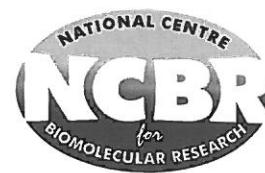




MASARYK UNIVERSITY
FACULTY OF SCIENCE
NATIONAL CENTRE FOR BIOMOLECULAR RESEARCH



Prof. Michaela Wimmerová, Ph.D.

tel.: +420-549498166

fax: +420-549492556

E-mail: michaw@chemi.muni.cz

<http://ncbr.chemi.muni.cz>

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Hany Štambergové
„Lidské membránově vázané karbonylreduktasy“

Předložená disertační práce Mgr. Hany Štambergové je primárně zaměřena na identifikaci, klonování, a základní charakterizaci vybraných dehydoregenas/reduktas s krátkým řetězcem zapojených do metabolismu karbonylových sloučenin. Práce je psaná v klasickém formátu, přiloženy jsou 4 publikace, na kterých je práce založena. Na 43 stranách teoretického úvodu je velmi přehledným způsobem uvedena rešerše studované tématiky, která hierarchickým způsobem uvádí předmět studia disertační práce od obecné charakterizace membránových proteinů, lidských membránových enzymů až po detailnější charakterizaci jednotlivých tříd enzymů zapojených do metabolismu karbonylových sloučenin. Tady bych chtěla vyzdvihnout perfektní čeština, kterou je práce napsaná včetně již zmíněného hierarchického uspořádání teoretické části, které dovoluje i čtenáři detailně se nezabývající touto problematikou velmi přímočarý a jasný pohled na studovanou skupinu proteinů. Myslím si, že speciálně první část by byla velmi dobrou učební pomůckou pro všechny, kteří se chtějí věnovat či něco dozvědět o topologii membránových proteinů. Na druhé straně, striktní snaha o absolutní použití českého jazyka, nemusí být vždy přínosem. Např. překládat „Rossmann fold“ jako Rossmannův záhyb nevede úplně k představě toho, co je ve struktuře obsaženo. Raději bych se přimlouvala bud za Rossmannovo uspořádání, anglikanismus „fold“ v uvozovkách, nebo opisnější český překlad. Ale to je obecný problém vědeckých textů psaných v češtině a musím přiznat, že si doktorandka s tímto úkolem poradila docela bravurně.

Metodická část práce je velmi detailně popsaná, a musím konstatovat, že jsou to jedny z dosud nejlépe zpracovaných metod, které jsem za svá léta oponování doktorských prací měla možnost hodnotit.

Poslední část disertační práce shrnuje dosažené výsledky v průběhu řešení cílů práce a většinou jsou i diskutovány se současnými literárními poznatkami. Občas však splývá, kdy doktorandka diskutuje to, co vyplývá z jejích výsledků, a kdy informace z literatury. Výsledková část se z pochopitelných důvodů překrývá s publikacemi, které jsou přílohou disertační práce. Možná právě tento fakt vede ke snížení ostrážitosti při sledování návaznosti jednotlivých výsledků, se kterou byly zpracovány předcházející kapitoly výše zmíněné. Například, v kapitole 5.3.9. jsou testovány kinetické parametry metabolismu odbourávání bupropionu třemi subcelulárními frakcemi (cytosol, mikrosomy, mitochondrie), aby byly zjištěny informace o tom, jak jsou zapojeny do tvorby tří hlavních metabolitů bupropionu. Následně byl proveden obdobný screening s konkrétními rekombinantními enzymy resp. frakcemi hmyzích buněk. Až z tabulky 27 vyplýne, že se jednalo o subcelulární frakce jaterní tkáně, o jejichž přípravě se však metodická část nezmiňuje. Při detailní prohledání metodické části lze v tabulce 23 nalézt použitá množství těchto frakcí pro HPLC stanovení, zdroj materiálu však není uveden ani v seznamu chemikálií.

