

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Evy Zatloukalové: Využití chelatovaných iontů kobaltu pro imobilisaci a separaci proteinů

Cílem předkládané disertační práce Mgr. Evy Zatloukalové bylo studium využití schopnosti různých proteinů specificky interagovat s kovovými ionty k jejich separaci a následně ke studiu jejich vlastností, Afinitní chromatografie na imobilisovaných kovových iontech představuje jednoduchou ale velmi účinnou separační techniku, která tuto vlastnost proteinů umožňuje využít. Aplikace této metody není omezena jen na izolace proteinů ale, což je velmi důležité, je výhodná k analytickým účelům. Autorka ve své práci použila ionty kobaltu, jak dvojmocné tak trojmocné, imobilisované pomocí kyseliny iminodiocetové.

Pomocí afinitní chromatografie na imobilisovaných kobaltnatých iontech byly separovány myší jaterní proteiny a proteiny adsorbované na tento nosič byly dále separovány pomocí SDS polyakrylamidové elektroforesy a dvou-rozměrné elektroforesy. Popsaný postup byl použit k porovnání složení proteinů myších jater po indukci chloridem kobaltnatým .

Afinitní nosič obsahující chelatované kobaltité ionty byl použit pro imobilisaci protilátek. Tento typ imobilisace protilátek je velmi výhodný, protože umožňuje interakci protilátky s nosičem daným způsobem (tzv. orientovaná imobilisace) a přitom protilátka není chemicky modifikovaná. Autorka předkládané disertační práce velmi detailně vypracovala nový postup imobilisace protilátek na chelatovaných kobaltitých iontech. Prokázala, že tento postup je možno použít pro imobilisaci protilátek různých tříd (králičí IgG, slepičí IgY a lidské IgE). V modelových pokusech prokázala, že protilátka (králičí anti-OVA IgG) imobilisovaná na kobaltitých iontech je schopna rozpoznávat antigen (ovalbumin); studovala podmínky adsorpce antigenu i jeho eluce, stejně pak i stabilitu nosiče. Pro praktické využití bylo důležité zjištění, že popsáný nosič je opakovaně použitelný. Dále byla v práci věnována velká pozornost i theoretickým aspektům interakce antigenu s protilátkou imobilisovanou na kobaltitých iontech.

Thema disertační práce je aktuální, protože vypracování nové separační techniky umožňující separaci proteinů na základě daných vlastností proteinů, představují velmi důležitý nástroj pro řešení proteinového složení studovaných systémů. Zvolené postupy k řešení problematiky byly zcela odpovídající současným znalostem a umožnily prokázat výhodné využití popsanych method. Předkládaná disertační práce je sepsána přehledně, dobře členěna a doplněna řadou obrázků, což umožňuje čtenáři jednoduchou orientaci v textu. Získané výsledky jsou originální, což naznačuje i ta skutečnost, že většina výsledků byla buď publikována v recenzovaných zahraničních časopisech (2 publikované práce) a nebo je pro publikaci připravována (1 práce). Vedle toho byly výsledky disertační práce presentovány formou posterů (8x) na různých konferencích a symposiích.

Na závěr bych měla několik připomínek nebo dotazů, které nesnižují žádným způsobem kvalitu předkládané práce.

- a) trochu jsem postrádala připojení publikovaných prací k disertační práci;
- b) dotaz se týká eluce jaterních proteinů adsorbovaných na nosič obsahující immobilisované Co(II) ionty: porovnávala autorka složení frakce eluované změnou pH se složením frakce eluované roztokem imidazolu;
- c) byly adsorbovány nějaké proteiny na nosič, který obsahoval pouze imobilisovanou kyselinu iminodioxovou; , tento nosič byl používán k „přečištění“ extraktu tkáně;
- d) pokusila se autorka o identifikaci proteinů, které byly indukovány chloridem kobaltnatým a které se na afinitní nosič adsorbovaly.

Podle mého názoru předkládaná disertační práce Mgr. Evy Zatloukalové jednoznačně prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D:

Praha, 30. 8. 2006.



Dr. Marie Tichá