

<b>Posudek oponenta na diplomovou práci</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Klára Kohoutová
	Datum: 22.8.2023
Autor: Bc. Michal Vaško	
Název práce: Příprava a charakterizácia koronavírusovej exonukleázy nsp14	
<b>Cíle práce</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Příprava expresních vektorů nesoucích mutované verze nsp14 (E191A; H268A, D273A) a mutovanou verzi nsp10FL (T5A)</li> <li>• Expresse mutovaných i nemutovaných proteinů v bakteriálním expresním systému.</li> <li>• Purifikace všech verzí proteinů.</li> <li>• Charakterizace exonukleázové aktivity nemutovaného nsp14 v přítomnosti nsp10FL, nsp10sh a v nepřítomnosti nsp10.</li> <li>• Charakterizace exonukleázové aktivity mutovaných verzí nsp14 v přítomnosti nsp10FL a nemutované nsp14 v přítomnosti mutované verze nsp10.</li> </ul>	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO</b> Rozsah práce (počet stran): 77 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratek? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? přiměřeně Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO	
<b>Diskuze:</b> 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	
<b>Závěry (Souhrn) :</b> Jsou výstižné? ANO	
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Práce je přehledně členěná, v rozumné míře doplněná obrázky dostatečné kvality. Zde	

bohužel nemohu posoudit jazykovou úroveň.

Mám snad jedinou připomínku k členění práce: Složení použitých pufrů je uvedeno na straně 31-32 bez odkazu v textu práce, pro čtenáře by bylo pohodlnější, kdyby se na složení pufrů v textu odkazovalo.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Diplomová práce Bc. Michala Vaška se zabývá studiem koronavirové exonukleázy nsp14 a jejím interakčním partnerem nsp10. Součástí práce byla příprava několika verzí proteinů nsp14 a nsp10 a následné studium exonukleázové aktivity nsp14, autor si při jejím řešení osvojil řadu technik. Literární úvod je pečlivě zpracovaný a je dostatečný pro uvedení čtenáře do dané problematiky, cíle jsou jasně formulovány a v průběhu práce byly splněny. Experimentální část obsahuje potřebné informace pro zreprodukování provedených experimentů, výsledky jsou řádně komentovány. Vypracováním této práce autor prokázal, že je schopen jak samostatné práce v laboratoři, tak práce s literárními zdroji. Doporučuji, aby tato práce byla přijata jako podklad pro udělení magisterského titulu. K práci mám několik připomínek viz níže.

#### **Otázky a připomínky oponenta:**

##### **Otázky:**

- 1) Jaká je afinita komplexu nsp14 : nsp10, pokud je známá?
- 2) V práci zmiňujete, že nsp10 protein byl exprimován ze 2 litrů buněčné kultury a nsp14 ze 12 litrů. Můžete uvést typický výtěžek obou proteinů na 1 litr buněčné kultury?
- 3) U aktivitních esejí máte uvedené chybové úsečky, v textu práce není uvedeno kolikrát byla kvantifikace gelu opakována. Z kolika měření/opakování úsečky pochází?
- 4) Na straně 63 (Obr. 40) porovnáváte exonukleázovou aktivitu nsp14 v nepřítomnosti a přítomnosti nsp10FL, nsp10sh a nsp10FL T5A. V diskuzi zmiňujete, že prvních 8 aminokyselin nsp10 tvoří kontakt s nsp14, tyto zcela chybí u zkrácené verze nsp10sh. Přesto je aktivita nsp10sh výrazně vyšší, než aktivita nsp10FL T5A. Tuto skutečnost vysvětľujete jinou konformací komplexu, než má nsp14 : nsp10FL. Bylo nějak ověřeno, že všechny tyto varianty nsp10 interagují s nsp14?

##### **Připomínky:**

- Uvedl jste, že nsp10 slouží jako kofaktor pro nsp14. Jako kofaktor je většinou označována neproteinová složka. Bylo by vhodnější použít pojem modulátor.
- U velikosti částic koronavirů uvádíte, že je v rozsahu 80-120 nm, zároveň tvrdíte, že částice mají přesně 40 000 kDa, tomuto přesnému tvrzení bych se vyhnula.
- Význam jednotlivých mutací nsp14 a nsp10 mohl být v textu práce lépe vysvětlen, nicméně v diskuzi je objasněn dostatečně.
- Údaj, že plazmid byl naředěn v poměru 1:500 sterilní dH<sub>2</sub>O, je nic neříkající, v textu by bylo lepší se mu vyhnout a ponechat pouze výslednou koncentraci.
- Koncentrace Tris-HCl pufru v polyakrylamidovém gelu řádově stovky nM mi přijde podezřele nízká.
- U reverzní niklové chromatografie by bylo vhodné uvést její účel, poučený čtenář si ale domyslí, že byla použita pro odstranění SUMO kotvy a popř. neštěpeného proteinu.
- U aktivitních esejí není uveden objem reakce ani nanáška na gel.

Návrh hodnocení oponenta

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

