

Posudek oponenta disertační práce Mgr. Jany Frýdlové

"Separace žaludečních aspartátových proteas pomocí afinitní chromatografie"

Exaktních biochemických metod v lékařské diagnostice se využívá stále více a pořád jsou ještě oblasti, kde by bylo možné tyto postupy dále zavádět. Úkol, který si autorka vybrala nebyl vůbec lehký. Separace dvou enzymů, které jsou si velmi podobné jak strukturou molekuly tak enzymovou aktivitou, je úkol velmi komplikovaný. Autorka zvolila pro dělení biologicky aktivních látek, v tomto případě enzymů, pro biochemika typický přístup, a to afinitní chromatografii.


Splnění zadaného úkolu znamenalo připravit a vybrat nejvhodnější chromatografický nosič, stanovit nejvhodnější podmínky jak specifické adsorpce tak i desorpce pepsinů. To zahrnovalo i separaci pepsinů od balastních proteinů jako jsou albumin a hlavně jiné proteasy, tzn. trypsin, chymotrypsin aj. Všechny zmíněné kroky autorka vyzkoušela několika způsoby, aby z nich vybrala ten nejvhodnější. Nakonec se pokusila o vlastní separaci obou pepsinů, tj. pepsinu A a pepsinu C. Na úrovni modelových pokusů s prasečím pepsinem A a krysím pepsinem C se to autorce podařilo. Zbývá ještě experiment dovést až k oddělení obou pepsinů z lidské žaludeční sliznice, aby byl úkol splněn úplně.

Autorka v práci využila moderní fyzikálně-chemické, syntetické, enzymologické i imunochemické metody. Práce je sepsána přehledně, srozumitelně a bez překlepů. Podle mého názoru Mgr. Frýdlová osvědčila touto prací předpoklady pro samostatnou a tvůrčí vědeckou práci.

Práci doporučuji k přijetí jako práci disertační a navrhuji, aby Mgr. Janě Frýdlové byl udělen titul doktor (PhD).

Na závěr uvádím několik připomínek a dotazů, které ale nemají na mé hodnocení práce žádný vliv.

V Praze 1.8.2009


Doc. RNDr. Jana Barthová, CSc.

Připomínky a dotazy

1. Co to jsou hlavní buňky těla (str.10)?
2. Proč používáte diiodotyrosin jako analog substrátu? Zajímá mě hlavně proč je tyrosin jodovaný?
3. Jednotka aktivity enzymu by šla přepočítat na množství proteinu uvolněného za jednotku času místo změny absorbance. Ale ani tak by nebylo možné při použití dané metody vyjádřit aktivitu enzymu počtem rozštěpených peptidových vazeb. Takže je to vlastně jedno.
4. Pepsin C musí podle definice štěpit i substráty pepsinu A. Jde je nějak rozlišit enzymologicky?
5. Co znamenají % opakovatelnosti v Tab. 4.2? Čísla 2,4 a 5 neodpovídají textu, kde se mluví o stonásobném opakování bez změny.
6. Nemá nespecifická adsorpce jiných proteinů vliv na kapacitu nosiče při opakování chromatografie? Pokusila jste se nějak vyčistit nosič od adsorbovaných balastních bílkovin?
7. Je oprávnění mluvit o afinitní chromatografii, když se nejedná o interakci typu enzym-substrát, enzym-inhibitor, enzym-protilátka ap.
8. V tab. 4.4 by měly být doplněny celkové hodnoty aktivity enzymů, aby bylo možno porovnat návratnost jednotlivých kroků (recovery).
9. Nepůsobí aktivace zymogenů na aktivní enzymy autolysu a tím deaktivaci pepsinů?