

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Lenky Saskové
„Signalizační proteiny eukaryotického typu a jejich vztah ke kompetenci a virulenci
***Streptococcus pneumoniae*“**

Oponent: RNDr. Jan Nešvera, CSc., Mikrobiologický ústav AV ČR

Doktorská disertační práce Mgr. Lenky Saskové se zabývá analýzou funkcí proteinfosfatasy a proteinkinasy eukaryotického typu u grampozitivní patogenní bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Vzhledem k tomu, že *Streptococcus pneumoniae* představuje značný problém epidemiologický, získané poznatky o úloze proteinkinasy a proteinfosfatasy v buněčných regulačních procesech mohou mít i význam praktický.

Úspěšné zvládnutí mimořádného počtu náročných biochemických a molekulárně-biologických metod umožnilo autorce dosáhnout prioritních výsledků. Dokumentovaný objem výsledků i jejich zpracování a interpretace svědčí o péli autorky a o jejich schopnostech pro vědeckou práci.

Vlastní disertační práce je svým rozsahem (111 stran, 29 obrázků a grafů, 14 tabulek) i obsahem srovnatelná s obvyklým standardem disertačních prací. Přehled literatury je přínosný zejména v tom, že přehledným způsobem shrnuje dosavadní literární údaje o velmi důležitém, ale poněkud opomíjeném jevu, přirozené kompetenci a transformaci bakterií. Svědčí o dobré teoretické připravenosti autorky, stejně jako rozsáhlý seznam citovaných publikací. Další část práce má poněkud netradiční uspořádání, kdy oddíly Materiál a metody, Výsledky a Diskuse, jsou uvedeny pro každou problematiku zvlášť. Vzhledem k tomu, že při studiu funkce proteinfosfatasy byly používány jiné metody než při studiu funkce proteinkinasy, pokládám těsnější spojení popisu metod s výsledky, které byly jejich pomocí dosaženy, za vhodné. V případě Diskuse bych ovšem dal přednost tradiční interpretaci výsledků jako celku, protože mezi oběma studovanými enzymy existují funkční vztahy, které by bylo vhodnější diskutovat ve vzájemných souvislostech. Z obou oddílů Materiál a metody je patrná mimořádná metodická náročnost řešené problematiky. Stručně a přehledně zpracované Výsledky jsou dokumentovány řadou obrázků a grafů. Bohatá diskuse podrobně rozebírá získané výsledky a svědčí o interpretačních schopnostech autorky.

K práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Z jakých důvodů byl pro uvedená studia zvolen kmen *Streptococcus pneumoniae* CP1015, případně jeho derivát CP1095, a nikoli některý z kmenů, u nichž je známá úplná sekvence genomu? Na začátku Výsledků (str. 40) pak není uvedeno, v kterém z používaných kmenů byl gen *phpP* inaktivován.
2. Pro testování předpokládané inhibice exprese genu *phpP* působením *antisense* RNA po indukci nisinem byl sledován předpokládaný fenotypový projev (lyze buněk, tvorba proteinu PhpP). Bylo testováno (např. hybridizací), zda se *antisense* RNA po indukci opravdu syntetizuje?
3. Hodnoty v Tabulce 3.6 jsou hodnoty průměrné?
4. V Tabulce 3.2. chybí sekvence oligonukleotidu CAT2.
5. V posledním odstavci oddílu 4.3.1 (str. 75) se uvádí, kmen Δ *stkP* není schopen se vyrovnat s teplotním stresem, ale s ostatními stresy se částečně vyrovnává. Podle Obrázku 4.4.C je ale zcela potlačen růst kmene Δ *stkP* i osmotickým stresem.
6. V textu (str. 75 a str. 91) je uvedeno 95 genů, jejichž exprese je ovlivněna v kmenu Δ *stkP*, zatímco v příslušných tabulkách je uvedeno 96 genů. V Tabulce 4.4. je uvedeno 48 genů, jejichž exprese je v kmenu Δ *stkP* snížena, zatímco v odpovídajícím textu (str. 76, 1. ř.) se uvádí 47 genů.
7. V textu (str. 76, 2. ř. zdola; str. 95 – 96) se píše o transportním systému PiuA, zatímco příslušné geny (operon *spr1684-spr1687*) jsou v Tabulce 4.4. označeny *fatD*, *fatC*, *fecE* a *fatA*
8. V textu (str. 80) je uváděn operon hypotetických genů *spr1023-spr1026*, zatímco v Tabulce 4.5. a na Obrázku 4.6. jsou tyto geny označeny *spr1623-spr1626*.
9. Z nepřesných formulací a drobných formálních nedostatků uvádím např. výraz „oba proteiny jsme klonovali“ (str. 23, 9. ř. zdola) a některé anglicismy (indukce kompetence je kontrolována kompetenci stimulujícím peptidem, Δ *stkP* mutantní kmen).

Uvedené připomínky nijak nesnižují vysokou odbornou úroveň předložené doktorské disertační práce, která jasně prokazuje schopnost autorky samostatně vědecky pracovat a interpretovat získané výsledky. Proto doporučuji přijmout práci k obhajobě.

