

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Michal Čáp, Ph.D.
	Datum: 9.9.2014
Autor: Bc. Jiří Krupička	
Název práce: Studium esenciality genu <i>glmM</i> kódujícího fosfoglukosaminmutázu <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Cíle práce Cílem práce bylo především prokázat domnělou esencialitu genu <i>glmM</i> pro fosfoglukosaminmutázu u <i>S. pneumoniae</i> . K tomuto cíli vedlo několik mezikroků v podobě konstrukce merodiploidních kmenů a následně kmenů s jedinou alelou <i>glmM</i> regulovanou inducibilním promotorem. Dalším cílem pak bylo zjistit úlohu fosforylace pro funkci GlmM pomocí cílené mutagenese serinů 99 a 101.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 125 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, práce vychází z více než 150 převážně původních článků	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 16 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? ANO	
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):

Jazyková úroveň práce je vynikající, text je čtivý s naprostým minimem překlepů. Jen na straně 39 se jeden odstavec vyskytuje dvakrát po sobě. Celý postup práce je velmi dobře vysvětlen, včetně komplikovaných konstrukcí kmenů, které jsou vždy přehledně označeny, takže se čtenář ve výsledcích snadno orientuje. Obrázky a tabulky jsou přehledné a vhodně doplňují text. Oceňuji důsledné dodržení rozdílu mezi genem *glmM* a enzymem GlmM v celém textu. Naopak mám výhradu k pravopisu chemických sloučenin, zejména psaní *t* místo *th* (thiamin, kys. pantothenová, předpony thio-, methyl-, ethyl-).

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autor vytvořil kmeny nesoucí gen *glmM* pod regulovatelným promotorem a několika různými přístupy potvrdil, že růst tohoto kmene plně závisí na přítomnosti induktoru v médiu, čímž ověřil esencialitu *glmM*. Dále vytvořil kmeny nesoucí bodové mutace v serinech 99 a 101 a ukázal, že tyto mutace jsou důležité pro funkci fosfoglukosaminmutázy. Cíle práce tak byly splněny. Výsledky v dostatečné míře dokazují esencialitu genu *glmM* pro růst *S. pneumoniae* za studovaných podmínek. Pro definitivní stanovení významu fosforylace GlmM bude ještě zapotřebí dalších experimentů.

Otázky a připomínky oponenta:**K práci mám následující připomínky:**

V seznamu literatury je nejednotný formát zkratk časopisů (někdy zkratky s tečkami J. Biol. Chem., podruhé bez teček J Biol Chem).

Není uveden protokol pro fúzní PCR. V protokolu pro standardní PCR je pouze odkaz na protokol doporučený výrobcem.

Místo termínu zinkový promotor bych raději volil termín zinkem regulovaný/indukovaný promotor.

Odvodit složení mnohasložkového média C+Y vyžaduje notnou dávku soustředění. Možná by se dal najít přehlednější způsob popisu přípravy tohoto média.

Chybové úsečky u grafů růstových křivek představují střední chybu průměru. Tato hodnota, přestože je tak často i v odborné biomedicínské literatuře používána, nepopisuje variabilitu dat, ale pouze udává přesnost, s jakou byla vypočítána průměrná hodnota pro danou populaci. Variabilita dat, například biologických replikátů experimentu, je popsána například směrodatnou odchylkou. Proto je vhodnější udávat hodnoty \pm směrodatná odchylka, přestože je tato hodnota z definice vyšší než střední chyba průměru.

K práci mám následující dotazy:

Je znám důvod, proč je fosfoglukosaminmutáza pro některé bakterie esenciální a pro jiné nikoliv?

Je možné přidáním glukosamin-1-fosfátu, produktu fosfoglukosaminmutázy, do média suprimovat letalitu delece genu *glmM*?

Jaký je důvod přidání slabého detergentu deoxycholátu společně s mnohem silnějším detergentem SDS do roztoku pro lyzi buněk *S. pneumoniae*?

Jak si vysvětlujete pravděpodobnou nefunkčnost enzymu fosfoglukosaminmutázy při nahrazení serinů 99 a 101 jak alaninem, který způsobuje trvale defosforylovaný stav, tak kyselinou glutamovou, která mimikuje fosforylovaný stav?

Jaké metody lze použít pro stanovení fosfoglukosaminmutázové aktivity?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: