

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Šárka Bednářová

Název práce: Detekce enzymové aktivity Src kinázy imobilizované na magnetických částicích

Oponent práce: Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Šárky Bednářové je zaměřena na imobilizaci proteinkinázy na magnetický nosič, fosforylaci proteinů na tyrosinu a její detekci. K detekci jsou pak využívány jak protilátky proti fosforylovanému tyrosinu (pTyr) tak dendrimer pIMAGO. Nedílnou součástí je i analýza vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

Teoretická část práce je psána přehledně, s malým množstvím stylistických chyb či překlepů a podle doporučeného stylu. V teoretické části se studentka věnuje detailně kinázám, jejich přehledu a konkrétně se poté na tyrosinkinázy a Src kinázy. Dále jsou popisovány metody imobilizace proteinů, jejich výhody a nevýhody. Stejně tak jsou poté popisovány metody detekce fosforylace na proteinech a vybrané proteiny, u kterých je znám, nebo se předpokládá význam jejich fosforylace *in-vivo*. Závěrečná kapitola se pak věnuje multifosforylovaným peptidům, i když samotný text se věnuje spíše proteinům. Tato část by také mohla být lépe provázaná se souvisejícím textem v teoretické části. Bylo by také vhodné lépe využít potenciál této části a diskutovat např. vliv přemíry fosforylace proteinů při onemocněních, úskalí jejich detekce a přípravy *in vitro*.

Obecný výčet a počet kináz je v textu několikrát opakován, např. na straně 17: „Dnes je známo asi 90 různých kináz specifických pro rezidua tyrosinu“; na str. 19: „V dnešní době je známo asi 518 různých proteinkináz. Z toho je více než 90 tyrosinkináz.“; na str. 19: „... Známo je sice zatím jen necelých 100 tyrosin kináz...“.

V textu je minimum nepřesností, avšak na str. 43 se uvádí: „...Specifické anti-fosfoprotilátky se jsou schopné navázat pouze na určité aminokyselinové sekvence. Pokud místo fosforylace není známé, nejsou dostupné příslušné protilátky. Proto tuto metodu lze použít pouze na známé fosforylace...“. Toto tvrzení je bohužel zavádějící, jelikož existuje celá řada protilátek obecně proti pTyr bez nutnosti rozpoznávat určitou sekvenci proteinu. V experimentální práci jsou zmíněny např. anti pTyr protilátky SLBV4381 (Sigma Aldrich) na str. 62 a na str. 70 je popisována detekce anti-pTyr protilátkami pomocí Western blotu.

Celkově je ale teoretická část přehledná a dobře zpracovaná i přes výše uvedené drobné nedostatky.

Na věcně a srozumitelně psanou metodickou část navazuje první část výsledkové části, která popisuje postup optimalizace protokolu detekce fosforylovaných proteinů pomocí Western blotu. Na rozdíl od dalších kapitol výsledkové části je tato kapitola (4.1.) bohužel málo diskutována, a závěry z této kapitoly jsou tak nejasné. Byla úspěšně detekována fosforylace na serinu pomocí pIMAGO avšak průkaz možnosti detekovat fosforylaci na tyrosinu nebyl správně proveden.

Na str. 70-71 jejíž součástí je i Obr. č. 8 totiž ukazuje optimalizaci detekce fosforylovaného tyrosinu s použitím lidského IgG jako standardu. Lidské IgG, ale bohužel fosforylaci tyrosinu, podle dostupných informací, neobsahuje. K ověření je možné využít databázi PhosphoSite <https://www.phosphosite.org>. Navíc v databázi Uniprot, která je v práci zmíněna, se pTyr nenachází ani na konstantní části těžkého řetězce gamma 1-4 (proteiny

P01857, P01859, P01860, P01861) ani konstantních částech lehkých řetězců kappa či lambda u manuálně anotovaných proteinů. Jelikož je IgG sekretovaný protein, je nepravděpodobné, že by obsahoval pTyr, který je asociován především s intercelulárními proteiny. Signál detekovaný na obrázku č. 8 je tak pravděpodobně způsoben zkříženou reaktivitou sekundární protilátky s molekulou lidského IgG namísto IgG myši primární anti-pTyr protilátky. Jedná se o poměrně běžný jev. Funkčnost metody tedy tímto testem nebylo možné ověřit i když v části 4.4. je prokázáno, že funkční je.

Na str. 72 a 73 s detekcí fosforylací pomocí pIMAGO jsou správně detekovány proteiny α - a β -casein s fosforylací na serinu. Lehké řetězce protilátek mohou dle některých studií vykazovat fosforylací na serinu (DOI: 10.1038/s41587-019-0344-3), což pravděpodobně způsobilo slabou odezvu pomocí pIMAGO. Metoda je tedy funkční i když na obrázku č. 11C již fosforylace IgG detekována není.

