



Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Analýza posttranslačních modifikací ovalbuminu**

Autor práce: **Bc. Eva Coufalová**

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

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

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

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou fosforylace proteinu ovalbuminu 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 optimalizovány a paralelně analyzovány hmotnostní spektrometrií.

Diplomová práce má přiměřený rozsah (81 stran) a klasické členění, zahrnuje krátký úvod, teoretickou část (22 stran), následuje konkretizace cílů diplomové práce a experimentální část (17 stran), výsledky jsou shrnuty na 22 stránkách a závěry pak na necelých dvou. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 63 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy.

Teoretická část je zpracována přehledně a věnuje se struktuře a vlastnostem proteinů včetně jejich posttranslačních modifikací se zaměřením na fosforylaci, principu a instrumentaci kapilární elektroforézy (CE) a hmotnostní spektrometrie (MS), a stručně je popsán také studovaný protein ovalbumin včetně zmínky o možnostech využití CE a MS pro jeho analýzu. V experimentální části jsou podrobně popsány metodické postupy, které si studentka v rámci této diplomové práce zvládla osvojit. Zahrnují jednak metody přípravy magnetických nosičů pro proteolytické štěpení a defosforylaci, dále pak pracovní postupy přípravy jednotlivých vzorků ovalbuminu (štěpení defosforylaci a obohacování) a postupy analýzy připravených vzorků pomocí kapilární zónové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. V kapitole výsledky a diskuse jsou především interpretovány získané výsledky, které jsou doloženy formou tabulek, grafů a obrázků (MS spekter a elektroforegramů), za nedostatečnou ovšem považují diskusi, která by zde mohla být obsáhlejší.

Práce je sepsána pečlivě a srozumitelně s minimem stylistických neobratností (např. str. 75 "neoptimálnější") a překlepů (např. str. 49 "před každým měření", str. 47 Tabulka 3 je nazvána "Kalibrační řada trypsinu", přitom se jedná o kalibrační řadu ALP). Po formální stránce práce splňuje požadavky na ni kladené a na velmi dobré úrovni je také grafická úroveň textu.

Na autorku mám následující dotazy:

- 1) Ve výsledkové části na str. 55 je uvedeno, že ze získané rovnice regrese (vycházející z kalibrační závislosti proteolytické aktivity trypsinu stanovené pomocí substrátu BAPNA) bylo vypočítáno množství trypsinu imobilizovaného na magnetických nosičích. Ve skutečnosti se však zřejmě jedná pouze o podíl navázaného enzymu vykazující enzymovou aktivitu. Stanovovali jste i celkové navázané množství enzymu popř. máte přibližnou představu o poměru aktivní a neaktivní složky enzymu po imobilizaci?
- 2) Neúspěšná detekce obohacených defosforylovaných peptidů pomocí CZE je na str. 74 přisuzována pravděpodobným ztrátám peptidů při defosforylaci, čím si tyto ztráty vysvětľujete a bylo by případně možné jim nějakým způsobem předejít?
- 3) Na str. 74 je dále uvedeno, že koncentrace peptidů ve vzorku vlivem ztrát zřejmě klesla pod limit detekce CZE. Jaké bylo množství vzorku (proteinů, peptidů) dávkovaného při CZE (tento údaj není uveden v experimentální části a u jednotlivých elektroforegramů je uvedena pouze koncentrace vzorku)?

Závěrem lze konstatovat, že práce neobsahuje zásadní chyby či nedostatky, bylo dosaženo stanovených cílů, práci hodnotím jako zdařilou, **doporučuji ji k obhajobě** a hodnotím známkou **výborně**.

V Pardubicích dne 25.5.2015


.....
Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.