

KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE PŘF UK V PRAZE

Doc. RNDr. Tomáš Obšil, PhD.
Tel. 221951303
E-mail: obsil@natur.cuni.cz

Posudek oponenta na diplomovou práci:

Martin Štefl

obor Biochemie, PŘF UK v Praze

„Charakterizace signálních peptidas mitochondriálního typu“.

Diplomová práce Martina Štefla se zabývá studiem interakcí mezi proteiny a fosfolipidovými membránami pomocí metod fluorescenční korelační spektroskopie. Práce byla vypracována ve spolupráci katedry biochemie PŘF UK a Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR.

Hlavní cíle předkládané diplomové práce byly: i) modifikace lipidů a dvou různých proteinů (cytochromu c a prothrombinu) fluorescenčními sondami; ii) příprava homogenních fluorescenčně označených membrán, které poslouží jako matrice pro sledování interakce s proteiny; iii) studium vazby prothrombinu na membránu pomocí korelační fluorescenční spektroskopie.

Martin Štefl úspěšně označil vybrané lipidy pomocí fluorescenční značky a následně provedl jejich purifikaci pomocí TLC. Dále úspěšně modifikoval fluorescenční sondou jak cytochrom c, tak i prothrombin. Při testování fluorescenčních vlastností označeného cytochromu c však zjistil, že vzorek obsahuje agregovanou frakci, která znemožňuje FCS měření. Pro studium interakcí s membránou byl proto vybrán pouze označený prothrombin, který žádné agregáty neobsahoval. Dále Martin Štefl připravil homogenně označené imobilizované membrány vhodné pro následné FCS experimenty. Diplomant poté pomocí FCS měření stanovil disociační konstanty vazby prothrombinu na membrány o různém složení a difúzní koeficienty jak navázaného prothrombinu, tak i lipidů v membráně. Nakonec pomocí FLCS analýzy získal kroskorelační křivky, které naznačují kinetiku interakce mezi membránou a prothrombinem.

Předkládaná diplomová práce ukazuje, že autor získal řadu originálních poznatků a velmi dobře se seznámil s metodami fluorescenční korelované spektroskopie včetně přípravy fluorescenčně značených lipidů a proteinů. K formální podobě práce nemám žádné připomínky, práce je napsána přehledně a velmi pečlivě. V práci se vyskytuje minimální počet překlepů. Diskuse získaných výsledků a citace použité literatury jsou adekvátní.

K předkládané diplomové práci mám jen tři následující otázky:

1. Můžete vysvětlit podstatu „hydrofobní“ interakce iontů Ca^{2+} s aminokyselinovými zbytky v Gla doméně prothrombinu, kterou zmiňujete na straně 27. Jedná se opravdu o hydrofobní interakci?
2. Jakým způsobem byl připraven cytochrom c použitý v diplomové práci?
3. Byly ve vzorku cytochromu c agregáty přítomny již před jeho značením fluoroforem? Pokusil jste se nějakou metodou tyto agregáty odstranit?

Závěrem konstatuji, že Marin Štefl ve své diplomové práci demonstroval schopnost samostatné vědecké činnosti a předložená práce více než splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci a plně ji doporučuji přijmout k obhajobě.



Doc. RNDr. Tomáš Obšil, PhD.
Přírodovědecká fakulta UK
9. května 2008