

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče: Bc. Michal Hanigovský

Název práce: Příprava rekombinantního čepičkujícího enzymu z viru opičích neštovic a jeho biochemická charakterizace

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
x	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické nebo rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
x	A - výborná, bez závažnějších připomínek
	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
x	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
x	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
x	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5.

Michal se ve své diplomové práci zaměřil na heterodimerní komplex E1-E12 z viru opičích neštovic, který je zodpovědný za syntézu RNA čepičky 0. K dosažení výsledků využil minimálně 12 různých metod, od exprese proteinu až po aktivitní esej, a zdařile popisuje proces optimalizace exprese jednotlivých proteinů. Michal také optimalizoval podmínky biochemické eseye sledující aktivitu komplexu E1-E12 a samotné podjednotky E1 za využití hmotností spektrometrie.

Předložená práce je čtivá, dobře strukturovaná a text je doplněn vhodnými obrázky, které čtenáři pomáhají pochopit problematiku. Nemohu však přehlédnout některé chyby, které se v práci vyskytují. Převzaté obrázky by měly mít popis v českém jazyce. V textu se objevují drobné překlepy (např. „methyltrasfenrasa“ na str. 10; „protein“ na str. 25), což je vzhledem k rozsahu textu pochopitelné. Zbytečně jsou v práci používány anglicismy, pro které jsou české ekvivalenty běžné, např. „cap“ (čepička); „MTase“ (MTáza); „peak area“ (obsah plochy pod křivkou). V textu se ojediněle objevují slovenská slova, např. „táto“ (tato, str. 72, 75), „antigén“ (antigen, str. 17) a slohové neobratnosti (např. „po přetečení lyzačního pufru“, str. 35; „buňky byly přeloženy“, str. 40). Označení heteroatomů v textu (např. *N7*, *S*-adenosyl-L-homocystein) by mělo být psáno kurzívou a bylo by vhodné sjednotit psaní např. *N-7* vs. *N7*; *cap-0/1* vs. *cap 0/1*.

Rozsah citované literatury (65, resp. 62 zdrojů) je pro diplomovou práci odpovídající. V seznamu literatury se vyskytují 3 duplikáty (cit. 57/60; 8/61; 5/64) a v diskusi je použit rozdílný citační styl než ve zbytku práce („et al.“ vs. [číslo]). U citace č. 10 je chybně uveden název časopisu - Microbiology Society (vydavatelství) místo Journal of General Virology. Na str. 13 u obrázku 1 následuje citace [63] po citaci [9]. V seznamu použité literatury si nejsem jist stylem, který je použit. Řekl bych, že se nejvíce blíží stylu Vancouver či MLA – případně mě prosím opravte. Celkově bych doporučil pracovat s citačním programem, což by eliminovalo většinu potíží.

Po vědecké stránce byly experimenty provedeny a popsány adekvátně. V některých postupech Michal věcně komentuje jisté kroky, čímž prokazuje znalost prováděných metod. Aktivitní esej zahrnovala potřebné negativní kontroly, reakce byly prováděny v triplikátech a měření na hmotnostním spektrometru též probíhalo v technickém triplikátu. Výtku bych měl ke kapitole EC₅₀ (5.3.3.), kde by bylo vhodné uvést, jaký software (např. GraphPad) byl použit pro výpočet EC₅₀. Na základě textu práce to totiž působí dojmem, že vyhodnocení bylo provedeno „okometricky“.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1) V kapitole 4.7.2. uvádíte, že po dosažení OD 0.6 – 0.7 byla snížena teplota na 18 °C a exprese proteinu probíhala přes noc. Používal jste IPTG či jiný induktor exprese?

2) V diskuzi na str. 72-73 uvádíte: *“Optimální koncentrace RNA se pohybovala v rozmezí 15-30 μM. Zajímavé je, že kontrola bez GTP vykazovala vysokou aktivitu, která byla téměř identická při koncentraci 45 μM RNA. To naznačuje, že vazebné místo pro GpppN-RNA nemusí být specifické a dochází také k 2'-O-methylaci RNA.”*

Vzhledem k tomu, že komplex E1-E12 je zodpovědný za N7 methylaci, nemělo by docházet k nespecifické N7 methylaci než k 2'O methylaci?

3) V diskuzi na str. 73 uvádíte: *“U koncentrace 0,5 μM E byla za hodinu při laboratorní teplotě (25 °C) z 25 μM SAM proměněna pouze 0,98 μM. Enzymatická aktivita za těchto podmínek nebyla vysoká; vyšších hodnot bychom dosáhli při inkubaci při 37 °C. Nicméně, při této teplotě by mohly být výsledky zkreslené, protože enzymatická inhibice SIN by nemusela probíhat správně.”*

Proč se domníváte, že by inhibice sinefunginem (SIN) „nemusela probíhat správně“ při 37 °C? Nebylo by to naopak blíže patofyziologickým podmínkám při nákaze člověka?

4) Jaké množství proteinu E1 a E12 jste během svých experimentů získával? Je to dostatečné pro případné testování knihoven látek za účelem nalezení nových inhibitorů? Bylo by možné provést „high-throughput screening“ vámi používanou esejí založenou na hmotnostní spektrometrii?

5) Plánujete provádět krystalizační experimenty s E1-E12?

Stanovisko k opravě chyb v práci: opravný lístek/oprava v textu **NENÍ** podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci doporučuji k přijetí k dalšímu řízení: **ANO**

Navrhovaná celková klasifikace: Velmi dobře (**2**)

Datum vypracování posudku: 02. 09. 2024

Jméno a příjmení, podpis oponenta : Hugo Kocek