

## Posudek oponenta bakalářské práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : Tomáš Ludvík

Název práce: Příprava vybraných rekombinantních proteinů viru Aichi a dalších kobuvirů

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

1. Rozsah BP a její členění	
x	A - přiměřené, odpovídají charakteru BP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	<b>N - nedostatečné</b>

2. Odborná správnost	
	A - výborná, bez závažnějších připomínek
x	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
	<b>N - nevyhovující, s hrubými chybami</b>

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
	<b>N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)</b>

4. Jazyk práce	
x	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
	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
	<b>N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami</b>

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

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Úkolem bakalářské práce Tomáše Ludvíka bylo studium virové proteasy 2A ze dvou pikornavirů, Aichi viru a Coxsackie viru B3. Tento enzym je jedním z nestrukturálních proteinů a má důležitou roli v buněčném cyklu obou virů. Protein 2A se především podílí na štěpení virového polyproteinu, ale také dokáže vázat různé substráty hostitelské buňky, což virům umožňuje inhibovat některé klíčové procesy v hostitelské buňce a ulehčit celý proces infekce. Proto není jistě překvapivé, že se jedná o atraktivní cíl pro zásah antivirotiky. Předkládaná práce se zaměřila na přípravu dvou rekombinantních proteinů, 2A z Aichi viru a 2A z Coxsackie viru B3.

Práce je psaná velmi dobrou češtinou s minimem chyb či překlepů. Vypracování práce vyžadovalo od studenta osvojit si velké množství nových a užitečných technik jak v oblasti molekulární biologie, tak v oblasti exprese a purifikace proteinů. Myslím si, že se jedná o velice kvalitní bakalářskou práci se zajímavým a důležitým tématem.

K práci mám několik kritických připomínek:

1) V metodické části opakovaně na více místech chybí údaj o koncentracích chemikálií, které byly součástí reakčních směsí, v důsledku čeho byl popsán postup ne vždy dobře reprodukovatelný. Např. na straně 28 a 31 chybí koncentrace primerů v PCR reakcích, dále na straně 33 chybí údaj o koncentraci kanamycinu ve 100 mL LB média a na straně 34 chybí údaj o koncentraci nebo specifické aktivitě použitých TEV a Ulp1 proteas, je zde pouze specifikován použitý objem.

2) V kapitole 3.2.15 s názvem „Gelová permeační chromatografie“ mě zaujal popis použitých kolon. V případě vzorku 2A proteinu z Aichi viru byla použita kolona HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, což je opravdu kolona používána pro gelovou permeační chromatografii. Ale pro druhý vzorek 2A proteinu z viru CVB3 byly použity dvě kolony HisTrap FF a HiPrep 26/10 Desalting. Pokud vím, tak kolona HisTrap FF nepředstavuje kolonu používanou při gelové permeační chromatografii. Myslím si, že tato kolona měla být zmíněna ještě v kapitole o afinitní chromatografii. Dokonce sám autor ve výsledkové části pojmenovává obrázek (Obr. 14, str. 43), na kterém vidíme chromatogram při použití kolony HisTrap FF jako „Průběh afinitní chromatografie a SDS-PAGE pro tři frakce z grafu.“

3) Na straně 37 a 41 jsou uvedeny tabulky s názvem „Hodnoty absorbance plasmidové DNA při 260 nm“ (Tab. 9 a Tab. 10). V tabulkách můžeme najít název vzorku a jemu odpovídající hodnoty absorbance v jednotkách ng/μL a čísla se pohybují v řádech stovek. Zde autor nejspíš myslel koncentraci, ale napsal absorbanci, je to tak?

## B. Obhajoba

### *Dotazy k obhajobě*

1. Za předpokladu, že jsem text teoretického úvodu pochopila správně, tak při první translaci virového genomu pikornavirů po vstupu do hostitelské buňky musí 2A proteasa štěpit virový polyprotein, kdy je ještě sama součástí tohoto polyproteinu. Později je jinou virovou proteasou uvolněná z polyproteinu jako samostatný protein. Lze předpokládat různé biochemické vlastnosti tohoto enzymu (např. aktivita, substrátová specificita) v závislosti na tom, jestli je součástí polyproteinu nebo se vyskytuje jako volný enzym? Při opakované translaci virového genomu je častější samoštěpení polyproteinu 2A proteasou, jež je součástí tohoto polyproteinu nebo štěpení 2A proteasou, která již byla přítomna v hostitelské buňce z dřívější translace?
2. Podle jakých kritérií byly vybrány vektory pro expresi proteinů 2A z Aichi viru, resp. z Coxsackie viru B3, konkrétně plasmidy pHGB1 a pSumo? V obou případech je součástí fúzního proteinu kromě afinitní kotvy také další malý protein (soudím na základě SDS-PAGE gelů, kde rozdíl mezi štěpeným a neštěpeným proteinem je větší než pouhá histidinová kotva). Hrála přítomnost těchto malých proteinů roli při výběru vektorů?
3. Proč byla teplota exprese proteinů 2A zvolena na 18 °C? Předcházela tomuto rozhodnutí optimalizace teploty exprese?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

## C. Celkový návrh

Navrhovaná celková klasifikace: **výborně**

Datum vypracování posudku: 20.7.2020

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): RNDr. Olívia Petřalská, Ph.D.