

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : Martin Dvořák

Název práce: Příprava rekombinantního cytochromu P450 1A1

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

1. Rozsah DP a její členění	
X	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	
X	A - výborná, bez závažnějších připomínek
	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	
X	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	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	
X	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 - uspokojivý, 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	
X	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
	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. :

Diplomová práce se zabývá přípravou rekombinantního cytochromu P450 1A1 v *E. coli*. Jelikož jde o membránový eukaryotní protein, jedná se o principiálně relativně náročný úkol. Autor práce připravil metodou syntézy genů řadu expresních vektorů pro různé varianty tohoto proteinu a vypracoval metodu jejich exprese a extrakce z cytoplazmatických membrán *E. coli* a stanovil jeho množství různými spektroskopickými a enzymologickými metodami. Třebaže práce, pravděpodobně z časových důvodů, nebyla dovedena až ke chromatografické izolaci proteinu a přesné kvantifikaci výtěžku, lze konstatovat, že zadaný úkol byl splněn a že výsledek práce poskytuje dobrý základ pro pokračování výzkumu s tímto proteinem.

K práci mám jen několik drobných připomínek:

1. Abstrakt práce je až příliš podrobný, bylo by vhodnější ho zestručnit a některé informace technického a diskusního rázu ponechat až do práce samotné. Také není optimální, když abstrakt, který je sám shrnutím práce, má v závěru ještě shrnutí sebe sama.
2. Výjimečně se vyskytují drobné formální chyby, např. v kap. 1.1.5 v prvním odstavci nejednotné značení cytochromů (některé se zkratkou CYP a některé bez ní), na několika místech není u odkazu na obrázek na jiné straně uvedeno číslo strany (např. str. 60, 1. odst.), na str. 44 je uvedeno celé slovo „sekund“ místo zkratky „s“.
3. V experimentální části je u některých metod poněkud zdlouhavě popisován jejich princip a až poté následuje samotný popis metody (např. western blot, SDS elektroforéza, aj.).
4. U některých obrázků agarosových gelů i western blotů nejsou příliš zřetelné proužky standardů, pročež by bylo vhodné je pro lepší orientaci označit přímo do obrázku, třebaže jsou popsány v legendě.

I přes tyto drobné nedostatky však považuji práci za velmi kvalitní a doporučuji ji k obhajobě.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1. V kapitole 4.1.5 uvádíte, že první pokus o ligaci dvou syntonů do plazmidu pET22b nevyšel a že vznikly nežádoucí produkty délky cca 3000 bp. Na základě čeho toto usuzujete a jaký je podle Vás způsob jejich vzniku? (Podle polohy proužků na gelu by se také mohlo jednat o supercoil konformaci neštěpeného plazmidu, přičemž relaxovaná konformace je vidět slabě výše. To by svědčilo spíše o špatně proběhnuvším restričním štěpení.)
2. Jaký je význam modifikace v oblasti N-koncové membránové kotvy u variant „mod1A1“? Dá se prostřednictvím této modifikace vysvětlit nízký výskyt těchto variant v membránové frakci?
3. V kap. 4.2 uvádíte, že CYP1A1 nebyl v expresních buňkách majoritním proteinem, a proto ani nebylo možné jej detekovat na SDS elektroforéze. Takto nízké exprese jsou obvyklé pro proteiny, které jsou pro buňku toxické. Je znám důvod, proč by měl CYP1A1 vykazovat toxicitu vůči *E. coli*? Byl monitorován růst bakterií pomocí OD₆₀₀ i po indukci, aby bylo možno posoudit, jak dlouho je kultura živá?
4. Dokážete přibližně určit, jaký je výtěžek CYP1A1 v mg izolovaného proteinu na litr bakteriální kultury?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

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

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / **NE**

Navrhovaná celková klasifikace: **v ý b o r n ě**

Datum vypracování posudku: 7.9.2011

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): Marek Ingr