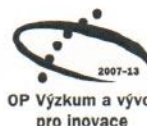




EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
**CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ  
A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM**  
ODDĚLENÍ BIOCHEMIE PROTEINŮ A PROTEOMIKY

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jitky Vítové s názvem

**Metody sekvenování peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie**

Diplomovou práci jsem měl k dispozici pro posouzení v elektronické podobě. Jde o text o celkovém rozsahu 137 stran vypracovaný na základě literární rešerše a experimentálních datových podkladů pod vedením školitele RNDr. Pavla Řehulky, Ph.D. z Ústavu molekulární patologie Univerzity Obrany v Hradci Králové. Práce je obhajována na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

Svoje návrhy oprav, připomínky a komentáře jsem učinil přímo v elektronickém textu s použitím revizního módu a předal autorce a školiteli. Po stránce formální je diplomová práce v pořádku. Zahrnuje prohlášení o samostatném vypracování, krátké anotace v jazyku českém i anglickém, úvod, teoretickou část, experimentální část s materiálem, metodikou, výsledky a diskusí. Konečně je k dispozici závěr se shrnutím výsledků a jejich významu, seznamy obrázků, tabulek a zkratk a také nezbytný přehled citované literatury, který čítá 117 položek a dodržuje citační normy. Myslím si však, že práce má příliš velký rozsah a naplňuje tak nechtíc úsloví o tom, že méně někdy bývá více.

Teoretická část dokládá vysokou úroveň autorčiny rešerše odborné literatury. Zmiňuje se proteomika jako vědní disciplína, její stručná historie a význam, který má pro identifikaci a kvantifikaci proteinů v biologickém materiálu či pro analýzu jejich struktury a funkce. Pokračují kapitoly o aminokyselinách, jejich vlastnostech a metabolických rolích, jde se dále k tvorbě peptidové vazby a peptidům či proteinům. Opět se zmiňují strukturní aspekty, rozdělení, funkce a posttranslační modifikace proteinů. Velká část teorie je věnována separačním technikám pro proteiny a peptidy (kapalinová chromatografie, elektroforéza), píše se o hmotnostní spektrometrii a zdůrazňuje se její napojení na separační techniky v instrumentaci analýzy proteinů a peptidů. Popsány jsou ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii, základní součásti hmotnostního spektrometru (s důrazem na typy hmotnostních analyzátorů). Konečně je shrnuto využití této metody pro identifikace proteinů cestou nepřímé či přímé analýzy aminokyselinové sekvence. Takto se autorka v závěru dostává i k použití modifikačních činidel, jejichž význam se projevuje ve snadnější interpretaci fragmentace modifikovaných peptidů (tj. usnadnění čtení sekvence) při tandemové hmotnostní spektrometrii. Tato část diplomové práce je uceleným spisem a je velmi zdařilá s kvalitou přehledového článku. K nedostatkům patří nepřesnosti a chyby v chemickém a biochemickém názvosloví, záměna seznamu gluko- a ketogenních aminokyselin a několik jazykových chyb. Doporučil bych v teoretické části důsledné uvádění zdrojů pro obrázky a tabulky (někde chybí), byť autorka obsah převzala v pozměněné formě. Zobrazená informace však musela být odněkud získána.





EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
**CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ  
A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM**  
ODDĚLENÍ BIOCHEMIE PROTEINŮ A PROTEOMIKY

Experimentální část obsahuje vyčerpávající přehled použitých chemikálií a materiálu a taktěž podrobný popis metodik používaných v laboratoři. Vzhledem k tomu, že experimentů byla provedena řada (což je bezesporu velké pozitivum této práce), je však metodická část s podrobnými „kuchařskými recepty“ pro modifikace dosti rozsáhlá (téměř 20 stran) a obtížně stravitelná. Doporučoval bych proto pro příště uvádět tabulku, která by přehledně shrnovala veškeré experimenty na jedné straně textu a fungovala jako určitá navigace. Předmětem byla příprava digestu standardu myoglobinu (s optimalizací průběhu štěpení v přítomnosti detergentu a jeho odstranění) a testování různých variant chemické modifikace vzniklých peptidů. Šlo o inkorporaci těžkého izotopu kyslíku  $^{18}\text{O}$  z vody  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , guanidylaci lysinových zbytků O-methylisomočovinou a modifikaci N-konce činidlem SPITC (prováděno v roztoku i s peptidy vázanými na stacionární chromatografickou fázi v mikrokolonce). Guanidylace byla nakonec kombinována s derivatizací činidlem SPITC a v optimalizovaném uspořádání aplikována na modelový i reálný vzorek. Ve druhém případě šlo o protein z lyzátu bakterie *Francisella tularensis*, kmen Schu S4, separovaný pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy. Tato kombinovaná derivatizace vedla k zjednodušení interpretace tandemových hmotnostních spekter peptidů z reálného vzorku, což při určení sekvenční informace ve spojení s databázovým vyhledáváním umožnilo úspěšnou identifikaci. Neznámým proteinem byl genový produkt z genu označeného jako FTT\_1441 (Q5NF13\_FRATT) z gramnegativní bakterie *Francisella tularensis subspecies tularensis*, jehož funkcí je vazba iontů železa. Výsledková část je podána velmi detailně, stejně jako diskuse, což je dokladem pečlivého zpracování a vyhodnocení experimentálních dat. Moje výtky se opět týkají především názvosloví a některých jazykových prohrěšků (nespisovné výrazy, skloňování), jde o analogické chyby jako v teoretické části.

K práci nemám žádné dotazy.

Po přečtení mohu konstatovat vysokou úroveň teoretických znalostí autorky a její schopnost využít je pro samostatně prováděné experimenty v laboratoři. Diplomantka musela zvládnout jak metody přípravy vzorku, tak i vlastní analytické postupy, které jsou sice promyšlené a v provedení relativně jednoduché, nicméně náročné na pečlivost provedení a trpělivost při optimalizaci. Práce splnila stanovené cíle zadání, v celkovém hodnocení je velmi kvalitní a propracovaná. Doporučuji ji proto k obhajobě bez zásadních výhrad a navrhuji známku A.

V Olomouci dne 19. 5. 2015

  
Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.