Posudek oponenta na diplomovou práci

☒ oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Mgr. Libor Krásný, PhD
	Datum: 5. 9. 2011

Autor: Bc. Jan Tkadlec

Název práce:

Vliv vyřazení genu *yxkO* při adaptaci na enviromentální stres u rodu *Bacillus*

Cíle práce

Přispět k pochopení role produktu genu *yxkO* v buňce. Konkrétně:
1/ Konstrukce kmenu *B. subtilis* s úplnou delecí genu *yxkO*.
2/ Konstrukce kmenu *B. subtilis* umožňující měřit míru obecné stresové odpovědi.
3/ Srovnat fentotypickou odpověď na vyřazení genu yxkO u přírodních izolátů *B. subtilis* a příbuzného druhu *B. amyloliquefaciens*.

Pozn: Takto jsou cíle řazeny v Úvodu. Doporučil bych řadit je stejně, jako se pak objevovaly ve Výsledcích, tj. 1-3-2.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO ~~NE~~
Rozsah práce (počet stran): 149
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO ~~NE~~
Je uveden seznam zkratek? ANO ~~NE~~

Literární přehled:
Odpovídá tématu? ANO ~~NE~~
Je napsán srozumitelně? ANO ~~NE~~
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO ~~NE~~
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO ~~NE~~

Materiál a metody:
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO ~~NE~~
Kolik metod bylo použito? 22

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~

Experimentální část:
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~
Je dokumentace výsledků dostačující? ANO ~~NE~~ - v čem jsou nedostatky?
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?
ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

Diskuze:
Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO ~~NE~~
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ~~ANO~~ NE

Závěry (Souhrn) :
Jsou výstižné? ANO ~~NE~~

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

Obrazová dokumentace je dobrá; pouze dokumentace swarmingu (focení misek, např. obr. 35) mohla být lepší – misky je dobré fotit bez víčka, dnem vzhůru a z úhlu, aby nevznikaly odlesky.

Jazyková úroveň je dobrá. Nicméně, doporučoval bych používat více česky znějící „faktor sigma“ než jedním slovem „sigmafaktor“. Občas se vyskytly gramatické chyby, např. na straně 97 „Buňky….si udrž**u**val**i**…“, ale obecně se jednalo o řídké jevy.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce je napsána souvisle a čtivě. Od Úvodu po Závěry se jedná o celistvý text, který směřuje z bodu A do bodu B. Nikde nejsou zbytečné „vycpávky“; na informace poskytnuté v Úvodu plynule navazuje výsledková část. V Diskusi je vidět vložené myšlenkové úsilí i snaha výsledky co nejlépe sumarizovat a porovnat.

Autor vytvořil mutantní kmeny z *B. amyloliquefaciens* a nedomestikovaného *B. subtilis* s přerušeným genem *yxkO*. Tyto kmeny porovnával s relevantními divokými kmeny plus divokým a mutantním kmenem laboratorního *B. subtilis*. Původní mutant v tomto genu má osmozenzitivní charakter, což bylo známo již z předchozích studií. V rámci fenotypických experimentů autor ukázal, že, ačkoli se jedná a velmi blízce příbuzné druhy/kmeny, přerušení tohoto genu má v některých případech na tyto organismy rozdílný vliv (např. absence *swarmingu* pouze u mutantního *B. amyloliquefaciens* a nikoli u ostatních kmenů). To může do budoucna spolu s detailní znalostí rozdílů mezi těmito bakteriemi přispět k rozluštění role YxkO.

Autor vytvořil nástroj (fúzi promotoru závislého na faktoru σ^B s markerovým genem *lacZ*) pro studium obecné stresové odpovědi. Integroval tuto fúzi do *B. subtilis* (do wt i odvozeného kmene mutantního v *yxkO*). Následně detekoval obecně sníženou míru stresové odpovědi (osmotický a etanolový šok) závislé na σ^B u mutantního kmene. Toto zjištění může naznačovat, že pozorované fenotypy kmene s přerušeným *yxkO* mohou být následkem primárně vzniklým nedostatečnou aktivací tohoto regulonu.

Cíle, které se podařilo splnit (2/ a 3/) tak představují solidní penzum výsledků, které mají vypovídací hodnotu a přispěly k rozšíření znalostí o studované problematice.

Nesplněný cíl (1/) jde na vrub technickým obtížím, které jsou inherentní součástí experimentální práce.

Celkově hodnotím práci kladně a přeji autorovi hodně dalších profesních úspěchů.

Otázky a připomínky oponenta:

1/ Str. 26: Dochází k produkci surfactinu a tvorbě bičíku u téže buňky, nebo se jedná o dva různé buněčné typy v rámci jedné populace?

2/ Str. 74: Jak dlouhé byly fragmenty PCR, které měly sloužit k homologní rekombinaci?

3/ Str. 76: Nepodařilo se zaklonovat hotovou PCR fúzi pro knock-out *yxkO* do vektoru při použití *E. coli* jako hostitelského organismu. Jaký byl další zamýšlený postup? Nebylo možné použít vytvořený PCR fragment (bez klonování přes *E. coli*) rovnou pro plánovanou transformaci?

4/ Str. 78: Jaká je homologie genu *yxkO* na úrovni DNA mezi *B. subtilis* a *B. amyloliquefaciens*?

5/ Str. 115: Jednalo se o transkripční či translační fúzi promotoru *ctc*? Obrázek, případně anotovaný sekvenční fragment promotoru by byl vhodnou ilustrací této části DP.

6/ Str. 119: Obr. 44-6. Chybí chybové úsečky. V kolika opakováních byly experimenty provedeny?

7/ YxkO má vliv na expresi z promotoru závislého na σ^B. Můžete prosím načrtnout možná vysvětlení/hypotézy proč je v nepřítomnosti YxkO tato exprese snížena? Navrhněte možné experimentální přístupy pro test vybrané hypotézy/hypotéz.

8/ U obr. 29-34 chybí měřítko

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

☐ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: