

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Michaela Schierová
	Datum: 20.5.2012
Autor: Tereza Šoberová	
Název práce: Studium vlivu fyzikálních a chemických stresů na vznik mutátorového fenotypu u <i>Bacillus subtilis</i>	
Cíle práce: Autorka se zabývá frekvencí vzniku mutací a frekvencí vzniku kolonií s mutátorovým fenotypem za podmínek stresu u půdní bakterie <i>Bacillus subtilis</i> .	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 109 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? V práci postrádám novější studie (s výjimkou práce kolegy Nunváře z roku 2009 a sborníku z roku 2011 pocházejí nejmladší práce z roku 2008). Některé poznatky jsou pouze zmíněny, aniž by se řešily souvislosti. Zároveň bych chtěla zdůraznit, že literární přehled Terezy Šoberové je zaměřen odlišně než přehled v předcházející diplomové práci Jaroslava Nunváře. Jsou použité literární zdroje v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Počet metod je těžké definovat, zahrnují metody klasické mikrobiologie a základní metody práce s DNA. Jsou metody srozumitelně popsány? Některé metody nejsou dobře popsány, bohužel to platí hlavně pro metody specifické pro tuto práci.	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? zpravidla ANO, NE vždy. U grafů by bylo vhodné lépe popsat osy y, doplnit údaje pro výpočet korekčního koeficientu a následně mutační rychlosti. Chybí údaj o vztahu OD, měřené při různých vlnových délkách, a počtu buněk. U kapitoly 4.4. zcela chybí dokumentace. 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? spíš NE

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Celkový vzhled práce je velmi dobrý, obsahuje řadu obrázků, které jsou opatřeny vhodnými legendami. Grafy mají přiměřenou velikost i legendu. Méně kvalitní jsou, bohužel, snímky ploten, dokumentující mutátorový fenotyp. Stylistická úroveň práce je velmi dobrá. Je proto velká škoda, že práce obsahuje značné množství gramatických chyb.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Tereza Šoberové prokázala, že je schopna zpracovat zadané téma po stránce teoretické i experimentální. Provedla a vyhodnotila řadu experimentů, které potvrdily výsledky předchozí diplomové práce. Zejména při sledování transkripční aktivity operonu *mutSL* a genu *ctc*, který je součástí operonu obecné stresové odpovědi, získala velmi zajímavé výsledky. Bez pochyby splnila požadavky kladené na diplomové práce na naší katedře, a doporučuji proto její práci k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) Na str. 17 mi chybí vysvětlení, jakým způsobem brání MMR rekombinaci.
- 2) Na str. 22 mi chybí charakteristické vlastnosti dvou zmíněných skupin σ faktorů.
- 3) Na str. 23 uvádíte, že proteiny a DNA jsou buněčné struktury.
- 4) Na str. 28 postrádám podrobnější informace o genu *ctc*, který je předmětem studia ve Vaší práci.
- 5) Na str. 29 uvádíte, že se adaptace na vysokou teplotu u *B. subtilis* zúčastňují 3 třídy regulačních proteinů. Můžete blíže specifikovat jejich vzájemný vztah?
- 6) Transkripční aktivitu *ctc* a MMR jste měřila pomocí reportérového genu *lacZ*. Ověřovala jste, že není před měřením nutné odstranit buněčné debris z lyzátu? Jak dlouho trvala inkubace s ONPG? Zjištěné hodnoty aktivity beta-galaktosidázy jsou vztaženy na jednotkovou OD, nikoliv na hmotnost proteinů? Předložené výsledky byly ověřovány nezávislou kultivací nebo jsou jen průměrem 3 odběrů z téže kultury?
- 7) Proč se při měření OD u *B. subtilis* používá odlišná vlnová délka než u *E. coli*? V práci používáte několik různých vlnových délek, aniž by to bylo vysvětleno (od 450 do 595nm).
- 8) Při měření korekčního faktoru, mutační rychlosti a při izolaci mutátorového genu používáte několikastupňové kultivace, avšak princip jednotlivých kroků není vysvětlen. To velmi znesnadňuje pochopení závěrů uváděných v Experimentální části a pravděpodobně i pochopení popisů os y u růstových závislostí.

- 9) Při PCR analýze potenciálních mutátorových klonů jste navzdory testování několika párů primerů nezískala produkt v odpovídající molekulové hmotnosti. Použila jste jinou, ověřovací PCR reakci, abyste prokázala, že izolovaná chromozomální DNA je v dostatečné kvalitě a v odpovídající koncentraci? Koncentrace templátu uvedená v tabulce je podle mého názoru nadbytečně vysoká. Bylo by vhodné uvést schéma, ze kterého by vyplynula vzájemná poloha ověřovacích primerů a délky očekávaných produktů.
- 10) Budou Vámi nalezené mutátorové klony dále testovány? Ověřovala jste dále rezistentní fenotyp u získaných kolonií, mutační rychlost, růstové vlastnosti atd.?
- 11) V Metodické části uvádíte atypický režim ligace, ale chybí u něj citace. Můžete vysvětlit, proč takový režim používáte?
- 12) U horizontální elektroforézy uvádíte hodnoty napětí ve V/cm^2 . Prosím, vysvětlete proč.
- 13) Nerozumím, jak lze z tabulky 2 na str.68 určit korekční faktor.
- 14) Ve Výsledcích často nesprávně zaměňujete pojmy aktivita beta-galaktosidázy, její koncentrace, její hodnota.
- 15) Můžete vysvětlit, proč křivka závislosti aktivity beta-galaktosidázy pod kontrolou promotoru *mutSL* na OD u kultury rostoucí při 28°C je více kostrbatá ve srovnání s kontrolní křivkou?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

RNDr. Michaela Schierová, PhD.