

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: **Optimalizace podmínek separace fosfopeptidů pomocí kapilární zónové elektroforézy**

Autor práce: **Bc. Andrea Richterová**

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

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

Předložená diplomová práce studentky **Andrey Richterové** se zabývá zpracováním vzorku modelového fosfoproteinu α -kaseinu zahrnujícím jeho proteolytické štěpení, obohacení o fosfopeptidy a následnou defosforylaci. Jednotlivé kroky byly analyzovány jednak hmotnostní spektrometrií a především pak kapilární zónovou elektroforézou ve spojení s UV-detekcí, u které byly optimalizovány podmínky separace.

Teoretická část je zpracována přehledně a věnuje se principu a instrumentaci kapilární zónové elektroforézy, popisuje strukturu a vlastnosti proteinů včetně jejich posttranslačních modifikací se zaměřením na fosforylaci, a v neposlední řadě jsou uvedeny možnosti využití kapilární zónové elektroforézy pro analýzu 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 jako je imobilizace enzymů trypsinu a alkalické fosfatázy na magnetické mikročástice, stanovení jejich enzymatické aktivity, štěpení α -kaseinu trypsinem, defosforylace alkalickou fosfatázou či obohacení fosfopeptidů pomocí TiO_2 , a dále pak pracovní postupy pro kapilární zónovou elektroforézu zahrnující pokrytí kapiláry, měření elektroosmotického toku a vlastní separaci připravených vzorků. Ve výsledkové a diskusní části jsou podrobně interpretovány získané výsledky, které jsou doloženy formou tabulek, grafů a obrázků.

Diplomová práce obsahuje 96 citací, které jsou zpracovány podle citačních norem, a její rozsah je 89 stran. Práce je napsána stylisticky dobře a čtivě. Nevyskytují se zde hrubé pravopisné chyby a je zde pouze minimální množství překlepů (např. str. 34 - thiolitické, str. 18 - difúze, str. 55 - průtok 1 $\mu\text{l/ml}$, str. 29 - kDA, str. 51 - 0,8 rpm).

K diplomové práci mám pár drobných připomínek a dotazů:

- 1) Drobné výhrady mám k několika nepřesným formulacím např. v názvech kapitol 4.4.1 a 4.4.5 je použito spojení Imobilizace trypsinu/alkalické fosfatázy na SiMAG-COOH/ NH_2 magnetických částicích, doporučovala bych spíše spojení Imobilizace na magnetické částice, dále pak nadpis kapitoly 5.5 Separace štěpeného α -kaseinu imobilizovaným trypsinem by mohl být formulován přesněji, a to Separace α -kaseinu štěpeného imobilizovaným trypsinem.
- 2) Zkratka LIF je vysvětlena jako laser indukovaná fluorescence, toto označení se opakuje i v textu (např. Tab. 2.2, str. 33), správně by měl být použit název laserem indukovaná fluorescence.
- 3) V textu není sjednoceno správné psaní procent, procenta by měla být oddělena mezerou, při těsném sázení pak mají význam složeného přídavného jména (např. str. 39 Kap. 4.2 Chemikálie).

- 4) Jsou používány nesprávné koncovky přídatných jmen slovesných např. ředící (str. 42), dělicí (str. 46 Tab. 4.2), koncovka -ící vyjadřuje děj, měla by být spíše použita koncovka -icí vyjadřující účel.
- 5) U chemikálií od firmy Sigma-Aldrich by mělo být uvedeno spíše jako místo určení St. Louis, MO, USA, kde je hlavní sídlo společnosti, než Steinheim, Německo.
- 6) U tabulky 5.5 bych doporučovala uvést i rozsah sekvence jednotlivých peptidů v rámci sekvence původního proteinu, pro snadnější vyhledání teoretického místa fosforylace.
- 7) Ne všechny píky označené v MS spektru na obrázku 5.6 korelují s tabulkou 5.5., např. peptid o hmotě 2080,0 označený ve spektru jako fosforylovaný, je v tabulce označen jako nefosforylovaný, bylo by vhodné lépe popsat.
- 8) U spektra na obrázku 5.11 je velice hezky a detailně popsán pozorovaný děj deamidace, doporučovala bych ale u tohoto spektra zvýraznit a více okomentovat také fosforylaci, zda a v jaké míře k ní docházelo.
- 9) V tabulce 2.1 na str. 19 je v případě typu pokrytí adsorpcí polymerů jako první vlastnost uveden pojem nízká, prosím o vysvětlení.
- 10) V Tab. 2.3 na str. 25 chybí v přehledu možnost výskytu fosforylace u některých zde uvedených aminokyselin, např. u lysinu a argininu, u nichž je zmíněn možný výskyt fosforylace v textu na str. 26. Jak je to s kyselinou glutamovou, může se u ní vyskytovat fosforylace?
- 11) Co znamená Scr homologní doména zmiňovaná na str. 28, zkratka Scr není vysvětlena?
- 12) Chybí vysvětlení zkratky HPMC, která je používána jako součást pracovního elektrolytu při CZE separacích, prosím o vysvětlení zkratky a významu použití této látky při separacích.
- 13) Jednou z podmínek složení pracovního elektrolytu pro dynamické pokrytí při elektroforetické separaci kaseinů je pH v kyselém prostředí, proč byl zvolen právě fosfátový pufr, pro nějž pH 2,5 není zrovna typické. Bylo by možné použít i jiný typ pufru např. glycinový nebo citrátový, které se běžně používají v takovýchto hodnotách pH? Jaký by to případně mělo vliv na separaci?
- 14) Defosforylace imobilizovanou ALP byla vyhodnocena jako vhodná metoda pro modifikaci peptidů před CZE-UV analýzou, protože separace v tomto případě byly úspěšné. Avšak dostatečná účinnost defosforylace nebyla v tomto případě prokázána ani technikou MALDI-TOF-MS, čím si tento fakt vysvětlujete a jakým způsobem bude případně probíhat optimalizace podmínek, aby bylo docíleno lepšího výsledku defosforylace imobilizovaným enzymem?

Práce splňuje stanovené cíle zadání. Přestože podmínky analýzy bude potřeba ještě dále optimalizovat, aby mohly být použity i pro reálný vzorek, je diplomová práce přínosem v daném výzkumu a výše uvedené připomínky a nedostatky jsou většinou formální a výrazně nesnižují její kvalitu. Proto hodnotím **výborně**.

V Pardubicích 21.5.2012

Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.

