

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jany Frýdlové "Separace žaludečních aspartátových proteas pomocí afinitní chromatografie"

Autorka vypracovala svou disertační práci pod vedením ing. Zdenky Kučerové CSc. na Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK. Jedním z řešených projektů se zabývá studiem vztahů mezi pepsinovými proteasami v lidské žaludeční šťávě a jejich zymogenů v lidské žaludeční sliznici, a výskytem závažných žaludečních onemocnění. Určení vzájemného poměru pepsinogenu A a pepsinogenu C je důležité pro diagnostiku atrofické gastritidy, která je považována za premaligní stav rakoviny žaludku. Jedním z cílů tohoto projektu je i vypracování metody pro separaci pepsinogenu A a pepsinogenu C a jejich aktivních forem, která by byla vhodná pro sledování jejich změn během žaludečních onemocnění.

Celý literární úvod je zpracován přehledně a doložen 91 citacemi. Dává současný a ucelený pohled na pepsinogen a pepsin a to jak na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, strukturu, mechanismus aktivace pepsinogenů na pepsin tak na syntetické a přirozené inhibitory pepsinu. Autorka rovněž popisuje současnou problematiku sledování hladiny pepsinogenů ve zdravém lidském těle v séru a tkáních a její změny při nejrůznějších patologiích. Detailně jsou popsány známé metody izolace a separace pepsinogenů a pepsinů.

Cílem předkládané práce bylo připravit vhodné afinitní sorbenty a hledat nejvhodnější podmínky pro izolaci a separaci pepsinů a pepsinogenů.

V experimentální části práce jsou připravovány afinitní sorbenty a testovány na kapacitu a specifitu. Afinitní chromatografií na různých sorbentech byly zjišťovány nejvýhodnější podmínky pro adsorpci a eluci jednotlivých forem, pro separaci pepsinogenů i pepsinů A a C. Izolace afinitní chromatografií byla prováděna pomocí FPLC, analýza směsi peptidů pepsinů po štěpení proteasou (α -chymotrypsinem) byla určována pomocí MALDI TOF. Identifikace lidských pepsinogenů byla provedena nativní polyakrylamidovou gelovou elektroforézou s vizualizací jednotlivých pepsinogenů na základě proteolytické aktivity po jejich aktivaci. Výběr metod odpovídá studovanému problému a praktické zvládnutí svědčí o experimentálních schopnostech autorky.

Výsledky jsou dokumentovány obrázky a tabulkami.

V souladu s cíli přinesla disertace nové poznatky:

1. Byly připraveny tři afinitní sorbenty jodovaná L-tyrosin-Sepharosa, 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa a N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa, které byly charakterizovány jejich schopností vázat modelový enzym prasečí pepsin A.
2. Při studiu interakce prasečího pepsinu A a jeho komplexu s pepstatinem A a nebo pepsinogenu A s připravenými sorbenty bylo prokázáno, že se aktivní místo pepsinu nepodílí na jeho interakci se sorbenty N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa a 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa.
3. Všechny připravené sorbenty byly použity k separaci pepsinu A a pepsinu C z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice pacientů s různými žaludečními chorobami i z žaludeční šťávy zdravého jedince.
4. Výsledky ukázaly jako nejvhodnější sorbent pro separaci pepsinu A a pepsinu C, N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosu. Na tomto sorbentu bylo též provedeno částečné oddělení pepsinogenu A z lidské žaludeční sliznice.

Práce je sepsána pečlivě s minimálním počtem překlepů. K disertaci mám následující připomínky a dotazy.

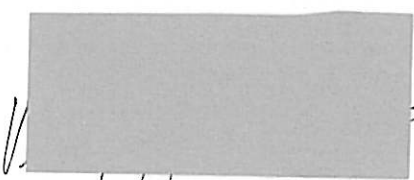
1. Str. 9 Tab. 1.1. V přehledné tabulce by měly být uvedeny všechny popsané žaludeční aspartátové proteasy, nejen ty používané v této práci.
2. Str. 34 Proč při proteolyse proteinů proteasou (α -chymotrypsin) používáte tak dlouhé časy 18 hod při 37° C pro štěpení?

3. Str. 40 Obr. 4.1. Schéma imobilizace derivátů....Přehledné schema, autorka by se měla odkázat na vlastní publikaci v r. 2008, kde je toto schema uvedeno. Považuji za důležité, aby vlastní publikace byly uvedeny v seznamu publikací a autorka je ve výsledcích zmiňovala.
4. Str. 48 Obr. 4.7. Pro přehlednost obrázku by bylo dobré zde uvést pH a ne odkazovat na chromatografické podmínky v obr. 4.6.
5. Str. 61 Chcete pokračovat v dalším dělení pepsinogenů A i C z lidské žaludeční sliznice, pro jejich lepší rozdělení? Zkoušeli jste na stejném nosiči separaci za jiných podmínek, kdy nejsou také tak silné nespecifické sorbce (nižší pH 5.0- 6.0, pozvolnější gradient iontové síly), a další dělení pomocí HPLC?
6. Str. 65 Vlastní publikace autorky by měly být uvedeny pod plným názvem a měly by být k disertaci přiloženy.
7. Netušíte jakou fyziologickou či patologickou úlohu by mohla hrát přítomnost pepsinogenu v semenných váčcích nebo prostatě?

Výsledky dosažené Mgr. Janou Frýdlovou představují přínos pro rozvoj základního biochemického výzkumu a to možnosti detekce aspartátových proteas pepsinu A a pepsinu C, které je důležité pro diagnostiku různých onemocnění žaludku z hlediska objasnění dějů spojených s patofyziologickými procesy u člověka.

Závěr: Mgr. Jana Frýdlová prokázala schopnost tvůrčí vědecké práce, osvojila si teoretické i metodické znalosti, splnila vědecký úkol, jímž byla pověřena. Výsledky disertační práce jsou obsahem tří publikací s IF. Doporučuji, aby disertační práce Mgr. Jany Frýdlové byla přijata k obhajobě a stala se základem k udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 30. července 2009


Doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i