lokalizaci rezistentních proteinů Vga(A)LC a Msr(A) neboť není stále rozřešeno, zda mají tyto proteiny dvojí funkci při rezistenci k antibiotikům ze skupiny inhibitorů translace. Jednak zda se váží na ribozomy a zároveň též na membránu.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO NE Rozsah práce (počet stran): 118 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE Je uveden seznam zkratk? ANO NE	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO NE Je napsán srozumitelně? ANO NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE Literární přehled je rozsáhlý a obsahuje jak základní informace uvádějící do problematiky, tak podrobně popisuje současný stav poznání funkce studovaných rezistenčních proteinů. V kapitole o regulaci exprese rezistenčních genů nejsou informace zcela přesně interpretovány s ohledem na původní zdroj. (viz též formální úroveň práce a připomínky) V práci je citováno 82 prací. V případě citace Dar & Sorek 2017 není uvedeno, že jde o sekundární citaci.	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE Kolik metod bylo použito? Byly použity metody v široké škále metodických přístupů od základních kultivačních technik mikroorganismů, rekombinantních technik při přípravě fúzních proteinů, příprava buněčných frakcí, imunodetekční metody až po zobrazování pomocí vysokorozlišovací fluorescenční mikroskopie. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky? Viz připomínky Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující? Ale není to chyba studentky, protože jde o komplexní problém, který se nedá vyřešit v rámci jedné diplomové práce, ale určitě k vyřešení problému přispěla.	

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE

Myslím si akorát, že některé závěry autorky by měly být podloženy dalšími experimenty, zvláště prokázání, zda dochází k expresi proteinu v „inclusion bodies“. Nabízí se i vysvětlení interakce s polyribosomy. Některé závěry jsou pak trochu neprůkazné a odporují si. Diplomová práce je však časově omezena a na detailní analýzu a řešení problému někdy není čas a je třeba se vypořádat s daným stavem věcí, o což se autorka úspěšně pokusila.

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO NE

**Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

Práce je psaná slovensky, takže zcela nejsem schopná posoudit pravopis, ale práce je napsaná čtivou formou, i když se autorka nevyhnula anglismům a laboratornímu slangu, které v jednom případě vedou k nepochopení textu. (příklad protein vypadává) Práce je pečlivě formátovaná a s minimem překlepů.

Práce obsahuje obrazovou dokumentaci jak v části literární rešerše, kde jsou použity ilustrační obrázky v dobré reprodukční kvalitě, jen v případě obrázku č. 9 mi přijde, že není dobře zvolen, či spíše jeho zredukování, a tak ne zcela správně doplňuje část o regulaci exprese rezistenčních genů a přiřazuje obrázek k textu popisující pouze regulaci atenuací, kde by spíše byl ilustrativní obrázek č. 3 z této publikace (Dar & Storek 2017).

V experimentální části grafy i obrázky výsledků fluorescenčních experimentů jsou zpracovány a prezentovány kvalitně a přehledně ukazují výsledky s výjimkou některých popisů, detailně uvádím v připomínkách.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

**Cíle práce určitě splněny byly, studentka provedla nadstandartní množství experimentů, které kriticky zhodnotila, i když k úplnému vyřešení problému nedospěla a kladný výsledek dostala na otázku, kterou si jako cíl nevytyčila a to, zda regulace exprese může probíhat atenuačním způsobem. Zadání práce však nebylo triviální a je součástí širšího projektu řešeného v laboratoři školitelky. Práce hodnotím jako kvalitní, pečlivě sepsanou, i když se autorka malým chybám nevyhnula. Studentka prokázala schopnost jak experimentální práce, tak kritického zhodnocení výsledků a jejich prezentace.**

**Otázky a připomínky oponenta:****Otázky:**

1. Jak bylo zajištěno vyloučení kontaminace membránové frakce polyribosomy vázaných na membránu?
2. Nemohou být rozdílné výsledky lokalizace Vga proteinu při různých přístupech stanovení (mikroskop x WB) v důsledku rozdílných kultivačních podmínek při přípravě vzorku na detekci? Mikroskop OD 0,2 a 0,8, imunodetekce OD 0,7-0,8.
3. Byly provedeny nějaké studie, které by ukázaly, zda konformační změny ribozomu s navázaným antibiotikem mění afinitu ribozomu k SD sekvenci a zda případné výsledky korelují se sekvencemi SD místa před riboregulátorem genů Vga proteinů?
4. V detailním popisu struktury NBD podjednotky ABC transportérů uvádíte, že v 3A smyčce je v aktivním místě tyrozin a 5-H smyčce histidin. Nezkoumal někdo, zda nedochází k fosforylaci na těchto aminokyselinách?

**Připomínky:**

1. V práci není vždy dodrženo jednotné používání názvu bakteriálních druhů, někdy je vypsáno celé, někdy zkratkou. Např. hned v klíčových slovech: *Staphylococcus aureus* a *S. haemolyticus* a *E. coli*
2. Proč v seznamu zkratk nejsou u některých obě jazykové verze vysvětlení? Např. Etta, MATE, MFS pouze anglicky a naopak u PtIM pouze česky?
3. Seznam plazmidů by měl obsahovat detailnější informace, měl být doplněn buď o genetickou mapu příslušného plazmidu, nebo odkaz kde je možné tyto informace najít. Chybí mi např. u plazmidu pRMC2 jeho kopiovost.
4. Můžete vysvětlit poměrně nezvyklou přípravu preparátu pro fluorescenční mikroskopii?
5. Jaký typ rezistence k anhydrotetracyklinu mají testované buňky?
6. Str 29 – popisovaný mechanismus terminace transkripce se zahrnuje též do regulací na translační úrovni, protože jsou s translací spřažené, speciálně v případě, který popisujete. K regulacím na transkripční úrovni se považují regulace iniciace transkripce. Viz obrázky 1ab z citace Dar a Storek 2017, kterou uvádíte jako zdroj obrázku č. 9.
7. Popisek v panelu 3 a 4– (str. 86): co znamená „indukce na začátku“? Mělo by být přesnější uvedení času.
8. V panelu 3 jsou označeny dva obrázky stejně a to pro A a F, dále s popisu není jasné, zda Z-stack maximální intenzity je pouze pro obrázky D, E, F?
9. V panelu 3 a 6 je jiná intenzita u obrázků bez indukce a s indukci, je to zavádějící, takto to vypadá, že i bez indukce dochází k expresi proteinu.
10. Co znamená informace : „Predtým bolo v laboratóriu pozorované, že ARE proteíny majú tendenciu po rozbití buniek vypadávať,“

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

xx výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: