

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Jan Nešvera, CSc. Datum: 23. 5. 2022
Autor: Bc. Klára Mikesková	
Název práce: The omega subunit of <i>Bacillus subtilis</i> RNA polymerase Podjednotka omega RNA polymerázy z <i>Bacillus subtilis</i>	
Cíle práce: Izolace a purifikace podjednotky omega RNA polymerasy z <i>Bacillus subtilis</i>. Testování vlivu izolované podjednotky omega na transkripci z vybraných promotorů.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 105 stran Práce je psána v angličtině Je uveden český abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použila autorka v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Jsou metody srozumitelně popsány? ANO Autorka použila ve své diplomové práci řadu biochemických a molekulárně biologických metod (např. izolace DNA, metody PCR, klonování fragmentů DNA, izolace a purifikace proteinů, transkripce in vitro).	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO 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? ANO	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	

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

Práce je svým rozsahem (105 str., 37 obr., 20 tabulek), obsahem i formou srovnatelná s obvyklým standardem diplomových prací. Obrazová dokumentace je kvalitní a názorně ilustruje získané výsledky a přehledně doplňuje popis teoretických základů v Literárním přehledu. Anglický text je na dobré úrovni a je velmi srozumitelný.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**Plánované cíle práce byly splněny.**

Diplomová práce popisuje přípravu různých rekombinantních plasmidů s cílem izolovat funkční podjednotku omega RNA polymerasy (RNAP) z *Bacillus subtilis* ve vysoké koncentraci a čistotě. Jako nejvhodnější se ukázalo použití plasmidového vektoru pET22b, které vede k produkci podjednotky ω s hexahistidinovou kotvou (ω -His). Byly optimalizovány podmínky pro její produkci v rozpustné formě a pro její purifikaci. Funkce purifikované podjednotky ω -His při transkripci pak byla testována metodou transkripce in vitro. Bylo zjištěno, že přítomnost podjednotky ω -His v RNAP vykazuje silný pozitivní efekt na transkripci, jak z vegetativních promotorů *Bacillus subtilis* (RNAP + SigA), tak z promotorů genů uplatňujících se při sporulaci (RNAP + SigF, RNAP + SigE). Tento pozitivní efekt byl ještě zesílen přítomností transkripčního faktoru delta. Jedná se o zcela nové originální výsledky. Vzhledem k tomu, že funkce podjednotky omega při transkripci u *B. subtilis* dosud nebyla popsána, výsledky získané v této diplomové práci významně posunují znalosti o regulaci iniciace transkripce u této modelové bakterie. Lze předpokládat, že získané výsledky budou součástí kvalitní publikace v mezinárodním vědeckém časopise. Kvalita předložené diplomové práce svědčí o předpokladech autorky pro vědeckou práci.

Otázky a připomínky oponenta:**A) Připomínky:**

V diplomové práci jsou některé nepřesné nebo nejasné formulace.

- 1) Str. 9, 5-6. ř.: Definice „RNA sequences that encode proteins are termed mRNAs“ není přesná.
- 2) Str. 22, 7. ř. zdola: Termín „redundancy of the ω subunit“ není jasný.
- 3) Str. 32, 2. ř. zdola: Místo „key sporulation factors“ má být „key sporulation sigma factors“.
- 4) Str. 36, 10. ř.: Věta „A set of experiments done in the Krásný showed“ není jasná.
- 5) Str. 72, 2. ř.: Věta „The design of the constructs is shown in Fig. 19“ neodpovídá příslušnému obrázku, kde je jen velmi obecné schéma.
- 6) Str. 76, 6. ř. zdola: Termín „MBP- ω was grown“ není přesný.
- 7) Str. 87, 1. odstavec: Termíny „ribosomal promoters“ a „non-ribosomal promoters“ nejsou přesné.
- 8) Str. 91, 8-9. ř. zdola: Věta „the cleavage of the MBP-tag was not possible because ω aggregated“ neodpovídá skutečnosti.
- 9) Str. 93, 16-17. ř.: Věta „the ω subunit in *E. coli* is co-transcribed with the gene *spoT*“ není přesná.

B) Otázky:

- 1) Jaké je vysvětlení dalších pásů (kromě podjednotek α , β , β' , ϵ) viditelných na obr. 30 ?
- 2) Na obrázcích 32 až 36 je na ose Y vynesena relativní transkripce. Na obr. 32 a 33 jsou uvedeny její hodnoty zřejmě v arbitrárních jednotkách, zatímco na obr. 34-36 jsou uvedeny v procentech. Jaké byly důvody pro uvádění různých jednotek relativní transkripce?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

