

Posudek oponenta bakalářské práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Jana Smolová

Název práce: Optimalizace exprese fotoaktivovatelných cytochromů P450 jako nano-sond pro studium membránové topologie enzymů metabolismu léčiv a aktivace karcinogenů

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

1. Rozsah BP a její členění	
X	A - přiměřené, odpovídají charakteru BP 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	
	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)
X	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
X	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	
	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
X	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	
	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
X	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.:

Předkládaná bakalářská práce je členěna obvyklým způsobem. Úvod je bohužel velmi obecný a netýká se konkrétních věcí, kterým se studentka během své práce věnovala. Nic se nedozvíme o CYP2B4, který byl v rámci bakalářské práce exprimován ani o buňkách či plasmidu, který byl k tomuto účelu využit. Kapitola 1.1.2 ač nazvána Interakce CYP2B4 s reakčními partnery o vzájemných interakcích nepojednává. Velkým nedostatkem je jen velmi stručné komentování dosažených výsledků, které je navíc uvedeno až v kapitole Diskuze, diskuze tím pádem téměř chybí.

V práci se vyskytuje větší množství překlepů či opominutí, z nichž většina nemění smysl napsaného textu a nebrání v jeho pochopení. Následující však vyžadují v bakalářské práci opravit:

Str. 9: „...totožnost primární struktury CYP je nejvíce 20% ...“, což není pravda, protože CYP v rámci rodin a podrodin dosahují homologie mnohem vyšší.

Str. 10, 11: ROH- hydrolyzovaný produkt monooxygenasové reakce, místo hydroxylovaný

Str. 12: „Bakterie využívají při proteosyntéze odlišné kodony než eukaryotické organismy...“, ačkoliv je genetický kód univerzální.

Str. 21: chybně uvedena jednotka molárního absorpčního koeficientu CYP

Str. 23, kap. 3.3.2.3: Chybí koncentrace a pH pufru pro resuspendování pelety

V tab. 1, 2, 3 je špatně uvedena jednotka koncentrace CYP.

Ačkoliv je pro celou bakalářskou práci stěžejní citace 36, podle které bylo při expresi CYP2B4 postupováno, tak je uvedena až v samotném závěru práce a ještě špatně, prvním autorem není Waskell L., jak uvádíte vy, ale Saribas A.S. V některých případech nejsou citace v textu uvedeny ve správném pořadí, jako např. str. 8, kde je nejprve citace 9 a následuje citace 14, to se opakuje i na str. 11 a 13. V seznamu citací je několikrát špatně uvedena zkratka časopisu *Protein Expression and Purification*, časopis *Current Protocols in Protein Science* není zkratkou uveden vůbec.

V práci se vyskytuje velké množství anglických výrazů, zejména pro označení chemikálií (př. lysozyme from chicken egg white) či roztoků (př. Compatibility reagent solution) a dalších. Autorka nedodržuje jednotné názvosloví enzymů (-asa x -áza). Zkratka CYP2B4 se píše bez mezery. Mezi číselnou hodnotou a jednotkou, která je ve tvaru přídatného jména (př. molární, procentní), se neuvádí mezera.

Co se týká výsledků, tak bych velmi doporučila jednotlivá měření koncentrace CYP zopakovat vícekrát a výsledky uvádět jako průměrnou hodnotu se směrodatnou odchylkou, čímž by se mohl omezit i vliv odebírání vzorků.

Bohužel nemohu souhlasit s některými tvrzeními, které autorka uvádí v diskuzi a to konkrétně, že k odumírání buněk vlivem dlouhé doby produkce a rychlejšího nárůstu počtu buněk dochází jen ve Fernbachových baňkách (str. 36), protože dle imunodetekce CYP2B4 k tomu dochází i v Erlenmayerových baňkách.

A dále, že optimalizovaný protokol exprese CYP2B4 je možné použít pro produkci cytochromu P450 s inkorporovanými fotolabilními aminokyselinami (str. 37), protože ze zkušeností z naší laboratoře vyplývá, že inkorporace fotolabilních aminokyselin rapidně klesá s časem produkce.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

- 1) Můžete uvést důvod, proč jsou buňky *E.coli* C41 odolné vůči expresi toxických proteinů na rozdíl od buněk BL21 Gold?
- 2) Při stanovení proteinů uvádíte, že bylo přidáváno „Compatibility Reagent Solution“. Bylo toto činidlo použito ve všech stanoveních? Proč?
- 3) Proč si myslíte, že odlišné výsledky Vaší exprese a exprese popsané v citaci č. 36 jsou způsobeny použitím jiného detergentu, když navíc dále v diskuzi uvádíte, že CYP2B4 byl z membrán úspěšně solubilizován a v nesolubilní frakci částečně zůstal pouze v případě bakteriálního kmene *E. coli* BL21 (DE3) z Erlenmayerovy baňky? Jaký detergent byl použit v původní práci a jak by tedy mohl ovlivnit výtěžek?
- 4) V diskuzi uvádíte: „Abychom mohli vymezit podmínky, za kterých je možné cytochrom P450 produkovat v limitním mediu, byla nejprve testována produkce nemodifikovaného cytochromu P450.“ Plánujete tedy do budoucna CYP nějakým způsobem modifikovat? Jak? Nemyslíte, že v limitním mediu bude růst buněk a následná produkce proteinu probíhat odlišně?

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:

Datum vypracování posudku: 5. 6. 2013

Jméno a příjmení, podpis oponenta : RNDr. Věra Černá, Ph.D.