

Posudek oponenta na bakalářskou práci pro rok 2021

Autor práce: Jakub Rozhon

Název práce: Biologicky aktivní peptidy v reakci na stresové podmínky včely medonosné (*Apis mellifera*)

Oponent práce: Mgr. René Lenobel, Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Naplnění cílů práce	5
2	Ucelenost a aktuálnost řešeršní části práce	5
3	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	5
4	Logika postupu při vlastní řešeršní práci	5
5	Úplnost popisu navržených (používaných) metodik a postupů	1
6	Grafická úprava textu a obrázků	5
7	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	3
8	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	5
9	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	5
Celkem bodů:		39

max
45

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Teoretická část práce je rozsáhlá a reprezentuje souhrn více než 200 odkazů, což je obdivuhodné. K této části bych měl hlavní výtku týkající se relativně volného užívání pojmů biomolekula / protein / peptid. Některé vysvětlované pojmy a procesy se týkají především proteinů, ale jsou uměle doplňovány i pojmem peptid. Také jsou v některých částech textu nesprávně používány ve větách čárky.

Připomínky:

1. V textu je význam některých vět nepřesně definován, např. str. 12 – „*Jejich funkce jsou širokospektré. Jsou to základní stavební kameny proteinů, které samy o sobě tvoří konkrétně u člověka pětinu jeho tělesné hmotnosti (Štern, 2011).*“ Jedná se o peptidy nebo aminokyseliny?
2. Kapitola 4.2.2. – Modifikace biologicky aktivních peptidů – vysvětlované procesy převážně běží na úrovni proteinů nebo nukleových kyselin. Většina peptidů pravděpodobně vzniká až finální řízenou proteolýzou.
3. Str. 20, první řádek - Co je myšleno pojmem „zónová elektroforéza“?
4. Str. 20, kap. 4.3.3 – Ve spodní části odstavce nerozumím přesně formulaci „AmPs ovšem také mohou způsobit jen ztenčení této membrány, jelikož mohou být cíleny na konkrétní metabolity a molekuly uvnitř bakteriální buňky.“ Je možné vysvětlit blíže propojení jednotlivých významů – ztenčení membrány vs cílení AmPs na proteiny nebo DNA/RNA?
5. Str. 24, kap. 4.3.5.2., druhá věta – dovolil bych si navrhnout příště nahrazení pojmu „odtrhnutí“ vhodnějším pojmem enzymatické odštěpení nebo něco podobného. Enzymatické odstranění části proteinů nebo peptidů neprobíhá trháním dané molekuly.
6. Str. 25, kap. 4.3.5.3 – druhá věta – Co je za aminokyselinu „trosin“?

7. Str. 35, kap.4.4.3.1 – řádek 11 – Opět bych navrhoval lepší formulaci místo části věty „nejprve syntetizován a až následnou kotranslační modifikací dojde k odtržení prohormonu AKH.
8. Str. 47, kap. 4.5.1.1. – Ke kapitole zabývající se použitím AMICON filtrů bych měl poznámku. Amicon filtrace je vhodnější pro sběr a zakoncentrování proteinů právě proto, že se koncentrují na horní straně filtru a do filtrátu odchází kromě malých peptidů či proteinových fragmentů většina nízkomolekulárních látek přítomných ve filtrovaném materiálu. Filtrát obsahuje všechny nečistoty a také není zakoncentrován, ale je spíše ještě naředěn během promývání AMICON filtru.
9. Str. 49, kap. 4.5.1.3, řádek 7 – Co je myšleno pojmem „neporušených“ proteinů?
10. Str.50, první odstavec, řádek 4 – Co je myšleno větou *„Při RP-LC je také možnost záměny solventu za jiný, který je následně také použitelný pro hmotnostní spektrometrii?“* Také bych upozornil, že je jsem přesně nepochopil význam následující věty *„IEC má jako „offline“ metoda výhodu ve sběru samotných vzorků, kvůli čemuž je možná analýza vzorku nezávislá na čase, dále v různých fragmentačních technikách vzorku a určité flexibilitě celého procesu – je možno zasahovat do eluce (není automatizována jako u RP-LC), možná následná injekce vzorku do hmotnostního analyzátoru“?*
11. Str. 50, kap. 4.5.2.1 – Nejsem si jist vyjádřením uvedeným v prvním odstavci, že technika ESI-MS umožňuje přímo určit strukturu dané molekuly, zvláště pro peptidy nebo proteiny to není zrovna jednoduchá záležitost. Také ESI-MS se nespojuje s plynovou chromatografií, ale pouze s kapalinou chromatografií nebo kapilární zónovou elektroforézou. Plynová chromatografie se kombinuje s ionizací pomocí elektronů, tzv. electron impact (EI).
12. Str. 50, kap. 4.5.2.1 – Také věta popisující vstup vzorku z chromatografické kolony do ESI zdroje není správně *„Vhodně připravený vzorek, nebo spíše požadovaná frakce k analýze, je rozpuštěn v těkavém solventu a putuje z chromatografické aparatury do kovové, či skleněné mikrostříkačky s kovovým pístem.“*
13. Str. 52, kap. 4.5.2.1, poslední věta v posledním odstavci kapitoly – Jak vede použití interních izotopově značených standardů ke zvýšení citlivosti při detekci pomocí ESI-MS?
14. Str. 54, kap. 4.5.2.2 – poslední odstavec, první věta – Proč si myslíte, že použití peptidů jako interních standardů vede k nižší citlivosti kvantifikace?
15. Str. 55, kap. 5.1.1.2 – Myslíte, že je možné jednoduše odstranit lipidy ze vzorku hemolymfy pomocí centrifugace?
16. Str. 57, kap 5.1.2.1 – poslední věta v posledním odstavci – *„Sesbírané frakce jsou vysušeny ve vakuu za nižších teplot (45 °C).“* Teplotu 45°C bych neoznačoval jako nižší teplotu.
17. Str. 58, kap 5.1.2.2 – poslední věta v posledním odstavci kapitoly – *„Pro eluci požadovaných peptidů je použita mobilní fáze B, kdy je při rychlé gradientové eluci (25 minut, průtoková rychlost 400 nL.min⁻¹) dle elučních časů standardů apidaecinu I sbírána frakce vzorku pro ESI-Qq TOF detekci.“* Kapilární kapalinová chromatografie je přímo on-line spojena přes ESI ionizaci s hmotnostním analyzátozem. Takže nedochází ke sběru frakcí, ale přímo k on-line analýze eluátu vytékajícího z chromatografické kolony.
18. Několikrát v experimentální části je uvedeno, že se používá proud suchého plynu, což je nesprávně interpretováno. Správně je výraz „proud sušícího plynu“.
19. Str.60, kap. 5.2.1.2 – první věta v prvním odstavci – Extrakce vzorků pomocí 80% metanolu? Je určitě Apm-AKH dobře rozpustný v 80% metanolu?
20. Str. 61, kap. 5.2.2.1 – třetí věta v prvním odstavci – *„Tento gel propouští molekuly mezi molekulovými hmotnostmi 100 až 1 800 Da (Bio-Rad, 2000).“* Principem SEC chromatografie je zadrž případně částečné dělení menších molekul v pórech nosiče. Molekuly s molekulovou hmotností větší než je definovaná velikost pórů obtékají částice gelu. Nevím, co je ve větě myšleno pojmem „propouští“.
21. Str. 61, kap. 5.2.2.1 – poslední věta v druhém odstavci – Co znamená označení „sesbírané frakce dvojího typu“?
22. Str. 62, kap. 5.2.2.2 – třetí věta v prvním odstavci – *„Stacionární fáze kolony RP-nLC je tvořena silikagelem, na který je v souladu s prepurifikačními kroky a SEC purifikací možno navázat alkylsilan o délce C18.“* Smyslu této věty nerozumím.
23. Str. 62, kap. 5.2.2.2 – poslední věta v druhém odstavci kapitoly – „Probíhá vysokotlaká kapalinová chromatografie s gradientem mobilních fází. Frakce vzorku jsou sbírány k

