

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.

Datum: 13. 9. 2021

Autor: **Bc. Tamara Balgová**

Název práce:

Studium mechanismů perzistence vůči antibiotikům u *Staphylococcus aureus*

Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo sledovat míru schopnosti perzistovat u vybraných klinických izolátů a prokázat vliv adaptačních mutací na míru schopnosti perzistovat, jako i blíže molekulárně charakterizovat perzistentní stav pomocí genové exprese.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 128

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? více než 20 metod

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Str. 44 - pro lepší přehlednost by bylo vhodné uvádět v tabulce oligonukleotidů kap. 3.1.9.1. přesnější účel jejich použití

Str. 44 - tabulka oligonukleotidů pro qRT-PCR obsahuje sekvenci zaznamenanou různými druhy písma

Str. 44 - firma pro syntézu oligonukleotidů se jmenuje Eurofins Genomics, nikoliv Eurofinsgenomics.

Str. 38, 39 - mapy vektorů by měly mít očíslování jako všechny ostatní použité obrázky v diplomové práci

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO, pouze výsledky získané měřením redoxního potenciálu pomocí průtokové cytometrie považují sice za důležitá, ale předběžná data. Pro přesnější interpretaci výsledků získaných z měření redoxního potenciálu by autorka potřebovala doměřit celou sadu vzorků minimálně ve třech biologických replikátech, což se z časových důvodů pravděpodobně nestihlo a čehož si je autorka sama vědoma.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO (celkem 10 stran)

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

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

Chronologické izoláty *S. aureus* použité v této práci nesou celou řadu mutací nasbíraných v průběhu infekce. Přestože se v převážné většině jedná pouze o substituce, které nemusejí mít výrazný efekt na funkčnost proteinu či jeho regulaci. Bylo by dobré se v diskuzi aspoň pokusit spekulovat nad jejich případným významem v perzistenci.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Grafické zpracování je na standardní úrovni. Všechny obrázky, grafy a tabulky jsou až na výjimky uvedené výše dostatečně zpracovány s výstižnou legendou.

Je nutné podotknout, že slovenština není můj rodný jazyk a tedy nejsem v mnoha případech kompetentní k tomu, rozhodnout, zdali se jedná o jazykovou chybu autorky, či jsou tato vyjádření běžně přijímána slovenskou vědeckou komunitou. Z tohoto důvodu se zde nechci pouštět do hlubší analýzy použitého jazyka autorky, pouze bych rád vybral několik příkladů drobných nepřesností:

Str. 72 – citujete diplomovou práci Anety Valtové, ale chybí zde rok sepsání.

Str. 74 – označení sloupečku „Pristup k proteínu“ je nešťastné. Pravděpodobně se jedná o chybný překlad spojení „Protein accession“ či „Accession number“.

Laboratorní žargon:

Str. 108 – „upstream, downstream“ místo před genem či za genem ve směru transkripce

Str. 108 – „naamplifikovat“ místo amplifikovat či pomnožit

Str. 12, 113 – „vydeletovat“ místo odstranit

Str. 54, 56 – „vyizolovaný“ místo izolovaný

Str. 44, 56, 57 atd. – „primer“ místo oligonukleotid

Str. 80 – „frame shift mutácia“ místo mutace se změnou čtecího rámce

Nesmyslná, protichůdná tvrzení či nesrozumitelné výrazy atd.:

Str. 17 – „Pomocou produktov génov SOS odpovedi sa opraví DNA a vzniknú mutácie.“ – správně asi „vzniklé mutácie“

Str. 18 – „Tento systém selektívne zabíja **perzistentné** bunky, inhibuje rast bunky a bráni funkcii MDR (multidrug resistance) efluxnej pumpy NorA. Delécia génu *norA*, ktorá vytvára túto exfluxnú pumpu znižuje síce rezistenciu na fluorochinolóny, ale zvyšuje prežívanie perzistentných buniek.“ – správně je to: „Tento systém selektivne zabíja **neperzistentné** bunky...“

Str. 19 – „Small colony variants (SCVs) sú formou perzistentných buniek u *S. aureus*, avšak nie jedinou (bakteriálne L – formy).“ – věta by si zasloužila přeformulování bez použití závorky

Str. 22 – „Agr systém obsahuje gén, ktorý kóduje prekursor autoindukujúceho peptidu, AIP (autoinducing peptides), ktorý tento systém vníma a tým ho aktivuje (Wang a Muir 2016). – lepší formulace by byla „..., který je tímto systémem vnímán...“

Str. 83 – autorka uvádí zkratky FSC a SSC bez vysvětlení. Obě zkratky jsou sice uvedené v seznamu zkratek, ale při jejich prvních uvedení v textu by bylo dobré je vysvětlit.

