

Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Kateřina Lorinčíková (Přírodovědecká fakulta UK, Praha):

Stanovení a porovnání elektromigračních vlastností markerů pro izoelektrickou fokusaci

Oponent: RNDr. Václav Kašička, CSc., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha

Námětem předkládané diplomové práce bylo studium elektromigračních a acidobazických vlastností důležitých látek, dvou komerčně dostupných sad markerů používaných jako standardy izoelektrických bodů (pI) při separaci a analýze a určování pI bílkovin, polypeptidů a jiných amfoterních látek metodou izoelektrické fokusace v kapilárním či plošném gelovém formátu. Studované markery zahrnovaly 14 pI standardů na bázi derivátů nitrofenolu připravených ve skupině Dr. Šlaise v Ústavu analytické chemie AVČR v Brně a pět oligopeptidových pI markerů připravených ve skupině Prof. K. Shimury na Fukushima Medical University ve Fukušimě.

Téma diplomové práce je aktuální a vědecky i prakticky významné, neboť stanovení přesných hodnot izoelektrických bodů bílkovin je důležitou součástí charakterizace bílkovin, zejména monoklonálních protilátek, které jsou stále častěji používány jako cílená biologická léčiva při léčbě řady závažných onemocnění.

Autorka si stanovila tři stručně formulované dílčí cíle:

1. Proměřit závislost elektroforetické pohyblivosti na pH pro 14 pI markerů vytvořených skupinou Šlaise a stanovit jejich pI
2. Proměřit závislost elektroforetické pohyblivosti na pH pro pět komerčně prodávaných pI markerů vytvořených Shimurou a stanovit jejich pI
3. Porovnat naměřené hodnoty pI s komerčně udávanými hodnotami a ověřit jejich správnost

Rád konstatuji, že všechny tyto tři cíle byly úspěšně splněny, dokonce i částečně překročeny neboť nebyly stanoveny pouze izoelektrické body, ale i další významné charakteristiky pI markerů, jakými jsou jejich kyselé disociační konstanty, limitní iontové pohyblivosti a gradient změny náboje v závislosti na pH, tzv. parametr $-dz/dpH$. Výsledky diplomové práce představují významný příspěvek k přesnější charakterizaci významných látek, pI markerů prakticky používaných při určování izoelektrických bodů bílkovin a jiných amfoterních látek metodou kapilární či plošné gelové izoelektrické fokusace. Tyto parametry umožňují kvantitativně i kvalitativně porovnávat vlastnosti jednotlivých markerů. Pro další praxi elektromigračních metod je cenné, že byly zpřesněny hodnoty pI standardů izoelektrických bodů, které umožní v budoucích experimentech přesnější měření izoelektrických bodů i u nově připravených látek. Pro charakterizaci pI markerů byla vhodně zvolena jiná elektromigrační metoda, kapilární zónová elektroforéza, která opět prokázala, že kapilární elektromigrační metody, kromě využití pro analytické účely, představují mocné nástroje i pro fyzikálně chemickou charakterizaci širokého spektra látek a pro studium dějů probíhajících v roztocích, např. acidobazických a komplexotvorných reakcí. Práce vhodně navazuje na předchozí výsledky pracoviště autorky, na kterém je teorie elektromigračních procesů dlouhodobě studována a jež v této oblasti patří k absolutní světové špičce.

Po formální stránce je diplomová práce sepsána přehledně a v pěkné grafické úpravě. Vyskytuje se zde však řada typografických i gramatických chyb a nevhodných formulací či výrazů. Jedná se např. nevhodně zavedené a autorkou často používané anglikanismy „kouting“ a „koutování kapiláry“ místo českých v práci také používaných výrazů „povlak“ či „pokrytí/pokryvání kapiláry“, nebo o nevhodné formulace jako např. „silné kyseliny a zásady bez protiiontů narušují pokrytí kapiláry“, „elektroforetické pohyblivosti v elektrickém poli“, „prohození zón“ místo „změna pořadí zón“, chybějící mezery mezi hodnotami veličin a jejich jednotkami“, tabulka 4 neobsahuje limitní pohyblivosti, jak je uvedeno v její hlavičce.

Připomínky, dotazy a náměty do diskuse:

1. Několik nepřesností je obsaženo v seznamu symbolů i dále v textu, např. pH je chybně definováno jako „záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů“ (místo „aktivity vodíkových kationtů“). Naproti tomu, pK_a , která je také vyjádřena pomocí záporného dekadického logaritmu, je prostě nazvána „disociační konstanta“ bez bližší specifikace, že se jedná o kyselou disociační konstantu, oficiálně (dle IUPAC) zvanou „acidity constant“ (konstanta acidity) a někdy též nazývanou ionizační konstanta.
2. Na str. 11 autorka ne zcela správně uvádí, že „silanolové skupiny budou uvolňovat vodíkové kationty v zásaditém prostředí“, což sama napравuje na následující stránce, kde prohlašuje, že tyto skupiny „disociují v oblasti pH 3 až 8“. Příliš silné je rovněž tvrzení na str. 12, že v případě elektroosmotického toku „nejde o stabilní a opakovatelný jev“.
3. Nesprávné je tvrzení na str. 13, že iontová síla je dána sumou koncentrací nabitých částic v roztoku. Prosím o opravu v průběhu obhajoby.
4. Na str. 14, je symbol z_i nejednoznačně nazýván jednou jako náboj a podruhé jako nábojové číslo. Prosím o opravu v průběhu obhajoby.
5. V odkazech na publikace s více autory by měl být uváděn nejen první autor, ale první autor a kol. nebo první autor et al. Týká se to mj. odkazů na první dvě citované publikace, ze kterých by vyplývalo, že program AnglerFish vyvinul pouze Michal Malý a pI markery vyvinul pouze Šlais. Zvláště je uvedena též citace 4, „Karel Štulík a Univerzita Karlova“. Neúplné jsou citace 14, 16, 25, 26, 27 a 40, v odlišném stylu jsou citace 7, 28, 32, a 36.
6. Řada citací je velmi zastaralých, z devadesátých let minulého století. Např. pro konstatování, že CE nachází uplatnění při analýze léčiv a peptidů jsou uváděny citace z r. 1996 a 1999, ačkoli na tato témata jsou k dispozici přehledné články z r. 2018 a 2020.
7. Práce je založena na měření závislosti efektivních pohyblivostí na pH, překvapivě v ní však chybí vztahy pro výpočet pohyblivostí z experimentálních CE dat a pro závislost efektivní pohyblivosti na pH, jejímiž parametry jsou konstanty acidity a iontové pohyblivosti. Prosím o doplnění v průběhu obhajoby.
8. Podle jakého kritéria bylo rozhodováno, zda byly použity výsledky ze tří, čtyř či pěti měření.
9. Na str. 15, subkapitola 2.4.2., odst. 2, autorka uvádí, že izoelektrickou fokusaci lze použít pro určování nukleotidů v genové sekvenci. Prosím o bližší vysvětlení.
10. Na str. 35 je zmiňováno použití kapiláry pokryté fluorokarbonem. O jaký povlak se jedná? V kapitole 4.1 Využití chemikálie a přístroje jeho původ ani popis nejsou uvedeny. Prosím o doplnění v průběhu obhajoby.
11. Kromě v práci uváděných izoelektrických a izomobilitních bodů je další charakteristikou amfolytů také jejich izoionický bod. Jak je definován a jak je určován.

Závěr:

Autorka prokázala teoretické znalosti zkoumané problematiky a schopnost jejich praktického využití. Diplomová práce přináší nové cenné poznatky o možnosti využití kapilární zónové elektroforézy k charakterizaci elektromigračních a acidobazických vlastností amfoterních (poly)elektrolytů, zejména bílkovin a peptidů. Změřené přesné hodnoty izoelektrických bodů standardů pI umožní přesnější určování těchto parametrů pro další amfoterní látky analyzované metodou izoelektrické fokusace v kapilárním i plošném gelovém formátu. Práci doporučuji k obhajobě. Navrhovaný klasifikační stupeň: výborně.

