

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Michaely Rajčanové : „Peptidové inhibitory imobilizované na magnetické nosiče a Sepharosu aplikované na separaci žaludečních aspartátových proteinů.“

Oponent : Prof. Ing. Martin Fusek, CSc.

Hlavní cíle disertační práce Mgr. Michaely Rajčanové byly (strana 28) nalezení nových separačních metod pro izolaci dvou lidských aspartátových peptidáz (pepsin A a C), které by sloužily jako podklad pro lepší diagnostiku gastrických patologií. Pro tento úkol si disertantka vybrala metodu afinitní chromatografie, kde ligandem jsou peptidové inhibitory aspartátových peptidáz, jejichž inhibiční konstanty by se měly výrazně lišit pro dané enzymy.

Předkládaná disertační práce je vypracována v rozsahu 98 stran včetně citované literatury. Autorka cituje 82 literárních zdrojů v převážné většině poněkud zastaralých.

Formální úprava

Dlužno podotknout, že z formálního hlediska je v disertaci mnoho nešťastně zvolených formulací a odchylek od zavedených postupů. Například bych očekával, že seznamy přístrojů, chemikálií a biologických materiálů budou seřazeny abecedně, ale není tomu tak. Dále autorka v teoretické části použila ilustrační obrázky, zjevně ne vlastní – například obrázek 12 - a to bez uvedení zdroje.

Formulace jako : „Hladiny pepsinogenů se mění s pohlavím, věkem, váhou a **národností**“ (str 20), „Nejzávažnější nemocí je rakovina žaludku“ (Str. 20) nejsou zcela správné.

Teoretická část.

Teoretická část je rozvedena na 15 stranách základního textu. Mohu jen konstatovat, že takový rozsah odpovídá v rámci experimentálních oborů diplomové práci a ne disertaci, zvláště když autorka pokrývá celou řadu předmětů – od aspartátových peptidáz až po afinitní chromatografii a používané nosiče. V teoretické části se také autorka dopouští celé řady nepřesností. Tak například na straně 14 je uvedeno, že „Po přijetí potravy z PGA vzniká pepsin A v kyselém prostředí žaludeční šťávy“ a samotný molekulární proces není uveden. Tento proces je pak zmíněn na straně 18 kde se praví „a molekula zymogenu podstupuje konformační změny odsunutím aktivačního peptidu z rozsedliny. Aktivní centrum je odkryto a enzym se stává aktivním“. Nikde ani zmínka o autokatalytickém odštěpení aktivačního peptidu, tedy závěru aktivace, který je (mimo jiné) důvodem ztráty stability v bazickém prostředí což má zásadní fyziologické důvody. Navíc, na jedné stránce najdeme pojmy aktivní místo a aktivní centrum, i když z textu vyplývá, že je míněno to samé. Na straně 18 – hned první věta následujícího odstavce říká, že „povaha aktivního místa dává malým substrátům možnost natočení. Proto se pro výzkum specifity mechanismu hodí lépe substrát dostatečně velký a většinou syntetický. Z přirozených substrátů se používají hemoglobin“ Musím se zeptat – co je míněno „možnost natočení“? Co je „výzkum specifity mechanismu“ – míní se

tím enzymatická specificita a nebo výzkum katalytického mechanismu, a proč po zdůraznění důležitosti syntetických substrátů následuje výčet proteinů?

Význam důležitosti určování hladin obou pepsinů v tělních tekutinách, který je vlastně základním motivem celé práce na necelé stránce textu a je podpořen 11 citacemi. Očekával bych, že to bude významně podrobnější popis a zdůvodnění celé práce. Řada ne zcela přesných formulací a velmi zkratkovitý popis je i na dalších stranách věnovaných imobilizaci a afinitní chromatografii.

Zásadním způsobem mi chybí vysvětlení, jak a proč byly pro experimenty zvoleny dané peptidové inhibitory.

Experimentální část.

Experimentální část má 22 stran. Popis metod je přiměřený a ilustrativní. Nicméně měl bych několik technických připomínek: na straně 37 je uvedeno, jak bylo orientačně určeno množství navázaného ligandu. Jedná se o nesmírně zjednodušený postup, kdy nebyl určován vliv vymývání. Proč nebyl použit daleko přesnější postup určení obsahu aminokyselin po jejich hydrolyze z nosiče? Na straně 41 a následných je popsáno, jak byla určena kapacita nosičů pro jednotlivé enzymy. Nikde není uveden způsob promývání se změnou např. iontové síly. Tak jak je metoda popsána, bylo možno zanechat do experimentu velikou chybu, protože mohlo dojít k nespecifické sorpci samotných enzymů. Na straně 42 je popsáno určování nespecifické vazby obecných proteinů na nosiče. Není uvedeno, proč byly zvoleny právě trypsin, chymotrypsin, albumin? Je předpoklad, že právě serinové proteázy budou interferovat se stanovením pepsinu v lidské krvi? Poslední poznámkou k experimentální části je to, že by možná pro určování kinetických parametrů bylo lépe použít vhodný syntetický substrát, použití metody štěpení hemoglobinu je přeci jen mírně archaické a možná zbytečně pracné.

Výsledky a diskuze.

Celkově lze shrnout, že výsledky, které disertantka získala, odpovídají stanoveným cílům. Nicméně není jasné, jak je to tedy s inhibicí prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C jak je uvedeno na straně 63. V jedné větě se praví, že peptid -Ty-Tyr. -Phe-Tyr- neinhibují ani jeden z enzymů, zatímco následující tabulka 3.3. ukazuje pro peptid Tyr-Tyr pro pepsin C mikromolární inhibici. Jedná se přeci o klíčové měření, které by mělo ospravedlnit celou práci a při tom je popsáno zřejmě chybně. A jestliže není naměřena žádná inhibice uvedenými peptidy v roztoku, proč jsou potom použity pro afinitní nosiče a proč tam potom dochází k záchytu pepsinu A. Samotná diskuze je uvedena na 3,5 stránkách.

Celkové hodnocení :

Disertantka Mgr. Michaela Rajčanová ve své práci nazvané „Peptidové inhibitory imobilizované na magnetické nosiče a Sepharosu aplikované na separaci žaludečních

aspartátových proteinas.“ provedla celou řadu experimentů a splnila stanovené cíle. Přes velké výhrady k textu disertační práce i k zvoleným postupům a vzhledem k publikacím uvedeným v atoreferátu doporučuji práci k obhajobě.

V Praze dne 19.9.2014

..... /

Prof. Ing. Martin Fusek, CSc.

Dotazy:

1. Jak/proč byly zvoleny právě dané peptidy jako ligandy?
2. Proč nebyla uvažována imunspecifická cesta pro určení jednotlivých enzymů ?
3. Proč byly pro nespecifickou sorpci vybrány právě uvedené tři proteiny ?