

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Posudek oponenta diplomové práce

Rok obhajoby: 2021

Autor/ka práce: **Bc. Nikola Rychlá**

Vedoucí práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant/ka:

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

Název práce: **Klonování a příprava plasmidu pro expresi vybrané reduktasy z vlasovky slezové**

Rozsah práce: 76 stran, 27 obrázků, 18 tabulek, 43 citací

Hodnocení práce:

- | | |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: | velmi dobrá |
| b) Náročnost použitých metod: | výborná |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat: | výborná |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost): | velmi dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy: | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů: | velmi dobrá |
| i) Splnění cílů práce: | výborné |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů: | výborné |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň): | velmi dobrá |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | velmi dobrá |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Předložená diplomová práce Bc. Nikoly Rychlé obsahuje všechny požadované součásti, nicméně jejich kvalita je kolísavá. Teorie týkající se *Haemonchus contortus* a terapie *haemonchos* je poměrně zdařilá, zatímco část týkající se biotransformace a karbonyl-redukujících enzymů je víceméně jen otročským opisem/překladem zdrojů 13, 16 a 26. Myslím, že by se teoretická část dala využít lépe, nebylo třeba obsírně popisovat lidské enzymy této skupiny, když nebyly objektem diplomové práce. Metodika je popsána ve vhodné podrobnosti umožňující případné zopakování postupu, ale dle mého názoru, nepatří do této části popisování/vysvětlování různých faktů (např. o stabilitě RNA na str. 30, princip BCA na str. 47) či příklady amplifikace Obr. 6 a 8, které by patřili spíše jako ukázka do výsledků. Výsledkovou část tvoří 12 stran a zasloužila by si v některých aspektech lepší zpracování (viz připomínky např. popis obrázků), některé věci chybí (např. alespoň zmínka o úspěšné ligaci) zatímco jiné jsou nadměrně podrobné (např. měření koncentrace proteinu - tab. 18 z jednotlivými měřeními a výpočet z rovnice). Diskuse využívá pouze 3 zdroje. I přesto, že oblast karbonyl-redukujících enzymů u *H. contortus* je oblast neprobádaná jistě by se nějaká další témata k diskusi našla. Diplomová práce trpí celou řadou nedostatků zejména v oblasti jejího zpracování, působí trochu jako "šitá horkou jehlou". Nicméně obsah samotné

experimentální práce je pro diplomovou práci zcela v pořádku. Je zřejmé, že studentka musela pro úspěšné splnění práce využít a naučit celou řadu metodik z oblasti molekulární biologie, biochemie a bioinformatiky. I přesto, že jde vlastně o práci přípravnou, je velmi důležitá a je zcela evidentní, že její výsledky budou dále využity pracovní skupinou doc. Matouškové k hlubšímu pochopení rezistence *H. contortus* k flubendazolu.

Dotazy a připomínky:

Připomínky:

- formální úprava diplomové práce (např. řádkování a odstavce) je velmi "rozmáchlé", některé strany nesplňují ani rozsah normostran (např. 24, 30), chybí také číslování stránek, což snižuje orientaci v textu

- v práci se vyskytuje řada chyb a nepřeností z nichž některé vybírám: např. str. 14: " Základem reakcí jsou enzymy metabolizující xenobiotika. Jedná se o transportní proteiny a biotransformační enzymy"...transportní proteiny nepatří mezi enzymy, str. 15 " tj. redukci karbonylové skupiny, a to ztrátou kyslíku či adicí dvou vodíků"...u redukce karbonylové skupiny rozhodně nedochází ke ztrátě kyslíku, kofaktor NAD(P)H se zapisuje takto nikoliv NA(P)DH jak je uvedeno na mnoha místech teoretické části, str. 21, membrána pro imunometody je PVDF a nikoliv PVFD jak je na straně 48, počet členu SDR nadrodiny není příliš aktuální, je z roku 2009, v roce 2016 bylo publikováno (Jornvall et al., Chem Biol interact) více než 600 000 hitů v databázi Uniprot a jistě aktuálně bude číslo ještě mnohem vyšší, str. 27 - nestačí napsat pouze primární anti-histag protilátka Abcam, Abcam prodává celou řadu protilátek uvedené specifity pocházející z různých zvířat, podobně charakterizace sekundární protilátky je nedostatečná, ...

- popisy obrázků a tabulek by mohly být obsáhlejší (někde bez četby okolního textu nelze odhadnout čeho se týkají či jsou nepřesná), na str. 50 by se hodilo na začátek výsledků uvést z jakých vzorků byla RNA izolována (pouze v tabulce ISEM, ISEF, WRM, WRF, IREM, IREF). Zkratky ISE, IRE a WR jsou poprvé a naposledy na str. 8, stejně tak např. v tabulce 13 není jasné je vzorek 1-4, obrázek 18, 19 by si zasloužit popis velikosti DNA v markeru aby bylo zřejmé, zda produkty po enzymatické restrikci/PCR odpovídají očekávanému

Dotazy:

- Které karbonyl-redukující enzymy se podílí na metabolismu flubendazolu u člověka ev. hospodářských zvířat?

- Na straně 15 uvidíte, že karbonylová skupina je přítomna na řadě eobiotických subtrátů. tudí karbonyl-redukující enzymy jsou zodpovědné za jejich biologickou aktivitu a také, že jejich role je nenahraditelná v patofyziologických procesech. Můžete vysvětlit a uvést na příkladu?

- Jaký je rozdíl mezi *E.coli* a kompetentní *E.coli*?

- Co znamená noRT na str. 30? Jaký by měla daná reakce ukázat výsledek a proč se dělá?

- Klonování bylo provedeno po pCI vektoru, který se používá pro expresi neznačených proteinů. Vysvětlete jakto, že jste mohla použít pro detekci proteinu metodou dot blot anti-histag protilátku?

- Vysvětlete popis osy y u obrázků 13-16? jde o správný výraz? Co má znamenat?

hodnocení, práce je: velmi dobrá

k obhajobě: doporučuji

V Hradci Králové

24. května 2021

podpis oponenta/ky