Oponentský posudek diplomové práce

Název: Fosforylace rekombinantních proteinů solubilními a imobilizovanými kinázami

Diplomant: Bc. Eliška Šťovíčková

Oponent: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Předložená diplomová práce Bc. Elišky Šťovíčkové se zabývá fosforylací proteinů, důležitou posttranslační modifikací, která může významně ovlivnit funkci/regulaci určitých proteinů a stát tak na počátku rozvoje některých onemocnění jako je např. Alzheimerova nemoc. Diplomová práce je poměrně rozsáhlá (137 str.), přesto poměrně čtivě napsaná práce bez chyb a překlepů. V teoretické části poměrně obšírně rozebírá fosforylaci proteinů, typy kináz a fosforyláz, metody detekce fosforylovaných proteinů a diagnosticky významné fosforylované proteiny. Možná by neškodilo teoretickou část více zaměřit a hlouběji se zabývat např. pouze vybranými kinázami, které jsou pak experimentálně využívány, tak aby čtenář nebyl zbytečně zahlcen přemírou informací. Konkrétním experimentálním cílem byla příprava magnetických částic s navázanými vybranými kinázami a zavedení metod pro kontrolu účinnosti fosforylace proteinů takovými částicemi ev. rozpustnými formami enzymů. Diplomantka musela, pro splnění cíle práce zvládnou velké množství různých metodik, které jsou dobře, podobně a přehledně v diplomové práci popsány. Během práce bylo třeba řadu metod také optimalizovat (zejména ty pro kontrolu účinnosti fosforylace). Během experimentální práce bylo získáno velké množství výsledků, které jsou podrobně popsány a zobrazeny pomocí vhodných obrázků a grafů v sekci výsledky a diskuse. Jediná výtka k práci se týká diskuse, bohužel zde není přítomna ani v náznacích. Ačkoliv vazba kináz na magnetické či jiné částice je tématika poměrně nová (omezený počet studií, např. Li et al. 2015, J Chromatography A, 1425, 8-16.), některé další aspekty práce by se určitě diskutovat daly (např. metodiky detekce peptidů či fosforylovaných proteinů, aktivity kináz). Cíle práce se podařilo splnit, byly připraveny magnetické částice s navázanou kinázou PKA a GSK-3β, které si po imobilizaci zachovaly aktivitu a byly také zavedeny vhodné metodiky na hodnocení účinnosti fosforylace proteinů připravenými částicemi.

Dotazy:

Je možné využití připravené magnetické částice s PKA či GSK-3 i jinde než v přípravě fosforylovaných proteinových standardů pro diagnostiku?

Vedle imobilizace kináz na magnetické partikule byla snaha také imobilizovat alkalickou fosfatázu. Pro jaké experimenty byl tento nosič uvažován?

Je známo kolik je na PKA či GSK-3β volných aminoskupin využitelných pro používaný typ vazby na částice? Připravený nosič je směsí různě navázaných PKA/GSK-3β? Může některá orientace být neaktivní? Existuje možnost orientované vazby?

Byla před použitím PKA, GSK-3β a alkalické fosfatázy testována jejich aktivita a porovnána s deklarovanou hodnotou? Byla aktivita po imobilizaci srovnatelná?

U obrázků 31 a 32 uvádíte, že teoretická molekulová velikost tau proteinu je 45,9 kDa. Na SDS-PAGE ale máte zarámovány proužky o velikosti cca 70 kDa. Čím si vysvětlujete tento rozdíl? Jaký nárůst molekulové hmotnosti se očekává po fosforylaci? Nebylo by lepší použít méně % gel?

V závěru diplomové práce byl testován nosič s PKA s „realným vzorkem“ proteinem tau. Proč nebyl stejně testován nosič s GSK-3β? Jak by ho bylo možné testovat?

Je možné připravit partikule, na které by byla imobilizována směs různých kináz tak aby mohl být jejich účinkem připraven protein s různými typy fosforylace? Nebo je pro tyto případy lepší použít směs nosičů nesoucí jednotlivé imobilizované kinázy?

Závěrem lze říci, že se jedná o velmi kvalitní, nadstandardní diplomovou práci, která navíc jistě přinesla důležité výsledky pro domovské pracoviště. Student splnil všechny zadané úkoly. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou

výborně

V Hradci Králové 2. 5. 2018

RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.