

## Oponentský posudek diplomové práce

**Název:** Elektrochemické stanovení kinetických parametrů solubilní a imobilizované proteinkinázy A

**Autor:** Bc. Kristina Malíková

**Vedoucí:** doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Cílem předložené diplomové práce Bc. Malíkové byla optimalizace elektrochemické detekce pro stanovení fosforylace proteinů s využitím zlatých nanočástic, poté stanovit aktivitu proteinkinázy A v solubilní a imobilizované formě a stanovit její kinetické parametry.

Tak jak cíle uvádí autorka představují pouze zkopírované zadání práce. Jedná se vlastně o jakousi osnovu práce, přehled dílčích kroků, které by měly vést k dosažení cíle. Cíle by podle mne měly být definovány jasně a stručně.

V teoretické části se studentka zaměřila na proteinkinázu A a její funkci, popsala metody imobilizace enzymů včetně konkrétních příkladů a metody stanovení aktivity proteinkinázy a fosforylace proteinů. Vzhledem k zaměření práce je teoretická část uspořádána a členěna logicky a zahrnuje odpovídající kapitoly. Na druhou stranu jsou jednotlivé kapitoly psány velice stručně až zkratkovitě, což vede k horšímu porozumění obsahu. Srozumitelnost zhoršuje rovněž používání zkratk bez jejich předchozího zavedení a chybějící vysvětlení některých základních pojmů, např. co je aktivita enzymu a jakým způsobem se vyjadřuje. V textu je dále pro ilustraci vložena řada obrázků, které by dobře dokreslovaly jednotlivé techniky imobilizace nebo detekce, kdyby byly blíže popsány a vysvětleny. Takto je na čtenáři, aby se v nich orientoval sám. Např. v Obrázku 6 předpokládám, že fialové čtverečky jsou enzymy a došlo tedy k jejich imobilizaci. První odstavec kapitoly 2.4.5. je těžko srozumitelný pro člověka mimo obor.

Experimentální část adekvátně shrnuje použité chemikálie, instrumentální vybavení i pracovní postupy, i když i v této kapitole jsou některé nejasné nebo nepřesné informace. Např. tištěné senzory DropSens Metrohm DRP-C110 s uhlíkovou pracovní elektrodou se dodávají se stříbrnou referenční elektrodou a nikoli argentchloridovou. Plocha pracovní elektrody by pak měla být 12,56 mm<sup>2</sup>, protože výrobce uvádí průměr 4 mm, a nikoli 11 mm<sup>2</sup>. Totéž platí o senzoru DropSens Metrohm DRP-110STR s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (Ag RE a 12,56 mm<sup>2</sup>). Dále autorka píše o pomocné diamantové elektrodě. V tomto případě pozor na pojmy. Opět je třeba uvádět borem dopovanou diamantovou elektrodu, protože diamant jako takový je izolant. Proto nemůže být elektrodou.

Kapitola „Výsledky a diskuse“ představuje velice stručný přehled provedených experimentů a dosažených výsledků, často bez jakékoli diskuse nebo zasazení experimentů do kontextu. Počáteční kapitoly týkající se elektrochemické detekce a její optimalizace nejsou stručným popisem příliš negativně poznamenány, protože se jedná o jednoduché experimenty s jasným cílem získat nejlepší možný detekční nástroj. Přesto i tady se vyskytuje spousta nejasností. U následujících částí zaměřených na stanovení aktivity a kinetických parametrů je ale situace jiná. Díky strohosti textu, absenci popisu provedených experimentů a jejich účelu, a bez diskuse

získaných výsledků se pro čtenáře vytrácí smysl práce a jen těžko lze porozumět některým výsledkům.

Konkrétní připomínky k teoretické části:

- Graf 1: Legenda v grafu (PBS pro první křivku) neodpovídá experimentální části, kde autorka píše, že první křivka byla 0,1 HCl (str.43, kapitola 3.4.2 Elektrochemická detekce zlatých nanočástic). PBS není definováno, předpokládám, že jde o fosfátový pufr? U prvních měření SWV (Graf 1-3) by bylo vhodné specifikovat podmínky měření převzaté z předchozí práce, které byly podle následujícího textu v rámci optimalizace měněny.
- Na straně 51 na konci autorka uvádí, že proudová odezva byla odečítána při potenciálu odpovídajícímu maximu píku (+0,35 V). V odpovídající tabulce 4 jsou ale u všech měření hodnoty potenciálu 0,25 V.
- Při voltametrických měřeních je vhodné vždy uvádět odezvu základního elektrolytu, aby bylo evidentní, co se na křivce změnilo po přidavku analytu a zda sledované píky nebyly již v elektrolytu, resp. jestli odpovídají analytu.
- Str. 56 – je uvedeno, že bylo měřeno s pomocí SWV s optimalizovanými podmínkami s využitím SP-BDDE i DRP-C110. Optimalizace ale proběhla pouze pro SP-BDDE. Byly tedy pro DRP-C110 použity podmínky optimalizované pro SP-BDDE nebo z předchozí práce. V předchozím textu se uvádí, že pro tento senzor byl optimalizován expoziční čas, ale experiment ani výsledek není nikde uveden. Není tedy jasné, jaké parametry byly použity.
- S tím souvisí z mého pohledu nedostatečné popisky u obrázků. Podle mne nestačí jen název obrázku, ale měly by být uvedeny i podmínky provedených měření, aby byl obrázek samonosný a poskytl všechny potřebné informace bez nutnosti listování textem.
- Graf 17 – doporučovala bych nastavení osy y od 0 a nikoli od 54 % (proč zrovna tato hodnota?). Pak by bylo evidentní, že rozdíl u všech 4 reakčních směsí je minimální.
- Ve výsledkové části se hojně opakují informace uvedené v experimentální části, které opravdu patří do experimentální části, např. charakteristika a dodavatel magnetických částic, specifikace použitého hmotnostního spektrometru apod.
- Kapitola 4.4.1. Kalibrace solubilní proteinkinázy A elektrochemickou detekcí – Podle mne nevhodný název, nebyla kalibrována proteinkináza, ale její detekce.
- Graf 18 – tato závislost by vůbec neměla být proložena přímkou.
- Str. 67, 1. odstavec – Moc stručně popsáno pouze s odkazy na kapitoly v experimentální části. Vyžaduje neustálé listování mezi experimentální a výsledkovou částí. Ve výsledkové by bylo vhodné vedle odkazu uvést i stručnou informaci o postupu, aby se čtenáři připomnělo a nemusel hledat který z postupů v experimentální části se skrývá pod jakým číslem kapitoly.

Z hlediska formální stránky předložené práce je zřejmé, že tato by mohla být zpracována pečlivěji, bez velkého množství gramatických a stylistických chyb. Větší pozornost mohla být věnována i formátování textu, kdy v některých místech jsou např. různě velké mezery. Tabulky jsou přehledné a obrázky graficky dobře zpracované, jen popisky by mohly být podrobnější.

### Formální připomínky:

- Seznam zkratk není rozhodně kompletní, chybí v něm řada zkratk používaných v textu i všechny symboly fyzikálních veličin ( $K_M$ ,  $v_{max}$ ,  $S$ ,  $I$  apod.). Současně řada zkratk není zavedena/vysvětlena ani v textu při jejich prvním použití (např. AMP, AuNPs, CM5, ITO, MOPS, DTT, EDTA, MES). Ani v obrázcích by neměly být zkratky bez vysvětlení.
- Řada obrázků v teoretické části předchází odkazu na něj v textu. Správně by měl být nejprve odkaz na obrázek a teprve poté vlastní obrázek.
- V textu se vyskytuje řada vyjádření, která nejsou gramaticky správně (špatné tvary slov, opakující se slova, čárky ve větách, neúplné věty, chyby i v nadpisech kapitol).
- Veličiny se píšou kurzívou, pro stejné veličiny autorka někdy používá velké a někdy malé písmeno (mělo by být jednotně), indexy nejsou vždy v indexu.
- Obrázek 15 – je třeba si vždy při popisu grafu uvědomit, že se vynáší na osu  $x$  nezávisle proměnná a na osu  $y$  závisle proměnná. Správně je tedy závislost velikosti proudové odezvy Au nanočástic na době kinázové reakce a nikoli naopak. V druhé části má být závislost proudové odezvy na době inkubace s Au nanočásticemi.
- Rovnice na str. 36 – rovnice se nevkládají jako obrázek, ale přes editor rovnic, neoznačují se jako obrázek, ale jako rovnice a číslovají se (v textu odkaz s číslem stejně jako u obrázků).
- Když autorka v textu uvede, že byly použity podmínky z předchozí práce (str. 49), musí následovat odkaz na tuto práci (nestačí, že už byla zmíněna např. v teoretické části).
- U kladných hodnot potenciálů autorka někdy uvádí znaménko  $+$  a někdy ne. Mělo by být jednotně.

