



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Ústav biologie a lékařské genetiky
1. LF UK a VFN

Přednosta
prof. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D.

Albertov 4, 128 00 Praha 2
Tel. 224968180
oseda@lf1.cuni.cz

1.9.2020

Oponentský posudek

Dizertační práce

**VYTIPOVÁNÍ A SLEDOVÁNÍ EXPRESE GENŮ OVLIVŇUJÍCÍCH SYNTÉZU
Kyseliny hyaluronové ve *Streptococcus equi* subsp.
zooepidemicus pomocí technologie DNA čipů a real time PCR**

Ing. Radka Hrudíková

Ústav fyzikální a spotřební chemie, FCH VUT v Brně

Školitel: doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

Tématem předkládané dizertační práce ing. Radky Hrudíkové jsou vysoce aktuální oblasti „-omické“

Předložená dizertační práce má rozsah 121 stran a je psána formou komentovaného souboru původních publikovaných prací. Práce je psána čtivou češtinou, má logickou strukturu, velmi pečlivě je zpracována i typograficky (v celé práci jsem zaznamenal jen ojedinělé překlepy).

Teoretická část stručně, ale výstižně shrnuje problematiku tvořící výchozí bod pro cíle a řešení práce, především charakteristiku a (bio)produkci kyseliny hyaluronové. Zvláštní pozornost je věnována tématům zásadním pro samotnou experimentální část práce, tedy genomické a transkriptomické charakterizaci *S. zooepidemicus* včetně přístupů celogenomové sekvenace, technologie DNA čipů a kvantitativní PCR. Citace recentních zdrojů je adekvátní, zdařilá je volba a zpracování obrazové dokumentace.

Ing. Hrudíková se ve své dizertační práci zaměřila na 2 konkrétní cíle, genomickou charakterizaci bakteriálního kmene *S. zooepidemicus* CO4A ve srovnání s výchozím kmenem, dále pak porovnání transkriptomického profilu obou kmenů za různých podmínek. Za použití širokého metodologického portfolia se podařilo odvést obrovské penzum práce a skutečně cílů dosáhnout, tedy

především kompletní sekvenace genomu kmene *S. zooepidemicus* CO4A a nalezení řady změn oproti sbírkovému kmeni *S. zooepidemicus* ATCC35246 včetně mutací v rámci *has* operonu. Druhou úrovní klasifikace bylo zhodnocení rozdílů v transkriptomu obou kmenů v průběhu kultivace a zhodnocen byl i efekt suplementace N-acetylglukosaminu. Použité metody jsou vesměs vhodně zvolené, jednou výtku mám k statistickému a bioinformatickému hodnocení transkriptomických dat a statistickému vyhodnocení exprese genů (viz níže). Diskuze získaných výsledků je poměrně stručná, nicméně adekvátní a rozprostřena v sekcích výsledků a závěru. Lze konstatovat, že získané výsledky jsou pro výzkumnou oblast regulace syntézy kyseliny hyaluronové prioritní a určitě posunují poznání těchto procesů s nezanedbatelným translačním potenciálem pro biotechnologické přístupy.

Komentář

K práci mám jen několik drobných výhrad a dotazů:

1. Není zřejmé, zda některá z impaktovaných publikací je podkladem hodnocené dizertační práce či nikoli, text práce na žádnou z publikací neodkazuje, i když tematicky je zde patrný překryv.
2. Mou jedinou zásadnější výhradou je absence popisu statistické metodologie u vyhodnocení transkriptomických dat (kromě zmínky, že data byla zpracována v MS Excel). Není ani zřejmé, kolik replikátů bylo pro toto vyhodnocení použito, jaká metoda (kromě poměrně liberální 10% fold change) byla použita k odfiltrování falešně pozitivních nálezů v důsledku mnohonásobného porovnávání. Stejně tak u qPCR se hovoří o vyšších či nižších mírách exprese bez uvedení použitého statistického testu a hladiny signifikance. Obzvláště markantní je chybění statistického vyhodnocení změn exprese v čase.
3. TABULKY:
 - a. Při uvádění sekvence primerů (např. tabulka 24, 26, 28) nejsou označeny jejich 5' a 3' konce, byť se dá předpokládat, že jsou anotovány standardně v 5' -> 3' směru.
4. GRAFY:
 - a. U některých grafů jsem shledal drobné formální nedostatky – nebyly vyznačeny graficky hodnoty os x a y, jen uvedeno číslo volně plující vedle os (všechny grafy), v některých případech není vyznačena ani samotná osa y (grafy 4-7), často je zbytečně volen vysoký počet neinformativních desetinných míst (např. grafy 8-29).
5. DOTAZY:
 - a. V kapitole 5.2. se stručně vyjadřujete k jednotlivým současným technologickým přístupům next-generation sequencing. Můžete porovnat tyto přístupy z hlediska jejich vhodnosti pro celogenomové sekvenování bakterií?

- b. Jaký postup byste zvolila při manipulaci dalších zjištěných potenciálních genů, které mohou ovlivňovat syntézu kyseliny hyaluronové, s cílem zvýšení této produkce?
- c. Veškerá stanovení genové exprese jsou provedena na úrovni mRNA. Diskutujte potenciální úskalí extrapolace této informace na úroveň exprese proteinu a jeho funkce.

Závěr

Na základě výše zmíněných skutečností konstatuji, že předložená práce nejen splňuje, ale výrazně překračuje kritéria kladená na dizertační práce v oboru, splňuje podmínky uvedené v § 47 odst. 4 zákona 111/1998 Sb. a ing. Radka Hrudíková touto prací jednoznačně prokázala tvůrčí schopnosti a proto tuto dizertační práci doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 1.9.2020

prof. MUDr. Ondřej Šeda, Ph.D.

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Albertov 4, 128 00 Praha 2