

Oponentský posudek diplomové práce Jiřiny Josefiové.

Diplomová práce Jiřiny Josefiové se zabývá studiem genů zodpovědných za osmoadaptaci u grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*. Cílem práce bylo nalézt geny pro vysokoafinitní systém transportu draslíku do buňky, který hraje důležitou roli v primární reakci bakterie na hyperosmotický stres.

Práce je pěkně graficky zpracována s přijatelným množstvím „překlepů“, má klasické členění a obsahuje všechny nezbytné součásti. Před částí Úvod, ke které nemám připomínky, je zařazen seznam zkratk, který je velmi stručný a podle mého názoru neúplný. Pokud autorka vysvětluje zkratky PCR nebo dNTP, bylo by jistě vhodné tento seznam doplnit o vysvětlení dalších zkratk, které se v textu nacházejí např. cDNA, RBS, IPTG.

Literární přehled je zpracován pečlivě a plně koresponduje s řešenou problematikou. Tady bych chtěla autorku pochválit za zařazení podkapitoly Osmotický tlak a turgor. V této části autorka vysvětluje fyzikální pojmy osmotický tlak, osmolarita a jejich vztah k bakteriální buňce. Ke kapitole Literární přehled mám několik připomínek a 1 dotaz:

1/ Obrázek 4 na straně 21 by si zasloužil lepší legendu.

2/ Na straně 28 v posledním odstavci nepovažuji za nejvhodněji formulovanou větu:

„Srovnáním sekvencí tohoto systému s ostatními druhy bakterií byl objeven jen u...“

3/ Na straně 30 jsem úplně nepochopila jak je to s „vazbou dinukleotidů KtrA reguluje transportní aktivitu KtrB“. Kam se dinukleotidy váží?

Kapitola Materiál a metodika je nejrozsáhlejší částí diplomové práce. To je dáno jednak množstvím metod, které autorka při své práci používala, ale také její snahou o co nejdetailnější popis metod. Bohužel tato snaha místy spíše připomíná slohové cvičení a může čtenáře poněkud odradit. Například popis metody Příprava kompetentních buněk *E.coli* na str.50. Co je na první pohled zřejmé z metodické části je to, že autorka metody prováděla osobně a také si je plně prožila a užila.

K této kapitole mám několik dotazů a připomínek:

1/ Str. 39. Byla teplota sterilizace médií autoklávováním 120°C?

2/ Str.45. „Protilátku jsem před použitím centrifugovala při maximálních otáčkách 5 minut.“

Jaké jsou to otáčky, v seznamu použitých přístrojů uvádíte 4 centrifugy.

3/ Str. 41. Spc médium – složky média „Yeast Extrakt“, lépe kvasničný autolyzát, když další složkou jsou „kasaminové kyseliny“, lépe kyselý kaseinový hydrolyzát. Nejednotnost v pojmenování – „glycerol“, str.37, str.49/ „glycerin“, str.41, str.48. Dále bych chtěla autorku práce upozornit, že řada základních chemikálií, které při své práci používala, není vůbec v této části uvedena.

4/ Str.52, 53. Skutečně je 15ml zkumavka mikrozkušavka?

5/ Nevhodné názvy – str.53 a 58 stočila centrifugací, str.62 próby.

Výsledková část je členěna přehledně, popis práce je srozumitelný s odkazem na příslušnou metodickou část. Každá podkapitola je uvedena cílem.

I k této kapitole mám několik dotazů a připomínek.

1/ Domnívám se, že by bylo vhodné uvést odkaz na literární zdroj k použité koncentraci chloramfenikolu při selekci mutant s inzertem mini – Tn10, pokud tato skutečnost nebyla zjišťována diplomantkou experimentálně (str.70). Rovněž doplnit odkaz na základě kterého diplomantka vybrala vhodnou koncentraci KCl a NaCl pro selekci mutant (str.71).

2/ Nelze plně souhlasit s tvrzením na str.71, že diplomantka vybrala 8 mutant, jejichž kolonie nevyrostly za osmotického šoku na médiu bez draselných iontů a v přítomnosti kompatibilních látek měly velice slabý nebo žádný nárůst. Tomu plně neodpovídají výsledky uvedené v tabulce č.1 na str.73.

3/ Na str.76 uvádíte, že po hybridizaci jste detekovala u mutantu č.19 dva pozitivní signály při restrikci enzymem EcoRI. Na obr.15 B, který je na straně 78, jsou ale vidět 3 signály? Totéž

platí pro mutanta č.47, kdy v textu uvádíte 2 signály, ale na str.79, obrázku 16 B jsou vidět 3 signály.

4/ Vzhledem k snížené kvalitě obr.20, na straně 90, není pro mne jednoduché se orientovat v interpretaci tohoto obrázku tj. v legendě.

V kapitole Diskuze diplomantka podrobně hodnotí dílčí výsledky, zamýšlí se nad experimenty a hledá odpovědi (v konfrontaci s databází) a dává je do souvislosti s experimentálními daty.

Kapitola Seznam literatury obsahuje celkem 84 citací z nichž téměř polovina je za posledních 5 let.

Ke kapitolám Diskuze, Závěr a Seznam literatury nemám žádné dotazy ani připomínky.

Závěr: Musím konstatovat, že autorka měla při své práci smůlu a pozitivních výsledků není mnoho. Nemyslím si však, že by to byla její vina, svědčí pro to i množství experimentálních přístupů, které Jiřina Josefiiová použila.

Domnívám se, že hledání osmoregulačních genů u takového bakteriálního druhu jakým je *Bacillus subtilis* je velmi obtížné vzhledem k tomu, že osmorezistence a sporulace jsou regulovány stejnou regulační drahou. Diplomová práce Jiřiny Josefiiové, i přes výše uvedené připomínky, je na velmi dobré úrovni, přestože se jí nepodařilo dosáhnout plně všech vytýčených cílů. Doufám, že tato skutečnost diplomantku neodradí od další experimentální práce. Autorka zvládla velké množství mikrobiologických, ale hlavně molekulárně biologických metod a získané výsledky dobře interpretovala.

Doporučuji proto, aby její práce byla přijata jako diplomová.

21.9.2006

RNDr Blanka Zikánová

