

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Petra Lišková
	Datum: 7. 9. 2021
Autor: Michaela Novotná	
Název práce: Mechanismus inducibilní genové exprese rezistenčního proteinu Vga _{ALC} ze <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
Cíle práce Diplomová práce si klade za cíl objasnit molekulární mechanismus přirozené inducibilní exprese genu <i>vga_{ALC}</i> pocházejícího ze <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , který kóduje rezistenční ARE ABCF protein, a buněčnou lokalizaci tohoto proteinu exprimovaného z vlastního promotoru.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? <u>ANO</u> NE Rozsah práce (počet stran): celkem 127 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, <u>ANO</u> NE Je uveden seznam zkratek? <u>ANO</u> NE	
Literární přehled: Odpovídá tématu? <u>ANO</u> NE Je napsán srozumitelně? <u>ANO</u> NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? <u>ANO</u> NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? <u>ANO</u> NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? <u>ANO</u> NE Kolik metod bylo použito? Více než 20 různých metod zahrnujících: metody kultivační, práce s DNA a RNA, s proteiny, měření intenzity fluorescence, fluorescenční mikroskopie, sw nástroje pro práci s DNA, RNA, mikroskopickými snímky. Jsou metody srozumitelně popsány? <u>ANO</u> NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? <u>ANO</u> NE Je dokumentace výsledků dostačující? <u>ANO</u> NE Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? <u>ANO</u> NE Myslím si, že ano; dílčí cíle jsou formulovány tak, aby zvolený experiment dal odpověď na danou otázku.	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? <u>ANO</u> NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? <u>ANO</u> NE Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? <u>ANO</u> NE	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? <u>ANO</u> NE	

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

Po formální stránce práce splňuje požadavky na diplomovou práci, je úhledná, text je pečlivě formátován, obsahuje 38 obrázků, 6 grafů a 28 tabulek, součástí práce jsou také přílohy: spoluautorská publikace Vimberg et al., 2020, obrazová dokumentace predikce sekundárního uspořádání transkriptu *vgaALC* a mikroskopické snímky, které jsou prezentované v samotné práci vícebarevně, rozložené na jednotlivé barevné kanály.

Anglicizmy se v práci vyskytují hojně, což je někdy ke škodě, když český přepis by měl jen pozměněný slovosled (zejména ve větách s „ribozomem zprostředkovanou atenuací“).

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce je komplexní a propracovaná, obsahuje velké množství výsledků. Text práce je více než jako diplomová práce pojat jako práce disertační nebo jako publikace. Některé výsledky tím ztrácí zasazení do základních údajů, jsou již vysvětlovány na vyšší úrovni. To by mohlo být v kontextu psaní diplomové práce považováno za chybu, protože diplomová práce by naopak měla vysvětlit danou problematiku i obecnému čtenáři. Autorka jako přílohu diplomové práce přikládá publikaci, již je spoluautorkou. Věřím tedy, že cíle práce byly splněny a diplomovou práci lze hodnotit výborně i přes výhrady k formátu práce.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

Některé věci jsou málo komplexně komentovány: kolegové „z oboru“ jistě rozumí, ale někdo, kdo se danou tematikou běžně nezabývá, nedocení dosah a smysl dané informace, někdy postrádám podrobnější interpretaci výsledků, co si autorka o získaných výsledcích myslí (např. výsledek predikce pomocí PASIFIC, str. 78 a příloha 2). Výsledková kapitola 5.4 naopak připomíná diskusi, výsledky jsou komentovány ve vztahu k publikovaným datům. V celé práci se v souvislosti s regulací genu mluví jako o regulaci jeho „exprese“. Výraz „exprese“ neodkazuje na jeden specifický děj, vyjádření tak působí zamlženě. Např. v názvu kapitoly 5.1.4 „Vazba antibiotika do ribozomu jako prerekvizita spuštění genové exprese“, kde se jedná o vazbu antibiotika do ribozomu s regulační oblastí již transkribované mRNA daného genu.

Výsledková kapitola 5.3 obsahuje směs již publikovaných informací, z popisu není úplně jasné, co z výsledků na Obr. 27 (str. 84), je vlastnoruční práce autorky, tedy co je předmětem obhajované práce a co je přejato z literatury Lenart et al., 2015.

Obrázky v kapitole 5.5 (Obr. 34, 35, 36, 37, 38) mají vždy v části A vyznačen čas odběru vzhledem k růstové fázi kultury. Jedná se však vždy o Graf 5, jsou zde vyznačené všechny tři růstové křivky, jak jsou v Grafu 5. Růstová křivka se tedy nepojí k danému experimentu. Bylo by vhodnější použít jako schéma nějakou jednu průměrnou růstovou křivku a označit ji jako schéma.

Otázky:

1. Proč byl v práci použit *S. aureus* a ne *S. haemolyticus*? V práci to není komentováno.
2. Co spouští transkripci *vgaA*?
3. V kapitole 5.1.2 (str. 74) byla stanovována intenzita fluorescence fúzního reportérového proteinu jako míra exprese sledovaného proteinu. Správná funkce reportérového systému byla potvrzen tím, že u kontrolního konstruktu LCreg_538 byl „signifikanční signál“ naměřen pouze v přítomnosti linkomycinu. Jakým způsobem byl signál hodnocen jako „již signifikantní nebo ještě ne“?

4. V kapitole 5.5.1 komentujete výsledky grafu 5 slovy: „...všechny testované kmeny rostou stejně.“ Jakým parametrem popisujícím růst bakteriální kultury při jednorázové kultivaci by bylo možné takovou skutečnost také popsat a kvantifikovat?
5. Nerozumím popisu a tedy ani obsahu Obr. 34 (kapitola 5.5, str. 103), kde jsou dvě řady snímků (číslovaných A-J) označeny Vga_{ALC} a Vga_{ALC}-eqFP650; v příloze (jsou tyto snímky A-J (jednotlivé rgb kanály) označeny všechny jako Vga_{ALC}-eqFP650). Jaký je rozdíl mezi snímky v řádcích na Obr. 34? Antibiotikum linkomycin zde bylo přidáno na úplném začátku kultivace, přítomnost proteinu byla sledována po dosažení buněčné denzity na McF=1, což odpovídá časné exponenciální růstové fázi. Jak vysvětlíte, že při koncentraci linkomycinu 16 µg/ml, kterou současně označujete za hodnotu MIC pro linkomycin pro danou kulturu, nebyl v kultuře detekován produkt Vga_{ALC}-eqFP650 (rezistenční protein fúzovaný s fluorescenčním reportérem), ačkoliv kultura i v této inhibující koncentraci antibiotika rostla?

Další připomínky, které není nutné předčítat:

Ve výsledkové části se často opakuje doslovně odstavec (7 řádků) o postupu měření IF reportérového fluorescenčního proteinu, který by stačilo sepsat jednou a dále se na něj pouze odvolávat. Na str. 80 je odkaz na Graf G v oddíle 5.5.1, kde se ovšem nachází Graf 5, Graf G se v práci nenachází. U Obr. 9A (str. 19) se překrývají popisky. Cíle práce jsou formulovány nespecificky, je samozřejmě jasné, o co se jedná, ale zrovna cíle práce by měly být jasné dané bez možnosti omylu („4. Ukázat závislost antibiotické specifity indukce genové exprese (čeho?) na délce a aminokyselinové sekvenci vedoucího peptidu (jakého?) v nepřítomnosti rezistenčního proteinu (kterého?)“).

Nekompletní výčet laboratorního slangu a anglicizmů: „...ribozom-vazebným antibiotikům“ (str. 9), „...proteinů s netransportní funkcí“ (str. 18), „leader peptid“ (str. 25), „putativních“ (str. 28), „...32 nukleotidů upstream od...“ (str. 34), „fluorescenční barvička“ (43).

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: