



Posudek na bakalářskou / magisterskou práci

- školitelský posudek
 oponentský posudek

- bakalářská práce
 magisterská práce

Autor: Vašová Kateřina

Název práce: Charakterizace mutantních forem 17 β -HSD10 proteinu

Oponent: Mgr. Ing. Miloslava Bajer Ďuráčová, Ph.D.

Struktura/členění práce:

Předložená diplomová práce má standardní členění experimentálních prací. Úvod práce čtenáře stručně seznámí s enzymem 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza typu 10 (17 β -HSD10), jeho roli v ontogenezi a neurodegenerativních poruchách. Teoretická část je členěna na tři podkapitoly. Kapitola o studovaném enzymu nabízí základní informace o struktuře kódujícího genu a samotném proteinu. Nechybí zde kapitola s informacemi o fyziologické funkci enzymu, tato tematika je poměrně složitá, text však stručně a přehledně definuje jeho nejdůležitější funkce v lidském organismu. Logicky pak následuje krátká rešerše onemocnění, která souvisí jak s nadměrnou, tak deficitní přítomností enzymu. Obsahově významnou část textu pak představuje kapitola věnovaná Alzheimerově chorobě. Kapitola Amyloidový prekurzorový protein (APP) spolu s kapitolou Amyloid-beta peptid na sebe logicky navazují a vyúsťují tak plynule v kapitolu o akumulaci amyloid-beta peptidu a v kapitolu věnující se vazbě 17 β -HSD10 na amyloid-beta. V závěru teoretické části by bylo možná vhodné, vzhledem k tématu diplomové práce, více rozvést hypotézu změny v genu HSD17B10 a její vliv na metabolismus/transport APP.

U použitého materiálu by bylo lepší uvádět i sídlo firmy a konkrétní produkt, tedy nestačí např. uvést pouze: centrifuga (Eppendorf).

Experimentální část je přehledně členěna. U použitých metod je na začátku krátký teoretický úvod, tím bych spíše obohatila teoretickou část. Dílčí části praktické práce mají logickou návaznost, experimenty jsou přehledně popsány. Je zde popsána exprese a purifikace proteinu 17 β -HSD10 a jeho mutovaných variant, SDS-PAGE elektroforéza produkovaných proteinů, stanovení enzymatické aktivity wt 17 β -HSD10 a jeho dvou mutantních variant a stanovení rovnovážné konstanty reakce (pouze pro 17 β -HSD10).

Literární zdroje, citace a jejich použití:

Seznam literatury je zpracován pečlivě, sdělení jsou v textu citována správně.

Výsledky a jejich zhodnocení/diskuze:

Výsledková část je dobře zpracována. Mám zde přesto několik připomínek. Pro logickou návaznost by bylo lepší přehodit reportování výsledků pro kapitoly 5.1 a 5.2, první tedy uvést měření koncentrace proteinu a za něj poté zařadit SDS elektroforetické gely. V kapitole 5.1 autor popisuje, že byly vzorky během celého procesu purifikace sbírány na kvantitativní analýzu. Toto je zde navíc a nezapadá do kontextu. U výsledků je místy znovu opakován, případně ještě doplněn postup, který by měl být součástí experimentální části práce. V kapitole 5.3.3 se autor chybně odkazuje na kapitolu 5.3.3.

Sepsání kvalitní diskuze je bezesporu těžkým úkolem. Autor si s tímto poradil dobře a jde vidět, že chápe principy vědecké práce. Výsledky jsou diskutovány s odkazem na dostupnou vědeckou literaturu. Autor obratně shrnul výsledky experimentu a navrhl další možné postupy. Jako největší slabinu hodnotím místy neobratné vyjádření, například: „*Obě mutantní varianty 17β-HSD10 nevykazovaly při použité esaji enzymatickou aktivitu.*“, doporučuji nahradit: Ani jedna z mutantních variant nevykazovala při použité esaji enzymatickou aktivitu. Dala bych si dále pozor na tyto věty/souvěti: „*O enzymaticky neaktivních mutantních formách 17β-HSD10 píše i Yang et al.*“, „*U mutantní varianty 17β-HSD10 (Y168G, K172G) studované v této diplomové práci byla také provedena změna tyrosinu ve stejné pozici 168, tentokrát na fenylalaninu funkčně podobný alanin.*“

Formální úroveň:

Pokud jde o formální rozvržení práce, je práce standardně strukturovaná. Práce je přehledná a jednotlivé kapitoly jsou správně seřazeny v obsahu umístěném na začátku textu práce. I zde mám několik připomínek. Některé převzaté obrázky jsou neostré. U obrázku č. 3, by bylo lepší vytvořit vlastní, v programu tomu určeném. V tabulkách sjednotit umístění jednotek, jednou autor jednotky vypisuje jednotlivě, podruhé zase jednotky vpisuje do záhlaví.

Splnění cílů práce:

Cíle práce, tak jak byly definovány, byly splněny.

Celkové hodnocení:

Diplomová práce, tak jak je předložena, vykazuje jasné známky seznámení autora s poměrně složitou problematikou. Obzvláště rešeršní část je velice čtivě a zajímavě zpracována.

Vypracování této práce vyplývá z podmínek uvedených v § 46 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb., práce obsahuje všechny předepsané náležitosti, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Otázky:

1. Pro expresi rekombinantních proteinů jsou používány rozličné exogenní hostitelské systémy, jako je *Escherichia coli* (jako i v případě této DP), znáte nějaké jiné expresní systémy a může autor vyjmenovat jejich výhody/nevýhody ?
2. Může autor uvést nějakou jinou metodu používanou k určení identity proteinu?
3. V DP byla velikost izolovaných proteinů ověřena pomocí SDS-PAGE, existují databáze, kde je možno získat široké spektrum informací o studovaných proteinech a to i včetně velikosti proteinů, může autor nějaké vyjmenovat?
4. V závěru práce je uvedeno, že mutantních forem nemající enzymatickou aktivitu je možné využít v budoucím výzkumu a možnostech léčby Alzheimerovy choroby, může nějaký další současný výzkum na toto téma autor uvést?
5. Může autor vysvětlit toto tvrzení, které se objevuje v řešeršní části DP: Koncentrace 17β -HSD10 v mozkomíšním moku může odrážet jeho množství v mozku. Bylo publikováno, že koncentrace 17β -HSD10 v mozkomíšním moku klesá s věkem, přesto je v mozkomíšním moku pacientů s Alzheimerovou chorobou 5,7 krát více 17β -HSD10 než v kontrolní skupině odpovídajícího věku.

V Hradci Králové dne 13. 1. 2023

Miloslava Bajer Ďuráčová