

# Oponentský posudek disertační práce

**Mgr. Daniely Horníkové**

## **Řízení enzymatické aktivity molekuly kreatinkinázy změnami její konformace**

Disertace byla vypracována na Katedře fyziologie živočichů Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Zabývá se vlivem pH a přítomností substrátů na vazbu kreatinkinázy v M-linii kosterního svalu a konformačními změnami tohoto enzymu. Jako experimentální model byly použity myofibrily izolované z *m. psoas* potkana a králíka. K nesporným kladům práce patří široké spektrum metodických přístupů a moderních analytických technik, vhodně zvolených k zodpovězení jednotlivých dílčích otázek. Je nutné vysoce ocenit, že autorka úspěšně zvládla nejen řadu běžných biochemických separačních a analytických metod, ale i teoreticky a prakticky velmi náročné fyzikální techniky využívající fluorescenčních jevů.

Vlastní spis obsahuje 90 stran textu a obrazové dokumentace včetně seznamu téměř 300 použitých citací, které zahrnují jak práce historické, tak nejnovější články vztahující se k tématu. Je členěn obvyklým způsobem na literární úvod, metodiky, experimentální část, diskusi a stručné závěry. Dále je spis doplněn 50 stranami příloh, které obsahují detailní metodické protokoly a kopie dvou publikovaných článků autorky shrnující výsledky disertace. Řešení formou příloh považuji za zcela vyhovující z hlediska přehlednosti metodické kapitoly.

25 stran teoretického úvodu je věnováno různým aspektům systému kreatinkináza/fosfokreatin, jeho fyziologickému významu, struktuře a buněčné lokalizaci izoform kreatinkinázy a interakci enzymu s proteiny M-linie sarkomery kosterního svalu. Tato kapitola svědčí o hloubce znalostí tématu a dobré orientaci autorky ve složité problematice a často rozporných literárních údajích. Moje nepodstatná výhrada se týká pouze řazení úvodních kapitol: podle mého názoru by bylo logičtější a pro nepoučeného čtenáře pochopitelnější začít obecnější kapitolou 1.2., nazvanou „Fosfagenové systémy“, spíše než popisem vlastností kreatinkinázy. Výsledky jsou prezentovány na 15 stranách přehledným způsobem včetně tabulek a názorné grafické dokumentace. Není sporu o tom, že autorka s pomocí nejmodernějších metod získala řadu cenných výsledků, které rozšiřují a upřesňují současné představy o struktuře a funkci svalové kreatinkinázy. Velmi zajímavé jsou výsledky, které přesvědčivě ukazují, že síla vazby kreatinkinázy v M-linii sarkomery závisí na pH a přítomnosti substrátů, které mění konformaci její molekuly. Významné jsou také výsledky měření konformačních změn enzymu, získané pomocí různých fluorescenčních sond. Jednotlivé dílčí specifické nálezy práce jsou stručně a fundovaně diskutovány na 6 stranách a jejich seznam je uveden v jednostránkovém závěru; neškodilo by však ještě krátce shrnout vlastní přínos disertace k řešení dané problematiky z obecnějšího hlediska (toto shrnutí postrádám také v autoreferátu).

Jakkoliv nepochybuji o odborných kvalitách disertace, je zřejmé, že formální stránce spisu mohla být věnována poněkud větší pozornost. V textu se vyskytují některé nepřesnosti a stylisticky neobratné formulace, které zbytečně odvádějí pozornost čtenáře od odborné stránky. V takto zaměřené práci se asi nelze zcela vyhnout výrazům převzatým z angličtiny, ale nemusely by se používat alespoň v případech, kdy existují přijatelné české ekvivalenty (např. *band*, *strip*, *channel*, *X-ray* apod.). Vyskytují se i gramatické chyby, i když většina je méně závažných.

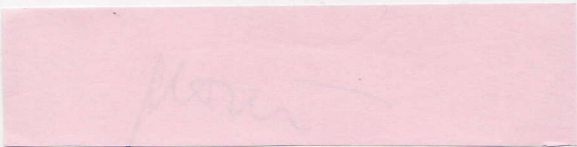
K výsledkům práce bych si dovolil položit dva upřesňující dotazy:

- 1) Na straně 58 je uvedeno, že aktivita nezařazené kreatinkinázy byla 250 IU/mg proteinu, zatímco po označení různými fluorescenčními sondami se aktivita pohybovala mezi 15 a 80 IU/mg proteinu, tedy v řádově nižším rozmezí (str. 61 – 67). Tento výsledek je prezentován jako důkaz, že značení nepoškodilo strukturu enzymu. Zajímalo by mne, jaké jsou argumenty pro toto tvrzení a jak velký pokles aktivity by byl považován za projev poškození.
- 2) Je něco známo o tom, zda se liší vazba kreatinkinázy v myofibrilách kosterního a srdečního svalu, které mají odlišnou strukturu M-linie sarkomery?

**Závěr:**

Oponovaná práce přináší řadu prioritních výsledků a nových poznatků, které rozšiřují současné představy o struktuře a funkci myofibrilární kreatinkinázy. Výsledky byly publikovány ve 2 člancích v zahraničních časopisech s impakt faktorem a vysokou úrovní recenzního řízení. Autorka prokázala, že ovládá vědecké metody, má potřebné teoretické vědomosti a je schopna samostatné výzkumné činnosti. Jsem přesvědčen, že disertace splňuje požadavky stanovené zákonem, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě a Mgr. Daniele Horníkové udělit titul Ph.D.

V Praze, 24. 2. 2009



prof. RNDr. František Kolář, CSc.  
Fyziologický ústav AV ČR