

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Václav Vopálenský
	Datum: 25.5.20112
Autor: Jitka Jirát Matějčková	
Název práce: Interakce vybraných bílkovin s RNA polymerázou z <i>Bacillus subtilis</i> .	
<b>Cíle práce</b>  Všechny cíle práce se týkají charakterizace $\delta$ podjednotky RNA polymerázy z <i>B. subtilis</i> .  Konkrétně se jedná o 1/ hledání potenciálních vazebných partnerů $\delta$ podjednotky RNA polymerázy; 2/ přípravu delečních mutant $\delta$ podjednotky RNAP; 3/ hledání analogů či homologů $\delta$ podjednotky v různých organismech.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO Rozsah práce (počet stran): 107 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? víceméně ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO, autorka cituje 135 prací	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? cca 9  Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, některé postupy (izolace plastidové DNA pomocí komerčních souprav) jsou popsány zbytečně podrobně	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? spíše NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO, ale ne příliš extenzivně Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? částečně	
<b>Závěry (Souhrn) :</b> Jsou výstižné? ANO	

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

Formální úroveň práce je velmi dobrá, překlepy se vůbec nevyskytují, kvalita obrázků je dostatečná, anglikanismů je pomálu (pausing – str. 25). Jazyková úroveň je vynikající, obecně je práce „čtivá“ s logickým tokem textu.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

**Cíle práce byly splněny. Nepodařilo se prokázat interakci mezi YxbF a  $\delta$  podjednotkou RNA polymerázy, což je ovšem samo o sobě také „pozitivní“ výsledek. Ostatní naplánované cíle byly splněny. Navzdory všem zde uvedeným připomínkám doporučuji práci k obhajobě.**

**Otázky a připomínky oponenta:**

Nejprve bych si dovolil pár připomínek, některé z nich jsou spíše formálního charakteru:

1/ na několik místech v Literárním úvodu jsem nabyl přesvědčení, že se neopíráte o příliš aktuální data/publikace. Těžko věřit tomu, že kompetence u *B. subtilis* byla popsána v roce 2006, jak se čtenáře snažíte přesvědčit na str. 11. Na straně 20 uvádíte: „Zatím nejsou známy kompletní informace (struktura, biochemie, genetika) ani o jedné bakteriální RNAP“, s tím bych nesouhlasil, ani kdybyste toto tvrzení podepřela citacemi novějšími než z roku 1999 a 2000. Jsem také hluboce přesvědčen, že o molekulárním mechanismu syntézy RNA (str. 23) jsou k dispozici daleko novější a přesnější informace, než v práci uvádíte (citace 1994).

2/ občas se nevyhnete nesprávnému citování, např. na straně 11 uvádíte, že cizorodá DNA vstupující do *B. subtilis* se následně může integrovat do genomu (citujete Dubnau and Losick, 2006). Ve skutečnosti se ovšem jedná o review, správná citace by byla Chen *et al.*, 2005.

3/ u obrázku 1 na straně 12 je internetový odkaz, který není správný/funkční.

4/ Tvrzení, že TCRF opravuje chyby v DNA v průběhu transkripce (str. 32) asi není zcela vhodné.

5/ V kapitole Materiál a metody uvádíte i lokace i jednotlivých firem, přičemž občas bych si dovolil nesouhlasit (Serva je německá firma, Sigma naopak americká; na str. 44 má být Biometra D62; M.G.P. či MGP; Roche máte uvedeno jak USA, tak i Německo apod.)

6/ Seznam Chemikálií není úplný, nejsou zde uvedeny některé použité sloučeniny následně zmiňované u jednotlivých postupů (TEMED, alkalická fosfatáza, glycerol, souprava na sekvenaci DNA).

7/ není uveden původ používaných kompetentních buněk, případně postup jejich přípravy.

8/ Diskuse je z mého pohledu spíše souhrnem výsledků. Určitě by bylo vhodné rozvést možná pokračování započatých analýz, experimentů atd.

A nyní pár otázek:

1/ Jak je chráněná maturovaná bakteriální mRNA před degradací ve srovnání s RNA

nematurouvanou? (strana 13)

2/ na straně 20 uvádíte: „*B. subtilis* a *E. coli* se liší v rozpoznávání terminačních signálů a mechanismu terminace transkripce“. Na straně 26 uvádíte: „U *B. subtilis* není protein Rho esenciální a převládá Rho-nezávislá terminace transkripce“ Jak se tedy liší terminace Rho-nezávislá terminace transkripce mezi *E. coli* a *B. subtilis*?

3/ Velmi mne zaujal koncept nanoRNA (strana 21). Kde se tyto krátké RNA berou, mají nějakou definovanou sekvenci, mohou být i delší?

4/ Velmi často uvádíte, že NTP a CTD domény  $\delta$  podjednotky RNAP *B. subtilis* jsou spojeny 7-9 lysiny. Stejně tak uvádíte, že  $\delta$  podjednotka se skládá ze 173 AK. Jak tomu tedy u *B. subtilis* vlastně je?

5/ na straně 46 i dále v textu uvádíte, že k produkci proteinů byl použit kmen *E. coli* BL21. Dle mého názoru jste použila kmen BL21(DE3).

6/ jaký je důvod začlenění 1 cyklu o teplotě nasedání primerů 56 °C při PCR reakcích (str. 55)?

7/ orientace PCR primerů se obvykle udává ve směru 5' - 3' (strana 70 a 83). Předpokládám, že to máte pouze špatně označené v textu diplomové práce.

8/ pokoušeli jste se nějakým způsobem optimalizovat produkci YwC (jiné produkční podmínky/jiný expresní kmen apod.)

9/ Dle mého názoru jsou na obrázku 26 (strana 78) v PAAGE elektroforéze patrné nějaké nespecifické proteiny při izolaci  $\Delta\delta$ RNAP. Je to možné? A pokud ano, o jaké proteiny se jedná?

10/ Myslíte si, že denaturace YxbF je dostačující „negativní“ kontrola? (strana 80)

11/ Z čeho vycházejí struktury na straně 82 (obrázek 30)? Jde pouze o predikce (jakým softwarem) či se jedná o krystalografické analýzy (citace)?

12/ Dle obrázku 32 (strana 84) se nezdá, že by purifikace zkrácených forem  $\delta$  podjednotky proběhla příliš dobře, minimálně ve srovnání s čistotou purifikované  $\delta$  podjednotky. Proč tomu tak je? A jaké bude schéma následných experimentů se zkráceninami  $\delta$  podjednotky?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: