

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
Mgr. Zuzana Cvačková, Ph.D.

Datum: 3.9.2019

Autor: Bc. Debora Kálalová

Název práce:

Doména 1.1 primárního faktoru sigma a nový systém pro expresi RNA polymerázy z *Bacillus subtilis*

Cíle práce

Klonovat a purifikovat doménové konstrukty faktoru σ^A a ověřit funkci autoinhibiční domény 1.1

Klonovat a purifikovat rRNAP z *B. subtilis* a otestovat její funkci a vlastnosti

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 92 stran

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 a jsou v práci správně citovány? ANO

Připomínky:

Obrázek 1 je zmíněn na straně 9, ale je až na straně 12. Měl by být co nejbližší místu, kde je poprvé zmíněn.

V legendě u obrázku 6 je uvedeno, že schéma částí faktoru σ^{54} bylo popsáno výše. Ale ten popis patří i do legendy.

Str. 25, 2. odstavec kapitoly 2.1.4.3: Zde je dost zmateně popsána RNA vazebná N-koncová doména faktoru Rho (...“Každá podjednotka faktoru Rho obsahuje N-koncovou doménu. Tato doména má schopnost vázat RNA. Naproti tomu N-doména má schopnost vázat sekvence na RNA (*Rho utilisation sites*), které jsou cca 40 nt dlouhé a obsahují hodně cytosinu...”)

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? 24 metod zahrnujících práci s mikroorganismy, s DNA i s proteiny a transkripci *in vitro*

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, místy až velmi detailně, kapitola tvoří třetinu celkové práce

Připomínky:

V tabulce 6 (str. 44) nesedí objemy jednotlivých komponent reakce (na celkových 48ul reakce neodpovídají jenom 3ul 10x koncentrovaného pufru).

Na str. 49 (kapitola 4.7.1) jsou zmíněné 0,5l falkonky. Ty budou ale mít objem 50ml.

Str. 55, 4. řádek odspodu: „... na UV lampě (název stroje??)...“ Chybí případný název / firma, navíc je tu zapomenuta autorčina poznámka v závorce.

Str. 44, 46 pozor na fosforilaci (po r je ypsilon)

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Připomínky:

Tabulka 13 (str. 63) má ukázat sekvence primerů použitých pro amplifikaci promotorových sekvencí, ale sekvence v tabulce chybí.

Na str. 60, poslední řádek nad tabulkou 11: „Kotva se exprimuje na konci proteinu...“ Měla byste uvést, o který konec se jedná.

U obrázků z gelové chromatografie a analýzy frakcí pomocí SDS-PAGE (obr. 14 na str. 62 a obr. 20 na str. 71) není jasné, které frakce z chromatogramu jsou v jednotlivých drahách na gelu.

Na obr. 15 (str. 65) není uvedeno, jak byla provedena statistika. Na osách y by mělo být uvedeno, že se jedná o relativní vazebnou aktivitu.

Na obr. 16 (str. 66), obr. 22 (str. 72) a obr. 23 (str. 74) chybí údaj o počtu opakování experimentů a o provedené statistice (o jakou odchylku se jedná).

Na obr. 18 (str. 69) nesedí dobře popisky velikostí jednotlivých bandů markeru. Dále jsou vždy označeny dráhy 1 a 2, ale není jasné, zda je mezi drahami rozdíl nebo jsou naneseny duplicitně.

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? ANO

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Grafická úroveň práce je v pořádku. Je zde přiměřené množství obrázků, grafů a tabulek. Práce je psaná velmi čtivě. Jsou v ní sice různé překlapy, ale není jich moc.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Literární přehled dobře pokrývá zpracované téma. Je psaný jasně a čtivě. Navíc je doplněn řadou vhodně vybraných schematických obrázků, které usnadňují čtení a pochopení textu.

Oceňuji širokou škálu metod, kterými autorka při práci disponovala. Metody jsou dobře a podrobně zdokumentovány, experimenty by podle nich bylo možné jednoznačně zopakovat.

Cíle práce jsou jasně definované a považuji za splněné, třebaže se nepodařilo purifikovat všechny plánované doménové konstrukty faktoru σ^A .

Výsledky jsou dobře diskutovány a je nastíněn směr případného dalšího výzkumu.

Celkově hodnotím diplomovou práci jako velmi zdařilou a doporučuji ji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky (většinou drobné) jsem přidala pod hodnocení jednotlivých částí práce.

K diplomové práci mám následující otázky:

Proč se pro indukci exprese domén σ a pro RNAP používala odlišná koncentrace IPTG?

Primery se sekvencemi restričních enzymů použitých pro klonování jsou často velmi dlouhé (přes 50 nt). Jaký je k tomu důvod?

Z důvodu vysoké srážlivosti proteinů se nepodařilo purifikovat všechny plánované doménové konstrukty faktoru σ^A . Zkoušela jste tento problém vyřešit dialýzou do jiného pufru?

V práci je v souvislosti s rRNAP okrajově zmíněn faktor HelD. Jaká je jeho funkce?

V diskusi navrhuje možné využití rRNAP pro tvorbu nových antibiotik. Jakým způsobem by se to provádělo?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: