

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Václav Vopálenský

Datum:

16.9.2010

Autor:

Lukáš Dvořáček

Název práce:

Podjednotka delta bakteriální RNA polymerázy a její role v regulaci genové exprese u *Bacillus subtilis*

Cíle práce

V této práci jsou definovány dva hlavní cíle práce. Za prvé je to potvrzení přítomnosti neobvyklých nukleotidů asociovaných s delta proteinem. Dalším cílem bylo ověřit vliv podjednotky delta RNA polymerázy na iniciaci transkripce *in vivo*.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): celkem 100 stran

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO, ale vcelku stručný

Je uveden seznam zkratk? ANO, ale ne zcela úplný

Literární přehled:

Odpovídá tématu? vcelku 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? víceméně ANO, občas by ovšem bylo vhodnější citovat „původní“ práci a nikoliv přehledové články.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? Více než 20

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, až na kapitolu 7.1.2., kde bych uvítal lepší Dokumentaci experiment;

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO, použitá paleta experimentálních technik je dostačující, nicméně některé z těchto experimentů by bylo třeba zopakovat

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? Spíše jde o shrnutí výsledků než o diskuzi v pravém slova smyslu

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO, ale pouze sporadicky

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):

Po formální stránce je práce vcelku v pořádku, až na, alespoň dle mého názoru, vcelku minimalistické provedení jak českého tak i anglického abstraktu a na ne zcela úplný seznam zkratk. Stejně tak v kapitole Materiál, by se měl ocitnout veškerý použitý materiál. Zkratka *et al.* by se měla uvádět v kurzívě, což autor činí, s výjimkou všech obrázků. Poslední formální výtka je použití číslování stránek, s číslováním se obvykle začíná až u abstraktu.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. S ohledem na bohatou metodiku a s přihlédnutím k dobrému formálnímu vypracování této diplomové práce se jedná o práci vcelku zdařilou.

Otázky a připomínky opONENTA:

Nejprve bych si dovolil pár připomínek:

- 1) Rozhodně bych v této práci nepoužíval obrázky převzaté z Wikipedie (obr. 1 a 7)
- 2) Co se literárního úvodu týče, je dle mého názoru, alespoň na stranách 10-16, příliš „učebnicový“, a do jisté míry, v tomto provedení, vcelku zbytečný
- 3) U obrázku 14 (str. 31) není zřejmá koncentrace NTPs.
- 4) Pokud zmiňujete svoji bakalářskou práci (str. 32), bylo by dobře jí řádně citovat
- 5) Jaké strukturní homology jsou uvedeny na obrázku 15 (str. 33)?
- 6) Jaký je rozdíl mezi maximálním zrychlením a maximálním odstředivým zrychlením? V práci operujete s oběma termíny.
- 7) O seznamu použitých přístrojů a materiálu jsem se již zmiňoval, je vcelku neúplný, neucelený, nepřesný.
- 8) Kapitola metody by mohla být uspořádána logičtěji, např. popis štěpení PCR reakce bych navrhoval uvést ZA samotný popis provedení PCR apod. Většinou nejsou uvedeny přesné koncentrace složek jednotlivých reakcí (např. u PCR), případně jsou uvedeny ne zcela přesně (koncentrace primerů použitých k sekvenování je 3 – 10 pmol)
- 9) Opravdu jste inkuboval štěpený vektor s alkalickou fosfatázou 6 hodin? A stejně tak, opravdu jste štěpil PCR amplifikovaný produkt (není uvedeno, zda byl přečištěný) také 6 hodin?
- 10) Jakou revezní transkriptázu jste použil na „primer extension“?
- 11) Opravdu jste centrifugoval Ni-NTA agarózu při 15 000g?
- 12) Termín „noční“ kultura, který je v této práci hojně užívaný není dle mne ideální
- 13) Urea se překládá do češtiny obvykle jako močovina.

A nyní pár otázek:

- 1) Velmi často se zmiňujete, že třeba relativně vysoká koncentrace NTP pro iniciaci transkripce (např. str. 28), nicméně nikde neuvádíte žádný konkrétní údaj. Jaká koncentrace je tedy třeba?
- 2) Na straně 16 uvádíte, že se u *B. subtilis* ppGpp váže na podjednotku β' . Kam se váže u *E. coli*? Na straně 25 uvádíte, že to není známo, což mne trochu překvapuje. Jak moc je homologní podjednotka β' u *B. subtilis* a *E. coli*?

- 3) Pozorovali jste přítomnost cyklických nukleotidů opakovaně nebo šlo pouze o jediné pozorování?
- 4) Už jsem se zmínil o kapitole 7.1.2. Zde postrádám obrazovou dokumentaci provedených experimentů (PCR, ověření klonování, případně sekvenace a ověření integrace expresní kazety do chromozomu). Podařilo se Vám vyizolovat alespoň malé množství proteinu?
- 5) V grafu na straně 85 jsou dle Vás vynesena data ze dvou nezávislých experimentů. Jednalo se o biologická či technická opakování? Jak moc získané hodnoty kolísaly? A jaké hodnoty jste nakonec vynesl do grafu?
- 6) Na straně 86 a 87 opět uvádíte, že jde o dva nezávislé experimenty. Stejná otázka, jednalo se o biologická či technická opakování? Na straně 87 máte uvedené vyhodnocení experimenty ve formě grafu. Nepřijde mi optimální počítat ze DVOU hodnot směrodatnou odchylku.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: