



Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.  
Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie  
ALBERTOV 2030, 128 40 Praha 2, ČR  
tel. + fax +420224913538, pacakova@natur.cuni.cz  
V Praze dne 12.8.2009

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Lenky Novotné „Studium fosforylace lidských pepsinů“

Disertační práce Mgr. Lenky Novotné je zaměřena na vysoce důležitou oblast výzkumu, na studium fosforylace lidských pepsinů. Stupeň fosforylace souvisí s mnoha závažnými žaludečními onemocněními, jako je např. rakovina. Pro praktické využití tohoto poznatku k diagnostickým účelům bylo nutné vypracovat jednoduché a spolehlivé metody, použitelné i pro velmi malá množství vzorku.

Autorka se správně zaměřila na vysoce selektivní afinitní chromatografii k izolaci a separaci fosforylovaných forem pepsinu. Nejprve bylo třeba vypracovat metodu izolace a separace fosfopeptidů a fosfoproteinů. Zvolená metoda, afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC), umožňuje selektivní zachycení fosforylovaných forem peptidů a proteinů. Mgr. Novotná testovala různé sorbenty, které jsou stabilní za vysokých tlaků v HPLC, různé ligandy i různé kovové ionty pro dosažení optimálních výsledků. Jako modelové látky byly zvoleny kuřecí ovalbumin a prasečí pepsin A. Dále byly testovány různé adsorpční a desorpční pufrы a nalezeny optimální podmínky pro izolaci testovaných látek.

V dalším kroku byla vypracována IMAC metoda separace fosforylovaných a částečně defosforylovaných forem prasečího pepsinu A a aplikována na lidské pepsiny izolované ze žaludeční šťávy a žaludeční sliznice pomocí iontově výměnné chromatografie. Byl prokázán vyšší stupeň fosforylace pepsinu u vzorku od pacienta s rakovinou žaludku.

Významného výsledku bylo dosaženo v další části disertace. Podařilo se určit místo fosforylace v sekvenci aminokyselin, nejprve u prasečího pepsinu A i později i u lidského pepsinu A, což doposud nebylo publikováno. Vyvinuté metody byly spojeny s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF, intenzivní píky byly podrobeny analýze MALDI-TOF/TOF MS. Podařilo se identifikovat několik fosfopeptidů pocházejících z různých proteinů přítomných v lidské žaludeční šťávě a určit polohu fosforylace.

Cíle disertace byly splněny. Autorka vykonala pozoruhodné množství náročných experimentů s biologickými vzorky s využitím nejmodernějších analytických metod (HP-IMAC, MALDI-TOF-MS).

Na práci oceňuji systematický přístup autorky k řešení zadaných úkolů. Po metodické stránce je významné vypracování metody izolace a separace fosforylovaných pepsinů s využitím selektivní afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech. Velmi cenné, dosud nikde nepublikované, jsou poznatky o určení polohy fosforylace a identifikace fosfopeptidů z pepsinu A přítomného v žaludeční šťávě. Autorka tak dosáhla významných původních výsledků, které jsou přímo aplikovatelné v lékařské praxi.

Práce byly publikované v prestižních časopisech (Journal of Chromatography A, Journal of Separation Science, Chromatographia, Enzymes) (celkem 4 publikace, ve třech je první autorkou Mgr. Novotná, v jednom druhou), kde prošly recensním řízením. Významná je účast Mgr. Novotné na mezinárodních konferencích (celkem 10 krát, vyhrála 1. cenu v soutěži o nejlepší poster v roce 2007 na 13<sup>th</sup> International Symposium on Separation Science na Štrbském plesu).

Práce je velmi dobře sepsána. Obsahuje velmi pěkný úvod s rozsáhlou literární rešerší. Je logicky členěna, výsledky jsou správně interpretovány. Po formální stránce není práci co vytknout.

K autorce mám pouze dva dotazy:

- Je známo, že u afinitní chromatografie (a nejen u ní) se negativně projevuje nespecifická sorpce. Zajímalo by mne, zda tento jev také pozorovala u testovaných IMAC sorbentů a jaké jsou možnosti potlačení nespecifické sorpce.
- Z vlastní zkušenosti znám problémy spojené se získáním vzorku lidských pepsinů. Jaká je současná situace?

Závěr:

Výsledky disertace představují významný příspěvek k problematice fosforylace pepsinů i k vývoji nových vysoce selektivních přístupů k izolaci a charakterisaci biologicky významných látek obecně. Výsledky jsou přímo využitelné v praxi. Autorka prokázala velmi dobré teoretické znalosti zkoumané problematiky a schopnost tvůrčí vědecké práce. Doporučuji, aby disertační práce Mgr. Lenky Novotné byla přijata k obhajobě a aby se stala základem pro udělení vědecké honosti Ph.D.

