

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Radovan Fišer

Datum: 11.9.2014

Autor: Zuzana Stehlíková

Název práce: Studium funkce proteinu Spr1057 *Streptococcus pneumoniae*

Cíle práce

Cílem práce bylo objasnit funkci proteinu Spr1057 in vivo.

Jednotlivé cíle uvedené v práci:

1. Připravit mutantní kmeny *S. pneumoniae* za účelem sledování funkce proteinu Spr1057.
2. Testovat citlivost mutantních kmenů *S. pneumoniae* k modifikovaným nukleotidům, konkrétně k 5-fluoro-2'-deoxyuridinu a 5-bromo-2'-deoxyuridinu.
3. Testovat míru inkorporace atypického nukleotidu 5-bromo-2'-deoxyuridinu do DNA mutantních kmenů v porovnání s divokým kmenem *S. pneumoniae*.
4. Pomocí kotranskripční analýzy ověřit existenci předpokládaného operonu genu spr1057.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 95

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 a jsou v práci správně citovány? ANO

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Manipulace s DNA: PCR, elektroforéza a extrakce DNA z gelu, restrikční štěpení, ligace

Práce s RNA: izolace celkové RNA, syntéza cDNA (RT-PCR), kotranskripční analýza, qPCR

Manipulace s proteiny: Izolace proteinů, stanovení koncentrace, SDS-PAGE, „Western blotting“

Práce s bakteriemi: kultivace *E. coli* a *S. pneumoniae*, příprava kompetentních buněk, transformace, izolace plazmidů a chromosómalní DNA, sledování inkorporace 5-BrdU, sledování citlivosti bakterií k modifikovaným nukleotidům.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, většinou přesně a do detailů

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO práce obsahuje značné množství výsledků s uvedeným počtem opakování.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO na 7 stranách

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

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

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO, v sedmi bodech jsou shrnuty podstatné výsledky práce

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

Jak zobrazovaná schémata a grafy, tak snímky gelů a membrán jsou ve výborné (publikační) kvalitě. Text je prostý překlepů a je psán velmi věcně a přesně. Kromě seznamu zkratk jsou v práci podrobně popsány použité bakteriální kmeny, vektory, oligonukleotidy, enzymy, protilátky, chemikálie atd. Složení pufrů a roztoků je také uvedeno v samostatné tabulce. Zde není jednotně uvádění koncentrací látek (g/l, mol/l). Přehledné tabulky s uvedením citací jsou použity i v literárním úvodu pro výčet virulencních faktorů a dvousložkových systémů *S. pneumoniae*, podobně jako seznam substrátů kinázy StkP.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Literární přehled dokonale umožní čtenáři nahlédnout do problematiky této diplomové práce. Veškerá předkládaná data jsou zde uváděna i v návaznosti na práce pocházející ze stejné laboratoře. Během řešení předkládané diplomové práce autorka připravila celkem sedm různých kmenů *S. pneumoniae*, které byly využity pro výzkum role proteinu Spr1057. Některé z těchto kmenů sloužily jako velmi dobře promyšlené pozitivní a negativní kontroly. Autorce se podařilo prokázat zásadní biologický význam zkoumaného proteinu, tedy enzymu degradujícího modifikované báze.

Otázky a připomínky oponenta:

Na mnoha místech práce jsou nepřesně uváděny parametry centrifugace (rpm).

V tab. 4.4 (str. 41) je chybně sumární vzorec izopropanolu.

Na straně 13 je odkaz na tabulku 2.1, která je až na str. 16.

Autorka uvádí (str. 11) proces fosforylace a defosforylace proteinů jako jeden z hlavních mechanismů přenosu signálu do buňky. Jaké jsou další mechanismy?

Co znamená, že *Streptococcus pneumoniae*: „Za nepříznivých podmínek netvoří spory“?

Na straně 18 jsou určité delší pasáže bez citací. Z jaké práce tyto informace pocházejí?

Co je polyvalentní konjugovaná vakcína? (str. 19)

Od kdy se měří doba trvání přirozené kometence? (20 minut, str. 19)

Citace „Yeasts et al., 2002“ je chybná. (str. 24)

Zkratku FLAG je lepší neskloňovat.

Na str. 36 je nejednotné české a anglické značení enzymů.

Souprava na čištění produktů PCR není uvedena v materiálech a metodách (str. 45).

Parametry elektroforézy na str. 50 mají chybné jednotky.

Mezi str. 48-49 se opakuje část věty.

Otázky

Čím je vyvolána β -hemolýza? (str. 13)

Co jsou molekuly PsaA a PspA? (str. 16) Jak souvisí transport Mn^{2+} , Zn^{2+} a adheze bakterie?

Jak funguje pneumolysin? V práci je uvedena enzymatická aktivita (str. 17).

Jakou roli hraje protein CbpA v průstupu bakterie do krevního řečiště?

Jak je modifikován prekursor CSP? (str. 20)

Jak je to s homologii Spr1057 a YjjG? (str. 30)

Dá se očekávat, že sekvence, které zůstaly v genomu po deleci *spr1057* mají nějaký vliv na fyziologii buňky?

Jak (proč) ovlivňuje Mn^{2+} růst bakterií v přítomnosti Zn^{2+} ? (str. 53) Jaký vliv na indukci pomocí Zn^{2+} mají použítá média?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: