

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Datum:

10.9.2012

Autor: Bc. Nela Štekerová

Název práce:

Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*

Cíle práce

DP se týkala jednoho tématu, kterým byla úloha proteinu Spr0334 v signalizaci a regulaci *S. pneumoniae*, který je kromě své úlohy lidského patogena také modelovým organizmem. Cíle jsou definovány velmi jasně a v práci byly splněny. Práce je také dobře shrnuta v abstraktu.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): Práce má celkem úctyhodných 135 stran včetně citované literatury.

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE

Je uveden seznam zkratk? ANO NE

Ve zkratkách bych jen vytkl výraz „streptokoci“ místo „streptokokové, ani zkratka „chr.DNA“ se mi příliš nelíbí, je asi zbytečná. Vysvětlení zkratky „rpm“ jen anglicky v česky psané práci trochu vadí.

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 bych rád pochválil, je napsán čtivě, dokumentován recentními citacemi. Na straně 22 bych přivítal lepší objasnění mechanismu „bratrovraždy“ pomocí lyzinů.

Literárních odkazů je kolem 180.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE

Kolik metod bylo použito?

Práce je velmi metodicky bohatá, protože zahrnuje jak genetické manipulace s genem Spr0334, tak fyziologické charakteristiky připravených mutant včetně důkladné velikostní analýzy bakteriálních buněk.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

Metody jsou popsány velmi dobře, postupy jsou popsány podrobně včetně vysvětlení, k čemu jsou jednotlivé konstrukty určeny. Hantýrky je v této části minimálně.

Překlepů je minimálně.

46: yeast extrakt

50: název „3.1.9 Počítačová analýza“ je málo vypovídající

50: u programů **MicrobeTracker Suite** a **Prism** by bylo dobře uvést výrobce

53: je dobře vztah pro výpočet T_m ? **Nechybí nějaká konstanta?** „ $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$; T_m (°C);

60: vysvětlíte z hlediska fyziologie bakteriálního transportu následující popis: „Pokud jsme do média přidávali $ZnCl_2$, abychom indukovali přepis genů pod indukčním zinkovým

promotorem, přidávali jsme do média či kultivační půdy rovněž 0,1 mM MnCl₂. Přítomnost Zn²⁺ totiž vede k „hladovění“ buňky na Mn²⁺“

61: „přidáním 0,1 objemu 3 M NaOAc“ – nechybí tady něco?

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

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

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Experimentální část je velmi dobře dokumentovaná. Jsou vysvětleny cíle každé etapy a dílčí závěry. Je graficky dobře zpracovaná od obrázků konstruktů přes grafy a mikrofotografie, vše v dobrém rozlišení.

V první části výsledků by bylo dobré zdůraznit, že jde vlastně o část úvodu, protože čtenář automaticky považuje obrázky ve výsledkové části za práci autorky – zvláště tehdy, když u obrázků 4.1-4.4 nejsou literární odkazy (ty by každopádně být měly).

Na str. 80 by měla být na ose specifikována procenta – čeho jsou to procenta.

84: čísla u sloupců v histogramu jsou nadbytečná. Naproti tomu by bylo přesvědčivé proložit křivku rozložením velikosti, která by hned ukázala, že jsou vrcholy histogramů různé.

89: detekce – detegovat (tato chyba je běžná, v této práci je 11x)

89: *S. pneumoniae* (v práci 4x)

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

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

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

Formální úroveň je na velmi dobré úrovni.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny, byť jeden výsledek (funkcí nefosforylovaný protein) je zatím dost záhadný. Práce je rozsáhlá výsledky, má promyšlenou koncepci, hodnotím ji rozhodně velmi vysoko. Doporučuji práci rozhodně k obhájení.

Otázky a připomínky oponenta:

str. 63: „**Teplotní stres:** Citlivost buněk různých kmenů *S. pneumoniae* na teplotní stres jsme testovali vystavením kultur teplotám 37°C (kontrola) a 40°C.“

Otázka: je tahle teplota ověřená jako indukce teplotního šoku? Čekal bych, že 40°C postihne i divoký kmen změnou růstu.

Otázka: jak vypadala předchozí historie kultury před teplotním šokem? Proč jste zvolili 40°C?

str. 75: „Jak je patrné z porovnání průběhu růstových křivek *S. pneumoniae* divokého a mutantního kmene (obr. 4-9), mutantní kmen $\Delta spr0334$ (Sp57) má prodlouženou lag fázi.“

Otázka: Lag fáze je definovaná jako fáze, kdy kultura neroste. Ve Vašem případě roste nízkou růstovou rychlostí. Semilogaritmické vynesení navíc ukazuje, že u divokého kmene lag fáze není (není tedy jen „kratší“). Lag fázi má smysl hodnotit ze semilogaritmického vynesení a určovat její délku standardním způsobem. Tvrdím zároveň, že na obr. 4.24. žádná lag fáze není.

U dalších srovnávání růstu bych postupovat stejně – porovnával růstové rychlosti a celkový nárůst v semilogaritmickém vynesení. Nedostatky nelogaritmického vynesení jsou patrné

hlavně tehdy, pokud vykazujete zkrácení generační doby u komplementačního kmene (str. 91) a prezentujete normální vynesení.

92: „V přítomnosti induktoru v médiu pozorujeme u kmene Sp60 zrychlení doby zdvojení na 35 min, které je stejné pro divoký kmen (Sp1)“

Komentář: pokud jste počítala doby zdvojení, což je chvályhodné, měly by být uvedeny v nějaké srovnávací tabulce. Nesdílím Váš optimismus, že čtenář vidí hodnotu generační doby – vidí jen jiný průběh exponenciální závislosti.

96: Jak by se choval kmen Sp65 (se záměny Thr za Ala) ve fyziologických studiích? Tyto studie byly citlivější – ukázaly, že komplementační kmen nekomplementuje dostatečně. Pokud by se ukázalo, že Sp65 roste při stresech ještě hůř než Sp60, mohlo by to znamenat, že fosforylace má přece jen nějaký účinek.

Naivní otázka: nemůže být Spr0334 fosforylován jinde?

Co je chybného na úvaze: Delece StkP ovlivní morfologii buněk. StkP fosforyluje Spr0334. Delece Spr0334 ukázala, že změna morfologie je způsobena signalizací StkP- Spr0334, tedy fosforylací. Fosforylace Spr0334 však není nutná, k normální morfologii stačí jeho přítomnost, ne jeho fosforylace. Je poslední věta ve sporu s ostatními nebo ne?

115: je opravdu možné, aby se úvodní redukce pentózofosfátové dráhy odehrávala mimo buňku?

117: co budete moci prohlásit o mechanismu signalizace u kmene Sp65 v případě, že by v budoucnu fungovaly/nefungovaly fosfomimetické záměny?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: