



Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.
Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
ALBERTOV 2030, 128 40 Praha 2, ČR
pacakova@natur.cuni.cz
V Praze dne 8.8.2019

Oponentský posudek disertační práce ing. Evy Zborníkové
Vývoj nové metody analýzy nukleotidového fondu v bakteriálních buňkách

Předkládaná disertační práce se zabývá stanovením nukleotidů v bakteriálních buňkách. Informace o jejich zastoupení jsou důležité při studiu vlivu interních i externích podmínek na látkovou přeměnu bakterií, neboť nukleotidy hrají klíčovou úlohu ve většině metabolických dějů.

Cílem této práce bylo vypracovat jednoduchou a robustní HILIC-MS metodu pro rutinní analýzu nukleotidů, která by byla aplikovatelná ve většině biologických a biochemických laboratořích. Za tím účelem byly optimalizovány podmínky úpravy vzorku, separace i detekce.

Vyvinutá metoda byla aplikována na buněčné extrakty bakterií *Escherichia coli* kultivovaných jednak za standardních podmínek a jednak za přítomnosti antibiotika mupirocinu, který u *E. coli* vyvolává stringentní odpověď, což se projeví mj. změnou koncentrací některých nukleotidů. Dále byla vyvinutá metoda aplikována na extrakty bakteriálního rodu *Mycobacterium smegmatis*.

Práce je založena na jedné publikaci v časopise mBio s impakt faktorem 6.747, druhé zaslané do tisku. Celkově je Ing. Zborníková spoluautorkou 13 publikací, dvou patentů a 4 posterů.

Výhodou vyvinuté metody je zjednodušený pracovní postup, jednoduchá selektivní detekce bez nutnosti optimalizování MS/MS přechodů a kvantifikace s pomocí neznačeného externího vnitřního standardu, který je možné přidat až po extrakci. Umožňuje v jednom kroku rozlišit široké spektrum nukleotidů, včetně isomerních struktur jako pGpp a GTP, pGp a GDP, které jsou obtížně stanovitelné vedle sebe a je proto možné využít metodu jako screeningovou pro biologické účely, která je schopná stanovit a bezpečně odlišit nukleotidy od jiných intracelulárních metabolitů a zachytit i menší změny v koncentracích alarmonů během stringentní odpovědi.

Práce obsahuje obšírný 22 stránkový úvod, který je doložen 140 citacemi a představuje velmi užitečný soubor informací, následovaný výsledky a jejich diskuzí. Práce je dobře sepsána. Je logicky členěna, výsledky jsou správně interpretovány.

Otázky do diskuse:

- 1) Str. 18: ϵ_l je molární absorpční koeficient, pod tabulkou a v seznamu zkratk je uveden jako extinkční koeficient (ϵ)
- 2) Použitá zkratka pro Anion Exchange Liquid Chromatography (AEX) je neobvyklá, běžně používanou zkratku AEC nelze použít, protože je v práci použita pro adenylátovou energii. V literatuře se používá i zkratka AIEC.
- 3) Syntéza ppGp, pGpp, pGp v laboratoři – prováděla je autorka sama?
- 4) Proč není uvedena celá publikace 2?

- 5) Bylo by možné pro stanovení nukleotidů v bakteriálních buňkách využít rovněž kapilární elektroforézy, která se uplatnila např. při stanovení nukleotidů v krvi?

Závěr:

Vytčené cíle byly splněny. Výsledky disertace představují významný přínos pro řadu oborů. Autorka prokázala velmi dobré teoretické znalosti zkoumané problematiky a schopnost tvůrčí vědecké práce. Doporučuji, aby disertační práce Ing. Evy Zborníkové byla přijata k obhajobě a aby se stala základem pro udělení vědecké hodnosti Ph.D.