

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Téma diplomové práce: Nové metodické přístupy specifické izolace fosfoproteinů a fosfopeptidů

Jméno studenta: Bc. Rudolf Kupčík

Jméno oponenta: doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

Posudek oponenta

Cíle práce

Diplomová práce se zaměřuje na optimalizaci metodických postupů vhodných pro izolaci proteinů nebo peptidů posttranslačně modifikovaných fosforylací. K tomuto účelu student použil tři různá uspořádání: (1) vsádkové, (2) kolonové a (3) mikroprůtokové. Metody byly nejprve optimalizovány na standardních vzorcích a po dosažení pozitivních výsledků byly aplikovány na reálný bakteriální vzorek.

Struktura (členění práce)

Práce je členěna do kapitol, které na sebe logicky navazují. V úvodu autor krátce zmiňuje důležitost identifikace posttranslačně modifikovaných proteinů. Teoretická část je věnována přehledu proteinových modifikací se zaměřením na fosforylace, metodám separace a izolace proteinů. V této části je přehledně zpracovaná kapitola o afinitní chromatografii. Dále je popisována metoda hmotnostní spektrometrie, kde však je příliš mnoho informací o typech ionizací či funkcích hmotnostních analyzátorů. Zbytečně je uvedeno schéma hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap (obrázek č. 10), který obsahuje mnoho anglických popisů, které dále v textu nejsou komentovány. Navíc tento typ hmotnostního spektrometru nebyl použit pro měření vzorků. Na druhou stranu zde chybí jiné důležité informace např. o vícenásobně nabitých iontech (rozdíl mezi MALDI a ESI ionizací, princip MS^2 , MS^3 nebo analýzu peptidů s vícenásobnou fosforylací). V textu se vyskytují nepřesné formulace, např. na str. 38 uvádíte: „Pro identifikaci fosfopeptidů využíváme mimo jiné řadu MS metod. Jednou z nich je přímé porovnávání spekter před a po inkubaci vzorku s alkalickou fosfatázou....“. Zde se používá stále stejná MS metoda, jen měříme jinak připravený vzorek. Poslední kapitola teoretické části je věnována mikroprůtokovým systémům a je, podle mého názoru, nejlépe zvládnutým tématem v diplomové práci. Do teoretické části by bylo vhodné zahrnout kapitulu o bakterii *Francisella tularensis*, ze které byly připraveny vzorky a identifikovány fosfoproteiny.

V experimentální části jsou popsány použité metody a jednotlivé modifikace v pracovních postupech. Text je psán strukturovaně, přehledně a srozumitelně. V této části chybí metoda pro stanovení koncentrace proteinů. Dále by sem měly být přesunuty informace o kapalinovém chromatografu BioLogic uvedené v kapitole Výsledky a diskuze na str. 73 a 74. Ve výsledkové části jsou uvedeny a zároveň diskutovány pozitivní i negativní výsledky optimalizace obohacovacích technik. Interpretace jednotlivých výsledků jsou doloženy obrázky, tabulkami, hmotnostními spektry, což usnadňuje pochopení celé problematiky. Pravděpodobně nepozorností se do textu dostaly závažné formální nedostatky (uvedené níže), které vynikající výsledky snižují. V závěru jsou shrnuty všechny dosažené výsledky, které dokládají splnění cílů diplomové práce.

Literární odkazy

V předkládané diplomové práci je citováno 134 literárních odkazů z toho 17 jsou odkazy na internetové stránky. U všech typů citací jsou dodrženy citační normy. Rozsah práce je 132 stran, v textu je uvedeno 6 tabulek a 86 obrázků.

Formální úroveň práce:

Formálních chyb a překlepů v textu je velké množství, uvedu jen ty nejzávažnější. Název bakterie *F. tularensis* je v mnoha případech psán nesprávně (bez kurzívy, zkomoleně). Název hmotnostního analyzátoru s Fourierovou transformací je uváděn v celé práci špatně (Fournierova transformace). Tabulka č. 5 se v textu vyskytuje 2x (str. 84 a 85). V legendách obrázků č. 43 a 44 se vyskytuje stejný popis zkumavky 2 a 4 (dvoukroková se S-NHS), stejný problém je u obrázku č. 45. Popis hmotnostních spekter obrázky 73, 74, 75, 77, 79 mají špatně uvedený rozsah m/z . Hodnoty m/z z MS spekter diskutované v textu by měly být uvedeny na dvě desetinná místa (ne na čtyři desetinná místa – použitý hmotnostní spektrometr nemá takovou citlivost). Na str. 56 je formulován postup pro odsolení elučních frakcí, který je jen těžko pochopitelný. Student by si měl dávat větší pozor na některá uváděná tvrzení např. definice proteomiky na str. 12: „Věda, která se zabývá identifikací **proteinu** včetně jeho kvantifikace....“ nebo „Fosforylace bakteriálních proteinů **má** vztah k jejich virulenci...“. Vztahy fosfoproteinů k virulenci bakterií nejsou zcela probádané, proto je lepší vyslovit hypotézu, pokud nejsou po ruce přesvědčivé důkazy, které např. u bakterie *F. tularensis* nemáme.

Otázky

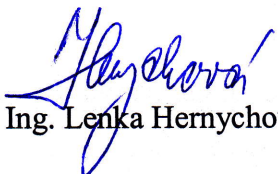
1. Na straně 25 své diplomové práce uvádíte, že „kolona s reverzní fází (RP) je spojena přímo s hmotnostním spektrometrem (MS) pomocí elektrospreje (ESI)“. Mohl byste vysvětlit propojení HPLC s hmotnostním spektrometrem, který má MALDI ionizaci?

2. V rámci své diplomové práce se vám podařilo identifikovat proteiny *F. tularensis* posttranslačně modifikované fosforylací. Jsou známy další informace o těchto proteinech (funkce, lokalizace, protein-proteinové interakce, zapojení v signálních cestách)? Lze některé vlastnosti predikovat a jak?

Závěrečné hodnocení: Bc. Rudolf Kupčik úspěšně optimalizoval metody sloužící k izolaci a koncentraci fosforylovaných proteinů/peptidů. Výsledkem byly identifikace a charakterizace fosforylovaných proteinů bakterie *Francisella tularensis* do té doby nepopsaných. Jedná se o zcela originální výsledky. Doporučuji, aby student dál pokračoval v této problematice a snažil se získané výsledky publikovat ve vědeckém časopise a prezentovat na konferencích.

I když student všechny zadané cíle splnil, formální stránka diplomové práce nebyla zcela zvládnutá. Z tohoto důvodu navrhuji známku **velmi dobře**.

V Brně dne 27. 5. 2012


doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.