

Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Tomáš Kouba:

Vliv DNA elementů na aktivitu a regulaci rRNA promotorů u *Bacillus subtilis*

Diplomová práce se zabývá hledáním sekvenčních prvků promotorů *Bacillus subtilis* majících vliv na regulaci iniciace transkripce koncentrací iniciačního nukleotidu. Regulace funkce promotorů genů pro rRNA je u *B. subtilis* zřejmě zcela odlišná od regulace popsané u *Escherichia coli* a z tohoto důvodu jsou poznatky o mechanismu regulace velmi zajímavé.

Práce má 86 stran (Literární úvod 27, Materiál a metody 22, Výsledky 19 a Diskuse 5).

Literární část dostatečně uvádí do problematiky, je rozsáhlá, přehledná, srozumitelná a logicky uspořádaná. Text je doplněn velkým počtem obrázků. Tyto obrázky jsou však převzaté z odborných prací a autor se nepokusil je ani modifikovat, tím méně tvořit obrázky vlastní. V obrázcích zůstaly i prvky, které se k výkladu přímo nevztahují, a také anglické texty. Schopnosti autora pracovat s grafikou v počítači by jistě umožnily vytvořit vlastní, výstižnější a instruktivnější obrázky.

Počet chyb, anglicismů a neobratných formulací v literárním přehledu i dalších částech nepřesahuje běžný standard diplomové práce. Autor některými výrazy a formulacemi – i když poměrně vzácně – dokládá zhoubný vliv médií na český jazyk. Např. na str. 6: „úvod...stručně **mapuje** současný stav poznání“ (tedy nikoliv popisuje či dokládá). Další jazykové prohřešky shledávám spíše v používání anglicismů, z nichž mě nejvíce zaujala formulace na str. 33: „...tato diplomová práce **adresuje** tuto otázku.“ Str. 17 „G a C bohatý diskriminátor“, str. 38 resinové částice, str. 40 mercaptoethanol, str. 43 forward a reverse vlákna, str. 43 cycler. U nepřeložitelných nebo běžně používaných odborných anglických výrazů je vhodné používat kurzívu.

Další drobné chyby a nedostatky: str. 13: „podjednotky mají kruhový tvar“; str. 13: místo Å by měly být používány nm; str. 33: poslední řádka: adenin není nukleotid; str. 39: „falkonky“. Tabulka 1 na str. 16 je nevhodně uspořádaná. Jednotky času se zkracují s, min, h. Na str. 42 je přesně popisována příprava gelu („agaróza rozvařena v mikrovlnné troubě, ochlazená tekoucí vodou...“), ale v závěru postupu jen zmíněno: „U plazmidů byla zkoumána kvalita a kvantita“ bez dalších podrobností. Autor se mnohde neubrání textovému editoru, který po teče vnucuje velká písmena (*E. Coli*, *B. Subtilis*). Použité anglicismy jsou odbornou veřejností z větší části ignorovány a dráždí dnes již jen staromilce. Str. 17: Doporučovaný český termín pro *consensus sequence* je „konvenční sekvence“ (i „konsensus“ je snad přijatelný). Co je zde míněno „nekonvenčními hexamery?“

Metody jsou popsány podrobně, přehledně a dostatečně. Mnohé údaje jsou uváděny v tabulkách, které však nejsou číslovány (např. str. 47).

Výsledky jsou psány stručně a výstižně. Tato hutná, ale logická a srozumitelná forma umožňuje čtenáři snadno sledovat průběh experimentálních prací, které se odvíjejí jako napínavý příběh. Výsledky jsou zjevně podloženy obrovským množstvím experimentů, které vedly k potvrzení vytčené pracovní hypotézy a vytvoření velmi ucelené práce. Autor při tom

použil velký počet pokročilých metod a prokázal tak svoje technické schopnosti. Měl zřejmě i značnou dávku štěstí, protože výsledky do sebe výborně zapadají a vytvářejí nakonec jednoznačný a jasný závěr. Výsledky jsou velmi dobře dokumentovány výstižnými obrázky.

Výtky:

Str. 59: Tabulka 2: Sloupce „genotyp“ a „rezistence“ jsou zbytečné, protože údaj je ve všech případech stejný. „Koncentrace plazmidové DNA“ spíše než „koncentrace plazmidů“.

Str. 60, obrázek 35: Jak bylo prokázáno, že horní pás obsahuje chromosomovou DNA? Domníval bych se spíše, vzhledem k jeho ostrosti, že obsahuje jinou konformační formu plazmidové DNA.

Str. 70: U obrázku 46 by mělo být uvedeno, že se jedná o hypotézu.

Str. 72: Text „Vyhodnocení primárních dat“ u obrázků 48 a 49 nic neříká.

Otázky:

1) Závisí dle názoru autora studovaná regulace promotoru pouze na sekvenci oblasti -10 a diskriminátoru, nebo též na fyzikálně-chemických vlastnostech vlákna DNA (ohyb DNA, stabilita a flexibilita dvoušroubovice, tendence tvořit určitou konformaci). Mohou zcela odlišné sekvence DNA určovat téměř stejnou regulaci zkoumaného typu?

2) Dá se předpokládat, zda citlivost ke koncentraci $iNTP$ bude zvyšována hexamerem -10 s vyšší nebo nižší podobností konvenční (konsensus) sekvenci? Je dlouhý poločas rozpadu komplexu RP_0 (a tím ztráta regulace) při použití RNAP z *E. coli* dán pevnou vazbou RNAP na promotor, jehož sekvence je u *B. subtilis* velmi blízká konvenční sekvenci?

Práce má celkově vysokou úroveň. Velký počet experimentálních údajů je dobře zpracován a interpretován. Práce je uzavřena potvrzením hypotézy. Předkládaná práce dle mého názoru zcela splňuje požadavky na kvalitu diplomové práce. Doporučuji proto jednoznačně přijmout práci k obhajobě.



Ing. Miroslav Pátek CSc.

12.5. 2008