

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : **Bc. Václav Havelka**

Název práce:

Výzkum DNA kompatibilních reakcí a jejich využití při přípravě DNA kódovaných knihoven

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	
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	
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
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

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
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Předkládaná diplomová práce Bc. Václava Havelky shrnuje nejprve tematiku DNA kódovaných knihoven, především jejich praktické využití při identifikaci funkčních fenotypů (peptidů či proteinů) na cílový protein. Popsal základní techniky využívající tyto knihovny, tj. phage display, ribosome display a buněčné display techniky využívající bakterie *E.coli* či kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Detailně se následně zaměřil na popis tzv. chemických DNA kódovaných knihoven, kterých se týkala předkládaná práce. Během ní syntetizoval konstrukt oligopeptidu a testoval různé podmínky odstraňování chránících skupin a vliv těchto podmínek na degradaci DNA. Bylo zjištěno, že i mírnější podmínky odstraňování jsou stále agresivní k DNA a uchazeč tedy přistoupil k začlenění 7-deasa purinových nukleotidů do oligonukleotidů, které zůstávají substráty DNA polymeras a jsou stabilní v kyselých podmínkách během odstraňování peptidů. Připravil modelový konstrukt sestávající se z DNA oligonukleotidu, spojky a biotinylovaného lysinu, konstrukt ze směsi separoval pomocí streptavidinových magnetických kuliček a následně peptidovou část štěpil trypsinem.

Předkládaná diplomová práce je napsaná srozumitelně, čtivě, s malým množstvím stylistických chyb a překlepů, dokumentována pěknými grafickými materiály. Na závěr bych rád shrnul, že se jedná o kvalitní práci, která jistě poslouží k dalšímu výzkumu DNA kódovaných knihoven a jejich využití např. při studiu posttranslačních modifikací. Plně ji doporučuji k obhajobě.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1) Během afinitní selekce chemických DNA kódovaných knihoven s cílovými proteiny je nutné, aby modifikovaný peptid efektivně interagoval s proteinem, zatímco připojená DNA by se měla chovat inertně a neovlivňovat vazbu peptid-protein. Mohl byste zmínit, jak moc použitá spojka mezi DNA a peptidem zaručuje „inertnost“ DNA na vazbu peptid-protein? Lze chemické DNA kódované knihovny použít i pro cílové proteiny, které mají vazebné místo pro rozpoznávající molekulu ukryté uvnitř struktury nebo se tato metoda hodí spíše pro proteiny s vazebným motivem na povrchu proteinu?

2) U biotinylovaného konstrukt **1c** byla zhodnocena separace konstrukt na streptavidinových magnetických kuličkách. Bylo zjištěno, že většina konstrukt **1c** byla na kuličkách imobilizována, přesto ale část konstrukt **1c** zůstala v roztoku a na kuličky se nevázala. Mohl byste navrhnout, jak by bylo možné zlepšit tento poměr ve prospěch navázaného konstrukt na kuličky a zlepšit tak jeho purifikaci?

3) Během čištění modelových peptidů na preparativním HPLC byl průběh monitorován pomocí vlnové délky 254 nm. Peptidy nebyly derivatizovány ani konjugovány s oligonukleotidy. Mohl byste říci, proč jste zvolil právě tuto vlnovou délku a ne standardně používanou detekci při 220 nm, popřípadě 280 nm?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

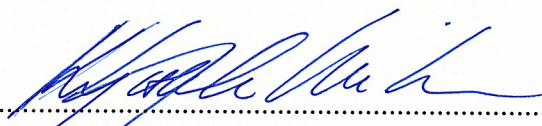
opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

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

Datum vypracování posudku: 8.7.2020

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS):



RNDr. Milan Kožíšek, Ph.D.

