

Profesor Ing. Jan Káš, DrSc.
Ústav biochemie a mikrobiologie
Vysoká škola chemickotechnologická
Technická 3
166 28 P r a h a 6

Oponentský posudek

disertační práce Mgr. Lenky Novotné
s názvem

Studium fosforylace lidských pepsinů

Disertační práce v doktorském studijním programu *biochemie a pathobiochemie*, byla Mgr. Lenkou Novotnou vypracována na 1.LF UK v Praze pod vedením pí. Ing. Zdenky Kučerové, CSc. Téma doktorské disertační práce je obtížné, velmi zajímavé a aktuální. Fosforylace, jako jeden z nejvýznamějších typů posttranslačních modifikací proteinů, ovlivňuje řadu významných fyziologických i patologických procesů probíhajících v lidském organismu a stupeň fosforylace může být tedy využit v diagnostice různých chorob. Autorka disertace si se svou školitelkou vybraly problematiku fosforylace pepsinů, ale použité a vyvinuté metodiky mohou být aplikovány i na studium řady dalších biologicky aktivních proteinů, takže práce vlastně svým významem přesahuje vytýčený rámec výzkumu a má v mnoha směrech obecný charakter.

Současný stav problematiky (v práci uvedený jako teoretická část) je velmi dobře, přehledně a čtivě popsán. Popis fosforylace proteinů i charakterizace pepsinů by mohl být použit do učebnice či malého přehledného článku. Metody separace a izolace fosfoproteinů a fosfopeptidů, jakož i způsoby jejich detekce a identifikace jsou popsány velmi fundovaně a ukazují dobře i na problémy, které se v této oblasti výzkumu vyskytují. V této části práce disertantka prokázala, že je s řešenou problematikou velmi dobře obeznámena. Pouze na str.5, 2 ř. zdola má být uvedeno proteinkinasy místo proteinfosfatasy (doporučuji opravit) a na str. 6 „abnormální změna v jejich aktivitě“ je výraz vágní neříkající zda se aktivita zvýšila či snížila. U Tab.1 (str.9) by neškodilo uvést v legendě význam použitých jednopísmekových symbolů aminokyselin. Každý čtenář si ihned nevzpomene, že např. K je lysin. Bílkoviny mají strukturu terciární a ne terciální (1.ř. pod Tab.1.1) To jsou však jen drobnosti.

Cíl práce je v disertaci jasně formulován. Je možno konstatovat, že vytýčené cíle disertační práce byly splněny.

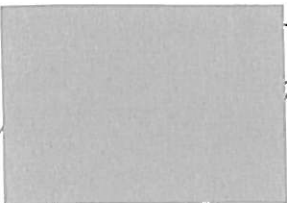
V experimentální části práce jsou dostatečně charakterizovány a popsány použité chemikálie, přístroje a aplikované metody tak, aby bylo možno práci reprodukovat.

Spojení presentace výsledků s diskusí vidím v tomto případě jako pozitivní, neboť autorka dobře konfrontovala výsledky své práce s výsledky ostatních autorů. Cílem disertace bylo nejen stanovení stupně fosforylace, ale i identifikace fosforylačních míst. Pro vypracování a ověření vhodných metod byly použity modelové fosforylované proteiny (prasečí pepsin A a kuřecí ovoalbumin) u nichž byl znám jak stupeň fosforylace, tak i fosforylační místa. Ověřené techniky pak byly aplikovány pro separaci a charakterizaci různých lidských pepsinů. Pro separaci fosforylovaných a nefosforylovaných forem pepsinů pak byla použita vysokotlaká afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých a galitých iontech. Pepsiny pacienta s karcinomem žaludku vykazovaly vyšší stupeň fosforylace než pepsiny zdravého jedince. Po rozštěpení pepsinu α -chymotrypsinem a separaci fosfopeptidů na imobilizovaných železitých nebo galitých iontech a následnou analýzou MALDI-TOF/TOF a za pomoci proteinové database se podařilo identifikovat příslušný fosfopeptid a určit místo fosforylace v lidském pepsinu.

Problémy s hodnocením stupně fosforylace proteinů autorka disertace v zásadě formulovala na str. 12 (1.3), navíc není zcela jasné kolik molekul proteinu je při abnormální fosforylaci skutečně fosforylováno a zda fosforylace nutně probíhá do stejných fosforylačních míst. Proto by bylo jistě zajímavé pokračovat v tomto výzkumu a analyzovat patologické vzorky více jedinců.

Závěrem mohu konstatovat, že disertantka má ve svém oboru hluboké teoretické znalosti, při řešení prokázala značnou zručnost a nápaditost, experimentální dovednosti a tvůrčí schopnosti. Je vyzrálým vědeckým pracovníkem. Zadaný úkol řešila způsobem, který odpovídá všem požadavkům kladeným na disertační práce doktorského studijního programu zákonem a předpisy Karlovy univerzity v Praze. Z hlediska požadavku § 47, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb. práce přináší původní a publikovatelné výsledky (viz seznam publikací v předních zahraničních časopisech). Na základě tohoto hodnocení doporučuji disertační práci Mgr. Lenky Novotné k obhajobě a udělení titulu PhD pro obor biochemie a pathobiochemie.

V Praze 18.8.2009



Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.