

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Radovan Fišer
	Datum: 12.9.2012
Autor: Jakub Lenart	
Název práce: Vliv aminokyselinové variability na rezistenční fenotyp u ARE podrodiny ABC proteinů	
Cíle práce 1) Porovnat vliv variability aminokyselin proteinů Vga(A) a Vga(A) _{LC} na rezistenci 2) Sledovat změnu rezistence u dalších mutant Vga(A) odvozených ze sekvencí v GenBank 3) Připravit konstrukty Vga(A) s proteinovou kotvou pro detekci buněčné lokalizace	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE Rozsah práce (počet stran): 111 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné ANO Jsou v práci správně citovány? Místy NE. V seznamu je nejednotný formát a občasné zkracování <i>et al.</i>	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Kultivace bakterií, příprava kompetentních buněk, transformace, cílená mutagenese pomocí několika kitů, izolace DNA, restriční štěpení, PCR, stanovení inhibičních koncentrací pro antibiotika dvěma způsoby Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? Neúspěch při konstrukci některých mutací zatím znemožňuje jednoznačné závěry. Autor hodlá na tématu dále pracovat.	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Formální úroveň je asi největší slabinou celé práce (viz Přípomínky). Práce je psána slovensky a obsahuje nezanedbatelné množství chyb. Občas se objevují chyby v použití kurzívy v názvech genů/proteinů.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

1) Autorovi se podařilo připravit celkem 8 nových mutant v proteinu Vga(A) v pozicích 212, 219, 220, 226. U všech proteinů byl zjištěn vliv na rezistenci vůči linkomycinu, klindamycinu a pristinamycinu IIA.

2) Podařilo se připravit jednu fyziologicky relevantní mutaci v pozici 218, která mění substrátovou specifitu.

3) Podařilo se připravit Vga(A) konstrukty s N- a C- terminálními kotvami (His-tag, FLAG). Tyto proteiny však ztratily biologickou funkci a nebyly pro další pokusy použity.

Otázky oponenta:

- Jaká je sekvenční podobnost aRE proteinů s EF-3? (str. 13)
- Na str. 21 autor píše o některých mechanismech ochrany producenta vůči antibiotiku. Jaké jsou další mechanismy?
- Autor uvádí (str. 27) jako možný mechanismus resistance vyvolaný ARE proteiny změnu zásahového místa – ribosomu. Jak by se tento mechanismus projevoval v intracelulární koncentraci antibiotika? Ta byla zkoumána především v souvislosti s „efluxními“ mechanismy resistance.
- Jakým způsobem je indukována Erm metyláza? Která antibiotika jsou indukující – proč? (str. 33)
- Autor píše (str. 34), že v případě konstitutivní resistance nedochází k vytvoření inhibičních zón. Prosím o vysvětlení.
- Na str. 41 autor uvádí: „PBP2a působí jako transpeptidáza a preberá funkci klasických PBP proteinů, které jsou inaktivované beta-laktamázi.“ Prosím o vysvětlení.
- Proč byly použity dva různé kontrolní kmeny *S. aureus* pro stanovení citlivosti diskovou a diluční metodou (str. 43)?
- U elektroporačního zařízení vyrobeného v MBU (str. 58) se uvádí použití elektrického pulzu po dobu 2 sekund (300V a 32 μ F). Máte nějakou představu o změně napětí v čase? Většinou se udávají parametry obou komponent RC obvodu.
- Jakým z popsaných způsobů jste odstraňoval templátovou DNA po PCR (str. 60)?
- Jak závisí rychlost pohybu fragmentů DNA při elektroforéze na teplotě (str. 67)?
- Na str. 80 autor uvádí potíže s reprodukováním výsledků diluční metody. Pokládám to za zásadní, v čem je autor předpokládá problém?
- Na str. 83 autor (celkem třikrát) uvádí tři nezávislá stanovení inhibičních zón. Jaká je

tedy chyba stanovení? Jednalo se o různé klony *S. aureus*?

- Konstrukt Vga(A) s kombinací aminokyselin SGAG je patrně nefunkční. Jaká jsou možná vysvětlení? (str 84)
- Z Obr. 15 vyplývá, že kmeny *S.aureus* ACX... a *S.epidermidis* ZP_047... mají stejné aminokyseliny na sledovaných pozicích. Jedná se opravdu o různé druhy?
- Autor testoval přítomnost plazmidu (str. 92) nesoucího gen pro mutovaný faktor virulence. Dá se předpokládat, že počet kopií plazmidu je stejný a míra exprese genu je rovnoměrná ve všech buňkách? Narážím na „rozmazané“ okraje inhibičních zón (str. 69). Jaká může být variabilita mezi klony?
- Jaký je další plán využití „nefunkčních“ konstruktů s kotvou?

Připomínky

- Za větami a čísly tabulek občas chybí tečka.
- V seznamu zkratk (str.8-9) nejsou dodržována velká/malá písmena v názvech aminokyselin.
- Chybí kurzíva v latinských názvech (str.9).
- V úvodu chybí citace (str. 14).
- Obrázek 1 (str. 15) je jen částečně přeložený.
- Při odkazování na Obr. 2 (str. 16) se píše o ATP. To není na obrázku nijak znázorněno.
- Začátek a konec str. 17 se poněkud opakuje.
- Vyjadřování je někdy nesrozumitelné (str. 17): *Najzákladnejší príklad predstavuje spojenie 2 TMD domien a 2 NBD domen v poradí prvá TMD, ktorá je spojená s prvou NBD. Druhá TMD je spojená s prvou a druhou NBD.*
- Obr. 3 (str. 17) je bez citace.
- Odstavec 2.1.4.3.3 (str. 20) je bez citace.
- Nejednotné použitie kapitálek v názvech antibiotik (str. 29-30).
- Obr. 8 (str 34) není prakticky popsán a je bez reference.
- Formulace „14- a 16- členná makrolidová esteráza“ je nevhodná (str 35).
- „Hydrolytické štiepenie“ (str. 35)
- Na str. 39 se opakují tvrzení o koaguláza-negativních stafylokocích.
- Chybí reference pro vektor pRB374 (str 43).
- Příprava 10% glycerolu (str. 46) vypadá nepravděpodobně. (Opravdu bylo odměřeno 89,92 ml vody a 10,08 ml koncentrovaného glycerolu?)
- Příprava fyziologického roztoku by mohla být mnohem stručnější, koncentrace pak v mol/l. (str. 46)
- Str. 54, chybí přesná citace diplomové práce.
- V odstavci 3.2.1.2 se uvádí různé koncentrace glycerolu pro skladování buněk v -75°C (10 nebo 20%).
- Na str. 57 je zaměňováno zrychlení a otáčky rotoru centrifugy.
- Na str. 59 je nešťastná formulace: „na internetových stránkach firmy Clontech je program, ktorý primer navrhne za nás“. Opravdu zde není nutný žádný duševní vklad?
- Tabulka V. není ve výsledcích, jak se uvádí na str. 59.
- Obrázek 10 je rozdělený na str. 60-61 a mezi částí A a B je vložený text. Bylo by lepší Obrázek rozdělit (10 a 11). Barevné značení zde není jasně vysvětleno.
- Na str. 63 se u centrifugace neuvádí zrychlení, ale pouze RPM.
- Byla sekvenace DNA prováděna v Korei? (str 68)

- Výpočet nanášky antibiotika na disk (str. 70) je triviální a bylo by možné jej uvést bez použití vzorce. Z uvedeného vzorce není ani patrné, kterou proměnnou hledáme.
- Tab. XVII. není přehledná. Co jsou tučné řádky?
- Tab. XX nemá citace u hodnot MIC.
- Na str. 82 zavedené zkratky pro fenotyp by mohly být buď všechny jednopísmenné, nebo všechny dvoupísmenné. Při zápisu „cLpa“ je to matoucí.
- Termín „bezhydrát“ není vhodný (str. 99).

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: