



V Praze dne 25. února 2009

Posudek na disertační práci Mgr. Daniely Horníkové***Řízení enzymatické aktivity molekuly kreatinkinázy změnami její konformace***

V rámci své disertační práce si Mgr. Daniela Horníková vytkla za cíl získat dostatečná experimentální data k popisu prostorové konformace a konformačních změn kreatinkinázy a také popsat na molekulární úrovni vliv vazby substrátů a pH na vazbu kreatinkinázy v M-linii sarkomem v průběhu kontrakce.

Kandidátka použila pro dosažení vytčených cílů řadu pokročilých biochemických i biofyzikálních technik, zejména fluorescenčních. Prokázala bezpochyby svou schopnost tyto techniky si nejen osvojit, ale zejména je adekvátně aplikovat a získaná data vyhodnotit. Evidentně též velmi dobře zvládla experimentální data interpretovat a aplikovat do 3D modelu enzymu.

Předložená práce obsahuje 139 stran textu včetně výsledkových příloh ve formě čtyř publikací, v nichž na jedné je první autorkou. Práce obsahuje kvalitní literární přehled a dostatečný popis biochemických i biofyzikálních metod, které dle mého názoru plně stačí k popisu použitých technik. Vysoce oceňuji i velmi dobře popsanou úvodní část o fosfogenech. V některých teoretických pasážích však snad autorka zachází do obecných souvislostí až učebnicového charakteru.

Ve výsledkové části se podařilo autorce identifikovat v rámci charakterizace myofibril s použitím nízkoinotového média tři rozdílné podjednotky kreatinkinázy, které dále charakterizovala. Prokázala jak schopnost kontrakce myofibril, tak i zachování specifické enzymatické aktivity kreatinkinázy. Pokročilé fluorescenční metody pak použila pro lokalizaci a charakterizaci specifických vazebných míst. Závěry, které autorka učinila o kompartmentalizaci substrátů, produktů i samotných enzymových komplexů jsou nejen zajímavé v rámci předložené disertační práce, ale nepochybně ji přesahují v rámci obecných závěrů. V rámci studia proteinové dynamiky se kandidátce povedlo též detekovat a částečně popsat konformační změny enzymu v důsledku vazby jednoho či dvou substrátů. V neposlední řadě je potřeba též zmínit důležitý výsledek popisující zásadní vliv pH na interakci kreatinkinázy s myofibrilami v M-linii.

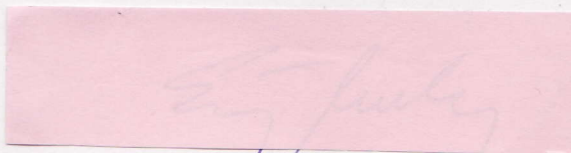
I ve zdařilé práci se vždy objeví nějaké nedostatky překlepy nebo nejasnosti. Na straně 44 chybí odkaz na zdroj obr. 4 (pravděpodobně převzato z textu dr. Fišara), na str. 45 je nešťastně uvedeno u měření FRET tvrzení „emisí nebo-li anizotropií.“, což nesprávně navozuje u čtenáře pocit ekvivalence obou závislostí. Na str. 46 je uvedena u pulzní metoda (time domain method) jako jediná technika časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Na str. 47 je pak nešťastně použit termín „polarizovaný detektor“. Na str. 59 je uveden název kapitoly „Časově rozlišená fluorescenční anizotropie (steady state)“, což pokládám za zavádějící titul. Na str. 60 je

uvedena zřejmě neúplná věta: „Akrylamid (elektron postrádající molekula) byl jako účinný zhášec.“ Chtěla snad autorka v rámci této věty zmínit i existenci nabitých zhášedel? Na str. 64 chybí uvedení počtu měření. V práci se najdou i občasné překlepy, např. na str. 65 je uveden aminokyselinový zbytek cys namísto Cys.

K práci mám následující otázky:

1. Kolik tyrosinových zbytků obsahuje monomer kreatinkinázy? Nemohly tyto zbytky přispívat k nativní fluorescenci (viz obr. 10, 11, 12, Tab. 1,2)?
2. V práci byl akrylamid použit jako zhášedlo tryptofanových zbytků. Autorka jistě správně použila toto zhášedlo pro částečnou charakterizaci mikrookolí nativních fluoroforů kreatinkinázy. Proč nebyla použita další zhášedla, například ionty, která by výrazně přispěla k nábojové charakterizaci mikrookolí fluoroforů a k jejich lokalizaci na povrchu či uvnitř proteinu?
3. Není výpočet vzájemné vzdálenosti mezi Trp a DNCl (str. 64) ze střední doby života excitovaného stavu Trp simplifikací? Jaký byl při výpočtu použit orientační faktor?

Přes uvedené nedostatky hodnotím předloženou práci vysoce kladně a doporučuji jí k obhajobě.



Doc. RNDr. Evžen Amler, CSc.