To nejsou výtky k obsahové části, ale části formální, kde přidání jedné věty by velmi zjednodušilo orientaci ve výsledcích (tak jak je tomu třeba na str. 74). Obdobně by pomohlo občasné znovuzopakování některých zkratek (BEVS, NNK, ...). Nejdříve by se také měly v textu objevit grafy a teprve potom tabulky, které z nich vyplývají (str. 78-79, Tab. 27, Obr. 50).



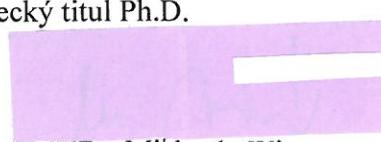


K práci mám následující připomínky a dotazy:

- Str. 81. Při potvrzení přítomnosti enzymů v mikrosomální frakci, by bylo dobré ukázat i imunochemickou detekci ostatních subcelulárních frakcí.
- Str. 85. Bylo by vhodné uvést struktury použitých substrátů pro screening a/nebo uvést systematické názvy. Např. benzil – v přiložené publikaci je již uveden systematickým názvem, což by bylo vhodné i ve vlastní disertační práci.
- Str. 69: Snažili jste se dále využít fluorescenční detekce exprese a produkce proteinů k další selekci nejlepších produkčních klonů?
- co znamená zkratka CLint? Nemyslím tím, jak se počítá, ale z čeho je odvozena? Chybí v seznamu zkratek. Jaký je její význam?
- Podle čeho se pozná „vysoká“ redukční aktivita mikrosomální frakce (str. 74, obr. 21)?
- Na str. 90, obr. 36 diskutujete, že se redukční aktivita rekonstituované DHRS7 zvýšila 5x oproti exprimované DHRS7 v Sf9 mikrosomech. Má tento údaj bližší relevanci? Předpokládám, že se porovnává specifická aktivita enzymu vztažená na celkové bílkoviny (mikrosomy) vs. purifikovaný protein (liposomy). Pak je to pouze otázkou množství inkorporovaného proteinu v liposomech. Nebo jste nejakým stylem určili podíl DHRS7 enzymu v mikrosomální frakci?
- S výše položenou otázkou je spojeno obecné porovnávání specifických aktivit jednotlivých mikrosomálních či cytoplasmatických frakcí s produkovanými SDR enzymy při přeměně různých substrátů. Tato informace je spojena s množstvím studovaných enzymů v příslušných frakcích. Zkoušeli jste imunochemicky/densitometricky vyhodnotit relativní zastoupení studovaných enzymů v jednotlivých vzorcích? Předpokládám, že specifická aktivita je vztažena na celkové množství proteinu.
- Zkoušeli jste měřit stabilitu/nestabilitu purifikované proteinu DHRS7 bez jeho inkorporace do liposomů?

Mgr. Hana Štambergová je autorkou či spoluautorem čtyř publikací, které jsou součástí disertační práce jako přílohy. Mohl být asi být diskutován podíl doktorandky na publikacích, kde není první autorkou. Na závěr ale mohu konstatovat, že Hana Štambergová prokázala, že je schopná samostatně vědecké práce, a to nejen v úzce zaměřené oblasti vědy. Příprava rekombinatních proteinů, resp. klonování lidských proteinů nebývá jednoduché a často se velké množství práce a optimalizací zhustí do několika stránek textu. Tady bych chtěla Haně opravdu pogratulovat k vysokému číslu pozitivních rekombinantů i produkovajících kmenů. Obdobně musím hodnotit i další experimentální práci, pokrývající základní a aktivitní charakterizaci připravených enzymů. Vznesené připomínky spíše formálního charakteru, které doprovází každý rozsáhlejší spis, a určitě neubírají na kvalitě předložené práci.

Na základě výše uvedeného, doporučuji disertační práci Mgr. Hany Štambergové k obhajobě a aby jí byl, po absolvování úspěšné obhajoby, udělen vědecký titul Ph.D.



V Brně 18.12.2013

Prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

