

Posudek na disertační práci Mgr. Marka Kučky

Cílem předkládané práce bylo přispět k detailnější představě o metabolismu steroidních hormonů u ptáků jmenovitě u kuřete. Autor si položil čtyři okruhy otázek k řešení a sice za prvé sledování metabolismu steroidních substrátů v různých tkáních kuřete se snahou identifikovat mechanismy inaktivace glukokortikoidů, v druhém okruhu charakterizovat mineralokortikoidní receptor z pohledu jeho afinity k 11- dehydro a 20- dihydro derivátům glukokortikoidu kortikosteronu. Ve třetím okruhu otázek naklonovat protein 20 beta – HSD z kuřete, který je zodpovědný za metabolismus glukokortikoidů a dále ho exprimovat v bakteriích E. coli a purifikovat. Takto vyčištěnou bílkovinu inkubovat s různými steroidy, které umožní získat představu o jeho substrátové a kofaktorové specifitě. Posléze čtvrtým cílem této práce bylo kvantifikovat expresi mRNA kuřecího proteinu 20 beta – HSD v různých tkáních pomocí metody kvantitativní Real Time PCR a ověřit tak, že distribuce exprese mRNA koreluje s experimentálními daty získanými v prvním okruhu otázek a dále zda-li existují pohlavní rozdíly v expresi mRNA u kuřete. Autor použil k vyřešení těchto daných okruhů otázek adekvátní molekulárně-biologické a biochemické metody jako je kvantitativní PCR v reálném čase, klonování, příprava rekombinantního proteinu apod. a dále HPLC, použití radioligandových měření atd. Celkový rozsah předkládané práce je zcela dostatečný, rovněž množství citovaných referencí je odpovídající.

Stanovené cíle v předkládané disertační práci se podařilo docílit, zvláště bych chtěl zdůraznit identifikaci sekvence cDNA kuřecího genu 20 beta-HSD a získání funkčního rekombinantního proteinu exprimovaného v E. coli a důkaz, že je zodpovědný za 3- a 20- reduktázovou aktivitu změřenou v různých tkáních kuřete. Dále porovnání získané aminokyselinové homologie tohoto enzymu se sekvencemi u savců a ryb umožnilo i vytvoření trojrozměrného modelu na základě téměř identické sekvence s dosud známou strukturou této bílkoviny z prasete.

Na závěr bych měl ještě několik dotazů:

- 1) zdali získaná bílkovina 20beta- HSD z kuřete má známá místa pro glykosylaci a případně kolik?
- 2) jestli tato bílkovina tvoří dimery či oligomery, případně tvoří homomerní či heteromerní komplexy
- 3) existuje knock out model tohoto genu třeba u myši a jak se případně projevuje?
- 4) doporučil bych pro přehlednost vložit odstavec s publikovanými či předloženými pracemi autora

Disertační práci pana Mgr. Marka Kučky splňuje všechny kritéria pro úspěšnou obhajobu.

