

## POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: **Bc. Iva Vykydalová**

NÁZEV PRÁCE: **Kvantifikace proteinových vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím stabilních izotopových značek**

Předložená diplomová práce Bc. Ivy Vykydalové má celkový rozsah 102 stran.

Teoretická část (22 stran) uceleně pokrývá všechny oblasti, které byly plánovány během diplomové práce. Zahrnuje elektroforetické a chromatografické techniky pro dělení proteinů a peptidů, principy proteomické přípravy vzorků a základy hmotnostně-spektrometrické analýzy peptidů a proteinů a to jak z kvantitativního, tak kvalitativního hlediska.

Experimentální část pak představuje téměř 2/3 diplomové práce, z čehož usuzuji, že studentka odvedla opravdu velký kus experimentální práce a získané výsledky jistě budou tvořit cenný příspěvek k řešení grantového projektu uvedeného v diplomové práci. Studentka si v praxi vyzkoušela řadu pokročilých technik z oblasti proteomické analýzy proteinů. Významný příspěvek této předložené práce spočívá ve využití chromatografických technik aplikovatelných k off-line frakcionaci komplexních peptidických směsí. Tento postup vede k finální hlubší analýze proteomů ve vzorcích složitě biologického materiálu, jakým bezpochyby lidská plazma je.

K frakcionaci peptidů byly využity tři odlišné typy chromatografických nosičů a odpovídající podmínky separace (reverzní fáze za bazických podmínek, basicRP; hydrofilní chromatografie, HILIC; a ionexová chromatografie na silném katexu, SCX). Frakcionační postupy byly provedeny v mikrogradientovém uspořádání, které vyžaduje značnou experimentální zručnost, jež studentka během práce úspěšně prokázala. Samotná optimalizace SCX frakcionace jako chromatografické techniky, která doplnila již zavedené chromatografické frakcionace na basicRP a HILIC, byla řešena logicky a vedla k optimalizovanému postupu využitelnému v následných srovnávacích experimentech s využitím reálných vzorků plazmy v rámci grantového projektu.

K diplomové práci mám následující připomínky týkající se kvality prezentace některých experimentálních postupů a výsledků.

- 1) kap.2.2 - Zkrácený popis přípravy modelových vzorků peptidické směsi je velmi povrchní. Pokud je komplexní postup popsán ve zmíněné publikaci, tak by možná stačila zmínka o této modelové směsi před SCX optimalizací.
- 2) Kap. 2.4 - Deplece plazmy - při uvedení hodnoty centrifugace v rpm je nutné uvést i typ centrifugy, pro kterou tento údaj platí. V soupisu technického vybavení jsou uvedeny minimálně dvě různé centrifugy.
- 3) Kap 2.5 – Vzorek - depletovaná lidská plazma - jaký byl finální objem vzorku depletované lidské plazmy použitý v dalších experimentech, myšleno ve spojení s procesem deplece a s otázkou finálního objemu depletované plazmy po depleci? Tyto údaje jsou poskytovány relativně nepřesně i v dalších experimentálních částech diplomové práce.
- 4) Kap. 2.7 - Jaké byly koncentrace a objemy vzorků plazmy a depletované plazmy? Jaký objem například představovalo množství 25 µg proteinů?
- 5) Kap. 2.8.1 - Nejednotné označování zpracovávaného vzorku depletovaná plazma - buněčný lyzát vs proteinová směs (kap. 2.7).
- 6) Popisy obrázků nejsou vždy dostatečně informativní a v některých případech je obtížné pochopit celkovou podstatu zobrazených informací – např. obrázek 12 – zobrazené

chromatogramy reprezentují množství peptidů zachycených nebo nezachycených na SCX nosiči? U následujících obrázků 13 až 16, 20 a plus obrázky v příloze bych ocenil číselné označení typu gradientu dle tabulek 10 a 11 pro jednodušší orientaci podle textu.

- 7) Podkapitoly 3.5.1-3.5.4 – v textu chybí označení typu vzorku, který byl frakcionovaný. Až z popisu obrázku je zřejmé, že se jedná o TMT značenou plazmu. Předpokládám, že to je vzorek TMT značené depletované plazmy. Také ve všech popisovaných chromatografických experimentech chybí informace o hmotnostním množství nanášeného vzorku.
- 8) Opakování informací – tabulka 12, obrázek 22 a text v kapitole 3.6.2 – Identifikace proteinů – popisují opakovaně stále stejné informace bez dalšího hodnocení. V druhé části této kapitoly se mluví o identifikaci unikátních proteinů a peptidů pro jednotlivé typy frakcionací. Z hlediska identifikace unikátních proteinů je nutné současně hodnotit kvalitu jednotlivých identifikací proteinů například se zaměřením na počty identifikovaných unikátních peptidů vztahených k identifikovaným unikátním proteinům. Tato část výsledků by si zasloužila hlubší interpretaci.

Rozšiřující otázky pro obhajobu práce:

- 1) Vysvětlíte důvod použití kyseliny mravenčí při chromatografické separaci peptidů na reverzní fázi během kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Jsou i jiné alternativy?
- 2) Optimalizace SCX probíhala, pravděpodobně, při použití vzorků peptidů z lyzátu buněk Jurkat bez značení pomocí TMT, že? Pokud byly použity vzorky bez značení, lze předpokládat, že TMT značené vzorky plazmy se možná budou chovat při frakcionacích odlišně. Byla tato informace brána v úvahu a projevila se nějak v samotné mikrogradientové SCX frakcionaci?
- 3) V práci byly využity tři typy mikrogradientové frakcionace pro dva typy vzorků TMT- značené/neznačené. Bylo by možné navrhnout nejvhodnější kombinace mikrogradientové frakcionace pro daný typ vzorku na základě prezentovaných výsledků? Volby kombinací zkuste zdůvodnit.

Závěrem bych potvrdil, že všechny plánované cíle práce byly splněny a předloženou diplomovou práci **doporučuji k obhajobě** a navrhuji **hodnocení A**.

Mgr. René Lenobel, Ph.D.

Laboratoř růstových regulátorů PŘF UP & ÚEB AVČR

V Olomouci dne 17. 5. 2021