

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Oponent/ka: **PharmDr. Hana Štambergová, Ph.D.**

Autor/ka práce: Kateřina Musilová

Rok obhajoby: 2016

Název práce:

**Molecular cloning of YinP gene from Leishmania major using two red fluorescent pXG-mCherry plasmids.
Valuable tools for gene expression location.**

Rozsah práce: počet stran: 87, počet grafů: 0, počet obrázků: 34,

počet tabulek: 17, počet citací: 106, počet příloh: 2

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: výborná
- c) Zpracování teoretické části: výborné
- d) Popis metod: velmi dobrý
- e) Prezentace výsledků: velmi dobrá
- f) Diskuse, závěry: dobré
- g) Teoretický či praktický přínos práce: velmi dobrý

Případné poznámky k hodnocení:

Diplomatka se v předložené práci zabývá přípravou fúzních konstruktů protozoálního proteinu YinP s fluorescenčním proteinem mCherry na N- a C-terminálních koncích. Takto připravené konstrukty mají sloužit k experimentálnímu ověření in silico predikce subcelulární lokalizace YinP proteinu v protozoálním parazitu Leishmania major. Tento protein by se mohl stát novým terapeutickým cílem při léčbě leishmanióz. Vzhledem ke klimatickým změnám, které mohou vyústit k rozšíření rizikových oblastí a tím i ke zvýšené incidenci leishmanióz, se jedná o velice zajímavé a čtivé téma. Ráda bych vyzdvihla jazykovou vybavenost diplomantky, v práci se nachází minimum gramatických chyb či překlepů.

Teoretická část je zpracována přehledně a velice pečlivě, což poukazuje na autorčinu schopnost pracovat s literaturou (do této kapitoly spadá většina citovaných zdrojů). Autorka se detailně věnuje všem aspektům souvisejícím s leishmaniózami. Nicméně některé informace se zbytečně opakují včetně opakovaného zavedení již použitých zkratk (např. o amastigotě se obdobné informace nacházejí na str. 18, 19, 20; informace o původcích jednotlivých typů leishmanióz na str. 14 a 24). V této části je největším nedostatkem nedodržování obecné konvence v nomenklatuře genů resp. proteinů (doporučení dle HGNC či NCBI), což je ve výsledku značně matoucí (zejména na str. 29 kapitola 2.2, 2. odstavec a obr. 6).

Metodická část byla zpracována podrobně s popisem všech provedených metod včetně jejich principů, což je nadbytečné (např. u kapitoly 4.2.7); pozor na špatně uvedené jednotky na str. 43 v tab. 2, kde jsou uvedeny ml místo µl. Orientaci v této části by určitě zjednodušil obr. 28, který je ale v jiné části (až na str. 68).

Výsledková část (kapitola 5 "Results and Discussion") je přehledná s řadou tabulek a obrázků. Nicméně tato kapitola je spíše kombinací zopakované metodiky s výsledky a zcela chybí diskuze s komentáři vztahující se k jiným (obdobným) pracím. Na str. 71 je chybně uveden titulek obrázku 31.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

Doporučovala bych dodržovat nomenklaturu NCBI/HGCN pro zápis názvu genu (kurzívou) a proteinu (bez kurzívy) a citovat elektronické zdroje (v tomto případě především internetové zdroje obrázků) dle normy ČSN ISO 690, tedy bez URL adresy v textu. Pozor na nejednotnost v používání kurzívy (in silico, in vivo, Leishmania), v psaní sand fly/sandfly. V kapitole terapie leishmaniózy bych uvítala obrázky se strukturami používaných léčiv. V metodice by bylo lepší používat jednotky RCF (x g) místo RPM. Některé obrázky ve výsledkové části jsou (možná jen v tištěné verzi) špatně čitelné.

Otázky:

- 1) Na straně 32 resp. 33 uvádíte, že vektor pXG-mCherry12 byl konstruován pro přípravu N-terminálního fúzního proteinu. Na straně 56 resp. 58 (obr. 17) ale uvádíte, že při přípravě pXG-mCherry12-YinP bylo nutno vystříhnout stop kodon, což by odpovídalo dle běžných konvencí přípravě C-fúzního konstruktů. Mohla byste to vysvětlit?
- 2) Proč se ověřovala orientace sekvence pro mCherry (str. 55), když se plasmid pXG-mCherry12/34 pouze amplifikoval a následně purifikoval ze zásobní kultury? Mají snad na pracovišti nějaké zkušenosti s určitou nestabilitou těchto plasmidů?
- 3) Na str. 58 uvádíte, že amplifikace YinP se specifickými primery pro vložení restričních míst NotI vede ke vzniku fragmentu 2000 bp. To je poměrně velký insert, z čehož usuzuji, že se jedná i poměrně velký protein (v textu není uvedena velikost YinP). Nemůže tedy celková velikost fúzního proteinu ovlivnit folding samotného YinP a tím i jeho lokalizaci v buňce?
- 4) Vysvětlíte rozdíl mezi obr. 24 a 25.
- 5) Byla k ověření in silico predikce subcelulární lokalizace YinP použita i jiná experimentální metoda? Případně jakou byste navrhla?

Celkové hodnocení: velmi dobře, k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové dne 15.9. 2016

.....
podpis oponentky / oponenta