

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : Bc. Marek Zákopčaník

Název práce: Rekombinantní příprava DNA vazebné domény transkripčního faktoru TEAD4

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

1. Rozsah DP a její členění	
A	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
B	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	
	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
B	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
	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
C	C - upokojivý, 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	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 se v podstatě zabývá optimalizací podmínek rekombinantní exprese a purifikace konstruktů proteinu TEAD4 v *E. coli* (hlavně kroku dezintegrace buněk) s následnou charakterizací proteinového preparátu pomocí MS a vazebnou studií s DNA (charakterizace nativní elektroforézou).

ad 1: Rozsah práce je dostatečný, ale u některých kapitol bych uvítal v případě DP více v obsahu (např. v diskusi po úvodní stránce s uvedením citací jsou diskutovány výsledky bez dalšího srovnání s literaturou).

ad 2-3: Ne vše je jednoznačně objasněno, zvláště v metodice (např. str.38 koncentrace Chmf definována přídatkem 10 μ L, str.39. neuvedená koncentrace cDNA použitého plasmidu pro transformaci, jen uveden objem 0,5 μ L, ...). Opravdu barvicí roztok CBB R-250 obsahuje 4% MetOH (str. 35)?

ad 4: Text práce obsahuje řadu jazykových neobratností, jsou časté i “anglikanismy”, laboratorní hantýrka, a anglická stavba věty (např. byl použit “tepelný” šok pro transformaci, “elektronický pipetovač”, “barva ze vzorkového pufru doputovala k čelu gelu”,

Nalezené shody dle programu Turnitin jsou minimální, celkové skóre je 28%, ale pouze jedna – digitální repositář (10% v hlavičce a obecných částech textu) a nejedná se o plagiát.

Celkově hodnotím práci Marka Zákopčanika kladně a doporučuji práci k obhajobě

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

Doplňující metodické dotazy:

1. Byla optimalizována pro produkovaný konstrukt koncentrace induktoru a použitá 0.05mM koncentrace IPTG je vhodná (existuje citace na práci)? Proč jste pro produkci testovací exprese (2h při 37°C) a velkoobjemové produkci (1h při 30°C) použil jinou délku a teplotu (str. 39 a 41)?
2. Jaký byl objem nosiče a geometrie použité kolony s nosičem TALON – afinitní chromatografie str.43? Jaký byl celkový průběh SEC, na obr. 23, str.55 je uveden eluční objem pouze v rozsahu 9-20 mL)? Jaký extinkční koeficient byl použit pro výpočet konc. proteinu z hodnoty A280nm?

Dotazy k práci:

3. Jaká je rozdílnost v použitém EmulsiFlex od obecně známého “French pressure cell press”? Byly použité podmínky pro desintegraci buněk (3x1100 bar) již dříve optimalizovány?
4. Odpovídá nalezený proteinový proužek na SDS-PAGE (v přítomnosti 100mM DTT ve vzorkovém pufru) s relativní mobilitou 34kDa nějakému nalezenému signálu *m/z* v FT-ICR MS spektru? Proč nebylo toto individuum odděleno pomocí SEC (koeluce s TEAD4 konstruktem o MW 17kDa), když se podařilo oddělit protein o relat. mobilitě 25kDa?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

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

C. Celkový návrh: velmi dobře

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

Datum vypracování posudku: 11.9.2020

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.