Posudek oponenta na diplomovou práci

Oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Radovan Fišer
	Datum: 26.5.2023

Autor: Kateřina Mašková

Název práce:
Hypotetický protein Spr1962 jako nový substrát signalizační dráhy Ser/Thr proteinkinázy StkP a fosfatázy PhpP

Cíle práce
Cíle na str. 35 jsou velmi podrobné, oceňuji jejich určitost a srozumitelnost:

1. Vytvořit mutantní kmen Δspr1962na genetickém pozadí kmenů R6, Rx a D39 acharakterizovat jeho morfologické a růstové vlastnosti.
2. Prokázat fosforylaci proteinu Spr1962 proteinkinázou StkP vpodmínkách in vivo.
3. Připravit fosfoablativní a fosfomimetickou formu proteinu Spr1962v poziciT273 a charakterizovat morfologické a růstové vlastnosti kmenů.
4. Potvrdit místo fosforylace proteinu Spr1962 proteinkinázou StkP v podmínkáchin vivo.
5. Vytvořit komplementační kmen a porovnat jeho fenotypový projev ve srovnání sdivokým kmenem amutantním kmenem Δspr1962.
6. Připravit kmen *S. pneumoniae* exprimujícífúzní protein Spr1962-GFPa určit místo lokalizace proteinu vbuňce.
7. Charakterizovat deleční, fosfoablativní a fosfomimetické kmeny za stresových podmínek (teplotní stres a pH stres).
8. Porovnat sekretom mezi divokým typem a mutantním kmenem Δspr1962.
9. Prokázat asociaci proteinu Spr1962 scytoplasmatickou membránou pomocí frakcionace u mutantního kmene Δspr1962a kmene sfosfoablativní záměnou v pozici T273.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE
Rozsah práce (počet stran): 123
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO
Je uveden seznam zkratek? ANO (ale chybí např. zkratka SEDS)

Literární přehled:
Odpovídá tématu? ANO
Je napsán srozumitelně? ANO, a je velmi podrobný.
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?
ANO (méně přehledně internetové odkazy)

Materiál a metody:
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO
Bylo použito mnoho metod: práce s bakteriemi, DNA, proteiny, mikroskopie, …
Metody jsou popsány srozumitelně a velmi precizně.

Experimentální část:
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO, čtenář se dozví souvislosti mezi pokusy
Dokumentace výsledků je dostačující, chybí možná jen kvantifikace některých růstových rychlostí.
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?
ANO, množství provedených pokusů je spíše nadstandardně vysoké.

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
Diskuse je opravdu velmi rozsáhlá (str. 94-111).

Závěry (Souhrn) :
Jsou výstižné? ANO

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):
Jazyková úroveň je na velmi dobrá. Dále uvádím konkrétní formální připomínky.
Na obrázky je z textu odkazováno prakticky vždy těsně pod obrázkem, což není ideální (platí do str. 35, dále ve výsledcích).

Obtékání textu kolem obrázků někdy vede k tomu, že je obrázek moc malý, až nečitelný (Obr. 15, str. 58, Obr. 26, str. 72).

Obrázek 39 v sobě zahrnuje podstatnou část obrázku 18. To samo o sobě není problém, ale mělo by to být v textu zmíněno.

Tab. 3 je chybně označena jako Tab. 2 (str. 24).

Označní " Mn-dependentní anorganická fosfatáza" a " Mn2+dependentní enzym" je nejednotné a jazykově nešťastné.

Latinské názvy organismů v seznamu literatury nejsou kurzívou.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Velmi podrobně vysvětlené metody (včetně objasnění jejich principu; Polymerázová řetězová reakce, Elektroforéza vagarózovém gelu, izolace z gelu, Izolace chDNA S. pneumoniae, Místně specifická mutageneze, ...) mohou výborně sloužit pro někoho, kdo bude chtít podobné pokusy zopakovat. Oceňuji Tab. 1-2 (substráty StkP). Přehledné jsou také tabulky charakterizující kmeny, oligonukleaotidy apod.

Pěkné a podrobné jsou úvodní kapitoly: Proteinkináza StkP a fosfatáza PhpP, Membránové mikrodomény, ... Protein Spr1962 (SPD_1984).

Oceňuji tvorbu bodových mutace T273A, T273E (fosfoablatická a fosfomimetická) a jejich podrobnou charakterizaci.
Většina cílů byla splněna. Tam kde došlo ke komplikacím, je diskutován další možný směr výzkumu. Co se týká množství provedených pokusů, dosažených výsledků, ale i jejich prezentace, pokládám práci za nadprůměrnou.

Otázky oponenta:

- Můžete komentovat úlohu předpokládané nestrukturované oblasti proteinu StkP mezi N-koncovou cytosolickou doménou a transmembránovou částí (Obrázek č. 3, str. 15)? Co dále znamená tvrzení, že tři PASTA (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated) domény "jsou membránově axiální a jedna membránově distální"?

- Uvádíte, že "StkP se po přijetí signálu aktivuje a dimerizuje (Pallová et al., 2007). Těsné přiblížení dvou cytosolických domén StkP indukuje schopnost autofosforylace, následkem čehož dochází ke změně konformace a celkové aktivity." Jak je to u jiných typů senzorů dvoukomponentních systémů?

