



**Oponentský posudek disertační práce
Mgr. Jakuba Nováka
s názvem: „Virulence *Bordetella pertussis* perspektivou omics přístupů“**

Předkládána disertační práce Mgr. Jakuba Nováka je sondou do patogeneze bakterie *Bordetella pertussis* způsobující závažné onemocnění známé laické veřejnosti pod názvem „černý kašel“, které může u novorozenců nebo jedinců z oslabenou imunitou vést až k úmrtí. Ve své práci se Jakub Novák podílel na třech studiích, které si kladly za cíl pomocí vysoce kapacitních technik zahrnující proteomické a transkriptomické přístupy pro analýzu biologického materiálu sledovat interakci vybraných toxinů nebo celých bakterií s hostitelskou buňkou, konkrétně se jednalo o dendritické buňky nebo makrofágy. Práce je předkládána k obhajobě v anglickém jazyce, ve zkrácené verzi a je členěna do několika oddílů. První teoretický oddíl popisuje biologickou signifikanci zvoleného tématu. V biologické části autor stručně vysvětluje závažnost onemocnění, která mohou být způsobena bakteriemi rodu *Bordetella*, molekulární mechanismy a metabolické dráhy spojené s jejich virulencí. Následuje elegantní a detailní popis jednotlivých faktorů virulence, včetně jejich funkčních post-translačních modifikací a sekrečních drah. Celá teoretická sekce je ukončena popisem adaptace bakterie pro přežití v hostitelské buňce a možného vlivu na post-translační modifikace. Dokonce se domnívám, že příslušná část by mohla být publikována formou přehledového článku a skutečně, jedna publikace kategorie „review“ je součástí disertační práce.

Mezi první a druhý oddíl je vložena krátká sekce definující vědecké cíle disertační práce Jakuba Nováka. Druhý oddíl se trochu nelogicky jmenuje diskuse a v ní se autor snaží výstižně vysvětlit postupy a výsledky své práce, které jsou součástí tří kvalitních studií publikovaných v recenzovaných periodících, a u každého výsledku je shrnut příspěvek předkladatele na dané studii. Je nutné podotknout, že na všech publikacích je Jakub Novák uveden jako první autor. První práce popisuje buněčnou odpověď myších dendritických buněk na setkání se dvěma formami CyaA, s celým toxinem nebo pouze s jeho částí bez adenylát cyklosové domény. Jedná se o hezkou studii, kdy do proteinů kontrolní buněčné linie byly selektivně vneseny isotopově značené lysiny a argininy. Pokusné, isotopově neznačené buňky byly inkubovány s divokým toxinem nebo s toxoidem bez enzymatické aktivity. Poté byly vždy proteinové lyzáty smíseny s kontrolní a experimentální kulturou v poměru 1:1 v závislosti na koncentraci proteinů. Takto připravený mix byl natráven trypsinem a ze vzniklé peptidové směsi byly na oxidu titaničitém nabohaceny fosforylované peptidy, které byly následně hmotnostně-spektrometricky identifikovány a kvantifikovány. Ze získaných dat byly pomocí bioinformatického zpracování vybrány proteiny, které se fosforylovaly buď v důsledku zvýšené cytosolické hladiny vápenatých iontů, kterou způsobuje samotný toxoid, nebo zvýšenou hladinou Ca^{2+} a přítomností adenylát cyklázy v případě divokého CyaA. Pozorované změny byly ověřeny technikou „western blott“. Na základě získaných dat Jakub Novák došel k závěru, že napadení buňky toxinem vede k utlumení signální dráhy mTOR, možnému zvýšení produkce IL-10 a potenciální reorganizaci cytoskeletu.

Přírodovědecká fakulta UK

RNDr. Petr Novák, Ph.D.