Další části kapitoly jsou již metodicky správně provedeny a např. v části 4.2.2. je velkým přínosem pro další práci vliv přídavku bovinního sérového albuminu, který se ukázal jako klíčový pro zachování aktivity imobilizované Src kinázy. Hodnocení a výsledky v této části práce jsou logicky uspořádány, a i ověření míry vazby na částice je velmi důležité. I přesto, že pravděpodobně docházelo k rozpadu magnetických částic, dopadly experimenty v kapitole 4.2.3. velmi dobře a aktivita kinázy je z velké míry zachována min. po dobu 4. týdnů. Experimenty jasně potvrzují možnost imobilizovat enzymy na částice a zachování jejich aktivity.

V části 4.3. je již vlastní fosforylace pomocí Src. I přes problémy s přenosem proteinů na membránu a detekcí pomocí Western blotu bylo jednoznačně prokázáno pomocí hmotnostní spektrometrie, že MBP byl opravdu úspěšně nafosforylován a to jak volnou, tak imobilizovanou formou Src kinázy.

V kapitole 4.4. již bylo přistoupeno k fosforylaci lidského alfa synukleinu, kde fosforylace mohou hrát důležitou roli v ovlivnění konformace tohoto proteinu. Tato část práce je tedy naprosto klíčová.

Pomocí Western blotu byla úspěšně prokázána fosforylace solubilní Src kinázou jak detekčním systémem s pIMAGO detekcí, tak s využitím anti-pTyr protilátek. Následně byla lokalizována i fosforylace na Tyr39. Bohužel u imobilizované kinázy fosforylace potvrzena nebyla i přesto, že alfa-synuklein byl přítomen na membráně.

V kapitole 4.4.3. nebyly bohužel detekovány žádné fosforylace pomocí MS. Za možnou příčinu byla uvedena nedostatečná koncentrace vzorku. Velmi negativně pravděpodobně působila i přítomnost SDS ve vzorku, který je s MS nekompatibilní a je obtížné jej z roztoku odstranit. Standardní extrakce na reverzní fázi totiž bohužel nepomáhá.

I přes některé nedostatky hlavně v kapitole 4.1. bych chtěl nicméně vyzdvihnout experimentální přínos práce, který může být v budoucnu využit při další analýze *in-vitro* fosforylovaných proteinů

Dotazy:

- 1) Na str. 39. se uvádí v souvislosti všeobecně s se všemi kinázami: „...Zároveň i jejich skladovací stabilita v čase výrazně klesá...“. Je to možné uvést takto obecně? Pokud ano, prosím o uvedení validních literárních zdrojů.
- 2) Str. 42: „...Existují i částice s aldehydovými, Ni²⁺, Co³⁺ funkčními skupinami...“. Jsou částice s Ni²⁺ a Co³⁺ funkčními skupinami komerčně dostupné nebo je třeba je připravit v laboratoři? Jaký je rozdíl mezi Co²⁺ a Co³⁺ funkčními skupinami v souvislosti s imobilizací?

- 3) Nebyly detekovány žádné fosforylace u nativního MBP pomocí WB (Obr. 11C a 12), mohla za to již zmíněná fragmentace? Jaká molekulová hmotnost byla u MBP očekávána a jakou jste stanovili na membráně?
- 4) Jak si vysvětlujete, že na Grafu č. 3 je vidět, že po 1 týdnu došlo dle měření k poklesu množství enzymu a po 2 týdnech zase k jeho navýšení?
- 5) Str. 79 – Jakou roli hraje okyselení odebraných vzorků z reakční směsi pomocí 5% trifluoroctové kyseliny?

Závěr: Zvolené téma je poměrně složité a jeho zvládnutí vyžadovalo velké úsilí studenta. Přesto se podařilo prokázat úspěšně fosforylace na modelových proteinech, i když přínos imobilizace enzymu na nosič je v tomto případě je prozatím jednoznačně prokázán nebyl. Bylo by tak vhodné se tomuto tématu věnovat v navazující práci. Práce však položila základ pro budoucí úspěšnou fosforylaci alfa-synukleinu jako modelového proteinu pro studium vlivu fosforylace na jeho konformaci a s tím spojená onemocnění. Studentka jednoznačně splnila požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji **doporučuji k obhajobě**.

Práci hodnotím známkou C.

Hradci Králové dne: 29. 5. 2023

Podpis