Str. 105 - „V grafu pre relativnu expresiu génu *agrA* je možné vidieť, že expresia je skoro až 10 násobne nižšia oproti kontrolnému stavu a to hlavne po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu a oxacilínu.“ – správne je to „...po pôsobení antibiotík ciprofloxacínu a vankomycínu.“

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Tato diplomová práce se zabývá velmi zajímavou a z klinického hlediska také důležitou problematikou perzistencí bakterií, kterou autorka vypracovala v Laboratoři genetiky bakterií pod vedením RNDr. Ireny Liché, CSc. Autorka pomocí křivek hynutí stanovila míru schopnosti bakterií perzistovat po působení antibiotik u chronologických izolátů *S. aureus* od pacientů trpících cystickou fibrózou. Odhalila, že tato schopnost závisí na adaptaci izolátu. Dále zjistila, že mutace genu *sigB* může zvyšovat míru schopnosti perzistovat. Pomocí průtokové cytometrie určila, že každé antibiotikum má jiný vliv na membránový potenciál subpopulace přeživších buněk. Po ciprofloxacínu buňky svůj membránový potenciál ztrácely v menší míře než po působení oxacilínu a vankomycínu. Dále odhalila, že buňky ztrácejí svůj redoxní potenciál v čase po působení všech třech antibiotik. Stanovila expresi genů ovlivňujících perzistenci (*sigB*, *mazEF*, *agrA*, *rnalIII*) a zjistila, že exprese genů *agrA* a *rnalIII* byly ve většině případů potlačeny, což koreluje se stavem chronické infekce. Jediné, co se autorce nepodařilo připravit, byl $\Delta agrA$ mutantní kmen a tedy ani jeho míra schopnosti perzistovat.

Experimenty jsou dobře provedeny. Skutečnost, že analyzované chronologické izoláty Sa51A a Sa75A, které jsou geneticky totožné, se ve všech sledovaných aspektech chovaly shodně, jen dokládá správnost a přesnost provedení experimentů. Jedinou výjimkou je měření membránového potenciálu, kde byl ovšem vzorek Sa51A z časových důvodů měřen pouze jednou. Diplomová práce je především založená na křivkách hynutí, což je metoda časově dost náročná. Není tedy divu, že se autorce nepodařilo experimenty s redoxním potenciálem, kdy jsou buňky analyzovány v průběhu křivky hynutí, provést v dostatečném počtu biologických replikátů. I přesto však předkládaná práce obsahuje dostatečné množství nasbíraných a vyhodnocených dat, které budou dobrým základem pro další studium bakteriální perzistence.

Autorka splnila vytyčené cíle a prokázala slušné předpoklady pro vědeckou práci, a proto předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

V úvodu výsledků uvádíte sice, že testovaná antibiotika (ciprofloxacín, oxacilin, vankomycin) se běžně používají na léčbu stafylokokových infekcí u pacientů s CF a také, že působí odlišným mechanismem. Ovšem až do kapitoly Diskuze již zůstává utajeno jakým. Představit mechanismus působení antibiotik již na začátku prezentace výsledků je pro nezasvěceného čtenáře žádoucí.

V práci tvrdíte následující: „Stanovila som krivky hynutia v časovom intervale od 1 do 4 hodín, kedy bola kultúra v exponenciálnej fázy rastu a bola vystavená pôsobení rôznych antibiotík, ktoré mali koncentráciu 100x MIC. Rovnako ako pri predchádzajúcich diplomových prácach H. Kotkovej (Kotková 2019) a A. Valtovej (Valtová 2020) som použila metódu kvapkového výsevu na agarovú platňu v štyroch riedeniach. Niektoré nižšie riedenia u jednotlivých klinických izolátov vyrastali veľmi zle alebo nevyrastali vôbec, preto som pristúpila k metóde celoplošného rozteru.“ Čím si tento rozdiel medzi spotovací metódou a celoplošným výsevem vysvetľujete?

Prestože z textu není z počátku zcela jednoznačně jasné, jaký supernatant získaný filtrací noční kultury byl pro testy vyrůstání z perzistence použit, čtenář záhy odhalí, že se jedná o vlastní supernatant. Zkoušela jste také testovat supernatant z primoizolátu na vyrůstání perzistentních buněk chronologicky nejmladších, a tedy i nejvíce adaptovaných izolátů? Pokud ano, s jakým výsledkem?

Jak popisujete v literárním úvodu i diskuzi, delece v *sigB* snižuje tvorbu perzistentních buněk a neumožňuje vytvořit SCV buněk. Naopak ve výsledcích dále spekulujete, že substituce v invariantní oblasti genu *sigB* by mohla přispět ke zvýšení perzistence. Máte nějakou představu o tom, jakým mechanismem a přes kterou regulační dráhu by k tomuto zdánlivě protichůdnému faktu mohlo dojít?

Máte nějaké vysvětlení pro skutečnost, že profil membránového potenciálu je u chronologických izolátů obou testovaných pacientů po působení ciprofloxacinu odlišný než u vankomycinu a oxacilinu? Není třeba možné, že po vystavení buněk působení ciprofloxacinu delší dobu než testované 4 hodiny by vedlo k stejnému pozorování jako u vankomycinu a oxacilinu, tedy k výraznému nárůstu živých buněk bez membránového potenciálu?

V diplomové práci jste se mimo jiné zabývala stanovením relativní míry exprese genů ovlivňujících perzistenci u *S. aureus* (*sigB*, *mazEF*, *agrA* a *rnaIII*) v průběhu křivky hynutí. Ze získaných dat se dá ovšem také odvodit, jak se mění exprese těchto genů v závislosti na chronologických izolátech. Nejedná se mi tedy o určení míry exprese těchto genů v rámci jednoho chronologického izolátu, ale napříč všemi chronologickými izoláty po působení různých antibiotik po stejný časový úsek. Například tedy, jak se mění exprese *agrA* genu po tří hodinovém působení vankomycinu mezi chronologickými izoláty Sa39A, 40A a 41A? Můžete se pokusit vyhodnotit všechna získaná data tímto způsobem?

Můžete prosím vysvětlit tvrzení na str. 105: „V prípade tohto génu je expresia skôr utlmená ako by dochádzalo k nadprodukcii produktu tohto génu.“

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: