

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Datum:

15.9.2009

Autor:

Jaroslav Nunvář

Název práce:

Vliv environmentálních stresů na mutabilitu *Bacillus subtilis*.

Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, jaký je vztah stresu a mutační rychlosti, případně stresu a indukce MMR systému u *Bacillus subtilis*.

Jde o velmi aktuální a složitou tematiku, která zatím není u *B. subtilis* vyřešena.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 98

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE

Je uveden seznam zkratk? ANO NE

Literární přehled:

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 napsán velmi srozumitelně a jeho literární úroveň je vysoká, nenarazil jsem na nic podstatného, co bych autorovi měl vyčítat. Ke srozumitelnosti přispívá i nadprůměrné množství odkazů do jiných kapitol.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE

Kolik metod bylo použito?

....těžko odhadovat, tato otázka mě vždy iuvede do rozpaků. Šlo o kombinaci molekulárně biologických metod při konstrukci GFP derivátu proteínu MutL a kmenu pro sledování aktivity promotoru operonu *mutSL*, o fluorescenční měření a standardní techniky bakteriální genetiky a fyziologie.

Tato část je napsána velmi přehledně.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

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

Nedostatky bych viděl ve zpracování některých výsledků, které jsou nedostatečně diskutovány a v návrhu některých experimentů, které jsou informačně „málo bohaté“ a odvozuje se z nich více, než mohou ukázat, a naopak – některé výsledky jsou popsány příliš velkoryse a nejsou z nich všechny informace vytěženy.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

Vcelku ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující? Viz otázky oponenta...

Diskuze:

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

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? Vcelku ANO NE.

Rezervy bych viděl v porovnání modelu výpočtu mutačních rychlostí s postupy jiných autorů, které je pomínuto.

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

Autor poskytuje jednoduché vysvětlení různé regulace mutability u *E. coli* a *B. subtilis*.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

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

Formální úroveň práce odpovídá úrovni obvyklé u prací na naší katedře.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Myslím, že pokud budou tyto výsledky publikovány, pak pro připravovanou publikaci založenou na těchto výsledcích je třeba provést důkladný popis nového modelu výpočtu mutačních rychlostí, uvést jeho východiska, jeho odvození a dokázat jeho platnost a omezení, zasadit ho do kontextu obdobných snah v minulosti. Připomínky k některým experimentům jsou uvedeny dále, doporučoval bych vylepšené uspořádání některých pokusů a jejich důkladnější diskuzi.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázky:

- jak jste stanovil okamžik přechodu do stacionární fáze na obr. 20? V tomto vámi určeném okamžiku data ukazují změnu směrnice nárůstu aktivity, která je dána proložením maximem závislosti (tedy jedním bodem). Interpretujete ji jako „jednorázovou silnou indukci transkripce operonu“, což mi připadá přehnané. Chybí podrobnější komentář průběhu obrázku 20b, kde by měl být pojednán i pokles aktivity a rozdíl mezi kontrolou a stresovaným systémem. Mluvíte také o jednorázové proteolýze reportérového proteinu – proč?
- Tvrdíte, že v plotnových X-gal pokusech, kterými jste nahradil stanovení aktivity reportérového genu při růstu, nemají použité stresové faktory (pH 5.0, 28°C) vliv na aktivitu reportérového genu. To se dá snadno napadnout. Plotnové pokusy mají v tomto případě omezenou výpovědní hodnotu, ukazují snad jakýsi integrál aktivity v okamžiku fotografování. Jde o to, jaké rozdíly na plotnách (pattern modré barvy v hustém nárůstu bakterií) by znamenaly rozdíl mezi kontrolou a jaké ne. Každopádně by i ostatní stresy (pH 5.0, 28°C) měly být řešeny ve stejném uspořádání jako na obr. 20.
- Úvahy o zvyšování frekvence mutací (obr. 22A) podle mého neodpovídají definici mutační rychlosti tak, jak je uvádíte na straně 72. Mohl byste úvahy vedoucí k tomuto schématu vysvětlit?
- Vztahy 1 a 2 pro výpočet mutační rychlosti jsou zavedené bez odvození, ve výsledkové části ani v diskusi není odvolávka na žádné jiné práce, které by tento problém řešily. Problém frekvence mutantů při růstu byl přitom rozhodně mnohokrát řešen. Mohl byste vysvětlit, jak jste ke vztahům došel, jaká je souvislost mezi

schématem na Obr. 20A a těmito vztahy? Na výpočtu je zvláštní to, že umožňuje výpočet mutační rychlosti „z jedné misky“, ne alespoň ze dvou, odebíraných z definovaně rostoucí kultury v různých časech a vysévané na plotny. Tam by byla růstová rychlost jasná a z frekvence mutací by se dala mutační rychlost spočítat přirozenějším způsobem. Stanovení mutační rychlosti ve stacionární fázi je problematické z principu, protože není znám počet replikací v kultuře během stacionární fáze. Toto omezení by mělo být u vašeho modelu zdůrazněno.

- Obrázek 26 ukazuje vliv stresu na mutační rychlost. Obrázek neukazuje směřodatné odchylky, uzavíráte, že stresy nemají vliv na mutační rychlost. Hodnoty ale kolísají v rozmezí 2,3 až 7×10^9 , což jsou velké relativní rozdíly. Je váš závěr ovlivněn také tím, že jste očekával zvýšení mutační rychlosti a odchylky na obě strany vás nezajímají, protože to není to, co jste očekával? Tady je ale trochu problém ve vašem přístupu – co kdyby i výsledek, že vysoká osmolarita snižuje (a ne zvyšuje) mutační rychlost, byl zajímavý a vy byste tenhle efekt jako první objevil?
- K obrázku 27, který ukazuje počet mutantních kolonií na plotnách v závislosti na použitém stresu, mám následující výhrady : data podle vašeho názoru potvrzují výsledky na Obr. 26. V textu ale chybí vyhodnocení těchto obrázků - zda má smysl počítat počet kolonií, zda je tento počet stejný nebo různý. Zřejmě byste jako pozitivní výsledek očekával podstatné zvýšení počtu kolonií, které se ale nekonalo. To ale neznamená, že byste úplně měl rezignovat na vyhodnocení a jen konstatovat, že „nebyla prokázána zvýšená mutabilita“. Dále by bylo nutno stanovovat mutační rychlost na několika paralelních miskách, používáte jen jednu. Myslíte, že byste došel k závěru, že stres v přítomnosti 1M NaCl indukuje zvýšenou mutační rychlost, pokud by byla data horních dvou misek přehozena? U kontrolní misky je totiž asi dvojnásobný počet kolonií než u systémem s NaCl.

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta: _____