V druhé publikaci se Jakub Novák snažil vystopovat molekulární mechanismy vedoucí k epigenetickým změnám hostitelských buněk v důsledku infekce bakteriemi z rodu *Bordetella*. Sice nebyl úspěšný, ale podařilo se mu vytipovat geny v genomu *Bordetella pertussis*, které by mohly mít deacetylasovou aktivitu, a díky pokusům v *E. coli* identifikoval lysinovou deacetylasu Bkd1, která ovlivňuje acetylaci širokého spektra proteinů *B. pertussis*. Na základě získaného poznatku byl připraven mutantní kmen *B. pertussis* a došlo na srovnání jeho interakce s hostitelskou buňkou oproti divokému kmeni. Výsledky studie nenaznačují sníženou expresi virulentních faktorů mutantního kmene a rozdílné přežití v kultuře hostitele. Nicméně se podařilo ustavit biologický model pro sledování dlouhodobé infekce lidských makrofágů.

Třetí předkládaný článek popisuje vliv G-T záměny v 5' UTR regionu genu *rpIN* mutantního kmene JN1 na jeho chování v kultuře lidských makrofágů. Práce představuje rozsáhlou proteomickou a transkriptomickou studii s ověřením získaných výsledků průtokovou cytometrií, imunoprecipitací a technikou „western blott“. Výsledkem je zjištění, že G-T záměna vede k zvýšení exprese alfa podjednotky RNA polymerasy, snížení exprese virulentních faktorů a delšímu přežití v kultuře lidských makrofágů.

Poslední oddíl představuje závěr, ve kterém Jakub Novák, stručně shrnul klíčové úspěchy svého snažení, které jsou významné pro budoucí výzkum faktorů virulence rodu *Bordetella*. Nicméně větší zasazení výsledků do současného poznání by zvýšilo kvalitu předkládané práce.

Z předkládané disertační práce je patrné, že v průběhu svého studia se Mgr. Novák naučil celou řadu technik současné molekulární biologie a to včetně bioinformatického zpracování dat získaných pomocí vysokokapacitních omics technik. Prokázal, že získaná data je schopen interpretovat v kontextu současného poznání. Po formální stránce se práce jeví velmi dobře, i když se domnívám, že pro větší přehlednost by měla druhá část být koncipována jako „Results and discussion“ včetně stěžejních obrázků z publikací, které jsou součástí předkládané disertační práce.

Práci doporučuji k obhajobě a mám několik dotazů.

- 1) Ve své práci na straně 18 zmiňujete nižší účinnost nebuněčné vakcíny, kterou v současnosti používají vyspělé země. Ve stejném odstavci jsou uvedeny celkové počty nakažených včetně smrtnosti. Vámi uvedená informace je silně zavádějící. Lze vyjádřit kolik nakažených a mrtvých připadá pouze na vyspělé země?
- 2) V první publikaci zmiňujete nabohacení fosfopeptidů na oxidu titaničitém a jejich kvantifikaci. Znáte rizika spojená s použitím oxidu titaničitého při nabohacení fosfopeptidů a způsob jejich minimalizace? Dále by mě zajímal důvod kvantifikace pouze fosfopeptidů bez kvantifikace celého proteomu. Srovnání obou datasetů by zase mohlo přispět k zpřesnění informace získané z naměřených dat.

Přírodovědecká fakulta UK

RNDr. Petr Novák, Ph.D.



- 3) V případě druhé publikace mě napadá možnost použití ChIP-Seq analýzy infikovaných makrofágů s využitím protilátky proti Bkd1. Máte představu, proč nebyla uskutečněna?
- 4) Ve třetí publikaci jsem si všiml postupu přípravy buněčných lyzátů a média pro proteomickou analýzu. Myslíte si, že může dojít ke štěpení trypsinem v 8M močovíně? Dalé byla provedena redukce v 100mM DTT a alkylace pomocí 50mM chloracetamidu. Domníváte se, že alkylace proteinů proběhla úspěšně?

V Dolních Břežanech dne 20. 5. 2021

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta UK

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

adresa: Albertov 6, 128 00 Praha

telefon: 221 951 281

e-mail: novakpe1@natur.cuni.cz

ičo: 00216208, **dič:** CZ00216208

fax: 221 951 283

web: www.natur.cuni.cz