



Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.
Katedra biochemie
Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta
Hlavova 8
12840 Praha 2

Tel. +2-2195-1272 Fax.+2-2195-2331
E-mail: bezouska@biomed.cas.cz

Posudek oponenta na diplomovou práci Jany Mládkové nazvanou „Studium rozdílů v expresi proteinů vázajících glutathion v buněčných liniích nádorů prsu a primárních kulturách prsních epitelových buněk“

Diplomová práce Jany Mládkové se zabývá aktuální a zajímavou problematikou identifikace glutathion vázajících proteinů diferenciatně exprimovaných v buněčných liniích nádorů prsu pomocí proteomických technologií. Identifikace různě exprimovaných proteinů pomocí technik hmotnostní spektrometrie byla ještě doplněná měřením enzymových aktivit klíčových enzymů indukovaných při oxidativním stresu, zejména glutathion-S-transferas a glyoxylasy I. Takto široce pojatý výzkum je velmi aktuální nejen z hlediska poznání základních mechanismů karcinogeneze, ale i vzhledem k možnosti získání markerů časně diagnózy rakoviny prsu, jedné z nejzávažnější formy maligního onemocnění.

Cíle práce, mezi které patřilo ověřit možnost prefrakcionace proteinů extrahovaných z buněčných linií odvozených z rakoviny prsu pomocí afinitní chromatografie na GSH Sepharose, porovnat profily jednotlivých frakcí pomocí 2D elektroforesy, nejdůležitější diferenciatně exprimované proteiny identifikovat hmotnostní spektrometrií, a sledovat activity výše uvedených enzymů, byly kandidátkou splněny beze zbytku. Vznikla tak diplomová práce velmi dobré úrovně, což mj. dokumentuje i fakt, že některé výsledky již mohly být publikovány (publikace v časopise *Oncology Reports* je k diplomové práci přiložena).

Po formální stránce je práce vypracována velmi pečlivě, lze konstatovat, že se zde vyskytuje pouze minimum překlepů a formálních nedostatků. V literárním úvodu na str. 9 se zmiňuje práce významného německého patologa Rudolfa Virchowa z roku 1940, avšak tento vědec žil v letech 1821 – 1902. Na str. 18 má správně být Embden-Mayerhofovy cesty. V tab. 1 na str. 23 bych doporučoval místo termínu “Rozvinutí” proteinu použít spíše termín “Rozbalení” nebo “Denaturace”. Na str. 27 má být správně Fourierova transformace. Na str. 32 má být v anglickém názvu “Spectrometry”. Na str. 35 se většinou hovoří o fetálním telecím séru (spíše než hovězím). Na str. 51 a dalších nepovažuji za nazbytné ani příliš šťastné rozlišovat grafické prezentace na tzv. “Obrázky” a “Grafy”, myslím, že “Graf” může klidně být též “Obrázek”, a není to třeba takto komplikovat.

Ke kandidátce a její práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Na str. 25 uvádíte neslučitelnost barvení proteinů v gelu pomocí stříbrného komplexu s jeho identifikací hmotnostní spektrometrií. Takto absolutně položené tvrzení je ovšem nesprávné. Můžete tedy uvést, kdy lze a kdy naopak nelze "stříbřené" proteinové skvrny dále identifikovat hmotnostní spektrometrií?
2. Může kandidátka uvést další způsoby detekce proteinů na dvojrozměrných gelech používaných v současné proteomice?
3. Mezi proteiny interagujícími s imobilizovaným glutathionem byly identifikovány některé, u nichž je tato interakce poněkud neočekávaná. Můžete objasnit, proč jeví tento typ interakce například elongační factor EF-1 β ?
4. V závěru diskuse a též v souhrnu výsledků jsem úplně nerozuměl vyjádření kandidátky kladoucímu do souvislosti počet zkoumaných vzorků se statistickou významností získaných výsledků. Jestliže máme ve studii malý počet vzorků, nemusí být studie **reprezentativní**, přesto však mohou být získané výsledky statisticky významné, to závisí na velikosti naměřených hodnot, ne na počtu naměřených vzorků.

Závěrem je možné shrnout, že se kandidátce podařilo získat velké množství vědecky hodnotných výsledků, a tyto po formální stránce adekvátním způsobem též prezentovala v předložené diplomové práci. Diplomová práce tedy splňuje veškeré náležitosti, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě na katedře biochemie Univerzity Karlovy Přírodovědecké fakulty. Jedná se o práci velmi kvalitní, již v době podání diplomové práce byla na základě výsledků uveřejněna publikace v impaktovaném časopise *Oncology Reports* (**IF 1.6**).

V Praze dne 2. května 2009