

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : Bc. Anna Šidáková

Název práce: Analýza aktivního místa rutinoidasy z *Aspergillus niger* a jeho mutageneze

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 n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

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
	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
x	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	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. :

Hlavním cílem práce byla analýza tří rozdílných mutantních variant enzymu rutinoidasy, jejich produkce, purifikace a stádium vlivu těchto mutací na substrátovou specifitu. Diplomová práce má rozsah 74 stran a je členěna standardním způsobem do 5 stěžejních kapitol. Jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují a jsou psané srozumitelnou formou, nicméně po formální stránce se autorka nevyhnula řadě gramatických chyb, překlepům a chybnému slovosledu. Textová, tabulková a grafická část je vyvážená, vše je řádně číslováno a pro přehlednost doplněno legendou s vysvětlením použitých symbolů. U obrázků jsou odkazy na zdroj. Literární přehled ukazuje na zájem studenta o danou problematiku (citováno 50 původních prací). Studentka zvládla značnou část metodik z oblasti molekulární biologie, mikrobiologie a biochemie. Po metodické stránce lze vytknout zbytečně opakující se kapitoly (např. kap. 3.5.9.1 a 3.5.6 týkající se přípravy SDS gelů). Výsledky jsou uvedeny vždy podle zvoleného dílčího cíle. Jednotlivé cíle zahrnovaly konstrukci mutantních genů na základě molekulárního modelování, jejich klonování v kmeni *E. coli* a expresi mutantních rutinoidas v kmeni *Pichia pastoris*. U purifikovaných mutantních enzymů byly stanoveny základní biochemické vlastnosti pH a teplotní optimum, kinetické parametry a substrátová specifita s novými alternativními i nativními substráty (rutinem a isokvercitrinem). Vlastnosti mutantních enzymů pak byly porovnány s rekombinantním nemutovaným enzymem z *A. niger*. V diskuzi studentka úspěšně propojila experimentální data s dostupnou literaturou a shrnula své úvahy a rozdíly oproti literatuře.

Tuto diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení výborně.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1. Jakým způsobem byl připraven původní plasmid, který byl použit pro vnesení jednobodové mutace *AnRut-B*? Byla provedena optimalizace kodonu (codon usage) pro expresi v *Pichia pastoris*?
2. Byly sledovány růstové parametry dosažené kulturou jednotlivých mutantů v *P. pastoris* při kultivaci na methanolovém médiu? Pozorovala jste rozdíl v růstu?
3. V diskuzi uvádíte str. 63, že v *P. pastoris* dochází k částečné glykosylaci enzymu. Je původní enzym rutinoidasa glykosylován? Může odlišná glykosylace enzymu ovlivnit jeho vlastnosti?
4. Domníváte se, že postranní tunel má zásadní význam pro substrátovou specifitu enzymu? V případě přirozených substrátů rutinu a isokvercitrinu (Tab. 6) je rozdíl specifických aktivit u mutantu bez tunelu *AnRut-A* a rekombinantním wild type typem *AnRut WT* minimální.
5. Produkce mutantní *AnRut-B* s jednou záměnou vedoucí k uzavření postranního tunelu nebyla detekována v hostiteli *Pichia*, jako pravděpodobný důvod uvádíte, že „mohlo dojít k propojení smyček tvořících tunel nekovalentními interakcemi, což zásadně destabilizovalo sekundární strukturu enzymu“. Nemohlo dojít v průběhu cílené mutagenese ke změně sekvence DNA, například posunu čtecího rámce? Jakými primery byl konstrukt/plasmid *AnRut-B* sekvenován?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

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

Stanovisko k výsledku automatické antiplagiátorské kontrole práce aplikací „TURNITIN“:

procento shody s jinými texty v databázi

jedná se o **PRÁCI ORIGINÁLNÍ** **PLAGIÁT** (zakroužkujte) - v případě, že je podezření, že posuzovaná práce je plagiát, prosím zdůvodněte

C. Celkový návrh

Navrhovaná celková klasifikace (výborně, velmi dobře, dobře, neprospěl)

Datum vypracování posudku: 24.5. 2023

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): RNDr. Andrea Palyzová Ph.D.