

## Posudek oponenta na diplomovou práci

xx oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Irena Lichá, CSc.
	Datum: 4.6.2014
Autor: Bc. Jiří Pospíšil	
Název práce: Charakterizace Ms1, nově identifikované malé RNA z <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	
<b>Cíle práce</b>  Hlavním cílem práce bylo pokusit se o bližší charakterizaci nově objevené malé RNA (Sm1) z <i>Mycobacterium smegmatis</i> . Dílní cíle byly připravit a optimalizovat transkripční systém in vitro, pro <i>Mycobacterium smegmatis</i> a otestovat vliv vybraných sigma faktorů a SM1 na transkripci. Provést vazebné testy Ms1 a jejich mutovaných variant s purifikovanou RNAP s <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Rozsah práce (počet stran): 90 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Je uveden seznam zkratk? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Je napsán srozumitelně? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Dále oceňuji též uvedení recentních výsledků laboratoře, na které v experimentální části autor navazuje.	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Kolik metod bylo použito? Byly použity metody základní – pěstování mikroorganismů, PCR, klonování, elektroforetická analýza DNA, RNA i proteinů, izolace plazmidů a RNA, restriční analýza, atd., dále autor zvládl techniky pokročilejší a to izolace proteinů s His kotvou, jednak nadprodukovaných, jednak fúzovaných s kotvou v chromosomu <i>Mycobacterium smegmatis</i> , gelovou retardací, nativní proteinovou elektroforézu, in vitro transkripci, jednak na komerčním systému pro <i>E.coli</i> , tak optimalizoval systém vyvinutý v laboratoři pro <i>Mycobacterium smegmatis</i> .  Jsou metody srozumitelně popsány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Je dokumentace výsledků dostačující? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> – co chybí, v čem je nedostačující?	

Autorovi se nepodařilo zopakovat a optimalizovat in vitro transkripci s vazbou MS1, ale práce na diplomové práci je časově limitovaná a tento fakt nesnižuje kvalitu práce.

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO ~~NE~~  
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~  
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO ~~NE~~  
Diskuze je relativně krátká, což asi vyplývá z frustrace autora, že některé experimenty ne zcela vyšly, ale diskutuje možné chyby a navrhuje další řešení.

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO ~~NE~~  
Závěry nejsou napsány v bodech, tak jak je obvyklé, a autor zároveň tak trochu při jejich formování pokračuje v diskusi.

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

Formální úroveň práce je velmi dobrá, jak přehledová, tak i experimentální část je doplněná obrázky v dobré kvalitě, v experimentální části téměř publikační. Práce je psána česky, a úroveň slohu se různí podle částí. Literární přehled je napsán srozumitelně a dobrou češtinou, v části Materiál a metody se autor nevyhnul užívání laboratorního slangu, přestože tato kapitola patří k nejrozsáhlejším a nejpodrobnějším a bude zcela určitě dobrým průvodcem dalším studentům při opakování pokusů.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

**Cíle práce byly splněny, i když se autorovi ne všechny pokusy zdařily, tak jak by si asi představoval a některé experimenty bude potřeba zopakovat či optimalizovat. Práce má nejen velmi dobrou formální úroveň, ale autor zvládl celou řadu netriviálních molekulárně genetických technik, své výsledky adekvátně interpretoval a diskutoval. Autor práce, tak jak jí dokumentoval a sepsal v předložené diplomové práci, zcela jasně prokázal schopnost experimentálně pracovat, své výsledky vyhodnotit a prezentovat, čímž splnil požadavky kladené na diplomovou práci a předloženou práci doporučuji k obhajobě.**

**Otázky a připomínky oponenta:**

Nicméně i přes velice kladný dojem, mám k práci několik připomínek a poukázání na chyby v dokumentaci výsledků.

Str. 19. Kap 3..1.1. duplikace slov „ve směru“

Str. 66 – je popis obrázku správný? V titulu je ukázka analýzy PCR amplifikace... v textu obrázku je, že plazmid je štěpený restrikcí endonukleázami.

Str. 68 – při popisu dvou paralelních izolací uvádíte dva kmeny, ale označení mc<sup>2</sup>155 je Vámi uvedeno v tab. 2 jako genotyp u obou kmenů a ne název kmene. Mimochodem o jaký genotyp jde?

Na str 67 – uvádíte, že docházelo k agregaci proteinu, všech nebo nějakého konkrétního a kterého?

Na str 67 a 68 na obrázcích 26 a 27 je jako podjednotka  $\alpha$  označen protein o různé velikosti (na obr 26 – 30 kDa a na obr. 27 40 kDa). V Literárním úvodu uvádíte velikost 37 kDa.

Str 72 – legendak obrázku 29, co znamená tvrzení, že podtržené úseky značí promotorovou sekvenci u MS1 mutovaných, o jaké promotorové sekvence jde a proč nejsou u WT?

Otázky:

1. Na str.24 - píšete v literárním úvodu, že „syntéza pRNA může být zahájena pouze za přítomnosti dostatečného množství nukleotidů – trifosfátů (NTP), nebo dinukleotidů.“ Jakých dinukleotidů?
2. Str 68 – Byl u paralelní izolace RNAP z kmene bez fúze RNAP s 6x his proveden též krok s heparinovými kuličkami?
3. V diskusi v kap 8.2 zmiňujete blíže nespecifikované technické důvody, které neumožnily rozhodnout, zda se MS1 může vázat i na holoenzym. Můžete specifikovat?
4. Máte nějakou pracovní hypotézu, co je protein o velikosti 60 kDa, který byl kopurifikován při Vašich izolacích RNAP a o kterém se domníváte, že interaguje s Vašimi pokusy.
5. Jaké je uspořádání genů podjednotek RNA polymerázy u *Mycobacterium smegmatis* a proč jste pro její přípravu volili fúzi s 6x His v chromosomu?
6. Jsou popsány v literatuře nějaké informace o tom v jakém poměru je syntetizována RNAP a sigma podjednotky v buňce?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

x  výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: