

Posudek vedoucího diplomové práce Ing. Václava Staňka, Ph.D. na diplomovou práci Bc. Anety Kyralové nazvanou

Využití kapilární elektroforézy pro analýzu proteinových fosforylací

V předložené diplomové práci se diplomantka v souladu se zadáním zabývala optimalizací přípravy magnetických nosičů pro proteolytické štěpení a defosforylaci standardního vzorku α -kaseinu pro následnou analýzu fosfopeptidů pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) ve spojení s UV detekcí. Zoptimalizované podmínky přípravy vzorku α -kaseinu pak byly testovány i pro standardní vzorek rekombinantního tau proteinu. Práce koncepčně zapadá do komplexní problematiky analýzy proteinových fosforylací, řešené v rámci výzkumné skupiny imunochemie na KBBV.

V rámci teoretické části práce diplomantka popsala principy kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie a jejich instrumentaci. Dále se věnovala obecné charakteristice struktury a vlastností proteinů včetně popisu fosforylace jako nejčastěji se vyskytující posttranslační modifikace proteinů a rovněž detailněji charakterizovala vlastnosti a funkce tau proteinu. Na závěr pak shrnula některé dosud publikované výsledky o využití CZE a MS pro analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů. V průběhu experimentální práce diplomantka zpracovala standardní vzorky α -kaseinu podle navržených metodických postupů, které zahrnovaly optimalizaci štěpení fosfoproteinu trypsinem, obohacení získaných fosfopeptidů na TiO_2 částicích a defosforylaci fosfopeptidů pomocí alkalické fosfatázy. Pro imobilizaci trypsinu a alkalické fosfatázy byly použity dva typy magnetických nosičů, pro které byla vyhodnocena účinnost imobilizace a stabilita imobilizovaného enzymu. V případě imobilizace alkalické fosfatázy bylo dále testováno i různé prostředí a doba provedení imobilizace. Připravené vzorky byly analyzovány pomocí CZE a navíc byly všechny kroky úpravy standardního vzorku ověřovány pomocí MALDI-MS za účelem získání doplňujících informací o připravených vzorcích. Nakonec byly zoptimalizované podmínky přípravy vzorku aplikovány také na rekombinantní tau protein. Získané výsledky pak diplomantka přehledně zpracovala formou obrázků, grafů i tabulek a diskutovala je v přiměřeně rozsáhlé výsledkové části práce.

Aneta Kyralová po celou dobu pracovala na své diplomové práci samostatně a velmi svědomitě. Velice rychle si osvojila veškeré metodické postupy přípravy vzorků a přistupovala k nim s maximální pečlivostí. Rovněž prokázala potřebnou zručnost při obsluze přístroje pro CZE a také bez problémů zvládala vyhodnocování naměřených elektroforegramů a hmotnostních spekter. Po ukončení experimentální práce se mnou pak pravidelně konzultovala obsah i formu jednotlivých kapitol.

Z pohledu vedoucího diplomové práce nemám k řešeršni a experimentální práci diplomantky žádné připomínky, stejně tak ani k předložené diplomové práci, která je sepsána přehledně a srozumitelně. Mohu tedy konstatovat, že Aneta Kyralová splnila zadání diplomové práce, kterou hodnotím známkou

- výborně -.



V Pardubicích, 28. května 2014

Ing. Václav Staněk, Ph.D.