ESI-Qq TOF detekci v závislosti na elučním čase standardu ApmAKH.“ Viz. bod 17 – kapalinová chromatografie je přímo on-line spojená přes ESI ionizaci s hmotnostním analyzátozem. Nedochází ke sběru frakcí.

24. Str. 62, kap. 5.2.3.1 – kapitola „Externí kalibrace“ – nepochopen princip kalibrace pomocí standardu analyzovaného analytu a jeho interního standardu, viz bod 5. v části „Chyby, které je nutno opravit.“

Chyby, které je nutno opravit

1. Str. 50, kap 4.5.2.1. – Věta vysvětlující průběh ESI-MS není fakticky správně. Prosím o korekci.
2. Str. 51, kap. 4.5.2.1 – Celý čtvrtý odstavec věnovaný hmotnostním analyzátozům je velmi nepřesný, matoucí a kombinuje dohromady informace, které spolu přímo nesouvisí. Možná by stačilo jednoduše napsat větu, že s ESI ionizací lze obecně kombinovat i také tandemové hmotnostní analyzátozy jako například QqQ, QqTOF a další. Tento odstavec by měl být přeformulován.
3. Str. 56, kap. 5.1.1.2 – poslední věta v horním odstavci – Tato věta pravděpodobně není správně formulována „*Proteiny i peptidy se v tomto případě nacházejí v jedné společné frakci, která je obsažena v supernatantu – skladování při nízké teplotě (-80 °C) do doby dalšího využití.*“ Použití kombinace acetonu a TCA povede ke srážení proteinů a peptidů, takže předpokládám, že obě složky se budou vyskytovat v precipitátu a nikoliv v supernatantu.
4. Str. 56, kap. 5.1.2 – poslední věta na stránce – Nesmyslná formulace věty „*Je v nich zahrnuta slabá iontoměničová chromatografie na katexu prováděná v reverzní fázi, na kterou navazuje kapalinová chromatografie v reverzní fázi a nanokapilárním provedení (RP-nLC), jež umožňuje důkladnější analýzu za současného použití sníženého objemu vzorku*“
5. Str. 58, kap. 5.1.3.1 – Kapitola externí kalibrace je velmi nepřesně formulována. Je nutné přepracovat. Z textu není jasné, jak probíhá samotná kalibrace.

Výše uvedené připomínky nijak nesnižují kvalitu sepsané práce a doporučuji práci k obhajobě. Experimentální část práce je sice jen teoretická, ale doporučoval bych hlubší teoretické seznámení s technikami a postupy, které student chce používat ve své budoucí práci.

Moje navrhovaná známka odpovídá celkovému počtu bodového hodnocení dle tabulky.

Závěr: práci doporučuji / nedoporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne: 28. 5. 2021

Podpis

Hodnocení

A – 41-45

B – 36-40

C – 31-35

D – 26-30

E – 20-25

F – 20 a méně

