

## Oponentský posudek diplomové práce

**Téma diplomové práce:** Tau protein – analytické a obohacovací techniky pro detekci markeru Alzheimerovy choroby  
**Autor:** Bc. Hana Mašátová  
**Oponent:** PharmDr. Jana Klimentová, PhD.

### Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo zavedení metod izolace, obohacení a následné analýzy fosfopeptidů, jejichž další využití spočívá v analýze struktury fosforylovaného proteinu Tau – významného markeru Alzheimerovy choroby. K jeho dosažení měly být provedeny následující kroky: 1) optimalizace podmínek obohacovacích technik pro izolaci fosforylovaných proteinů, 2) derivatizace peptidů pro *de novo* sekvenování, 3) optimalizace složení matrice pro MS analýzu a 4) sekvenování *de novo* za použití exopeptidáz.

### Struktura (členění) práce

Práce je členěna obvyklým způsobem. V teoretické části je shrnut význam posttranslačních modifikací proteinů se zaměřením na fosforylace, jsou zde vyjmenovány základní metodiky pro obohacování fosfopeptidů a popsány techniky hmotnostní spektrometrie v proteomice. Poslední část je věnována Tau proteinu a molekulárně-patologickým aspektům Alzheimerovy choroby. Experimentální část zahrnuje postupy jednotlivých pokusů. Výsledky a diskuze jsou s výhodou spojeny do společné kapitoly. Jsou zde shrnuty výsledky jednotlivých experimentů uvedených v předchozí části. Z výsledků je patrné, že práce zahrnovala velké množství provedených pokusů a od autorky si vyžádala zvládnutí široké škály různých metodik, které vycházejí nejen z literatury ale jsou zde zoptimalizovány. Postup práce a dosažené výsledky jsou dokumentovány řadou obrázků hmotnostních spekter. V závěru pak autorka komentuje dosažení dílčích cílů práce. Podařilo se úspěšně optimalizovat metodu pro separaci a obohacení fosfopeptidů modelových standartních proteinů pomocí kombinace IMAC a TiO<sub>2</sub>. Bylo vybráno nejvhodnější složení matrice pro analýzu získaných fosfopeptidů pomocí MALDI-MS. Úspěšně byla provedena také derivatizace peptidů a následné *de novo* sekvenování pomocí MALDI-TOF/TOF. Vhodnost použití exopeptidáz pro nalezení fosforylované aminokyseliny v sekvenci se nepotvrdilo, jak je v textu dobře dokumentováno.

### Připomínky oponenta

Vysokou úroveň předložených výsledků poněkud snižuje formální stránka diplomové práce. Text je psán bohužel v některých případech dost nesrozumitelně, což se projevuje velmi často například chybějícími slovesy ve větách nebo přehozeným slovosledem a vyžaduje od čtenáře velkou míru tolerance. V teoretické části se často vyskytují informace vytržené z kontextu,

nesouvisející s předchozím textem a podané velmi nepřesně nebo zmateně. Z mnoha dalších formálních nepřesností uvádím například:

- Str. 16: „O-glykosylace probíhá na amidové vazbě Asn...“, následuje citace, která není uvedena v přehledu literatury,
- Str. 19: špatný vzorec 3-fosfohistidinu,
- Str. 27 nahore: místo „oxidy“ kovů by v celém odstavci měly být uvedeny „ionty“, oxidům je věnována další kapitola,
- Str. 32, popisek obrázku: HILIC je popsán jako hydrofilní interakční chromatografie, správně má být hydrofobní,
- Str. 41: v textu je odkaz na nesouvisející obrázek č. 7,
- Str. 44: „...v gliových buňkách např. v oligodendrocytech jako jsou oligodendrocyty...“

a mnoho dalších.

Při zavádění zkratk by autorka měla volit pečlivější přístup. Velmi časté jsou zkratky, které nejsou vysvětleny ani v textu ani v přehledu zkratk (např. PTEN, PHF a další), některé zkratky jsou naopak zavedeny zbytečně (např. na str. 54, jsou použity v celé práci pouze jednou), výjimkou není také vysvětlení zkratky zkratkou (str. 53, A $\beta$ 1-42). U zkratk vycházejících z anglických pojmů by měly být tyto také uvedeny. Při uvádění komerčních názvů by měl být vždy uveden výrobce (např. ProQ-Diamond a GelCode na str. 25, nebo názvy konkrétních hmotnostních spektrometrů na str. 37).

V experimentální části je text psán strukturovaně ve formě protokolů, nicméně i zde nalézám spoustu nepřesností. Návod k jednotlivým metodikám jsou často psány zmateně, např. na str. 62-63 (dvakrát za sebou zmíněno přidání trypsinu, pokaždé v jiném množství), nebo na str. 69 (celý postup je velmi nesrozumitelný, některé kroky se zdají být přehozené a v kombinaci s nedefinovanými zkratkami MO a MU je takto popsán postup jen velmi těžko zopakovatelný). Na některých místech se autorka odkazuje na neexistující kapitoly, např. na str. 66 (protokol 5.2.4). Chybí zde informace o analyzovaných vzorcích, není jasné, zda se jedná o standardní proteiny, jejich směsi či tkáňové izoláty, první zmínka je teprve v části věnované výsledkům. Dále chybí kapitola věnovaná alespoň základním parametrům nastavení použitých hmotnostních spektrometrů.

Ve výsledkové části na str. 73 mi chybí informace, jaké vzorky byly vlastně nanášeny na gel, jednalo se o směs  $\alpha$  a  $\beta$ -kaseinu, nebo byl nanášen každý zvlášť, zdůvodnění, proč je na gel nanášen i BSA, na obrázku gelu by měly být označeny proužky, které byly vyřezány a se kterými bylo dále pracováno. Na str. 77 je uvedena tabulka několika použitých matic, nicméně v experimentální části byla popsána pouze DHB. Na str. 82 autorka doslovně píše: „Odkazují se na článek, kde demonstrují...“ ale citace zde chybí. Na str. 91 je odstavec, kterému nejspíše chybí nadpis. Na str. 98 chybí citace k použité programové aplikaci. Syntetický peptid použitý pro *de novo* sekvenování za účasti exopeptidáz autorka někdy v textu označuje za fosfopeptid. Byl opravdu fosforylovaný nebo obsahuje pouze potenciální místa fosforylace?

Samostatnou kapitolou je pak práce s obrázky. Popisky u obrázků spekter jsou někdy nedostačující (např. na str. 88, obr. 37 – chybí popis, co představují jednotlivá spektra A, B,



C; na str. 99, obr. 48. – není komentován v textu a jeho popis je sám o sobě nejasný; str. 107: obr. 54 má stejný popis jako obr. 53.). Obecně u předložených obrázků hmotnostních spekter není možné porovnat intenzitu píků mezi jednotlivými spektry, protože intenzita je zde znázorněna jako relativní hodnota a vždy nejvyšší pík má intenzitu 100 %. Tam, kde je porovnávána kvalita jednotlivých spekter, by měla být vždy uvedena hodnota normalizované intenzity nebo nějaký ekvivalentní údaj odpovídající intenzitě signálu. Toto je uvedeno pouze asi na dvou předložených spektrech v celé práci.

### **Otázky do diskuze**

1. Pro obohacení fosfopeptidů pomocí metody IMAC a TiO<sub>2</sub> autorka používá vsádkové uspořádání. Jaká jiná uspořádání je možné použít?
2. Jakým způsobem byla hodnocena kvalita získaných hmotnostních spekter?

### **Závěrečné hodnocení**

Autorka úspěšně optimalizovala metodu izolace a obohacení fosfopeptidů a jejich následnou analýzu pomocí MALDI-MS. Cíle práce byly splněny, pozitivní i negativní výsledky byly dobře okomentovány. Experimentální úroveň práce je vysoká, rozsah provedených experimentů a předložených výsledků je velký a proto ji **navrhuji přijmout k obhajobě**. Nicméně horší formální úroveň snižuje její kvalitu. Z tohoto důvodu ji hodnotím klasifikačním stupněm **velmi dobře**.

V Hradci Králové  
23. 5. 2014



PharmDr. Jana Klimentová, PhD.