### Dotazy a podněty k diskusi:

1. V teoretické části byly použity pojmy „imobilizovaná proteinová fúze“ resp. „fúzní protein“, „nanoimpaktní elektrochemie“ resp. „nanoimpaktní elektrochemické experimenty“. Můžete ho vysvětlit?
2. Na str. 29 je uvedena věta: „Pro elektrochemickou detekci byla využita chloridová redoxní chemie metodou square-wave voltametrie (SWV).“, která nedává příliš smysl. K měření/analýze byla použita square wave voltametrie. Měření čeho? Co je míněno chloridovou redoxní chemií? Popište, jaké redoxní reakce probíhají a jakému ději odpovídá sledovaný proudový signál u popisované metody.
3. Obrázek 17: Graf linearizace podle Lineweaver-Burka. – Obrázek by si zasloužil vysvětlení v textu. Proč jsou dvě křivky (bílé a černé body)? Čemu odpovídají?
4. V kapitole 3.4.1. Podmínky elektrochemické detekce uvádí autorka podmínky přečištění různé pro CV a SWV? V případě CV je to  $-1,5$  V a v případě SWV  $1,5$  V? Můžete vysvětlit volbu hodnot potenciálu  $E_{kond}$ ?
5. Graf 4: Čemu odpovídá proudová odezva kolem  $0,65$  V?

6. Graf 10 - Proč byly pro SP-BDDE testovány pouze nanočástice o velikostech 5 a 20 nm, když v případě DRP-C110 šlo o 5 různých velikostí v rozsahu 5-50 nm? S těmito experimenty souvisí i dotaz, čím je dán pokles proudové odezvy pro totožné nanočástice mezi obrázky 9 (5 nm ~ -6,65  $\mu$ A, 20 nm ~ -10,64  $\mu$ A) a 11 (5 nm ~ -4,73  $\mu$ A, 20 nm ~ -6,26  $\mu$ A)? Změnily se nějaké parametry měření? A totéž pro SP-BDDE, kde podle mne je uveden dvakrát stejný experiment (v textu není uvedena žádná změna) v Grafech 10 a 12, ale výšky píků pro nanočástice se stejným rozměrem (5 a 20 nm) se změnilly. Můžete to vysvětlit?
7. Kapitola 4.4.1. Kalibrace solubilní proteinkinázy A elektrochemickou detekcí – Text této kapitoly je naprosto nedostatečný a nejasný. Píšete: „Kalibrační závislost proudové odezvy PKA...“ PKA poskytuje proudovou odezvu? O proudovou odezvu čeho se ve skutečnosti jedná? Měly by být popsány alespoň stručně podmínky/postup přípravy vzorku a analýzy, účel experimentu. K čemu měla sloužit kalibrační křivka? Proč byla měřena? Podle postupu 3.3.1. šlo o měření proudové odezvy AuNPs po provedené fosforylaci, při které se měnila koncentrace PKA? Mělo by to být tak, že s rostoucí koncentrací PKA roste množství fosforylovaného substrátu, a tudíž se zachytí více AuNPs a je vyšší odezva? Jediný Váš závěr je, že nebyly získány výsledky, ze kterých by mohla být sestrojena kalibrační křivka. Co to znamená pro Vaši práci? Měla byste závěr diskutovat. Navíc cílem bylo porovnání aktivity solubilizované a imobilizované proteinkinázy. Co Váš výsledek znamená pro toto srovnání? O aktivitě imobilizované proteinkinázy se v textu vůbec nezmiňujete.
8. Graf 19 a 20 – Z odpovídajícího textu není vůbec jasné, jak byly získány hodnoty rychlosti, jejichž převrácená hodnota je uvedena na osách y v grafech. Současně zcela chybí diskuse k výsledku, že se nepodařilo elektrochemicky stanovit kinetické parametry. Jaké mohou být příčiny a případně jaké další možnosti uspořádání, resp. změn parametrů lze otestovat?

Závěrem konstatuji, že Bc. Kristina Malíková provedla experimenty, které byly dle zadání nutné ke splnění cílů diplomové práce. A to, že výsledky těchto experimentů k jejich splnění nevedly, nemusí být nutně důvod k neobhájení práce, protože jde o výzkumnou práci, kde není vždy zaručen pozitivní výsledek. Současně si ale myslím, že v rámci času vyhrazeného na vypracování experimentální části diplomové práce v laboratoři mohla studentka zvládnout větší penzum experimentů a pokusit se některé ze vzniklých problémů vyřešit právě změnou v uspořádání nebo podmínkách, např. otestováním SP-BDDE i při stanovení aktivity proteinkinázy. Současně mohla studentka přistoupit zodpovědněji i ke zpracování vlastního textu práce. Je zřejmé, že k obsahu práce a kvalitě zpracování dat a textu mám zásadní výhrady, nicméně ji **doporučuji** k obhajobě a hodnotím známkou

--- E ---

V Pardubicích 23. 5. 2024

.....

doc. Ing. Renáta Šelešovská, Ph.D.