

Téma diplomové práce: **Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1B1**

Jméno studenta, studentky: **Bc. Tereza Lundová**
Jméno oponenta: **Mgr. Lucie Škarydová, Ph.D.**

II. Posudek oponenta

Diplomová práce Terezy Lundové se zabývá přípravou rekombinantní formy lidské AKR1B1, která patří do skupiny karbonylreduktas. Cílem bylo jednotlivé kroky optimalizovat tak aby byl získán čistý protein. Práce má celkem 63 stran a obsahuje všechny části, které by měla, nicméně jejich kvalita je kolísavá. V teoretické části nás diplomantka seznamuje s enzymy redukujícími karbonylové sloučeniny a podrobněji rozebírá vybraný enzym AKR1B1. Tato část má pouze 10 stran, přínosný by jistě byl i popis principů přípravy rekombinantních proteinů (např. možnosti vektorů, expresních systémů). V experimentální části jsou jednotlivé postupy práce dobře popsány, ale díky absenci navrhované části teorie se zde vyskytují i principy některých metod. Výsledky a diskuse jsou v spojení v jednu část, kdy diskuse je pouze komentářem výsledků popř. jsou diskutovány některé optimalizace v postupu. Chybí mi diskuse zabývající se porovnáním s autory, kteří také připravovali rekombinantní AKR1B1. I přes popsané nedostatky v sepsání práce se experimentální cíle práce podařilo dobře splnit.

Připomínky:

- Na str. 10 uvádíte, že SDR nadrodina obsahuje 3000 členů, což je informace cca z roku 2000. V aktuálních člancích (např. Kallberg et al. 2010) je uváděno číslo 47000.
- Na str. 12 není jasné, zda je názvosloví AKR nadrodiny založené na sekvenci AK či NK
- V práci se vyskytují výrazy působící příliš anglicky, i když jsou přeložené např. karbonyl-redukuující, strukturně-založená léčiva, redox-citlivý atd.
- Používané hovorové výrazy, např. žebříček pro markery molekulových hmotností, hokejka pro inokulační nástroj atd.
- Prakticky v celé práci je za pomlčkou mezera např. 50- 100 g, C- terminální konec atd., za lomítkem mezera např. 50µg/ ml a na konci řádku se často dělí sousloví, která patří k sobě. Díky tomu práce působí poměrně ledabylym dojmem.

Otázky:

- Na str. 10 je uvedena biotransformační aktivita 11β-HSD1, ale jaká je jeho fyziologická funkce ?
- Co znamenají zkratky v závorce u obou kmenů *E.coli* na str. 21?
- Proč byl používán právě vektor pET-28b(+)?
- Na obr. 21 je na elektroforéze frakce E1 s čistým proteinem nicméně jsou tam patrné další proužky v nižších molekulových hmotnostech? Stačí tato čistota? Jak dosáhnout vyšší?
- Byla testována aktivita získaného enzymu? Jaký byl použit substrát?
- Proč byl tento enzym připravován, když se dá zakoupit? Jaké experimenty jsou plánovány?

Práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, doporučuji ji k obhajobě.

vrhovaná klasifikace: **Velmi dobře**

V Hradci Králové dne: 24. 5. 2010

Podpis oponenta diplomové práce