

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Blanky Hamplové

**MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS AND PROTEIN KINASE C
IN THE HEART DURING POSTNATAL DEVELOPMENT**

Univerzita Karlova v Praze , Přírodovědecká fakulta,

Katedra biochemie a Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Předložená práce je psána v angličtině, má 69 stran úvodního spojovacího textu a celkem pět příloh, z toho čtyři publikace v impaktovaných anglicky psaných časopisech (s IF mezi 1,68. a 2,14) a jeden rukopis publikace připravený v angličtině. Z těchto prací je Mgr.B. Hamplová na čtyřech jako první autor.

Název disertační práce je plně v souladu s jejím obsahem. Práce jsou zaměřeny na změny v koncentraci fosfolipidových druhů a jejich mastných kyselin v srdci potkana během postnatálního vývoje, kdy se srdce musí přeorientovat z dominance pravé srdeční komory na komoru levou. Je sledován i vliv hypo- a hyperthyreoidismu ve srovnání s euthyreoidními kontrolami v 21 dni postnatálního vývoje srdce potkana. Dále jsou sledovány vývojové změny v množství a kvalitě diacylglycerolu, jakožto fyziologického aktivátoru protein kinasy C (PKC) i vývojové změny v celkové aktivitě PKC a expresi isoform PKC a vliv tlakového přetížení po narození na celkovou aktivitu PKC a její isoformy.

Sepsané práce obsahují řadu dosud nepublikovaných výsledků. Jejich přínos je např. v podrobné analýze složením mastných kyselin v jednotlivých fosfolipidních třídách a také v podrobnějším sledování časového průběhu změn fosfolipidů i PKC , které je dááno do souvislosti s probíhajícími fyziologickými změnami postnatálního vývoje levé komory myokardu.

V experimentální části autorka prokázala technické dovednosti a použila řadu technik extrakce lipidů vhodnou směsí rozpouštědel, rozdělení lipidů tenkovrstvou chromatografií i analýzy mastných kyselin. Při analýze PKC použila metody frakcionace tkáně, měření aktivity s radioaktivním ATP a stanovení exprese izoform PKC metodou imunodetekce na Western blotu.

Mé otázky k práci - Supplement 1, str.24, (Lipid analyses): Zajímalo by mě, proč pro separaci fosfolipidů dvojrozměrnou chromatografií dle Rousera jsou používány vrstvy silikagelu H. Já jsem používal silikagel G. Vadí snad přítomnost pojidla – sádry v analýze mastných kyselin?

Mám připomínky ke str. 13, kde píšete o existenci lipidních domén nazývaných v angličtině „lipid rafts“ nebo „caveolae“ v závislosti na tom zda obsahují nebo neobsahují protein kaveolin. Obě skupiny jsou obohaceny na cholesterol, sphingolipidy and fosfolipidy s dlouhými nasycenými mastnými kyselinami. S tím mi nesouhlasí Obr.2 na str 14, i když, připouštím, že je schematický. V lipidních raftech by se měly vyskytovat především (glyko)sfingolipidy a cholesterol. Odtud je jiný název Glycosphingolipid-enriched membranes (GEMs) a Cholesterol enriched membranes (CEMs). Ve Vašem schématu se molekuly glykosfingolipidů vyskytují řídce, jsou osamocené mezi více molekulami fosfolipidů. Připouštím, že znázorňování lipidních domén je velmi rozmanité a závislé na metodě zkoumání. Prosil bych ale o upřesnění složité otázky lipidních domén při obhajobě, třeba podle Vámi citované přehledné práce (31) Pike L. J., Biochem J., (2004) 378, 281-292.

Kromě toho jsou glykosfingolipidy v plasmatické membráně ve vnější vrstvě lipidní dvojvrstvy. Na Vašem obrázku jsou malovány i ve vnitřní cytosolické vrstvě

Na str. 20 píšete o důležité roli ceramidu a sfingosin-1-fosfátu v regulaci buněčné proliferace a zároveň apoptózy. Můžete upřesnit, jaká je v této regulaci úloha ceramidu, sfingosinu a jaká sfingosin-1-fosfátu.

Práce obsahuje minimum písarských chyb, které jsou nepodstatné. Např. na straně 14 a 15 úvodního textu jsou uváděny 2 obrázky , oba označené Fig. 2. Zajímavější je chyba, která unikla i redakci Physiological Research (Supplement 3). V práci je celý text pod nadpisem Introduction, další nadpisy jako Material and Methods, Results and Discussion chybí.

Závěrem konstatuji, že disertační práce Mgr. Blanky Hamplové, přinesla nové zajímavé výsledky, které byly publikovány v kvalitních impaktovaných časopisech, přispěly k plnění výzkumných grantů pracoviště školitelů. Práce svojí kvalitou plně vyhovuje požadavkům kladeným na doktorskou disertaci. Doporučuji připustit práci k obhajobě a souhlasím, aby po úspěšném obhájení byl Mgr. Hamplové udělen titul PhD.

F. Šmíd

V Praze 8. května 2007

Doc. RNDr. František Šmíd, CSc.