

Posudek oponenta na diplomovou práci

| | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek | Jméno posuzovatele: RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D. |
| | Datum: 7.9.2015 |
| Autor: Bc. Jakub Držmíšek | |
| Název práce: Produkce a sekrece faktorů virulence <i>Bordetella pertussis</i> | |
| Cíle práce: 1) Produkce a purifikace rekombinantních proteinů BopB, BopC, BopD, BopN. 2) Získání specifických protilátek proti purifikovaným komponentám T3SS a s jejich pomocí analyzovat produkci a lokalizaci proteinů T3SS v <i>B. pertussis</i> . 3) Analýza pórtvorné aktivity rekombinantních proteinů BopB a BopD. 4) Porovnání produkce a sekrece proteinů <i>B. pertussis</i> v divokém a Δhfq kmenu pomocí analýzy SDS-PAGE a následná identifikace proteinů s významně rozdílnou úrovní produkce pomocí hmotnostní spektrometrie. 5) Porovnání produkce a sekrece proteinů v kmenech <i>B. pertussis</i> izolovaných z infikovaných makrofágů. | |
| Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Rozsah práce (počet stran): 89 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Je uveden seznam zkratk? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE | |
| Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Je napsán srozumitelně? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE, stručně , celkově má pouze 10 stran textu Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE, ale ne všechny jsou správně citovány. Na začátku literárního přehledu nejsou citace zcela správně uvedeny, v textu není popsáno, že se jedná o souhrnnou práci, tj. review, a není uvedena primární práce, odkud informace pochází. Příklady ze strany 10: 1) „V roce 1578 je pak zaznamenána epidemie v Paříži a roku 1640 popisuje Guillaume de Baillou projevy onemocnění. O 39 let později je onemocnění pojmenováno „pertussis“ (Mattoo et al. 2005),...“ Tento údaj je z review, není ocitována původní práce; 2) „....., které pravděpodobně vychází z latinského „tussis perennis“, tedy přetrvávající kašel (Cherry 1999).“ – citace opět na souhrnný článek z časopisu Clinical Infectious Diseases, kde tato informace patří k původní citaci „Holmes 1940“. Seznam literárních odkazů zahrnuje celkově 95 publikací, z toho pouze jedna citace je z roku 2015 a 5 publikací z roku 2013; celkově je z posledních 5 let pouze 12 publikací. | |
| Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE | |

Kolik metod bylo použito? 16 (přibližně)

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~

V kapitole Materiál a Metody se objevují některé (drobné) nedostatky jako

- Chybí seznam chemikálií, ani v textu nejsou uvedeny, od jakých výrobců byly chemikálie použity;
- Fosfatázový pufr (str.22) – není uveden objem výsledného roztoku, uvedeny jen navážky, stejně tak i u TBS pufru, 5 x koncentrovaný (str.24);
- Informace k „Pufr Laemli“, uvedeno pH 6,8. pH se u tohoto pufru se neměří, zřejmě je to informace o pH ke pufru Tris-HCl (str.23).
- V kapitole Materiál a metody o SDS-PAGE (str.34) by stačila i citace, jak se přesně polyakrylamidové gely dělaly, případně dát množství smíchaných látek do tabulky, v textu je to velmi nepřehledné. Dobré je uvádět i velikost gelů, také u definování nastavení zdroje napětí pro průběh separace bílkovin v mA je dobré uvádět velikost a počet gelů v aparatuře, dle toho se proud nastavuje.
- Purifikace proteinů systémem ÄKTA –bylo by vhodné doplnit typ použité kolony a jaký gradient soli NaCl byl použit v experimentu (str. 39), jde o zásadní informace k purifikaci bílkovin.
- Citace z Wikipedie u jednoho z obrázků (Obr.6, str. 43) není vhodným zdrojem informací pro diplomovou práci.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~

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

- Měla bych výhrady k popisku jednotlivých obrázků, grafů. Podle mě jsou velmi stručné a ne zcela vystihují základní otázku, co je na obrázku, př. str. 47, Obr. 7: začíná „A- PCR produkt *bopN*....“, nebo **Obr. 8: A-** Zkouška produkce proteinu BopN
- Také některé informace zcela chybí, u 1-DE gelů není uveden typ použitého standardu molekulových hmotností (to není uvedeno ani v metodice), na Obr. 25 (str. 74) zase popis standardu chybí. V legendě postrádám informace o nanáškách bílkovin na gel (kolik μg na dráhu), není uvedeno, zda se jedná o reprezentativní gel a kolik bylo děláno opakování, ani typ detekce proteinů na gelu (barvení), případně kolika procentní gel byl použit (tato informace je uvedena pouze v části Materiál a metody).
- Obr. 22 (str.70) nejsou uvedeny směrodatné odchylky měření. V legendě opět není uvedeno, zda se tedy jedná o reprezentativní graf a z kolika opakování.
- Obr. 23 (str.71) není uveden popis grafu. Nedohledala jsem, co znamená osa Y, která je uvedena v jednotkách pA. V textu se mluví pouze o vodivosti uvedené v odvozených jednotkách SI – Siemens.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

Diskuze:

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

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ~~ANO~~ NE částečně

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO ~~NE~~, ale jsou málo konkrétní.

