

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Radovan Fišer

Datum: 22.5.2024

Autor: Bc. Tomáš Beneš

Název práce:

Vztah mezi StkP/PhpP fosforylační dráhou a diadenylát cyklázou CdaA produkující c-di-AMP u *Streptococcus pneumoniae*

### Cíle práce

Cíle na str. 2 jsou podrobné, oceňuji jejich určitost a srozumitelnost.

Cílem práce bylo osvětlit regulační vztah mezi diadenylátcyklázou CdaA, fosfoglukosaminmutázou GlmM a Ser/Thr kinázou StkP.

Jednotlivé cíle:

1. Ověřit interakci mezi CdaA a GlmM u *Streptococcus pneumoniae* in vitro pomocí dvouhybridového systému i in vivo pomocí koimunoprecipitace.
2. Otestovat možnou interakci mezi CdaA a StkP pomocí dvouhybridového systému a koimunoprecipitace.
3. Ověřit negativní efekt GlmM na syntézu c-di-AMP metodou diadenylátcyklázové reakce.
4. Zjistit vliv StkP na aktivitu CdaA metodou diadenylátcyklázové reakce.
5. Určit, zda je CdaA fosforylována kinázou StkP pomocí radioaktivní kinázové reakce a gelu Phos-Tag.
6. Ověřit esencialitu *cdaA* genu u *S. pneumoniae* přípravou deplečních kmenů a jejich charakteristikou.
7. Stanovit lokalizaci CdaA pomocí fluorescenční mikroskopie.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 99

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratek? 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

Oceňuji kapitolu "Úvod do fyziologie *S. pneumoniae*". Některé části této kapitoly možná příliš nesouvisí s tématem práce (popis virulencních faktorů *S. pneumoniae* - pouzdro, pneumolysin, přirozená kompetence a její regulace).

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Byla použita celá škála různých metod, které byly popsány srozumitelně a celkem pečlivě:

Metody práce s DNA:

PCR (běžná a inverzní), izolace plazmidové DNA, elektroforéza v agarózovém gelu, izolace DNA z gelu, klonování, příprava DNA pro sekvenaci

Metody práce s proteiny:

Expresie rekombinantních proteinů v E. coli, izolace rekombinantních proteinů s kotvou His-tag, izolace rekombinantních proteinů s GST-tag, BCA Protein Assay, SDS-PAGE, Western blot a imunodetekce, kinázová reakce, Phos-Tag SDS-PAGE, stanovení enzymatické aktivity - diadenylátcyklázová reakce

Manipulace s buněčnými kulturami:

Příprava kompetentních buněk, transformace DNA, dvouhybridový systém, koimunoprecipitace, měření růstových vlastností bakterií, příprava rychlých proteinových lyzátů, fluorescenční mikroskopie a vyhodnocení preparátů

Oceňuji rozsáhlý seznam DNA oligonukleotidů, vektorů a kazet, použitých bakteriálních kmenů, protilátek a chemikálií. Seznamy obsahují velmi přínosné slovní vysvětlení významu dané látky (kmene, apod.).

Stanovení koncentrace c-di-AMP s využitím fluorescence vázaného koralynu (a jeho zhášení ionty Br<sup>-</sup>) nicméně nepůsobí příliš věrohodně (str. 71). Bylo by vhodné prezentovat v práci naměřená data (ideálně emisní spektra) a podrobnější koncentrační závislost zhášení.

Běžně se využívá Stern-Volmerovo vynesení, které v některých úpravách umožní kromě zhášecí konstanty přesně stanovit množství (ne)dostupné frakce fluoroforu. Původní práce (Zhou et al. 2014) navíc porovnává zhášecí konstanty koralynu v roztoku a v přítomnosti c-di-AMP (zhášecí konstanty se liší asi 10x). V předložené práci takové srovnání nebylo uvedeno.

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO

Dokumentace výsledků je dostačující (kromě stanovení c-di-AMP). Poněkud postrádám kvantifikaci růstových rychlostí (např. citace: "...zvyšující se hladina IPTG nemá výrazný vliv na růst Sp1070...", str. 70).

Bylo by navíc možné kvantifikovat míru interakce proteinů v dvouhybridovém systému?

#### **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 spíše stručnější (str. 77-81).

#### **Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

Jedná se o konkrétní odpovědi na otázky, které si autor položil v úvodní části "Cíle".

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

Jazyková a formální úroveň textu je opravdu velmi dobrá. Naneštěstí hned první věta abstraktu obsahuje gramatickou chybu. Podobné problémy se v práci prakticky nevyskytují.

### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Podářilo se zjistit, že CdaA je ve zkoumané bakterii esenciální protein s membránovou lokalizací. Samotná lokalizace by měla být ještě dále studována. Na různých úrovních byla prokázána vazba CdaA na proteiny GlmM a StkP. Vazba proteinu GlmM pak snižuje enzymatickou aktivitu CdaA.

V závěru práce je předložen model, který navrhuje roli StkP v regulaci CdaA (str. 81). Práci celkově hodnotím jednoznačně kladně. Autor poměrně často píše v trpném rodě nebo v první osobě množného čísla. Ocenil bych proto, kdyby objasnil, do jaké míry se podílel na prováděných experimentech.

### **Otázky oponenta:**

- 1) Jak souvisí a) tvorba pouzdra a b) přirozená kompetence s proteinem CdaA?
- 2) Jaký je mechanismus syntézy bis-(3',5')-cyklického dimerického adenosinmonofosfátu (c-di-AMP)? Jak funguje DAC doména?
- 3) Je možné stanovit experimentálně hladinu c-di-AMP přímo v buňce?
- 4) Jak je uchováván kmen Sp1109 s deletovanou delecí nativní alely *cdaA*, nicméně s vloženým konstruktem Plac-flag-L-*cdaA*? Je u tohoto kmene možné experimentálně měnit/nastavit hladinu c-di-AMP pomocí IPTG?
- 5) Podle dostupné literatury je protein GlmM je schopen inhibovat aktivitu CdaA (Gibhardt et al., 2020; Tosi et al. 2019). Jak/proč se liší míra inhibice u jednotlivých studovaných bakterií?
- 6) Co je to fratricida u *S. pneumoniae*? Jak a čím je spouštěna? (str. 4, 5)

### **Připomínky oponenta:**

V textu se objevuje tvrzení (str. 76): "...je patrné, že CdaA opravdu lokalizuje do membrány. V ní se ale vyskytuje nerovnoměrně, často se shlukuje do určitých bodů roztroušených po membráně. Zároveň velice často lokalizuje do sept." Je zde odkaz na Obrázek 29 (chybně číslovaný jako 298). Rozlišení snímků však neumožňuje membránovou lokalizaci určit s jistotou (zejména proto, že se nejedná o konfokální řezy). Můžete ještě blíže komentovat rozmístění CdaA v membráně? Jak by bylo možné přesvědčivěji určit, jestli se protein opravdu nachází v mikrodoménách (viz str. 80)?

Návrh hodnocení oponenta: **výborně**

Podpis oponenta: