

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Posudek oponenta diplomové práce

Rok obhajoby: 2024

Autor/ka práce: **Bc. Štěpánka Jakubcová**

Vedoucí práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant/ka: Mgr. Nikola Rychlá

Oponent/ka: doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D., Univerzita Hradec Králové

Název práce: **Klonování a příprava plasmidu pro expresi reduktasy sdr12 z vlasovky slezové**

Rozsah práce: 76 stran, 16 obrázků, 11 tabulek, 56 citací

Hodnocení práce:

- | | |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: | výborná |
| b) Náročnost použitých metod: | výborná |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): | výborné |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat: | velmi dobrá |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost): | dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy: | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů: | velmi dobrá |
| i) Splnění cílů práce: | výborné |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů: | výborné |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň): | velmi dobrá |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | velmi dobrá |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Diplomová práce Bc. Štěpánky Jakubcové je experimentální prací z oblasti přípravy rekombinantních proteinů. Práce má obvyklé členění - teoretická, experimentální část, výsledky, diskuse a závěr. V teoretické části studentka velmi dobře, přehledně a výstižně, přibližuje čtenáři problematiku vlasovky slézové, rozvoje její rezistence na anthelmintika a enzymů ze skupiny SDR, které se mohou na rezistenci podílet. Experimentální část přehledně popisuje jednotlivé metody a experimentální přístupy použité v práci. Výsledková část oproti předchozím částem má o dost horší kvalitu, popis výsledků je dost kusý, mírně nepřehledný a zvolené výrazy nejsou vždy vhodné pro použití v závěrečné práci, odpovídají spíše "laboratornímu slangu". Někdy také není nění zřejmé, co daný výsledek vlastně znamená. Diskuse je kratší a spíše jen shrnuje současnou situaci na poli faktorů přispívajících k rezistanci helmintů, protože práce s vytipovanými biotransformačními enzymy z vlasovky je dosud velmi omezená. Je zřejmé, že studentka musela pro vypracování experimentální práce zvladnout řadu technik z oblasti molekulární biologie a biochemie a výsledky diplomové práce (připravený protein sdr12) jsou nové a připravený enzym bude dále charakterizován a bude určena jeho role v metabolismu vybraných anthelmintik.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- v diplomové práci se vyskytuje řada výrazů z "laboratorního slangu" - band, blank, napipetovat,...

- řada výrazů v práci je nepřesných/nevhodně uvedených, vybírám několik příkladů např. str. 46 - body kalibrační křivky se připravily do 6 mikrozkmavek - myšleno kalibrační roztoky se připravily do 6 mikrozkmavek, na str. 51 - Produkty PCR reakce se ověřily agarosovou elektroforézou - myšleno velikost vzniklých PCR produktů se ověřila agarosovou elektroforézou apod.

- popisy obrázků jsou velmi krátké, ve většině případu (hlavně ve výsledcích) nedostatečné k pochopení obsahu obrázku bez okolního textu (např. Obr. 15, obr. 16) či je vyjádření nepřesné (např. obr. 16 - popis studentky "western blot purifikovaného proteinu", lépe by bylo uvést něco ve smyslu "analýza přítomnosti proteinu sdr12 ve frakcích získaných během purifikačního procesu pomocí anti-histag protilátky metodou western blotting", protože nejde jen o purifikovaný protein). V textu také chybí povětšinou odkazy na obrázky.

Dotazy:

- na str.29 je uvedeno složení lyzačního pufru - co je myšleno směsí inhibitorů? Jaká je jejich funkce v lyzačním pufru? Jaká je role sloučenin jako je fluorid sodný, pyrofosfát sodný a fenylmetansulfonylfluorid v lyzačním pufru? V postupu pak uvádíte BugBuster. Byl tedy uvedený lyzační pufr použit?. Jaké jiné možnosti lyze E.coli by se daly teoreticky použít?

- na str. 32 uvádíte podmínky PCR reakce. Vysvětlíte podle čeho jste volila teplotu annealingu?

- vysvětlíte přítomnost proužků o malé velikosti (pod 500 bp) na agarosové elektroforéze (obr. 11), které nijak ve výsledcích nekomentujete.

- kolik proteinu sdr12 bylo získáno procesem popsané úvodní exprese a purifikace v 50 ml kultury E.coli? Je jeho čistota dostatečná? Bylo by jí možné zvýšit? Jak?

- doporučte jakými metodami by se dalo ověřit, že získaný enzym má vhodnou strukturu, není denaturovaný či agregovaný a lze ho využít pro studium jeho funkce?

- byla již provedena charakterizace některých sdr enzymů u příbuzného organismu Caenorhabditis elegans o kterém se v DP zmiňujete nebo jiného? Proč není uvedeno v diskusi například DHRS4 C. elegans z článku Kisiela M. et al. (2017), FEBS Journal, 285 (2), 275-293.

hodnocení, práce je: velmi dobrá

k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové

22. května 2024

podpis oponenta/ky