Diskuze má celkově pouze 4 strany textu. Úvod diskuze je v pořádku a vysvětluje zaměření práce, autor konfrontuje svůj přístup s literaturou, v čem je tato práce přínosem. Další části jsou slabší a autor popisuje vlastní výsledky bez konfrontace s literaturou. Celkově se na dalších 3 a ½ stranách textu autor odkazuje pouze na 5, resp. 4 publikace (jedna práce pocházející z laboratoře Prof. Šeba je zmiňována 2x). Což se mi zdá nedostatečné s ohledem na to, že jsem v textu našla několik míst, kde citace chybí. Diskuze by se mohla více zabývat metodickým přístupem, např. problematikou, proč purifikované proteiny nebyly v dostatečné čistotě a jakým způsobem lze tomuto v dalších experimentech předejít.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO ~~NE~~

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

Formální úroveň práce je v pořádku a odpovídá nárokům kladených na diplomovou práci. Grafika obrázků, grafů i tabulek je v odpovídajícím rozlišení. Text je srozumitelný, s drobnými překlepy (např. kyselina, oslední), jazyková úroveň dobrá.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

V práci je řešena zajímavá a stále aktuální tematika mechanismů virulence bakterie *Bordetella pertusis* způsobující černý kašel. Práce splnila všechny nastíněné cíle a metodicky je velmi obsáhlá. Dokazuje to i počet stran věnovaný popisu materiálu a použitých metod (26 stránek) a také část výsledková (29 stránek).

Předkládaná práce je hodně zaměřená na metodiku, což dokazuje počet i náročnost provedených metod.

V práci se objevily nicméně i některé nedostatky, jako méně obsáhlý literární přehled (10 stran) a hlavně nedostatečná diskuze výsledků. Celkově je vidět množství odvedené práce, ale menší čas věnovaný interpretaci získaných výsledků.

Přes tyto dílčí nedostatky doporučuji předkládanou práci k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

- Zajímalo by mě, jaké jiné bakteriální toxiny kromě pertuzového toxinu působí na G proteiny hostitelské buňky?
- CR3 receptor hostitelské buňky je důležitým cílem pro tuto bakterii, můžete jej trochu blíže popsat- pro jaký typ buněk je charakteristický, zda jej využívají i jiné bakterie pro vstup do buňky?
- (str. 20) „Dále bylo prokázáno, že se protein Hfq účastní regulace produkce hlavních faktorů virulence, jako jsou adenylát cyklázový toxin a pertuzový toxin, což mělo za následek snížení míry virulence.“ Toto tvrzení tedy znamená, pokud je protein Hfq v buňce přítomen, a funkční, má negativní vliv na produkci hlavních toxinů a vede ke snížení virulence bakterie?
- V práci jsem nenašla žádnou informaci o tom, jak byly 1-DE gely hodnoceny, jaký byl použit software? Jakým způsobem byly pak definovány proteiny, které byly vybrány pro další identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. U těchto výsledků mi chybí statistické hodnocení dat.
- V části výsledky autor prezentuje tabulky (Tab. 4 a 6; str. 73 a 76) identifikovaných proteinů pomocí MS, celkově vybráno 18 proužků z 1-DE gelu a identifikováno 23 proteinů. Jde o původní tabulky, nebo nějakým způsobem upravené? Zdá se mi málo pravděpodobné, že by 1 proužek na 1-DE gelu obsahoval více méně pouze 1 protein.

Je možné, že jste v tabulce uvedl pouze majoritní protein z proužku, ale toto informace pak není uvedena v legendě.

- V práci používáte Laemli pufr, jehož složení jste trochu modifikovali. Proč přidáváte do tohoto pufru kromě mercaptoetanolu i DTT? Máte k tomu nějaký důvod?
- Proč si myslíte, že přípravou nových rekombinantních konstruktů získáte čistější Bop proteiny? V čem budou tyto konstrukty vylepšené?
- V práci byl nastíněn další průběh práce jako získání kvalitní specifické protilátky a důkladná proteomická analýza. Lze tyto perspektivy práce více rozvést, konkretizovat?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: