

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis
Master's degree program in Pharmacy

Opponent's review of Master's thesis

Student's name: Martin Juhás

Mentor of the thesis: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D

Year of the thesis
defense: 2018

Opponent of the thesis: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Title of the thesis:

**Definition of the carbohydrate binding capacities of the novel
enterotoxin LT-IIc**

Formal comments: number of pages: 70, number of figures: 26, number of tables: 5, number of references: 112.

Type of work: Experimental work

- a) The aim of the thesis is: Fulfilled
- b) Language and graphic level: Excellent
- c) Processing of the theory: Excellent
- d) Methods description: Very good
- e) Results description: Excellent
- f) Discussion and conclusions: Excellent

I recommend Diploma thesis for the recognition as Rigorous thesis .

Opponent's comments: The diploma thesis of Martin Juhás is excellent in both the experimental and theoretical aspect, outstanding in the variety of methodology the student applied with all the complexity of gained results, and also high quality of the theoretical introduction, results description and discussion, which could be, in my opinion, part of a journal publication. Therefore, I recommend the thesis for the defense.

Nevertheless, I do have some minor comments. The use of shortcuts is not always consistent. In some cases, the shortcut is not explained in the first instance. And in some cases the shortcut is not mentioned in the list of abbreviations. Also, in my opinion, some parts mainly in the methodology lack logical order and some informations are doubled.

Questions: 1. On page 32 you mention that: "Each GSL was tested multiple times..", but you don't specify the number of experiments, and I neither found any values with standard differences, nor the error bars in the graph. Did you evaluate the differences in the measurements, or tried to evaluate the results statistically?

2. On the page 33 in the description of binding assays which were subsequently assayed in scintillation analyzer. Probably due to the lack of description of the plates used for the assay

it is not clear, how the samples were prepared for the measurement. Did you transferred only the content of the well or put all the well in the scintillation vial?

3. What is the principle behind the protein staining using the Imperial staining? Have you encountered any interference of the staining with the Western transfer?

4. In the description of the gel electrophoresis you mention that the concentrations 10, 1 and 0.1 mg/ml didn't produced satisfactory results and you switched to the 1, 2.5 and 5 mg/ml. Can you provide more information about the unsatisfactory results and why you chose the new concentrations?


5. On page 36 you describe the binding of protein to the membrane with studied glycoproteins, but contrary to the radioimmunoassay you don't mention blocking of the membrane before binding step. Is this intentional or a mistake?

6. During you work you used evaporation of the solvents from your samples under the flow of nitrogen. Could you describe the procedure practically? Could this be used to concentrate a sample dissolved only in water?

Evaluation of Master's thesis: Excellent

Recommendations for the thesis defense: Recommended

In Hradec Kralove 30. 5. 2018


.....
Opponent's signature

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra KFCHKL

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Martin Juhás**

Vedoucí/školicel/ka práce:
prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Rok obhajoby: 2018

Konzultant/ka práce:

Oponent/ka práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název práce:

Definition of the carbohydrate binding capacities of the novel enterotoxin LT-IIc

Rozsah práce: počet stran: 70, počet obrázků: 26, počet tabulek: 5, počet citací: 112

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: výborná
- c) Zpracování teoretické části: výborné
- d) Popis metod: velmi dobrý
- e) Prezentace výsledků: výborná
- f) Diskuse, závěry: výborné
- g) Teoretický či praktický přínos práce: výborný

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: Diplomová práce studenta Matina Juháse je po všech stránkách vysoce kvalitní, hodnotím ji jako vynikající jak z pohledu experimentální práce, která je velmi rozsáhlá metodicky (student použil HPTLC a radioimmunoassay pro hodnocení vazby enterotoxinů na glykosfingolipidy, gelovou elektroforézou a western blotting pro hodnocení vazby na glykoproteiny, sloupcovou chromatografii a LC-MS pro izolaci a následnou charakterizaci glykosfingolipidů z biologického materiálu), tak je vyjimečná i komplexním přístupem k problematice a v neposlední řadě i samotným zpracováním práce včentě podle mého názoru bezproblémové práce s literaturou a čtivosti celého textu. Troufám si říct, že by práce (jak experimentální část, tak jistě i diskuze) mohla být bez problémů součástí odborné publikace. Proto hodnotím práci jako vynikající a doporučuji i její uznání i jako práci rigorózní.

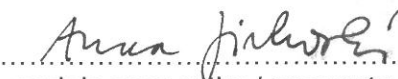
Dotazy a připomínky: Přestože je práce velmi kvalitní, v několika bodech jsem našla nedostatky. Jedním z nich byla práce se zkratkami. V několika případech nebyla zkratka vysvětlena při prvním výskytu v textu (ale byla v seznamu zkratek), v řadě případů pak chyběla zkratka v seznamu zkratek (EAEC, STEC, EPEC, WHO, GDI, HILIC...). Mám výhrady i k teoretickému popisu použitých metodik v kapitole metody. Myslím, že vhodnější umístění by bylo buď v teoretické části, nebo poté v diskuzi. Trochu nelogické mi přišlo i uspořádání jednotlivých kapitol, převážně v metodické části a někdy opakující se informace. V části o typech glykosfingolipidů mi naopak chyběla část popisující neutrální typy. Myslím také, že některé obrázky byly spíše tabulkami.

Mám i několik otázek:

1. Na straně 32 píšete, že: "Each GSL was tested multiple times.." ale nspecifikujete počet opakování, ani jsem si části výsledků nevšimla vyhodnocení ve smyslu jednotlivých hodnot s chybou, nebo chybových úseček v grafu. Vyhodnocovali jste tato měření a porovnávali mezi sebou?
2. Na straně 33 popisujete postup při navazování značeného proteinu na mikrotitrační destičky s navázaným glykosfingolipidem a poté přípravu na měření se scintilačním roztokem. Protože nepopisujete, jaké destičky byly použité pro stanovení, není zcela jasné, jak jste vzorek připravili pro měření. Můžete metodiku upřesnit?
3. Jaký je princip Imperial stainingu, který jste použili pro detekci proteinů na SDS-PAGE gelu. Nezaznamenali jste interferenci barvení proteinů s následným Western-blotem?
4. V popisu gelové elektroforézy zmiňujete, že koncentrace 10, 1 a 0.1 mg/ml neposkytovaly uspokojivé výsledky, proto jste pro další sérii experimentů zvolili koncentrace 1, 2.5 a 5 mg/ml. Můžete přiblížit, proč jste výsledky zhodnotili jako neuspokojivé a co vedlo k výběru následujících koncentrací?
5. Na straně 36 popisujete vazbu proteinu na membránu s přenesenými glykoproteiny, ale na rozdíl of radioimmunoassay nepopisujete blokaci. Je to záměr nebo omyl?
6. V práci několikrát zmiňujete odpařování pomocí dusíku. Můžete prakticky popsat provedení? Dal by se takto odpařit i vzorek rozpuštěný pouze ve vodě?

Celkové hodnocení, práce je: výborná, k obhajobě: doporučuji

V Hradci králové dne 30. 5. 2018


.....
podpis oponentky / oponenta