



Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Využití kapilární elektroforézy pro analýzu proteinových fosforylací**

Autor práce: **Bc. Aneta Kyralová**

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

Konzultant práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

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

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou fosforylací modelového fosfoproteinu α -kaseinu technikou kapilární zónové elektroforézy s UV-detekcí. Příprava vzorku zahrnuje proteolytické štěpení, obohacení o fosfopeptidy a defosforylaci. Porovnání záznamu elektroforetické separace takto zpracovaného vzorku před a po defosforylaci by mělo sloužit k potvrzení přítomnosti fosforylace. Jednotlivé kroky byly paralelně analyzovány také hmotnostní spektrometrií. Nakonec byly zoptimalizované postupy přípravy vzorku aplikovány také na Tau protein.

Diplomová práce má klasické členění, zahrnuje krátký úvod, teoretickou část (23 stran), následuje jednostránková konkretizace cílů diplomové práce a experimentální část (16 stran), výsledky jsou diskutovány na 22 stránkách a závěry shrnuty na necelých 2 stránkách. Celkový rozsah práce je včetně příloh, seznamu ilustrací, tabulek a literatury 92 stran. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 72 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy. Za nedostatek v tomto směru považuji pouze zastoupení zbytečně velkého počtu knih a monografií (cca 1/3 všech citací). Po formální stránce práce splňuje požadavky na ni kladené a je napsána stylisticky dobře a čtivě.

Teoretická část je zpracována přehledně a věnuje se principu a instrumentaci kapilární elektroforézy (CE) a hmotnostní spektrometrie (MS), popisuje strukturu a vlastnosti proteinů včetně jejich posttranslačních modifikací se zaměřením na fosforylaci, stručně je popsán také Tau protein a nakonec jsou uvedeny možnosti využití CE a MS pro analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů. V experimentální části jsou podrobně popsány metodické postupy, které si studentka zvládla osvojit v rámci této diplomové práce. Zahrnují jednak metody přípravy magnetických nosičů pro proteolytické štěpení a defosforylaci vzorků a dále pak pracovní postupy v rámci analýzy připravených vzorků pomocí kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. 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 pár drobných připomínek:

- všechny obrázky uvedené v rámci teoretické části jsou v angličtině, doporučovala bych jejich přeložení do češtiny,

- v teoretické části je uvedeno několik nesprávných tvrzení: 1) na str. 26 je C-trap, která je součástí LTQ Orbitrap hmotnostního spektrometru, označena jako kvadrupól, 2) na str. 31 je nesprávně uvedeno, že "Tau protein patří do rodiny mapkináz (MAPs)", zkratka MAPs přitom vyjadřuje s mikrotubuly asociované proteiny, a 3) na str. 31 je dále uvedeno, že "A β peptidové fragmenty vznikají proteolýzou integrálního membránového proteinu známého jako β -amyloid", jako β -amyloid se ovšem označuje produkt vznikající proteolýzou amyloidového prekurzorového proteinu.

Doplňující otázky pro studentku jsou následující:

- 1) U hmotnostních spekter štěpeného Tau proteinu (Obr. 4.11 a 4.12) je uvedena jako součást matrice složka DAHC, která ale není uvedena v případě spekter α -kaseinu a není uvedena ani v experimentální části či ve zkratkách, o jakou sloučeninu se jedná a proč zde byla použita?
- 2) V tabulkách v příloze se objevuje zkratka MC, která je v seznamu zkratek vysvětlena výrazem "missed cleavage", existuje český ekvivalent tohoto výrazu? Jak by jste výraz jednoduše vysvětlila?
- 3) V případě separace rekombinantního Tau proteinu pomocí kapilární elektroforézy byly testovány dva různé pufrы, 20 mM fosfátový pufr o pH 2,5 a 20 mM fosfátový pufr o pH 2,5 s přidavkem 0,05% HPMC a 6M močoviny, který se osvědčil, při separaci vzorků α -kaseinu. V práci je uvedeno, že po vyhodnocení záznamů byl pro další postupy vybrán 20 mM fosfátový pufr o pH 2,5. Oba záznamy pro srovnání nejsou v práci uvedeny, v čem se lišily a jak si případně tento rozdíl vysvětlujete?

Závěrem lze konstatovat, že navzdory připomínce, práce dosahuje dostatečné kvality a splňuje předpoklady potřebné pro **doporučení k obhajobě**. Práci doporučuji ohodnotit známkou **v ý b o r n ě**.

V Pardubicích dne 23.5.2014


Mgr. Barbra Jankovičová, Ph.D.