

## Oponentský posudek na diplomovou práci Zuzany Sušické na téma:

### RNA-polymerasa *Streptococcus pneumoniae* jako potenciální substrát proteinkinasy StkP.

Téma předložené diplomové práce navazuje na rozpracovanou tematiku laboratoře a to studium role signálních kinas eukaryotního typu v bakteriích. Dílčích cílů si autorka vytyčila hned šest, hlavním cílem bylo potvrdit výsledek z předchozích proteomických studií školitelky, že substrátem pro protein kinasu StkP *Streptococcus pneumoniae* je alfa podjednotka RNA polymerasy.

Po formální stránce má práce všechny předepsané části a kapitoly v obvyklém rozsahu. Literární přehled obsahuje poměrně obecný a široký přehled o problematice od popisu patogenních vlastností studovaného organismu *Streptococcus pneumoniae*, přes detailní studii struktury a funkce RNA polymerasy a regulace transkripce až po stručný přehled přenosu signálu u tohoto organismu. Detailní popis patogenních faktorů na 10 stránkách mi připadá neadekvátní k tématu diplomové práce ve srovnání se čtyřstránkovým popisem mechanismů přenosu signálu u studovaného mikroorganismu. Navíc v této poslední části jsem našla několik faktických nepřesností. (viz. Připomínky)

Metodická část obsahuje všechny použité roztoky a popis všech molekulárně genetických, biochemických i mikrobiologických metod s výjimkou stanovení růstové rychlosti. Ta je použita v experimentální části při charakterizaci vytvořených mutantů a prezentace jejího provedení není ani v této části dostatečně přesvědčivá.

Experimentální část je ale rozsáhlá. Zahrnuje jednak vytváření vektorů pro expresi alfa podjednotky RNA polymerasy a následné studie její schopnosti být fosforylována *in vitro* StkP kinasou. Tak vytváření mutantů se značenou alfa i beta podjednotkou RNA polymerasy přímo v *Streptococcus pneumoniae* za účelem snadné purifikace celého polymerasového komplexu a studium fosforylace celé RNAP. Experimenty jsou popisovány v logickém sledu tak, jak byly prováděny a jak to vyžadoval vývoj práce, je vždy uveden důvod a cíl každého jednotlivého následného kroku. Postup vytváření konstruktů je znázorněn schématy a výsledky jsou doloženy obrázky elektroforéz. Tato část je sice popsána na 20 stránkách, ale obsahem popisované práce je na diplomovou práci nadstandardní. Je z ní patrné, že autorka zvládla během své diplomové práce širokou škálu technik jak molekulárně genetických tak i metody biochemické a mikrobiologické. Prokázala, že je schopna řešit problémy a nepředvídané chování biologického materiálu během práce. Škoda jedině, že finální snaha prokázat fosforylaci alfa podjednotky v celém komplexu RNAP nebyla úspěšná.

V diskusi, ale autorka velmi správně tuto skutečnost diskutuje a prokazuje tak svou schopnost vyhodnocovat získané výsledky, i když jsou v daném uspořádání neúspěšné. Diskuse jako celek je velice rozsáhlá i když by možná některá fakta z úvodu diskuse mohla být spíše uvedena v literárním úvodu, který je jinak poměrně obecný. Ze souhrnu je patrné, že cíle práce byly splněny, přestože se nedospělo v tomto uspořádání k pozitivnímu výsledku.

Seznam literatury obsahuje přibližně 80 citací, formálně správně prezentovaných s výjimkou českých jmen, které jsou uvedeny bez diakritických znamének a nepřesnosti u citace Pallové P. 2003, nejde o práci disertační ale diplomovou. Mělo by být opraveno dodatečně.

Práce je napsaná celkem srozumitelně a čtivě, s minimálním počtem překlepů, používáním anglicismů a laboratorního slangu i když tomu se autorka v jednom případě nevyhnula. Na str. 51 při popisu izolace, výraz zbavit se proteinů během promývacích kroků, mohl být určitě vyjádřen jinak.

Autorka jednoznačně prokázala schopnost k experimentální i teoretické vědecké práci a předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

Přestože je práce kvalitní jak obsahově, tak i formálně mám k ní některé připomínky a otázky na autorku..

Na str. 9 u popisu obrázku 2-1 b by mělo být uvedeno, že jde o elektron mikroskopický snímek popř. uvést zvětšení u obou obrázků.

Na str. 32 z formulací autorky vyplývá, že dvousložkové systémy byly objeveny u archeobakterií, nižších a vyšších eukaryotních organismů a u patogenních bakterií, čímž opomíjí celou řadu těchto systémů u bakterií i nepatogenních s nepatogenní funkcí. Navíc v dalších odstavcích uvádí dvousložkové systémy jako vhodné cílové místo k antibakteriální terapii. Jak bylo možné předejít vedlejšími účinkům na vyšší eukaryota při takovéto terapii?

Na str. 33 uvádí *Bacillus subtilis* jako patogenní kmen.

Na str. 54 popis přípravy vzorku na hmotnostní spektrofotometrii není zcela jasný, nejdříve autorka popisuje promývání gelu, na konci popisu mluví o vzorku.

Na str. 55 je v úvodu výsledků uveden dřívější výsledek školitelky (včetně obrázku 2D elektroforézy) přestože již tyto výsledky byly uvedeny v úvodu (str. 34). Je pak trochu matoucí, zda se autorka na výsledku podílela či ne.

U všech obrázků elektroforéz by měly být uvedeny hodnoty hmotností (ne pouze vyznačeny sledované proteiny. (např. na obr. 5-4, 5-7 jsou, ale na dalších 5-5a,b,c, 5-16, 5-17, 5-18 chybí)

Prosím o vysvětlení tvrzení na str. 67. ....“ že antibiotiková kazeta vložená před gen *rpoA* negativně interferuje s expresí tohoto esenciálního genu a proto podléhá selekčnímu tlaku a vyštěpuje se z původního místa na chromozomu a vkládá se do jiného rekombinačního místa.“ Znamená to že Vámi používaný kmen má ještě další lokus v chromosomu sekvenčně podobný genu pro spektinomycinovou resistenci? Máte na mysli selekční tlak spektinomycinu nebo esenciálního genu *rpoA*? Jakým mechanismem mohou spolu oba geny /proteiny negativně interferovat.

V Praze 31. 5. 2007

RNDr. Irena Lichá, CSc.  
Katedra genetiky a mikrobiologie  
Přírodovědecká fakulta UK  
Viničná 5, Praha 2