



## Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Optimalizace preanalytické úpravy vzorků pro analýzu fosfopeptidů pomocí CZE**

Autor práce: **Bc. Michaela Konečná**

Vedoucí práce: **Ing. Václav Staněk, Ph.D.**

Oponent práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**

Předložená diplomová práce studentky Michaely Konečné se zabývá optimalizací přípravy vzorku modelového fosfoproteinu  $\alpha$ -kaseinu zahrnující jeho proteolytické štěpení, obohacení o fosfopeptidy a defosforylaci pro následnou analýzu technikou kapilární zónové elektroforézy s UV-detekcí. Porovnání záznamu elektroforetické separace takto zpracovaného vzorku před a po defosforylaci by mělo sloužit k potvrzení přítomnosti fosforylace, což by přispělo ke zvýšení potenciálu použitelnosti této techniky při analýze fosfoproteinů v reálných vzorcích včetně komplexních směsí. Jednotlivé kroky byly paralelně analyzovány hmotnostní spektrometrií.

Diplomová práce má klasické členění, zahrnuje krátký úvod, obsáhlou teoretickou část (31 stran), následuje jednostránková konkretizace cílů diplomové práce a experimentální část (16 stran), výsledky jsou diskutovány na 15 stránkách a závěry shrnuty na necelých 2 stránkách. Celkový rozsah práce je včetně příloh, seznamu použitých zkratk a literatury 94 stran. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 72 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy. Po formální stránce práce splňuje požadavky na ni kladené a je napsána stylisticky dobře a čtivě, za drobný nedostatek v tomto směru považuji pouze výskyt zbytečně hodně překlepů, což může být přisuzováno nepozornosti při rychlém psaní textu.

Teoretická část je zpracována přehledně a věnuje se principu a instrumentaci kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie, popisuje strukturu a vlastnosti proteinů včetně jejich posttranslačních modifikací se zaměřením na fosforylaci, a nakonec jsou uvedeny možnosti analýzy fosforylovaných proteinů a peptidů. V experimentální části jsou podrobně popsány metodické postupy, které si studentka zvládla osvojit v rámci této diplomové práce, zahrnující jednak metody přípravy vzorku a dále pak pracovní postupy v rámci analýzy připravených vzorků pomocí kapilární zónové elektroforézy. Ve výsledkové části jsou interpretovány získané výsledky, které jsou doloženy formou tabulek, grafů a obrázků. Předložené výsledky umožňují učinit závěry a hodnocení a lze tedy konstatovat, že základních cílů diplomové práce bylo v průběhu řešení dosaženo.

K předložené práci mám několik připomínek:

- v práci se vyskytují některé nesprávně vyjádřené anglicismy, které působí rušivě, např. clusters (str. 25) nebo miss cleavage (Tabulka 5.4 – str. 69, Tabulka 9.1 – str. 86)
- v kapitole 2.3.5.1 věnované charakteristice fosforylovaných proteinů chybí v přehledu aminokyselin, které mohou být v proteinech fosforylovány, threonin, u něhož je

fosforylace pozorována daleko častěji (cca 10 %) ve srovnání např. s tyrosinem (cca 0,05 %), který je zde uveden

- v kapitole 2.3.6 je nesprávné tvrzení o existenci „čtyř podjednotek kaseinu“, nejedná se o podjednotky ale varianty proteinu, kdy jde o samostatné plně funkční proteiny lišící se strukturou a vlastnostmi, jako podjednotky se označují polypeptidické struktury, které svým vhodným uspořádáním tvoří jednu funkční bílkovinu (opakuje se na str. 62), na obrázku 2.12 na str. 33 nazvaném jako „Struktura  $\alpha$ -kaseinu“ je navíc nesprávně znázorněna struktura tzv.  $\alpha$ -kasein exorfinu, což je pouze peptid izolovaný z  $\alpha$ -kaseinu tvořený 5-ti aminokyselinami (AMK 90-95 v rámci sekvence  $\alpha$ -kaseinu)
- některé názvy kapitol nejsou zcela přesně vyjádřeny např. kap. 4.4.1 „Imobilizace trypsinu na SiMAG-COOH magnetických částicích“ místo „Imobilizace na magnetické částice“ (opakuje se v kap. 4.4.4), u kapitoly 4.4.3 by bylo výstižnější místo názvu „Štěpení  $\alpha$ -kaseinu v roztoku“ použít název „Štěpení  $\alpha$ -kaseinu imobilizovaným trypsinem“
- v kapitole 2.5.4 „Způsoby obohacování vzorků fosfopeptidů“ by bylo vhodnější vedle kapitoly „IMAC“ a „Imunoprecipitace pomocí protilátek“ zařadit kapitolu „Afinitní chromatografie s využitím kovového oxidu“ (angl. metal oxid affinity chromatography, MOAC), do které by bylo možné zahrnout zbývající uvedené kapitoly – tj. 2.5.4.3 (Nanočástice  $\text{TiO}_2$ ) a 2.5.4.4 (Kompaktní nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ ) příp. i oxid hlinitý z kap. 2.5.4.2
- v případě kalibrace trypsinu byla připravena dle tabulky 4.1 na str. 48 koncentrační řada trypsinu v rozmezí hodnot 1-15  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , dle návodu na str. 49 pak do reakce bylo použito pouze 20  $\mu\text{l}$  z připravených kalibračních roztoků, což by mělo být zohledněno v kalibrační křivce u hodnot uváděných na ose x (str. 63)

Doplňující otázky pro studentku jsou následující:

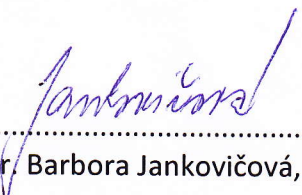
- 1) V teoretické části chybí zmínka o imobilizovaných enzymech, enzymy jsou zde popsány pouze obecně, na jejich použití přitom byla práce založena, jaké jsou hlavní výhody jejich použití? Potvrdila se vám některá ze zmíněných výhod i při vašich experimentech?
- 2) Z postupů v experimentální části vyplývá, že separace vzorku nativního  $\alpha$ -kaseinu (kap. 4.5.2) a naštěpeného  $\alpha$ -kaseinu (kap. 4.5.3) byly při CZE měřeny v prostředí 20 mM fosfátového pufru o pH 2,5 s přidavkem 0,05% HPMC a 6M močoviny, který se osvědčil, při separaci obohaceného vzorku naštěpeného  $\alpha$ -kaseinu (kap. 4.5.5) a separaci defosforylovaných vzorků již přidavek HPMC a močoviny není uveden, z jakého důvodu tomu tak bylo?
- 3) V práci se používal trypsin TPCK, co toto označení znamená a proč se používala právě tato forma enzymu?
- 4) V tabulce 5.4 je mezi nalezenými fosfopeptidy kaseinu identifikovanými pomocí MS po obohacení na  $\text{TiO}_2$  částicích uveden peptid o hodnotě m/z 1482,615, který není

uveden mezi očekávanými teoretickými fragmenty v tabulce 9.1 v příloze, jedná se tedy také o nově identifikovaný fragment?

- 5) Z jakého důvodu byla v případě imobilizace ALP prováděna 1-kroková a 2-kroková metoda, jaký je mezi těmito přístupy rozdíl?

Závěrem lze konstatovat, že navzdory připomínce, práce dosahuje dostatečné kvality a splňuje předpoklady potřebné pro **doporučení k obhajobě**. Práci doporučuji ohodnotit známkou **velmi dobře**.

V Pardubicích dne 24.5.2013

  
.....  
Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.