

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Branislav Večerek CSc.
	Datum: 23. 8. 2018
Autor: Veronika Kincová	
Název práce: Role proteinu BopN v sekrečním aparátu typu 3 u bakterií rodu <i>Bordetellae</i>	
Cíle práce: 1) Zkonstruovat kmen bakterie <i>Bordetella bronchiseptica</i> D445 s deletovaným genem <i>bopN</i> a rovněž kmeny s delecemi v genech <i>bscN</i> a <i>bteA</i> , které budou sloužit jako experimentální kontroly 2) Navrhnout a vytvořit reportérové systémy pro sledování aktivity sekrečního systému typu 3 tak, aby bylo umožněno stanovit sekreci substrátových proteinů T3SS do média a později i translokaci efektorů do cytozolu eukaryotických buněk 3) Objasnit vliv vápenatých iontů na sekreci skrze sekreční systém typu 3 do média a určit roli proteinu BopN v této regulaci	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 122 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? 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	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? více než 10 Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
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	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	

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

Formální úroveň je velmi dobrá, práce je napsána srozumitelně a s minimem chyb. Grafická úroveň je také velmi dobrá, práce je dobře členěna. Připomínku mám k používání jména rodu *Bordetella*, v práci je téměř výhradně použit výraz *Bordetellae*, který je v angličtině používán pro obecné označení všech druhů tohoto rodu, používá se však výraz *bordetellae*.

V některých případech vede doslovný překlad z angličtiny k zvláštním formulacím, např. několikrát se v práci opakuje „vliv na sekreci skrze sekreční systém“, proč ne „vliv na funkci sekrečního systému“?

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce splnila zadané cíle, studentka si nejen osvojila základy experimentální práce, ale získala i řadu sice předběžných ale velmi zajímavých výsledků. Černý kašel, způsobený bakteriemi *Bordetella pertussis*, je v posledních letech na vzestupu ve vyspělých zemích včetně ČR. Funkce a regulace T3SS u r. *Bordetella* stále ještě není zcela vysvětlena a předložená práce je proto velmi vítaná. Zvláště funkce BopN proteinu není úplně jasná a dosud publikovaná data poskytují pouze vágní představu. Autorka připravila celou řadu užitečných konstruktů a reportérů, které určitě pomohou zodpovědět řadu otázek týkajících se role tohoto faktoru v patogenezi černého kašle. Lze předpokládat, že na tuto práci bude navazovat dizertační práce, kde budou všechny tyto výsledky optimálně využity a dále rozvíjeny. Nejen z tohoto důvodu hodnotím tuto práci jako velmi kvalitní.

Otázky a připomínky oponenta:

K literárnímu úvodu mám několik připomínek:

1. Str. 15, důvodů k návratu černé kašle je řada, ale dva jsou v současné době považovány jako zásadní, snížená efektivita současných vakcín a adaptace patogenu na vakcinaci. Role adaptace je zde velmi upozaděna na polovinu věty („za uvážení stojí evoluce *B. pertussis*“).
2. Str. 17, vazba BvgA k regulovaným promotorům způsobuje pouze aktivaci transkripce! Za represi *vrg* genů je zodpovědný BvgR a RisAS systém, ty však nejsou v práci příliš zmíněny.
3. Str. 27, na špičce jehly se nachází pouze protein Bsp22, translokátory BopB a BopD jsou nejprve sekretovány, pak vytváří pór v membráně hostitele a teprve potom interagují s Bsp22 a dojde tak k připojení jehly a propojení obou cytosolů.

Experimentální část: výsledky jsou většinou diskutovány v dostatečném rozsahu, u některých experimentů mi ale diskuze chybí, zvláště v případech kdy výsledek neodpovídá předpokladu.

1. Obrázek 25, v peletu $\Delta bteA$ kmenu lze pomocí Western blot metody detekovat signál, který odpovídá BteA proteinu, jedná se o nespecifický signál?
2. Obrázek 42, proč nebyl v experimentu použit i $\Delta bopN$ kmen (pro porovnání s $\Delta bteA$ a $\Delta bteA \Delta bopN$ kmeny) zvláště když pak byl použit pro proteomickou studii?
3. Obrázek 43, jak si vysvětlujete sekreci Bsp22 v médiu s 2 mM vápníkem? (sekrece ostatních substrátů byla výrazně redukována!)
4. Tabulka 2, popsání efekty vápníku na sekreci jsou přesně opačné než ty, které vyplývají z dat v tabulce (např. pelet wt/wt + Ca má hodnotu 3,31, což by naznačovalo, že v nepřítomnosti vápníku je proteinu BopD 3x více v peletu což odporuje popsáním výsledkům). Dále není diskutován protein BopB, který je oproti všem ostatním T3SS substrátům v přítomnosti vápníku sekretován ve zvýšené míře, máte nějakou představu proč tomu tak je?

Drobné připomínky:

Str. 81, v práci nemohl být použit plazmid pBBR1, neboť neobsahuje použítá klonovací

místa, jedná se nejspíše o plazmid pBBR1MCS, který obsahuje „multiple cloning site“ z plazmidu pUC18.
Obrázek 31, plazmidy jsou zde špatně označeny, pro klonování byl alespoň dle popisu experimentu použit vektor pBBR1 AC.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: