

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

Katedra Biochemických věd

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

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

Rok obhajoby: 2016

Autor/ka práce: **Markéta Svobodová**

Název práce:

**Imunochemické stanovení enzymů DHRS8 a DHRS12 v lidských tkáních**

---

Rozsah práce: počet stran: 74, počet grafů: 0, počet obrázků: 29,

počet tabulek: 3, počet citací: 45, 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: dobrá
- f) Diskuse, závěry: dobré
- g) Teoretický či praktický přínos práce: velmi dobrý

Případné poznámky k hodnocení:

Diplomová práce má za cíl stanovit expresi dvou enzymů z rodiny SDR, DHRS8 a DHRS12, v lidských tkáních. Diplomová práce obsahuje všechny požadované části, má obvyklé členění, ale její kvalita je poměrně nízká. Text obsahuje řadu chyb, podivných formulací a nepřesností. Zpracování tématu není příliš obsáhlé, což spolu s horší vyjadřovací schopností diplomantky a nekvalitními obrázky (např. Obrázek 8 ve vytištěné formě velmi špatně čitelný, i další obrázky mají horší kvalitu než je obvyklé) nepůsobí příliš přesvědčivě. Odstavce v teoretické části či diskusi jsou často jen otrocky (a možná i strojově vzhledem k některým zvláštním formulacím) přeložené části publikací bez "ladu a skladu" a nějaké větší logické koncepce jednotlivých kapitol. Jsou zde také odkazy na publikace, které nejsou v referencích, případně odkazy na publikace, které se danou problematikou/tématem nezabývají (např. Štambergová et. al 2013 není v referencích, str. 61 odstavec uprostřed Bray et. al. 2013 se expresí mRNA nezabývá). Výsledková část opakuje z velké části metodiku, popis a hodnocení dosažených výsledků se obvykle omezuje na cca 2 řádky. Diskuse zčásti opakuje výsledky, z části se diplomantka pokouší diskutovat. Její práce byla uhlečena, protože výsledky týkající se DHRS8 byly již publikovány (Lundová et al. 2016, Mol Cell Biochem, 411(1-2), 35-42) a diskuse se tedy z určité části shoduje s publikovaným článkem. Souhrnem lze říci, že práce má poměrně nízkou úroveň, nebyl jí pravděpodobně věnován ani dostatek času (nízká úroveň formátování textů, popisu atd.), nicméně ji ještě lze doporučit k obhajobě.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

Většina obrázků teoretické části (Obr. 1 - 9) mají nízkou až neuspokojivou (Obr. 8) kvalitu, stejně jako některé obrázky ve výsledkové části (Obr. 19 film B, Obr. 20, Obr. 26). Obrázek 8 je navíc z části upraven chybně do čestiny - androstenedione není androstendiol

V teoretické části se vyskytuje řada faktických chyb - str. 10 je uveden neaktuální počet SDR zástupců, chybné tvrzení o katalytických aminokyselinách SDR na str. 14 (Serin a asparagin jsou velice konzervované na rozdíl od tyrosinového zbytku, který není vždy zastoupen - tyrosin je na rozdíl od výše uvedených zastoupen vždy, protože poskytuje proton do redukce), chybné tvrzení "dehydrogenasy/reduktasy patří do SDR nadrodiny zaujímají z celého množství reduktas až 25%", kdy ve článku (Persson et al. 2009) je myšleno všech dehydrogenas/reduktas

Teoretická část (i další části) obsahuje řadu nesmyslných, pokomolených vět či nevhodně použitých slov - str. 21 dole ("...protože protilátky nemohou být využity přímo ve struktuře gelu, nejdříve se zvyditelní hledané proteiny protilátkami přenosem rozdělených proteinu na membránu..", "...navázáním detekčního systému se výskyt proteinu vyvolává na film"), str. 23 ("Tím proteiny získají jednotný negativní náboj, a jakmile se zapojí do elektrického pole, tak se pohybují...")

Obecné kapitoly o SDR enzimech (2.1-2.6) jsou poměrně nevyvážené, zatímco vývoji výzkumu (vzhledem k počtu enzymů) či názvosloví se dozvíme dost informací (2.1, 2.3), kapitola o metabolické aktivitě je poměrně nepřehledná a substrátech SDR enzymů se toho moc nedozvíme. Chybí lepší přehled významných zástupců či přehled DHRS zástupců. Vzhledem k tématu práce bych uvítala informace o expresi těchto enzymů ve tkáních, které by jí obohatilo, zatímco počet rodin SDR enzymů u bakterií či archea téma práce nijak neobohacuje

V teorii o stanovení exprese bych uvítala popis i dalších použitelných metod než jen western blotting, který je ještě z velké části popsán jen v základních rysech dle učebnice (Šmarda a kol. Metody molekulární biologie), navíc např. schéma transferů je uvedeno v práci dvakrát, jak v teorii, tak v metodice, což se mi zdá víc než zbytečné

V sekci metodika je zbytečný popis přípravy (pouze překlad článku Lundová et. al) Sf9 buněk exprimujících cílové enzymy a mikrosomální frakce z nich, když tato práce nebyla součástí diplomové práce. Jiné, důležité věci v metodice chybí - výčet vzorků používaných pro stanovení exprese (ev. jejich koncentrace pokud nebyla měřena v rámci diplomové práce), není jasné jaké pufrů byly používány pro semi-dry and wet transfer proteinů při blottingu, množství nanášeného proteinu na elektroforézu by mělo být uvedeno v metodice (nikoliv až ve výsledcích), zcela chybí množství nanášených kontrolních vzorků atd.

Výsledková část je víceméně, zopakování metodiky (viz výše), popis obrázků ve výsledcích (ale i jinde) je nedostatečný (např. Obr. 18, 19, 20 Testování na vzorcích lidských homogenátů, za tímto krátkým názvem navíc následuje část, která vypadá spíš jako diplomatčiny poznámky k danému experimentu - hustota SDS PAGE gelu, ředění protilátek, doba inkubace, podmínky blottingu, doba expozice filmu atd, což by mělo být v metodice). Navíc některé kroky popsané ve výsledcích postrádají logický postup - optimalizace ředění protilátek aniž by se zkusili podmínky doporučené výrobcem (6.1.1 a 7.1), nahodilé změny blokovací látky (mléko, BSA u DHRS8), "nahodilá" množství proteinů na jednotlivé experimenty (viz dotazy).

V práci se taky objevují některá tvrzení různě na různých místech práce, a to včetně výsledků - např. výsledky týkající se exprese DHRS12 - v abstraktu je uvedené, že byla detekována v mozku, ve výsledcích, že nikoliv a v diskusi opět popsána detekce v mozku Odkazy na literaturu v textu mají různé tvary (např. Tang et al. 2014, jindy Tang et Le 2014), forma seznamu použité literatury neodpovídá závazným doporučením, ani pro články v časopisech (vybraný formát nemá ani zcela jednotnou formu) a internetové zdroje, seznam není ani podle abecedy

Práce obsahuje řadu gramatických i syntaktických chyb a zvláštních tvarů slov (např. zkoušející vzorek, enzymy redukuujících sloučenin) a nevhodně použitých výrazů (např. xenogenní místo xenobiotický), zavedení a používání zkrátek je nahodilé, některé termíny

nejsou jednotně zapisované (např. androstandiol x 3alpha-diol x5alpha-androstan-3alpha,17beta-diol), formátování textu je také nejednotné (různé fonty, různé zápisy opakujících se věcí např. obrázek:, obrázek -)

Dotazy:

Co to jsou nemoci způsobené změnou struktury enzymu (str. 16), myšleno změnou struktury SDR enzymů?

Na str. 13 uvádíte, že Rosmanův záhyb ve struktuře SDR poskytuje "lešení" pro různé sekvenční prvky? Vysvětlete. Uvádíte, že se do Rosmanova záhybu se váže kofaktor. Vysvětlete jak?

Co znamená "konvergentní evoluce konformace aktivní strany" na str. 14?

Co je to afinita enzymu? Ke kterému z popsaných substrátů má enzym DHRS8 nejvyšší afinitu? A ke kterému nejvyšší aktivitu?

Kdy byla popsána struktura DHRS12 (str. 20)?

Proč se kapitola 3 v teoretické části nazývá proteomika? Vysvětlete.

Jaké jiné metody lze použít pro stanovení množství proteinu ve tkáních?

Na str. 25 uvádíte "po transportu bílkovin na membránu se aplikují protilátky, které specificky zachytí hledaný úsek". Co je to hledaný úsek? Jaký je rozdíl mezi polyklonální a monoklonální protilátkou?

Na str. 25 uvádíte "tloušťka pruhu na fotofilmu odpovídá množství přítomného proteinu.

Výsledek se porovnává se standardem, u kterého přesně víme dané množství" - jaký výsledek ohledně množství proteinu z western blottingu lze dostat? Jaká forma standardu byla používána v diplomové práci? Na různých místech uvádíte různé standardy.

V práci byla analyzována exprese proteinů v lidských tkáních, kolik dárců bylo použito?

V různých místech práce používáte různé čísla.

Bylo prováděno stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích? V metodice je popsána BCA metoda, ale ve výsledkové části se takové výsledky nevyskytují. Informace o koncentraci používaných vzorků pro analýzu zcela chybí.

Proč se prováděla optimalizace pomocí dot blot dříve než byl western blotting vyzkoušen dle doporučení výrobců protilátek? U výsledků dot blotu hovoříte tom, že enzym byl detekován dostatečně. Co to znamená? Jak ovlivní ředění protilátek citlivost stanovení? Proč pak bylo v kapitole 6.1.4 použito ředění anti-DHRS8 protilátky 1:5000, když toto ředění nebylo použito ani v optimalizaci, navíc optimalizace pro jednu protilátku nelze použít pro jinou.

V čem byly ředěné protilátky anti-DHRS8 - v každé kapitole výsledku uvedeno jiné blokovací činidlo (úvodní experiment optimalizace - mléko, pak BSA, pak provedena optimalizace blokovacího činidla na mléko)?

Proč exprese DHRS8 i DHRS12 je u vzorků z různých dárců prováděna v různých materiálech (homogenát vs. mikrosomy)? Proč je používáno také různé množství proteinu? Navíc ve výsledcích píšete, že používáte 40 ev. 50 či 20 ug proteinu, ale hovoříte o koncentraci bílkovin ve vzorku - upřesněte!

Jaká je molekulová hmotnost stanovovaných enzymů? Je to pro vyhodnocení výsledků důležitý parametr, který ale není nikde v práci uveden? Co může být výsledek o velikosti 25 kDa na Obr. 28?

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

V Hradci Králové dne 13. 9. 2016

.....  
podpis oponentky / oponenta