

Oponentský posudek na diplomovou práci Ireny Ďuríkové "Proteinové komplexy metabolismu železa"

Diplomová práce I. Ďuríkové se zabývá popisem a charakterizací mitochondriálních bílkovinných komplexů obsahujících železo a jejich potenciální úlohou v transportu a uchovávání tohoto elementu.

V úvodní části práce autorka erudovaně pojednává o současném stavu poznání biologických vlastností železa zahrnující mechanismus buněčné internalizace extracelulárního železa, jeho vstup do mitochondrií, uchovávání skladovacími proteiny a mobilizaci pro fyziologické účely. Zevrubně jsou popsány mechanismy poruch metabolismu Fe vedoucí k onemocněním způsobeným jeho nadbytkem, či nedostatkem.

Ke studiu metabolismu železa byla jako model jaterní tkáň použita buněčná linie HepG2, odvozená od jaterního karcinomu, jež má zachovány většinu metabolických funkcí normálních hepatocytů. Buňky byly metabolicky značeny inkubací s ^{59}Fe ve formě citrátového komplexu, poté byly izolovány mitochondrie a provedena iontoměničová chromatografie proteinů obsažených v mitochondriálním lyzátu. Byly izolovány tři chromatografické frakce proteinů obsahujících železo jež byly následně separovány elektroforézou v "nativním" polyakrylamidovém gelu. Z gelů byly izolovány tři zóny obsahující bílkovinné komplexy obsahující železo, jejichž komponenty byly identifikovány tandémovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Kromě tohoto přístupu byla použita též technika koimunoprecipitace k identifikaci bílkovin asociovaných s transferinovým receptorem (TfR) a mitochondriálním membránovým proteinem VDAC2.

V kapitole Výsledky a Diskuse jsou tabulovány proteiny identifikované ve třech elektroforeticky separovaných proteinových komplexech obsahujících železo a jsou podány zpracované literární údaje o jednotlivých identifikovaných proteinech ve vztahu k metabolismu železa. Na základě těchto údajů jsou navržena schemata zahrnující uspořádání jednotlivých proteinů v komplexech a je nastíněna jejich funkce (Obr. 20 a 23).

Diplomová práce má výtečně podanou obsáhlou úvodní část pojednávající o současném stavu řešené problematiky. Autorka v ní podává zasvěcený pohled na problematiku metabolismu železa včetně patologických důsledků jeho poruch. Experimentální část je výborně zpracována, detailně jsou popsány použité metody i postupy. Kapitola Výsledky a Diskuse dokumentuje jednak experimentální dovednost již si diplomantka osvojila v průběhu řešení zadaného tématu, zahrnující metody buněčné biologie

a metody elektroforetické, i její schopnost získané experimentální údaje popsat a interpretovat.

Těžiště výzkumu založeného na “discovery approach“, což je případ předkládané diplomové práce, spočívá v interpretaci dosud známých poznatků o jednotlivých identifikovaných proteinových komponentách obsažených ve funkčním komplexu s cílem vysvětlit chování tohoto systému jako celku. Z tohoto náročného pohledu autorka odvedla pozoruhodný kus práce a vytvořila podmínky pro další pokračování tohoto originálního výzkumu buněčných proteinových komplexů souvisejících se železem.

Práci doporučuji přijmout jako práci diplomovou s hodnocením výborně.

22. května 2008



RNDr Zbyněk Hrkal, DrSc