- Co znamená, že "Delečního mutanta [fosfatázy PhpP] lze sice získat, avšak delším pasážováním dochází k hromadění supresorových mutací"?

- str. 62. Obr. 19: bylo by možná vhodné zobrazit i nižší počáteční hodnoty OD. V legendě obrázku se uvádí: "Delece v genu spr1962 nemá za standardních podmínek vliv na schopnost růstu." Nicméně kmen Sp208 (wt) roste pomaleji než Sp262 (Δspr1962::SJK) - jaké je vysvětlení? Nejsou zde uvedeny konkrétní rychlosti růstu (ačkoliv by stačilo připraveným grafem růstové křivky proložit přímku). Doby zdvojení jsou uváděny pouze u teplotního stresu (tab. 19) a pH stresu (tab. 20). Zde chybí statistická analýza (s ohledem na chybu stanovení směrnice).

- str. 64, tab 15: pro všechny bakteriální konstrukty odvozené od kmenů R6, Rx a "Rx,ΔphpP" platí, že délka buněk dokonale koreluje s jejich šířkou (toto však není v tabulce vyhodnoceno). Tedy, že buňky mají předevídatelný tvar: šířka=0,246xdélka+0,322. Pro kmen D39 to však neplatí (buňky jsou celkově kulatější). Máte nějaké vysvětlení? U této tabulky není napsáno, jak byla prováděna statistická analýza (asi shodně s Obr. 20).

- str 72: Jak brání FLAG epitop fosforylaci Spr1962, vzhledem k předpokládané struktuře (viz obr. 10, 13)? Je běžné (dle literatury), že by vložený linker (str. 81) zvyšoval míru fosforylace? A naopak, jak funguje konstrukt Spr1962-GFP?

Připomínky oponenta:
(připomínek je větší množství, protože práce samotná je velmi obsáhlá)

- Jak se *S. pneumoniae* brání (jak je přizpůsoben) zvýšeným hladinám H_2O_2, který sám produkuje pyruvátoxidázou?

- str. 70, tab 16: Jak se mění délka buněk původního kmene D39 bez delecí a bez komplementace při přidávání Zn^{2+}?

- Obr. 1: Není vysvětlena produkce prekurzorů peptidových feromonů. Jedná se o jakýsi cyklický proces?

- Jaká sekvence Pre-CSP je štěpena? Jak vypadá 17 AA produkt? (str. 13: Ze strukturního genu –comC je syntetizován jako protein ComC neboli Pre-CSP, který obsahuje 41 aminokyselin (Pestova et al.,1996). Následně je část peptidu odštěpená

ABC transportérovým systémem ComA/ComB, který má zároveňproteázovou aktivitu. Odštěpením N-koncové části se stává aktivním feromonem a je exportován z buňky)

- Flotiliny - z čeho pochází název této domény SPFH; "band-7 doména"? Jaká je sekvenční příbuznost členů této rodiny? (Obr. 11 ukazuje strukturní podobnost - patrně konvergentní).

- Nebylo by vhodné použít pro sledování lokalizace fluorescenčně značených proteinů konfokální nebo "superrezoluční" fluorescenční mikroskop?

- str. 55: Co znamená "Spolu se $ZnCl_2$ byl přidán také $MnCl_2$ prozlepšení životaschopnosti kultur v poměru 1:10 k zinku"? Proč?

- D39, spr1962-gfp... jak je to s hladinou exprese proteinu z nativního lokusu (str. 76)? Opravdu je zde vyšší, než u ektopicky exprimovaného inducibilního promotoru (str. 73)? Dá se podle intenzity fluorescence odhadnout, jaké množství proteinu Srp1962 v buňce je?

- Jak byly vybírány buňky pro měření rozměrů vzhledem k růstovému cyklu? Pozorovaný rozptyl hodnot (např. délky) pro jeden kmen je až 2,5 násobný.

Překlepy a drobné chyby:
str. 13, 54, 55, 57, 112 *S. pneumoniae* není kurzívou.
str. 12 "Díky, které je schopna transformace, tedy přijmout..."
Obr. 4, 5, 12 *B. subtilis* není kurzívou.
str. 28 "Bacillus Anthracis", "Listeria Monocytogenes"
Obr. 11 Co značí černý kroužek?
Obr. 11 je umístěn mezi obrázky 3 a 4.
Tabulka označená Tab 10 je v práci dvakrát (str. 39 a 41)
str. 48: "standartních", str. 49, 62, atd.
Označení na str. 53: "Tab. č. 14. str."
PDF soubor není dobře indexovaný, např. písmeno "ž" -> "ţ". Soubor tak není dobře prohledatelný.
str. 57: hladina významnosti se označuje "p".
str. 61: "Díky deleci fosfatázy PhpP se jedná o hyperfosforylovaný kmen"
str. 65: není čitelné měřítko u fotografií
str. 73: "Schéma vektoru pJWV25 pZn-spr1962-gfp je znázorněna"
str. 74 "Tyto foci byly viditelné"
str. 75: "délky buněk zobou experimentů "

Návrh hodnocení oponenta: **výborně**

Podpis oponenta: