

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
RNDr. Šárka Bobková, Ph.D.

Datum: 12/19/2021

Autor: Bc. Jan Keil

Název práce:

Studium unikátní signální dráhy Ser/Thr proteinkinázy StkP a fosfatázy PhpP u *Streptococcus pneumoniae*

Cíle práce

Práce se zabývá charakterizací nového substrátu proteinkinázy StkP, a to hypotetickým proteinem Spr0929, který byl identifikován pomocí MS analýzy. Cílem práce bylo potvrdit fosforylaci Spr0929 kinázou StkP a potvrdit místo fosforylace. Dále pak měly být charakterizovány kmeny s deletovaným *spr0929* genem s ohledem na jejich růstové vlastnosti, morfologii a růst za stresových podmínek. Posledním cílem bylo pak určit lokalizaci Spr0929, která by mohla pomoci poodhalit funkci tohoto proteinu.

Laboratoř buněčné signalizace, kde byla práce vypracována, se dlouhodobě zabývá studiem signálních drah spojených s StkP/PhpP, což potvrzuje i fakt, že v této laboratoři bylo identifikováno 5 z 12 doposud známých substrátů této kinázy. Díky tomuto dobrému vědeckému zázemí, má práce velmi dobrou odbornou úroveň a je součástí dlouhodobého výzkumného tématu uvedené laboratoře.

Autor se musel seznámit s různorodou škálou metod, od přípravy delečních kmenů, přes měření růstových křivek a mikroskopii až po metody *in vitro* a *in vivo* fosforylace. Zdá se, že autor si používané metody dostatečně osvojil a byl schopen i získané výsledky interpretovat a dávat do souvislostí s již známými publikovanými výsledky. Literární zdroje jsou řádně citovány, přičemž nechybí recentní publikace.

K práci mám několik formálních připomínek i odborných dotazů:

Formálně je práce čítající 123 stran rozdělena do 7 kapitol, které odpovídají standardnímu členění diplomové práce až na kapitolu Výsledky. Ta by měla být podle mého názoru uvedena jako samostatná kapitola nikoliv jako podkapitola Materiálu a metod. Autor by si též měl dát pozor na strukturu používaných vět, aby odborný text byl česky srozumitelný. Například věta „Na základě globálního fosfoproteomu závislého na proteinkináze StkP a fosfatáze PhpP byl threonin v pozici 255 proteinu Spr0929 identifikován jako fosfosforylovaný v hyperfosforylovaném kmeni s odstraněnou fosfatázou PhpP“ (Výsledky, str. 67) je dosti kostrbatá. Stejně tak obraty jako “vodná fáze byla osamostatněna“ (Literární úvod, str. 56) nebo vytvoření mutant otevřelo cestu (Výsledky str. 68) lze nahradit vhodnějšími odbornějšími výrazy. Dále by si měl autor dát pozor na použití některých cizích slov, jako např. infekce jsou oportunní nikoliv oportunitní, podmínky jsou standardní nikoliv standartní apod. V kapitole 4.7.1. chybí obrázky 31 a 32, na které je v textu odkazováno. Tyto obrázky by měl autor doplnit v erratech. V souvislosti s obrazovou dokumentací je vhodné, aby obrázky případně tabulky byly umístěny až za textem, ve kterém se na daný obrázek/tabulku odkazuje, nikoliv naopak.

Co se týče odborného textu, zde mám několik dotazů:

V literárním úvodu autor píše, že pneumokok je schopen alfa-hemolýzy produkcí H_2O_2 . Obvykle se uvádí, že hemolýza je způsobena produkcí hemolytických enzymů či sekundárních metabolitů. Můžete nějak blíž vysvětlit mechanismus produkce a následného působení uvolňovaného H_2O_2 na erytrocyty?

Na straně 17 literárního úvodu autor uvádí, že 76% proteinů pneumokoka stále není funkčně charakterizováno. Pneumokok je velmi intensivně studován, proto je toto číslo překvapivě vysoké. Můžete uvést, z čeho jste při uvádění této hodnoty vycházel (z údajů v databázi Uniprot, z článků, něčeho jiného)?

V kapitole „Výsledky“ mě zaujaly grafy znázorňující morfologické parametry testovaných kmenů. Z popisu mi ale není jasné, jak byly bakteriální buňky pro dané vyhodnocení vybrány a co bylo provedeno manuálně Vámi a co hodnotil uvedený software. Musel jste např. manuálně označit a „měřit“ buňky, které má software vyhodnotit nebo to byly softwarem vybrané bakterie např. v určité části preparátu?

Výsledky kapitola 4.3 delece genu *spr0929* – při tvorbě konstruktů pro deleci genu *spr0929* jste použil metodu fúzní PCR. Bylo možné fúzovat všechny tři uvedené fragmenty v jednom kroku nebo jste musel fúzi dělat postupně – nejdřív dva fragmenty a následně připojit třetí?

Jediným viditelným efektem delece *spr0929* na růst bylo zpomalení růstu u kmene Rx se zavedenou SJ kazetou. Jak správně uvádíte v diskusi, mohlo zde dojít k polárnímu efektu na geny umístěné downstream od *spr0929*. Jak to vypadá s promotorem genu *spr0929* – kde je umístěn a které geny jsou spolu se *spr0929* ko-transkribovány?

Z Vašich výsledků vyplývá, že samotná delece *spr0929* nemá zásadní vliv na růst ani morfologii (vyjma kmenů na pozadí R6) pneumokoka v testovaných podmínkách. Může to být způsobeno i tím, že se Vám (zatím) nepodařilo najít podmínky, při kterých by se role *Spr0929* projevila. Pokuste se navrhnout jiné další podmínky, ve kterých by bylo zajímavé fenotypový projev připravené mutanty otestovat.

V literárním úvodu uvádíte, že exprese *spr0929* je pozměňena při tvorbě biofilmů (Kumar Yadav et al, 2015). Jsou od té doby v tomto směru nějaké nové poznatky a chystáte se testovat též roli *spr0929* při tvorbě biofilmu?

Experimenty s pneumokoky jsou ztíženy existencí tří typů divokého kmene (kmen D39, RX, R6). Je úctyhodné, že v podstatě všechny experimenty byly provedeny na všech třech typech divokého kmene. Zajímalo by mě, jaká je ale situace v literatuře co se týče použití jednotlivých typů kmenů. Je jeden z kmenů považován za „modelový divoký kmen“ nebo se ve většině laboratoří též provádějí experimenty na všech třech typech genetického pozadí?

Autor splnil ve své práci všechny na začátku vytyčené cíle. Ačkoliv se nepodařilo prokázat/najít funkci zkoumaného hypotetického proteinu *Spr0929*, významným výsledkem bylo potvrzení fosforylace tohoto proteinu a pak zejména určení jeho lokalizace v blízkosti nukleoidu. Tento výsledek je důležitým poznatkem, ze kterého je možné se odrazit při další charakterizaci *Spr0929*, což autor plánuje v rámci svého dalšího studia.

Formální výtky nijak nesnižují odbornou kvalitu předložené práce, ale jsou upozorněním pro autora pro jeho budoucí publikační činnost, proto po zodpovězení dotazů a doplnění chybějících obrázků doporučuji práci k obhajobě.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

