

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
Doc. Ivo Konoopásek

Datum:
3.6.2019

Autor:

Bc. Simona Kleinová

Název práce:

Identifikace nových substrátů Ser/Thr proteinkinázy StkP

Cíle práce

Hlavním výzkumným tématem je protein Spr0175, jeden ze substrátů proteinkinázy StkP. Cíl: Vytvořit deleční kmeny *S. pneumoniae*, které neobsahují gen pro předpokládaný protein Spr0175 a určit morfologické a růstové vlastnosti ovlivněné tímto proteinem, jeho fosforylaci kinázou StkP jak *in vitro*, tak *in vivo* a nakonec i jeho lokalizaci.

Poznámka:

První věta Cílů: „Vytvořit mutantní kmen delta-*spr0175* na R6, Rx a D39 genetickém pozadí kmenů R6, Rx a D39a charakterizovat jeho morfologické a růstové vlastnosti.“je neobratná, mohla by být formulována líp.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 124, z toho Literatura 12 stran, cca. 150 citací

Poznámka ke struktuře: část výsledků by v odpovídající publikaci určitě patřila do části „Materiál a metody“. Jde o konstrukci delečních kmenů a kmenů produkujících rekombinantní protein Spr0175. Vzhledem k tomu, že tato příprava byla velmi pracná, lze pochopit, že je zahrnuta ve výsledkové části DP, i když jde „jen“ o materiál, který je nutný jako východisko pro výsledkovou část.

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Abstrakt by se měl víc soustředit na výsledky dosažené autorkou a tvořit ucelenější celek.

Je uveden seznam zkratk? ANO

Ve zkratkách je několik drobností:

Anti = Protilátka (???).....zbytečné zavádění zkratky

FLAG = Flag epitop (chybí vysvětlení). V práci se požívá i ve formě s malými písmeny třeba jako pojem „Flagová kotva“

SJK = Sweet Janus kazetabude diskutováno dále

TCS = Dvousložkový systému nás používáme spíš „Dvoukomponentový systém“, abychom se vyhnuli pojmu „složka“ a analogii s dvousložkovým lepidlem. Ale je to věc názoru.

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Poznámka: Pomohlo by, pokud by byly v LP přítomny texty týkající se proteinu Spr0175 a vlastností výchozích divokých kmenů *S. pneumoniae*, případně efektu hromadění supresorových mutací. Bylo by pak možné například lépe rozumět výsledkům (růstové křivky) nebo i designu jednotlivých pokusů. Nanejvýš důležitý efekt **hromadění supresorových mutací** se vyskytuje poprvé jako pojem ve Výsledcích a je vysvětlen teprve v Diskuzi.

V přehledu proteinů tvořící buněčnou přepážku bych uvítal lepší rozlišení prodlužovacího

růstu u kulatých a tyčinkovitých bakterií a jasnou specifikaci, zda obr. č. 4 je univerzální pro všechny bakterie. Stejně tak Tab. 1 neříká přesně, které proteiny jsou charakteristické pro *S. pneumoniae*.

Velmi podstatné mi připadá, že pokusy s delečními mutanty delta- Spr0175, které prováděli jiní autoři a které už byly publikovány, neuvádíte v Úvodu. Čtenář se pak v Diskuzi diví, že vlastnosti delečních mutantů už byly sledovány jinými autory. Mělo by být zřejmé, proč takové výsledky opakujete včetně přípravy mutantních kmenů.

Je napsán srozumitelně? ANO

Poznámka: V Úvodu je řada stylizačních neobratností, autorka měla dát větší pozor i na překlady, kterých je v práci dost. Vadí také množství anglicizmů. Viz dále.

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Práce je metodicky bohatá, byly použity rozmanité techniky genových manipulací, mikroskopie, různé elektroforetické detekce, blotovací techniky, izolace proteinů, bioinformatické techniky, analýza bakteriálního růstu.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Metody jsou popsány detailně, srozumitelně.

V popisu MaM je spousta prohřešků, především anglicizmů:

Například:

37:**Sweet Janus kazeta**....*Anglické přívlastky jsou překládány v tomto slovosledu. Jde o obecný trend, který u autorky přechází i do jejích vlastních textů. Proč nepsat například „deleční kazeta SVJ“, která byla definovaná ve zkratkách?*

37:levansukrázu....*sladíme sacharózou, ne sukrózou*

39: ... chemikálie obsahují analytickou čistotu ...

42: Selekční média **vznikly** přidáním....

43:s přídavkem 5 % **defibrilované** beraní krve*defibrinované*

45:Pfu ultra HF DNA polymeráza, Purple Taq polymeráza *jde spíš o obchodní názvy, ne o české nebo anglické názvy enzymů*

47:*v tabulce není program MicrobeJ zmiňovaný ve Výsledcích*

51: Příprava rychlých proteinových vzorků-chemická dezintegrace buněk.....*není vysvětleno, čím jsou vzorky „rychlé“*

54: Nejprve byly buňky v peletě resuspendovány.....*Doslovné počestění u slova „peleta“ (angl. „pellet“) se zatím používalo jako maskulinum. Jako femininum připomíná „dřevěné pelety“*

57: Měření růstových křivek.....*Opravdu probíhalo zaočkování do měřící kyvety rovnou naředěním bakterií z glycerolové konzervy s OD600 = 0,4 , bez růstu inokula mimo měřící kyvetu? Měření generační doby by mělo probíhat ve fázi ustáleného růstu, kterou od tohoto uspořádání nemůžeme chtít.*

V této kapitole mi schází popis pasážování, který je velmi důležitý pro Výsledky – jde o to, kolik generací představuje jedno pasážování.

Jakou chybu reprezentuje zjednodušení, kdy jako jednotlivé buňky počítáte 1 buňku, dvojici a trojici buněk, zatímco jako řetízek 4 a více buněk, kdy předpokládáte, že řetízek

představuje růstový defekt?

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?

Dokumentace je dostačující, ale mám dojem, že některé výsledky jsou interpretovány poněkud zkresleně (viz dále).

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Množství experimentů je dostatečné, i když bylo možno doplnit některé experimenty, které by verifikovaly navrhovanou interpretaci. Některé z nich by byly jednoduché (např. růstové experimenty mutantů delta- Spr0175 s antibiotiky), jiné jsou náročnější a jsou v dalším výhledu (sekvenace klonů lišících se růstovou rychlostí).

Prvních 20 stránek výsledků, které představují konstrukcí kmenů, je dobře čitelných, dokumentovaných. Jak bylo řečeno, tato partie mohla být součástí MaM.

K experimentální části mám tyto výhrady:

Grafy a obrázky je lepší pojmenovat jako „Obr. XX“ a ne „Graf xx“, Obrázek č. xx“.

61: schéma operonu by bylo lepší (pokud je k dispozici) v podrobnější formě, pokud jsou podrobně popisovány konstrukty počítající s touto oblastí

81:cit: “Z části a) i b) uvedených na obrázku č.27 lze usuzovat, že deleční kmen Sp353 s vloženou Sweet Janus kazetou (Rx; delta-spr0175::SweetJanus) na pozadí kmene Rx vede ke vzniku heterogenní populace.“Podle mého by do srovnání klonů odvozených od Rx versus R6 mohla být rovnou zahrnuta i tvorba řetízků a buněčná přepážka umístěná mimo střed – tyto vlastnosti jsou probírány zvlášť a srovnání je ponecháno až na Diskuzi. Dat je hodně měla by být shrnuta už tady.

82: Růstová charakterizace mutantních kmenů: k této části mám podstatné výhrady. Není jasné, zda se chybové úsečky vztahují k biologickým opakováním (nezávislým růstovým pokusům) nebo opakovaným měřením. Vzhledem k mým zkušenostem pochybuji o směrodatnosti tvrzení „Doba zdvojení u kmene Sp353_k17 byla vlivem pasážování snížena o 2 minuty z 33 na 31 min.“ (str. 82) vzhledem k tomu, že opakované měření růstové rychlosti je zatíženo větší chybou.

Pasážování není vysvětleno a není jasné, kolik generací představuje, co se s buňkami dělo během pasáží (rostly stále exponenciálně nebo ne?).

V Tab. 28 nejsou směrodatné odchylky generačních dob, zatímco v grafech jsou směrodatné odchylky OD. Proto mám pochybnosti o biologických opakováních.

V práci se používá chybně pojem „lag fáze“. Ten je definován jako doba, kdy buňky nerostou a je definován postup, jak stanovit jeho délku. Ta se v práci nestanovuje, ale nevyvážený růst na začátku kultivace je interpretován jako lag fáze. Tvrzení o zkracování lag fáze proto nemá smysl.

Design pokusů je tady komplikován tím, že byly sledovány klony jednotlivých mutantních kmenů a ještě jejich jednotlivé pasáže. Tedy proměnné byly: pozadí kmenů Rx,R6 – přítomnost/nepřítomnost deleční kazety – klon – pasáž. To samozřejmě značně komplikuje výsledky a je otázka, zda nebylo lepší vyjít z jednoduššího uspořádání.

Opravdové drama se odehrává na Obr. 3 (=Graf 3), kdy růst vykazuje dvě směrnice, kde první z nich je interpretována jako lag fáze a druhá slouží k výpočtu doby zdvojení. Doba zdvojení se přitom zkracuje jako funkce pasážování. To je samozřejmě zajímavý fenomén. Ale bylo by nutné ho prokázat nezávislými růstovými pokusy, pokud se tak nestalo. Je otázka, jak ovlivnil design růstového experimentu výsledky (očkování přímo z konzervy a bezprostřední stanovení růstových parametrů). Výsledky v tabulkách se kvůli počtu proměnných velmi

špatně sledují.

Část věnovaná fosforylacím rekombinantního proteinu Spr0175 in vivo a in vitro a jeho lokalizaci je zdařilá a představuje velké množství práce a logicky uspořádaných experimentů, které jsou dobře dokumentovány.

Výsledky obsahují množství špatně volených formulací, které někdy znesnadňují porozumění textu - například:

62: ...“ Pozitivní klony na genetickém pozadí kmene R6 byly pojmenovány **na kmen Sp352** (R6, *Δspr0175::SweetJanus*), pozitivní klony na pozadí kmene Rx **na Sp353**“ větě není kvůli nestandardní stavbě a předložkám rozumět...

75: Název kapitoly: „Příprava kmene s exprimujícím protein Spr0175-FLAG **pod zinkem indukovaným promotorem** na pozadí kmene *Δspr0175*“ by vyžadoval lepší formulaci

78: „Vzhledem k tomu, že *S. pneumoniae* je geneticky velice plastický organismus, který je schopen hromadit supresorové mutace, bylo pro odhalení stálosti fenotypu delta-*spr0175* testováno větší množství klonů. “... toto je naprosto zásadní tvrzení, které není nijak dokumentované a čtenář netuší, co si má představovat: jakého druhu jsou supresorové mutace, jak rychle se jsou schopny projevit a díky čemu.....Autorka uvádí vysvětlení až v Diskuzi: Rx má „...defektní mismatch repair systém“ (str. 100).

80: „Žluté šipky poukazují na **buňky neschopny se rozdělit**, čímž dochází k tvorbě řetízků.“

81: „Populace buněk je statisticky významně menší i v případě mutantních kmenů *Δspr0175*“ nejde o velikost populace, ale o velikost buněk.

Diskuze:

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

Diskuze je opravdu z velké části podrobné opakování výsledků, někdy i stejně formulované.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? **ANO NE**

Autorka srovnává své výsledky a ostatními – nedovedu odhadnout, zda bylo možno udělat srovnání důkladnější.

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

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? **ANO NE**

Souhrn by vyžadoval skutečně propojit výsledky a ne je podat v podobě „nepříliš souvisejících odrážek“ – je to škoda, protože výsledků je hodně a autorka by měla vymyslet celkový obraz úlohy proteinu – v podstatě je souhrn stejně opatrný jako popis výsledků a dodržuje jejich pořadí.

Bylo by potřeba shrnout – jakou úlohu má protein, jak je to s jeho fosforylací, jakou úlohu hraje genetické pozadí výchozího kmene. Abstrakt práce je lepší než Souhrn.

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

Nelíbí se celkově část věnovaná růstovým charakteristikám, jinak je úroveň grafického zpracování dobrá.

Jazykovou úroveň za dobrou nepovažuji – po stylistické stránce a v používání anglicizmů je co zlepšovat.

Zde jsou příklady:

1.Hlavní problém jsou přívlastky před podstatným jménem – „po anglicku“:

Abstrakt: Byly připraveny *Δspr0175* **mutantní kmeny...**

„**pomocí WesternBright ECL substrátu....**“ (91)

„Vazba ParB do **parS** místa zároveň ovlivňuje....“ (16)

„**LocZ/MapZ** kruh je nejprve umístěn ve středu buňky, kde **ko-lokalizuje se Z-**

prstencem.....“ (16)

„Vytvořit mutantní kmen delta-*spr0175* na **R6, Rx a D39** genetickém pozadí....“ (Cíle)

2. Nadužívání spojky „skrze“: tato spojka je používána v několika významech, jde o hantýrku, dost ošklivou – tuto spojku by většinou bylo možno vypustit a nahradit 7. pádem:

„Důležitou roli má i Ser/Thr proteinkináza StkP mající v kompetenci pozitivní regulační úlohou **skrze aktivaci** centrálního kompetenčního operonu *comCDE*....(str. 13)

„Glykanové řetězce jsou poté propojeny **skrze** krátké pentapeptidové můstky o sekvenci L-alanin....“ (17)

„Příčné vazby mohou být u pneumokoka tvořeny také **skrze** větvené peptidy....“ (17)

„disacharid je následně transportován **skrze** cytoplazmatickou membránu“ (19)

„Pomocí ko-immunoprecipitace bylo zjištěno, že LocZ/MapZ interaguje **skrze** C-koncovou doménu....“ (31)

3. Skloňování české podoby „Streptococcus“ - streptokok:

S. pneumoniae a ostatní **streptokoci** kódují (str. 8)....lépe „*streptokokové*

..... konzervovaný ve **streptokokích**,..... lépe: „*u streptokoků*...“

Prohřešků je daleko víc, například obvyklý nesoulad : detegovat/detekovat vs. detekce apod. Hantýrka hovorová: „...se pohybovalo v rozmezí 11-63 %, což průměrně dělá 44±21 % pro 5 testovaných klonů....“

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce přinesla zajímavé výsledky. Celkové zpracování je nevyrovnané, s mnoha výhradami. Přesto si myslím, že se autorka vyrovnala s vědeckým problémem, naučila se spoustu experimentálních metod a získala první zkušenosti s publikováním výsledků. Proto doporučuji práci k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) Vysvětlíte podrobněji úvahy o esencialitě genu *spr0175*. Jednotlivé úvahy o esencialitě mi nepřipadají konzistentní. Vyjděte například z tvrzení: „Analýzou profilů růstových křivek lze usoudit, že gen *spr0175* by mohl být skutečně esenciální.“ (str. 102)
- 2) Jakým způsobem budete postupovat při analýze mutací v genomu, kterou budete dokazovat hromadění supresorových mutací?
- 3) Jaké rozdíly v efektu mutace Δ *spr0175* na pozadí divokých kmenů R6 a Rx jste očekávala? Vysvětlíte rozdíly mezi oběma kmeny a důvody, proč bylo zajímavé je použít.
- 4) Byla provedena morfologická analýza delečních kmenů, které postupně vyrovnaly růstovou rychlost s výchozím kmenem? Jak byste interpretovala situaci, kdy by si tyto kmeny zachovaly změněnou morfologii?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

