

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Markéta Budínská

Název práce: Analýza jaderných proteinů ječmene s využitím chemické modifikace cysteinu

Oponent práce: Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost rešeršní části práce	4
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	4
3	Naplnění cílů práce	5
4	Logika postupu při vlastní rešeršní nebo experimentální práci	5
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	5
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	4
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	4
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	5
9	Grafická úprava textu a obrázků	5
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	5
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	5
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	5
Celkem bodů		56

max
60

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Diplomová práce Bc. Markéty Budínské je zaměřena na modifikaci cysteinu alkylačními činidly a jejich využití při analýze jaderných proteinů ječmene s cílem jejich analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie. Práce je psána přehledně, s minimem stylistických chyb či překlepů a podle doporučeného stylu. V teoretické části se studentka věnuje významu chemické modifikace cysteinů, konkrétním alkylačním činidlům a jejich využití pro vznik nových štěpných míst pro trypsin. Dále studentka popisuje rostlinné jaderné proteiny, které hrají roli v mnoha buněčných procesech, jsou však stále málo prozkoumané. Teoretická část dále popisuje analytické metody, především se zaměřením na hmotnostní spektrometrii a přípravu vzorků pro následnou analýzu. Teoretická část je psána přehledně a dostatečně vystihuje současný stav poznání v dané oblasti. Pouze v poslední části bych ocenil, kdyby autorka práce věnovala větší pozornost separačním technikám, které byly v praktické části využívány jak při optimalizaci protokolu, tak pro analýzu reálných vzorků jader ječmene a mazového povlaku tvarůžků.

V poslední části teoretického úvodu bylo nalezeno několik drobných nepřesností, viz. např. dotaz č. 1. Práce se opírá o celou řadu literárních zdrojů, které jsou zpracovány jednotným stylem. Drobnou výhradu mám k použití webového odkazu na stránky Thermo Fisher Scientific, který je zde uveden ve dvou variantách a v textu není rozlišeno, o který odkaz se jedná.

Na věcně a srozumitelně psanou metodickou část navazuje první část výsledkové části, která popisuje postup optimalizace protokolu s využitím hovězího sérového albuminu a jednoduché proteinové směsi. V této části se podařilo nalézt nejvhodnější podmínky pro aminoethylaci cysteinu a to s využitím 2-bromethylaminu v prostředí Tris (pH 8,2) s přídavkem 6M guanidin hydrochloridu provedené při laboratorní teplotě. Vzhledem k několika rozdílným přístupům, by v této části bylo vhodné, pro lepší přehlednost, zařadit schéma optimalizace. Součástí této části je několika tabulek s nalezenými peptidy dále v přehledové tabulce č. 20 v kapitole diskuze, která vhodně shrnuje celkové výsledky, které byly dosaženy při optimalizaci protokolu. Ve výsledkové části na ni, ale bohužel chybí odkaz. Nalezené optimální podmínky byly využity pro reálné vzorky představující buňčná jader v G1 a G2 fázi buněčného cyklu. Celkově lze vyzdvihnout identifikaci 30 (22) nových stěpných míst pro trypsin. To potvrzuje správně zvolený protokol aminoethylace, která může sloužit k dodatečné identifikaci proteinů bez dostatečného počtu K/R aminokyselinových zbytků.

Je škoda, že u doplňující analýzy mazového povlaku tvarůžku se nepodařilo nalézt vyšší počet identifikovaných peptidů pro vzorek modifikovaný 2-bromethylaminem než pro vzorek modifikovaný 2-jodacetamidem. Metoda tedy má potenciál především u proteinů s nízkým počtem K/R, kde představuje možnost zvýšení pokrytí sekvence či možnost vlastní identifikace, jak sama autorka uvádí v závěru. V některých případech by mohlo být vhodné oba přístupy kombinovat, a paralelně analyzovat vzorky modifikované buď 2-jodacetamidem nebo 2-bromethylaminem za vzniku aminoethylace. To by sice znamenalo větší časové nároky na analýzu, ale tento přístup by mohl přinést vyšší pokrytí jaderného proteomu.

Na začátku diskuze je zmíněn vliv pufrového systému elektroforézy na nežádoucí adukty s akrylamidem. Co se týče optimálního pH u Tricine vzorkového pufru namísto Laemmliho vzorkového pufru, po kroku odbavení a po „vysušení“ gelu čistým acetonitrilem bude pravděpodobně pH rovno pufru v kterém je rozpuštěno samotné alkylační činidlo a efekt původního vzorkového pufru bude zanedbatelný. Riziko je tedy spíše v blokaci cysteinových zbytků akrylamidem, jak je také uvedeno v diskuzi. Oceňuji, že byla provedena manuální lokalizace proteinů a u proteinů bez známé lokalizace byla toto odvozena na základě homologie s dalšími proteiny pomocí programu BLAST. Touto metodou se podařilo potvrdit lokalizaci identifikovaných proteinů v G1 a G2 fázi. Jsou diskutovány průniky jak mezi jednotlivými fázemi, tak mezi rozdílnými algoritmy použitých softwaru. V této části by grafická reprezentace dosažených výsledků např. pomocí Vennových diagramů působila přehledněji.

Celkově i přes drobné nepřesnosti, či jiné nedostatky v přehlednosti výsledkové části, bych chtěl vyzdvihnout především experimentální přínos práce, který může být v budoucnu využit při další analýze jaderných proteinů.

Studentka jednoznačně splnila požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Dotazy:

- 1) V kapitole 2.3.2.4 se uvádí, že pro všechny způsoby přípravy peptidových fragmentů (štěpení v roztoku, štěpení v gelu a příprava vzorku za pomoci filtru (FASP)) platí, že se při nich zároveň odstraňují detergenty. Platí toto tvrzení i pro uvedené štěpení v roztoku nebo je zde nutné použít další postup, např. extrakci?
- 2) Jak autorka vysvětluje, že v G2 fázi buněčného cyklu mnohem více identifikovaných peptidů/proteinů než v G1 fázi?
- 3) Proteiny zvolené pro optimalizaci mají známou aminokyselinovou sekvenci. Mohla byste u nich uvést celkový počet cysteinových zbytků? Korelují tyto počty s celkovým množstvím úspěšně modifikovaných peptidů?
- 4) Na str. 77 se uvádí, že guanidin působí denaturaci proteinů a zároveň i redukci disulfidických můstků. Pokud tedy působí jako redukční činidlo, jak lze vysvětlit, že se před alkylací používá redukční činidlo samostatně, konkrétně dithiotreitol či tris(2-karboxyethyl)fosfin?

Chyby, které je nutno opravit

Závěr: práci doporučuji / nedoporučuji k obhajobě.

V Pardubicích dne: 2. 6. 2020

Podpis



Hodnocení:

- A- 56-60
- B- 51-55
- C- 46-50
- D- 41-45
- E- 36 -40
- F- 35 a méně