Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Téma diplomové práce: Analýza proteinů s využitím imobilizovaného Clostripainu a techniky Selected Reaction Monitoring (SRM)

Jméno studentky: Bc. Jana Baronová

Jméno oponenta: Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

Oponentský posudek

Bc. Jana Baronová si při řešení své diplomová práce předsevzala dosáhnout úspěšné imobilizace Clostripainu na magnetické částice a porovnat využití takto imobilizovaného enzymu při štěpení proteinů s obecně zavedeným trypsinem. Pro imobilizaci clostripainu studentka využila několika odlišných nosičů a porovnala i různé metody vedoucí k samotné vazbě. Předložené výsledky demonstrují, že Clostripain lze úspěšně imobilizovat a účinnost imobilizace je možné kvantifikovat pomocí srovnání s kalibrační řadou. Studentka předložila srovnání jednotlivých variant a dvě vybrané varianty použila v následné analýze štěpení dvou vybraných proteinů. Pro hodnocení účinnosti použila srovnání s obecně zavedenou proteázou trypsinem. Srovnávala také účinnost imobilizované formy s formou rozpuštěnou v roztoku. Jako hodnotící kritérium použila kvantifikaci úbytku intaktního proteinu a zároveň metodu, která umožnila monitorovat množství produktů enzymatické reakce, tedy vznikajících peptidů. Studentka předložila výsledky umožňující učinit závěry a hodnocení. Lze tedy konstatovat, že obou základních cílů diplomové práce bylo v průběhu řešení dosaženo.

Práce je rozdělena do šesti kapitol, které respektují zavedený systém publikace diplomové práce. V teoretické části se studentka podrobně věnuje všem tematickým částem souvisejícím s řešenou problematikou, a to do odpovídající hloubky. V experimentální části studentka popisuje průběh pokusů způsobem, který je většinou dobře srozumitelný a pochopitelný. Výsledky a diskuze jsou spojené do jedné kapitoly. Následuje závěr, grafická příloha a seznam literatury. Celkem byla diplomová práce sepsána na 108 stranách. Po formální stránce práce splňuje požadavky na ni kladené. Studentka se vyvarovala gramatickým a stylistickým chybám, práce je čtivá a srozumitelná. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 131 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy.

Přes zmíněné klady se studentka nevyhnula několika nedostatkům. Jedná se v několika případech o chybné nebo nesprávné použití terminologie. Několika takových chyb se studentka dopustila v kapitole úvod. Hned první věta je stylisticky zpochybnitelná a navíc používá spojení „exprese proteinů“, které je věcně nesprávné. V některých pasážích hodnotí skutečnosti příliš zkratkovitě a nepodává ucelený souhrnný přehled, který vede k tématu práce. Příkladem budiž konstatování, že „základem stanovení proteinů je jejich rozštěpení na peptidové fragmenty pomocí proteolytických enzymů“. V tomto sdělení se přeceňuje význam

proteolytického štěpení při analýze proteinů. Podobně se nadsazuje význam SRM při stanovení proteinů. Podobné nepřesnosti se objevují i v teoretické části. Lze jen těžko souhlasit s tvrzení, že hlavní uplatnění proteolytických enzymů je v proteomice (str. 17). Stejně tak tvrzení, že imobilizované enzymy mají obrovský potenciál použití v biotechnologické, imunologické, biomedicínské oblasti a hlavně pak v již zmiňované proteomice (str. 26). Studentka směřuje jednoznačně k využití v průběhu své práce, ale nelze pominout skutečnosti i mimo tento záběr. Objevují se i technicky nesprávné údaje. Na straně 35, kde studentka popisuje Nanoelektrosprej, uvádí údaj průtoků kolem 20 µm/min, přitom sama při své experimentální práci používala průtok o téměř dva řády nižší (360 nl/min). Jako poslední takový nedostatek uvádím nepřesnou definici termínu MRM. Studentka dává do kontrastu SRM a MRM a uvádí rozdíly v jejich instrumentálním uspořádání, přitom tyto techniky vyjadřují shodný jev.

V experimentální části studentka operuje s termínem „rozvolnění". Ačkoliv je nakonec celkem zřejmé, co pod tím termínem vyjadřuje, kombinuje v tomto smyslu působení detergentu a reakci vedoucí k redukci a alkylaci disulfidických vazeb. Z tohoto důvodu nelze tedy použít pro název kapitoly 4.7 Rozvolnění proteinů pomocí RapiGestu. Studentka dále v textu sama správně hodnotí, že pro umožnění přístupu proteolytických enzymů k proteinu BSA má klíčový význam alkylace thioskupin Cysteinu.

Výsledky experimentů jsou celkem srozumitelně podány. K drobným výtkám patří připomínka, že se v kapitole popisující výsledky objevují některé úseky, které spíše patří do teoretické části (např obr. 15). Oceňuji výběr hodnotících metod. SDS-PAGE a kvantifikace pomocí denzity skvrn pro hodnocení úbytku intaktního proteinu a hodnocení přírůstku štěpených peptidů pomocí SRM kvantifikace dává možnost kvalitního popisu jevů. Stejně tak porovnání solubilní a imobilizované formy a srovnání stejné podoby trypsinu nabízí v rámci daných experimentálních podmínek pokus o objektivní hodnocení účinnosti štěpení. Prezentovaná data jsou dobře zpracována a svědčí o kvalitní experimentální práci. Ovšem z popisu experimentů ani z popisu výsledků není zřejmě, jestli se jedná o hodnocení jednotlivých pokusů, nebo jestli byly experimenty opakovány. Jedná se jak o údaje kvantifikace na gelu tak pomocí MS. Pokud tomu tak není, jedná se o nedostatek, který snižuje jinak kvalitní práci. Lze z toho důvodu obtížně učinit závěry, které by byly jednoznačné. V tomto směru si dovolím studentce vytknout nedostatek diskuze výsledků a příliš přímočaré závěry. Vyjádření ze závěru, kde studentka konstatuje, že solubilní a imobilizovaná forma Clostripainu štěpí srovnatelně, působí rozpačitě. Jedná se podle mne o jeden z klíčových závěrů a studentka nehodnotí, v jakém ohledu srovnatelně štěpení probíhá, jestli se jedná o údaj podpořený daty z jedné nebo obou hodnotících technik a na které výsledky se tento závěr odvolává. Pro vyznění celé diplomové práce by bylo vhodné, aby získané výsledky byly srozumitelněji zformulovány, případně diskutovány a v závěru dopady těchto zjištění jednoznačněji vyhodnoceny. Je dobré ovšem zmínit, že hodnocení takových experimentů není triviální a množství dat, kombinace technik a přístupů, činí z vyhodnocení komplikovanou záležitost.

Studentka prokázala schopnost experimentální práce a jejího zpracování do podoby publikace. Přes připomínky k počtu opakování a vyhodnocení výsledků, můžu předloženou práci doporučit k obhajobě a doporučuji ohodnotit známkou chvalitebně.

Doplňující otázky:

1. Souvisí interference materiálu zkumavek při stanovení kalibrační křivky s použitým enzymem, nebo se stanovovaným produktem reakce? Byla stejná data dosažena i při stanovení kalibrační křivky trypsinu?

2. V tab. 6 se objevují údaje nd - nedetekováno, v kolonkách pro charakteristiku imobilizace a imobilizovaného množství Clostripainu pro různé postupy imobilizace a na částicích PGMA a HEMA. Znamená tento údaj, že imobilizace nebyla vůbec úspěšná? Jak tento výsledek souvisí s hodnocením „z testovaných postupů se jako nejlepší jevila jednokroková karboimidová metoda s přídavkem S-NHS" (str. 64)?
3. Vysvětlete, proč by bylo žádoucí efektivnější štěpení Clostripainem pro rutinní aplikace (údaj uvedený na str. 71).

V Praze dne 24.5.2013

Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.