

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

Katedra Biochemických věd

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Oponent/ka: **RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.**

Rok obhajoby: 2013

Autor/ka práce: **Petra Kořínková**

Název práce:

**Klonování a exprese lidské AKR1A1**

---

Rozsah práce: počet stran: 62, počet grafů: , počet obrázků: 16,

počet tabulek: 13, počet citací: 38, počet příloh: 0

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: dobrá
- c) Zpracování teoretické části: dobré
- 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:

Předložená diplomová práce se zabývá přípravou rekombinantní formy lidské AKR1A1 v expresním systému E.coli. Práce má přiměřenou délku a obsahuje všechny požadované části, které jsou ale zpracovány v rozdílné kvalitě. Teoretická část nepůsobí příliš kompaktně, některé věci jsou rozebrány nadbytečně podobně (např. studie str. 23), jiné ve zkratce (xenobiotické substráty AKR1A1, když je celá teoretická část o biotransformaci). Součást teoretické části o biotransformačních enzýmech (str. 9-16) obsahuje pouze tři opakující se reference z toho dvě jsou skripta FaF (Kvasničková a kol., 1995, Skálová a kol., 2011) a poslední (Parkinson a kol. 2001) není vůbec uvedena v seznamu referencí. Metodická část je popsána dobře, podrobně a srozumitelně. Výsledky a diskuse jsou dohromady v rámci jedné kapitoly, nicméně tato kapitola obsahuje prakticky pouze okomentované výsledky, minimum diskuse. Uvítala bych např. porovnání přípravy rekombinantní AKR1A1 s jinými autory. Tato sekce také obsahuje obrázky, které sem nepatří - Obr. 7 by spíš patřil do metod a Obr. 13 do teorie. Reference nemají jednotnou formu, nejsou oddělené internetové zdroje a ty jsou také špatně citované v textu. Navíc náhodně jsem zjistila např. citace Riggs a kol. 2008 není správná, autoři jsou v referencích zcela zpřeházeni, správně by mělo být Bains a kol. 2008. Není tedy vyloučeno, že i další reference nejsou správně zapsané.

Dotazy a připomínky:

AKR1A1 je obecně známá pod pojmem aldehydreduktasa , pojem alkoholdehydrogenasa (str. 19, 21) je možná historický, uvedený mezi názvy tohoto enzymův databázích, ale v článcích jste na něj určitě nenarazila.

V diplomové práci jsou používány hovorové výrazy (např. histidinový ocásek, pro histidinovou značku, zkratka Žeb pro marker molekulových hmotností, vyizolovat atd.)  
Proč byla použita touchdown PCR? Proč má takový proces vyšší specifitu? Jak byly navrženy primery?

Co je to indukce enzymů? Je stále pravdivá věta "Většina těchto enzymů (myšleno biotransformačních) je ve tkáních neustále a jejich syntéza není závislá na přítomnosti a množství jejich substrátů" se starých skript uvedená na str. 10?

Proč z nadrodiny SDR rozebíráte podrobněji právě enzymy CBR1, CBR3 a CBR4? Jaká je jejich role v organismu? Jaké další enzymy z nadrodiny SDR se účastní biotransformace xenobiotik a kterých?

Na str. 49 se uvedeno, že pro ligaci bylo původně použito 400 jednotek T4 ligasy na ul, což nevedlo k úspěchu. Pro úspěšnou ligaci bylo třeba 2 miliony jednotek na ul? Podle čeho bylo původní množství zvoleno a proč byla pak použita hned 5000x násobná koncentrace (jiná, menší množství nejsou zmíněna)?

Aktivita připraveného enzymu byla testována se substrátem p-nitrobenzaldehyd, byly stanoveny kinetické parametry. Proč byl zvolen právě tento substrát? S literaturou porovnáváte pouze hodnotou  $V_{max}$ ? Je známá i  $K_m$ , případně je srovnatelná s vámi stanovenou hodnotou?

**Celkové hodnocení: velmi dobře, k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové dne 31. 5. 2013

.....  
podpis oponentky / oponenta