

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Ivo Konopásek
	Datum: 26.5.2015
Autor: Bc. Nela Klímová	
Název práce: Úloha RTX domény v aktivitě adenylátcyklázového toxinu z <i>Bordetella pertussis</i>	
Cíle práce Cíle práce jsou na konci Úvodu a ve zvláštní kapitole po kapitole Materiál a Metody, kde jsou rozepsány do stručných, ale výstižných bodů. Kapitola končí hypotézou, která doplňuje Cíle. Doplnit tuto hypotézu do Cílů bylo velmi poctivé, protože se její druhá část experimentálně neprokázala.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? <u>ANO</u> NE Rozsah práce (počet stran): 85 včetně citací Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, <u>ANO</u> NE Je uveden seznam zkratk? <u>ANO</u> NE Seznam je uveden trochu neočekávaně před seznamem použité literatury. Některé zkratky jsou vysvětleny jako „z angl. colicin tolerant“. Bylo by asi dobré u méně známých pojmů vysvětlit i samotný pojem, nejen překladový původ.	
Literární přehled: Odpovídá tématu? <u>ANO</u> NE Je napsán srozumitelně? <u>ANO</u> NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? <u>ANO</u> NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? <u>ANO</u> NE Literární přehled se zaměřuje na RTX toxiny a na jejich transport. Je cílen velmi dobře vzhledem k tématu a napsán velmi srozumitelně a doplněn asi 125 citacemi z období od 1980 do 2014.	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? <u>ANO</u> NE Kolik metod bylo použito? Experimentální kapitola je opravdu velmi bohatá. Zahrnuje konstrukci, produkci a izolaci nebo detekci delečních forem CyaA v E.coli i B. pertussis, testování biologických aktivit, qPCR, cirkulární dichroismus – tedy řadu molekulárně genetických, biochemických a biofyzikálních metod. Jsou metody srozumitelně popsány? <u>ANO</u> NE Metody jsou popsány velmi dobře. Složení pufrů se objevuje vždy u příslušné metody přímo v textu, což většinou srozumitelnosti nevadí, i když je v DP většinou zvykem uvádět složení roztoků zvlášť. Pouze v tabulce 3.1.5. Restrikční endonukleázy a jejich pufrů“ jsem v legendě neobjevil složení pufrů 1 a 2 , v legendě se naproti tomu objevil pufr 3 bez značky, který není v tabulce. Zkratku „VB“ v zemi původu bych asi nahradil zkratkou „UK“. Někdy není popis kvůli používanému stylu tak srozumitelný, jako by byl v případě, že by složení pufrů bylo zvlášť a text by se na něj odvolával. Příklady :	

(27) „Získaná plazmidová DNA byla uchovávána při teplotě 25 °C (mrazící box Liebherr, Švýcarsko)“ – zřejmě -25°C, aby měl mrazící box smysl.

(28) „K pufrům 3 a 4 bylo přidáno BSA na výslednou koncentraci 1x”

(29)“Při provádění PCR na koloniích *B. pertussis* byly do předpřipravené směsi,...“ – PCR asi nebyla prováděna na koloniích, které jen byly výchozím materiálem.

(31)“Vzorky byly odstředěny (16000 g,...)” - správně 16000 x g

(31) „5 µl 10x pufru pro DNázu I (Sigma)” – pokud číslo označuje násobnou koncentraci pufru, je třeba to uvést slovem “koncentrace”

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?

Dokumentace je na standardní úrovni, šikmé popisky některých obrázků u sloupcových grafů nebo elektroforetogramů kombinované s úsečkami koncentrací vápníkových iontů někdy ztěžují orientaci (např. Obr. 25). U obr. 28 je v legendě popiska ke vzorku B.p. CyaA Δ1-3, která neodpovídá označení na obrázku, kde je navíc písmeno “n” – možná mělo být “n/a”.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Pokusy jsou vedeny promyšleně a odpovídají na otázky zadané v cílech.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE

Diskuze řeší především vztah mezi sekrecí toxinu, velikostí RTX domény a C-koncovou signální sekvencí. Diskuze ukazuje velmi dobrý přehled autorky v tématu. Použití výsledků jiných autorů v diskuzi z období posledních 35 let ukazuje, že tematika byla řešena už poměrně dávno, ale že teprve autorka jednoznačně potvrdila význam RTX domény pro transport u CyaA.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

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

Formální úroveň je výborná, formulace vět je na vysoké úrovni, s podprůměrným výskytem neobratností uváděných dále, například:

(24) Transkripce genu *I-Sce I* je **kontrolována** BvgA/S systémem“. V češtině by měla být odlišována kontrola a regulace. Zde jde o regulaci a důsledek nepřesného překladu.

(60) došlo po **přetření** kolonií na misky neobsahující...” - hantýrka

(63) „,...umožňuje sekreci CyaA **přes** sekreční aparát typu I.” – správněji “sekrečním aparátem”

(68) „,...obsahuje RTX doménu, **v rámci níž** se vážou vápenaté ionty....” Lépe “do které se vážou”

(70) „skupiny..... našly v cytosolu **minimum proteinu**” - hantýrka

(70) **Vysvětlení tohoto jevu je takové**, že protein byl v cytosolu degradován kvůli chybějící části RTX domény.

(72) U CyaA tak může být nezbytný **zrovna blok 1**.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Celkově se mi práce velmi líbí a jednotlivé výhrady nesnižují její kvalitu. Bylo odvedeno pozoruhodné množství práce a výsledky tvoří pěkný celek, což se vždycky nepovede. Hypotéza o pomocné roli struktury RTX sekvencí při transportu je cenná a bude dále posuzována.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) Zajímalo by mě, zda zkoumání podílu mRNA cyaA a cyaB pro deleční mutanty v různých koncentracích vápenatých iontů bylo provedeno jako automatická kontrola nebo zda byly tyto pokusy vedeny nějakou hypotézou o vztahu mezi koncentrací transkriptu na jedné straně a koncentrací vápenatých iontů nebo délky transkriptu na druhé straně.
- 2) Vysvětlete trochu šroubované tvrzení, že „Předpoklad, že deleční mutanty zaujímaly strukturu divokého typu, je v souladu s navrženou hypotézou, že nepřítomnost biologické aktivity variant CyaA zkrácených v RTX doméně je způsobena nezbytností celistvosti celé RTX domény.” Zajímalo by mě, jak by tato úvaha zněla v případě, že by měření CD neukazovala správné sbalení RTX domény u delečních mutant.
- 3) Vysvětlete podstatu nepublikovaných výsledků Vašeho školitele, konkrétně o “centru sbalování” v RTX doméně CyaA a o “směru sbalování”, které několikrát ve Vaší práci citujete a které souvisejí s Vašimi výsledky s transportem delečních mutant.
- 4) Jaký bude další výzkum transportu a struktury RTX domény u CyaA?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: