

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Petra Lišková
	Datum: 31.5.2019
Autor: Bc. Tereza Mühldorfová	
Název práce: Studium funkce fosfoglukozaminmutázy GlmM u <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Cíle práce Cílem práce je podat důkaz esenciality fosforylace Ser99 a Ser101 proteinu GlmM bakterie <i>S. pneumoniae</i> . Dalším cílem této práce je určit buněčnou lokalizaci proteinu GlmM a případná další rezidua, která jsou fosforylována pomocí StkP-KD.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 137 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? Byly použita široká škála metod, mezi nimi metody mikrobiologické kultivační, molekulárně biologické a genetické (izolace DNA i proteinů, transformace bakterií, místně specifická mutageneze, PCR, elektroforetická separace molekul DNA a proteinů), mikroskopické. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO Některé postupy jsou částečně zredukovány na „použití dle pokynů výrobce [reagencií, kitu]“ (např. str. 70: „Stanovení koncentrace proeinů pomocí BCA“), což by nemuselo bránit bližšímu popisu metody, nicméně při stávajícím nemalém rozsahu metodik a celé diplomové práce to lze chápat jako zjednodušení.	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? NE 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 V rámci diskuze jsou výsledky opakovány hojně, někdy je zopakován i pracovní postup.	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Formální úroveň práce je dobrá, obsahuje 31 obrázků (číslováno do 32, obrázek 6 není	

přítomen) v dobrém rozlišení, 9 grafů a 12 tabulek. Text obsahuje překlepy a formální chyby v běžné míře. Laboratorní slang se vyskytuje zejména ve výsledkové části v míře vyšší, stejně jako anglicizmy a anglickojazyčná stavba vět.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle považuji za splněné. Práci Terezy Mühldorfové doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

1. Některá media a roztoky mají uvedeny navážky komponent bez uvedení objemu.
2. Seznam bakteriálních kmenů (Tab. 3, str. 48) zahrnuje jako separátní kmeny také *E. coli* DH5a/BL21 nesoucí plazmid, což podle mého mínění neodpovídá označení bakteriální kmen.
3. Výsledková část obsahuje mnoho pasáží, které by se hodily spíše do metodické části, např.: mapy plazmidů, postup genových manipulací, kontrola správnosti vkládaných genů, postup kultivace, atd. Výsledky se tak na první pohled zdají být velmi rozsáhlé a současně méně srozumitelné, protože se informace nadměrně opakují a samotnému popisu výstupů experimentů (grafů, obrázků) není věnován dostatek prostoru.
4. V kapitole 7.1.3 „Příprava konstruktů“, v *glmM* S99/101A-okolí nebylo vysvětleno ono „okolí“.
5. Pokud obrázek sestává z více částí (např. Obrázek 9), popis by usnadnilo rozčlenění na části, např.: A, B, C.
6. V kapitole 7.1.5 dle názvu slibujete „Charakterizaci mutantního kmene Sp369“, kapitola však neobsahuje žádný výsledek, ani odkaz na výsledek, obsahuje pouze popis pokusu.
7. Výsledky zpravidla nejsou detailně popisovány, pouze pomocí „z grafu vyplývá“ (str. 105), „časový posun v průběhu růstu oproti kontrolnímu kmeni“ (str. 88), a podobně.
8. Domnívám se, že růstové křivky v grafu 3 jsou nedostatečně, až chybně popsány a interpretovány. Samotné křivky nejsou popsány, kýžený výsledek je redukován na „pozorovaný defekt růstu“ (str. 88). Bez náležitého vysvětlení totiž lze růstovou křivku vyjadřující exponenciální charakter růstu bakteriální kultury jen stěží považovat za důkaz neživotaschopnosti daného kmene, jak popisujete na str. 88, kdy „kmen Sp369 vykazoval stejné vlastnosti jako kmen Sp283, a tedy jeho schopnost růstu byla striktně závislá na přítomnosti $ZnCl_2$ v médiu“, což berete jako průkaz esenciality *GlmM* a také fosforylace Ser99 a Ser101 *GlmM*. Vysvětlení „úbytek hladiny funkčního proteinu v buňce“ samo o sobě mnoho nevysvětluje.
9. Doby zdvojení v grafech růstových křivek nejsou dokladovány, ani není zadáno, v jakém rozsahu růstové křivky byly určovány. Zejména u popisovaných kmenů Sp283 a Sp369 při kultivaci bez Zn^{2+} (graf 3 a 4) to považuji problematické, protože by průběh dané křivky mohl pomoci lépe pochopit a objasnit, co se s buňkami bez (funkčního) *GlmM* proteinu děje.
10. Růstové křivky v grafech 5 a 6 nevycházejí z času 0.
11. Obrázky 18 a 19 předcházejí obrázek 17.
12. Při mikroskopické analýze morfologie buněk není ozřejmeno, jaké charakteristiky jsou sledovány.
13. Sp261 není představen v sekci „Materiál a metody“, není ani vysvětleno, proč je použit kmen odvozený od *S.p.* Rx oproti ostatním kmenům používaným v práci (*S.p.* R6) a co daný experiment měl podat za výsledek (kmen produkující vs. neprodukující pouzdro).
14. V kapitole 7.2.3 je pokus prováděn na „proteinovém lyzátu“, obrázek 25 postrádá popisek označující koncentrace Zn^{2+} pro jednotlivé proužky (jen čísla).

15. Kapitola 7.2.5 nese prostý název „Fluorescenční mikroskop“.
16. Kapitola výsledků 7.3.3 „Identifikace fosforylovaných zbytků proteinu GlmM pomocí MS analýzy“ neobsahuje žádné výsledky (obrázky a grafy), pouze holé konstatování „Vzorky byly rozděleny na 1D SDS-PAGE a obarveny pomocí Coomassie Blue G-250. Následně byly proužky proteinu GlmM vyříznuty z gelu a odeslány k MS analýze (Biocev). Z výsledků identifikace fosforylačních míst u GlmM v in vitro podmínkách vyplývá, že kromě detekované fosforylace na serinových zbytcích v pozici 99 a 101 je protein GlmM fosforylován na dalších 4 místech. Jedná se o zbytky T304, S414, T416 a T438.“ Toto považuji za nedostatečné.
17. Autorka při popisu výsledků používá osobní zájmeno my (např. na str. 115: „V rámci této diplomové práce se nám nejdříve podařilo...“) a není tedy zřejmé, zda se jedná o tzv. plurál autorský, nebo zda se na výsledcích podílel i někdo další. Mohla byste to, prosím, upřesnit?

Otázky:

1. V jakých případech byla pro kultivaci *S. pneumoniae* použita gelóza (zalití buněk do gelózy) a proč?
2. Máte nějaké detailnější vysvětlení a popis pro růst GlmM-deplečních mutant *S.p.* v mediu C+Y, kde nebyla indukována exprese ektopické kopie GlmM? Mohl by mít růst těchto kmenů jiné vysvětlení kromě potvrzení esenciality GlmM proteinu a jeho fosforylace?
3. Jaká je celková molární koncentrace Zn^{2+} v C+Y mediu, kterou popisujete jako „nulovou“, tedy bez přídavku Zn^{2+} ? Považujete za vhodné používat C+Y medium v případě hodnocení životaschopnosti kultury při nutnosti indukce Zn-promotoru, když samotné C+Y medium obsahuje $ZnSO_4$?
4. Proč byla analýza lokalizace proteinu GFP-GlmM prováděna na Sp331 a ne na Sp367 (kmen Sp331 exprimuje vedle GFP-GlmM i nativní GlmM, oproti kmenu Sp367).
5. Proč pro stanovení fosforylace pomocí MS nebyla použita Sp369 (dvojitá substituce GlmM-S99/101A)?
6. Je *S.p.* kmen Rx virulentní? (Popisujete kmen *S.p.* R6 jako avirulentní, Vámi používaný kmen Rx vzhledem k virulenci popsán nebyl.)

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: