



Ing. Jitka Vítková, DiS.
KBBV
Univerzita Pardubice
Studentská 573
532 10 Pardubice

v Hradci Králové, 24. května 2019

Oponentský posudek diplomové práce

Autor práce: Bc. Zuzana Dvořáková, Fakulta Chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Název práce: Chromatografická izolace a frakcionace fosfopeptidů na stacionární fázi s oxidem titaničitým

Oponent: doc. PharmDr. Aleš TICHÝ, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce studentky programu „Speciální chemicko-biologické obory – Bioanalytik“ **Bc. Zuzany Dvořákové** se zabývá optimalizací mikrogradientové metody separace fosfopeptidů na stacionární fázi s oxidem titaničitým za účelem zefektivnění fosfoproteomické analýzy hmotovou spektrometrií.

Práce má celkem 103 stran a tvoří ji teoretický úvod, cíle, experimentální část, výsledky a diskuze, závěr a seznam použité literatury. Práce obsahuje 39 obrázků a 3 tabulky.

Teoretická část je zpracována na 32 stranách a zachycuje danou problematiku velmi široce a přitom podrobně. Autorka se zabývá nejprve proteomikou a post-translačními modifikacemi s logickým za měřením pozornosti na fosforylace. Velmi detailně popisuje separační metody a princip hmotové spektrometrie. Celkově je tato část zpracována přehledně a srozumitelně a jistě by si zasloužila samostatné zpracování např. jako souborný přehledový článek typu „review“ do recenzovaného časopisu.

V kapitole Experimentální část podává autorka opět velmi detailní popis použitého materiálu a metodik včetně přístrojového vybavení a chemikálií, a to způsobem, který umožňuje plnou reprodukovatelnost provedených pokusů. Výsledky jsou popsány na 16-ti



stranách a jsou zároveň diskutovány, což není u fosfoproteomických optimalizačních studií podobného typu neobvyklé.

Autorka se nejprve věnovala optimalizaci pH a délky kolonky při mikrogradientové separaci za použití směsi peptidů α -kaseinu. Nejvhodnější eluční schéma pak použila při dalších optimalizacích separace. Byla prokázána lepší separace fosfopeptidů na delší kolonce, proto pro další experimenty byly použity kolonky s délkou 40 - 53 mm. Poté se věnovala možnostem opakovaného (až šesti-násobného) použití kolonky a optimalizaci objemu elučních roztoků použitých při tvorbě gradientu, k čemuž používala směs peptidů z fosvitinu.

Získané poznatky pak aplikovala ve druhé části experimentů prováděných na komplexním vzorku buněčného lyzátů linie Jurkat. Zde se autorka kromě porovnání různých frakcí a gradientů věnovala srovnání účinnosti tzv. vsádkového a mikrogradientního uspořádání a výsledky práce prokázaly, že optimalizovaný přístup využívající kolonky s nosičem poskytoval ve smyslu celkového počtu detekovaných fosfopeptidů signifikantně lepší výsledky. Tyto poznatky pak studentka jasně formulovala v závěru.

ZÁVĚR:

Práce je koncizní, je sepsána dobrou češtinou a obsahuje minimum překlepů. Cíle práce byly vytyčeny realisticky, jasně definovány a byly také odpovídajícím způsobem naplněny.

V rámci experimentů byly použity moderní metodiky v souladu se současnými světovými trendy. Práce byla provedena vědecky odpovídajícím způsobem a přinesla nové poznatky týkající se izolace fosfopeptidů z komplexní směsi a má dle mého názoru potenciál být publikována v časopise s „impakt faktorem“.

Na základě výše uvedeného konstatuji, že předložená práce vyhovuje všem předpisům stanoveným pro diplomovou práci a navrhuji její přijetí k obhajobě. Vzhledem ke kvalitě, rozsahu a zpracování předkládané práce ji hodnotím známkou „**A - výborně**“.

DOTAZY OPONENTA:

1. Na základě čeho jste stanovila množství TiO_2 v kolonce použité ve Vašich experimentech?
2. Lze podle Vás ještě nějak dále vylepšit problém tzv. nespecifické sorpce?



3. Dala by se Vámi optimalizovaná metoda použít pro analýzu vícenásobně-fosforylovaných peptidů nebo byste navrhovala jiný metodologický přístup?

doc. PharmDr. Aleš TICHÝ, Ph.D.

Katedra Radiobiologie
Fakulta Vojenského Zdravotnictví
Univerzita Obrany
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
tel.: +420 973 253 216
e-mail: tichy@pmfhk.cz