



## **Posudek diplomové práce studenta Rudolfa Andryše**

Tématem diplomové práce bylo optimalizovat dílčí separační kroky a optimalizovat postup purifikace lidské membránově vázané mikrosomální karbonylreduktasy. Práce je součástí projektu zabývajícího se izolací a strukturní charakterizací jaterního enzymu s karbonylreduktasovou aktivitou. Na základě již publikovaných výsledků o rozdílném poměru enantiomerů redukovaného oracinu se pravděpodobně jedná o nový jaterní enzym s karbonylreduktasovou aktivitou.

Student v teoretické části diplomové práce přehledně popisuje separační metody, které se pro izolaci proteinů ze směsi proteinů, tkáňového homogenátu nebo buněčného lyzátu používají. Student čerpal informace převážně ze zahraniční literatury. Škoda, že se zde diplomant zaměřil pouze na popis principu metod s odkazy na komerční webové stránky nebo encyklopedie a do přehledu nezahrnul i odborné vědecké články, kde autoři popisují s jakým úspěchem či neúspěchem použili tyto metody pro izolaci membránově vázaných enzymů. V takové formě by kompilační část diplomové práce byla velice zajímavá pro všechny, kdo se touto problematikou zabývají. Kapitola 2 obsahuje přehledně zpracované a edukativní formou podané recentní informace o karbonylreduktasach účastnících se metabolismu xenobiotik.

V rámci experimentální části se student zaměřil na dílčí kroky separace cílového proteinu s monitorováním obsahu celkového proteinu a karbonylreduktasové aktivity všech získaných frakcí včetně vyhodnocení poměru enantiomerů vzniklých při redukci oracinu. Vlastní zpracování výsledků doplněné o diskusi nad dosaženými výsledky je přehledné a vypovídá o zájmu a odborné erudici diplomanta.

Dovolím si v následující části posudku upozornit na drobné nepřesnosti, které jsem v práci našla. Připojím také dotazy, na které může diplomant během obhajoby své diplomové práce odpovědět.

U všech obrázků jak v teoretické tak experimentální části postrádám autora, tedy odkaz, odkud byly tyto obrázky, schémata převzaty. Některé obrázky mají nízkou kvalitu tisku, někdy je vhodnější hlavně u chemických vzorců obrázek

překreslit (obr. č. 3,4,12,21,22). V textu jsem narazila na drobnosti typu tripsinogen, ribonucleasa (AJ) na str. 74, zaujalo mne psaní termínu *in-vivo*, *in-vitro*. U gelů SDS-PAGE postrádám informaci o hustotě gelu nebo zda se jedná o gradientový gel. U grafu na str. 41 by mne zajímalo, z kolika opakování se vypočítávala hodnota  $K_m$  a  $V_{max}$ . U chromatogramů postrádám některé informace jako např. typ a velikost kolony, objem nanášeného vzorku, rychlost mobilní fáze, typ detekce (tzv. princip samonosnosti obrázků). V přehledu literatury jsou nejednotně uváděny časopisy, některé zkratkou, některé celým názvem. Jedná se o opravdu drobné připomínky, které však mohou studentovi v budoucnosti pomoci při dalším psaní vědeckých textů, proto jsem si dovolila všechny v posudku uvést.

#### Otázky pro diplomanta v rámci diskuze:

- 1) Stačí pro úplné potlačení proteázové aktivity přidat před solubilizací EDTA (str. 14)? Jsou i jiná řešení, jaká?
- 2) Proč je metoda gelové permeační chromatografie vhodná pouze pro látky větší jak 500 Da (str. 15)? Kde všude se tato metoda uplatňuje?
- 3) Diplomant v textu zmiňuje více metod, jak kvantifikovat množství proteinu ve vyšetřovaném vzorku (kap. 1.4.). Jsou všechny tyto metody vhodné i pro kvantifikaci peptidů a proč? Co je příčinou vysokého signálu absorbance u vzorků (A 0,6) s nulovou koncentrací BSA stanoveného metodou dle Bradforda (str. 58,59)?

Závěrem chci ocenit pečlivé vypracování diplomové práce s přehlednou prezentací výsledků. Velice kvalitní práce působí uceleným dojmem, student splnil všechny zadané úkoly a práci hodnotím známkou

**výborně.**

V Pardubicích 20. 5. 2011

Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph. D.