



Katedra biochemie
Přirodovědecká fakulta
Univerzita Karlova
Hlavova 8
12840 Praha 2
Tel. +2-2195-1285 Fax.+2-2195-1283

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Vojtěcha France

Analysis of post-translational modifications of proteins using mass spectrometry

Disertační práce předkladatele zahrnuje tři prvoautorské recenzované vědecké články ve velmi solidních impaktovaných časopisech. Převážně metodická práce studia struktury glykoproteinů aplikuje kombinaci chromatografických experimentálních přístupů s hmotnostní spektrometrií a případným automatickým zpracováním dat. Svojí povahou tak obsahuje značný aplikační potenciál do výzkumné a potenciálně i klinické praxe.

Text práce je napsán čtivě, obsahuje velmi malé množství překlepů, formulačních nepřesností/neobratností či formálních chyb (např. na str. 21 by mělo být uvedeno „twenty amino acids“ místo uvedených „four“). V česky psaných částech textu jsou občasné anglikanismy a „vzletná“ forma, ale celkově musím ohodnotit vysokou formální i gramatickou úroveň celého textu, která nijak nesnižuje skutečně kvalitní disertační práci.

V úvodu je čtenář postupně uveden do tématu s uvedeným přehledem použitých metod, který obsahuje všechny potřebné informace pro pochopení výsledkové části a diskuse. Výsledková část obsahuje tři tematické okruhy shrnující informace ze všech tří použitých prvoautorských publikací. Vysoce hodnotím přidané nepublikované informace, detailní metodický popis a kritický komentář výsledků disertační práce, který je veden věcně a erudovaně. Předkládané výsledky jsou objasněny v kontextu již známých informací z literárních zdrojů, které ukazují široký literární přehled a metodickou erudici. Případné dotazy či komentáře předjímá a fundovaně na ně v textu práce odpovídá a tak oponentům předem bere vítr z plachet.

K první a druhé publikaci, která řeší analýzu N-glykosylací dvou rostlinných enzymů, oceňuji kromě elegantního využití afinitního nosiče i skutečně detailní strukturní analýzu. K této části mám jeden dotaz, zda byla porovnána data glykosylací rekombinantní cytokinin oxidasy/dehydrogenasy s nativním enzymem, pokud je vůbec takový preparát k dispozici?

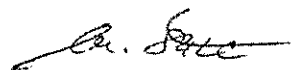
Třetí publikace prezentuje popis a charakterizaci O-glykosylací IgA1 HR. Zde oceňuji především komplexní metodický přístup a obrovské množství odvedené práce. Dovolil bych si jen krátký komentář k textu disertační práce, zda by nebylo pro čtenáře přínosné detailněji objasnit princip použitého BIOSPEAN „softwarového“ nástroje (je nastíněn v publikaci) a současně bych se přimlouval za uvedení doplňkových materiálů k publikaci („supplementary materials“). K práci mám dva dotazy:

Může mi předkladatel vysvětlit uvedený postup on-tip desalting and fractionation na str. 302, kap 2.3., jedná se o dva nezávisle použité postupy?

Jak vidí předkladatel metodické možnosti aplikace postupu na klinické vzorky?

Předkládaná disertační práce dle mého názoru splňuje požadavky kladené na disertační práci. Uvedené komentáře či poznámky nijak nesnižují vysokou kvalitu práce a proto podle Studijního a zkušebního řádu Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci doporučuji předloženou práci Mgr. Vojtěcha France přijmout k obhajobě. Protože práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvůrčí vědecké práci, dovoluji si na základě úspěšné obhajoby doporučit předkladateli udělení titulu „Ph.D.“.

V Praze dne 4. června 2014



Doc. Miroslav Šulc, PhD.
katedra biochemie PŘF-UK v Praze
miroslav.sulc@natur.cuni.cz.

Oponentský posudek k disertační práci Mgr. Vojtěcha France

"Analysis of post-translational modifications of proteins using mass spectrometry"

Ve své disertační doktorské práci se Mgr. Vojtěch Franc zabývá glykoproteomickou analýzou s využitím hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF a chromatografickou separací. Studie, kterou Mgr. Franc předložil, se zabývá bioanalytickými přístupy v glykoproteomice, a to jak na úrovni instrumentální bioanalitiky, tak i funkční glyko(proteo)miky. Všechny tři předložené práce obsahují zajímavé výsledky z obou těchto polí výzkumu.

Práce má 112 stran, sestává se z 26 stran úvodu jak do biologického výzkumu pomocí hmotnostní spektrometrie, glykoproteomiky, tak i příslušných bioanalytických metod. Následuje část o 14 stranách shrnující experimentální výsledky z předložených prací. Text je zpracován na velmi dobré úrovni, autorova angličtina více než adekvátně odpovídá deklarovanému stupni B2.

Minoritní výhradou oponenta jsou drobné nepřesnosti, které se v textu objevily patrně v posvátném zápalu při popisu významnosti autorových výzkumných zájmů, např. dalo by se s úspěchem polemizovat o vztahu proteomiky a funkční genomiky, jak je v textu uvedena (proteomika jako podčást funkční genomiky). Hmotnostní spektrometrie je rozhodně mocný nástroj, ale v Kühnerově studii (Kühner *et al.* 2009) to byla spíše tandemová afinitní purifikace než MS, co odhalilo proteinové interakce. K uvedeným typům glykosylací bychom pak mohli dodat ještě další tři (c-mannosylaci na uhlíku C2 indolového kruhu tryptofanu, fosfoglykosylaci či glukosylfosfatidylinositolovou kotvu). Sekvenem je také obecně zvána jakákoliv opakovatelná sekvence aminokyselin, na niž je vázán glykan, ne jenom známá Asn-X-Ser/Thr. Také iont $[M - 2H]^{2-}$ můžeme jen těžko nazvat aduktovým. A adukty s ionty alkalických kovů se podle dnes již nedoporučovaného názvosloví nazývaly pseudomolekulové ionty, nikoliv kvazimolekulové ionty, to byly ionty typu $[M+H]^+$.

I s výše zmíněnými drobnostmi, kandidát svými pracemi bezesporu prokázal schopnost adekvátně řešit výzkumné problémy, jak ukazuje fakt, že autor tyto výsledky publikoval jako tři prvoautorské články ve významných oborových časopisech (Electrophoresis /3.261, Q1/, Journal of Proteomics /4.088, Q1/). Práce tedy splnila všechny předpoklady pro doktorskou disertační práci (titul Ph.D.) a proto ji doporučuji k obhajobě.

23. 5. 2014, vypracoval Jan Havlíš



Otázky oponenta:

1. Optimalizoval jste metodu nanášení vzorku na vzorkovací destičku pro MALDI MS analýzu s ohledem na vzájemné potlačování ionizace, která u glykanů může být významná?
2. Máte nějakou představu o možnosti stanovení poměru glykosylovaná pozice / neglykosylovaná pozice v rámci jednoho glykoproteinu za předpokladu makroheterogenity?
3. Máte ze své výzkumné praxe zkušenosti se zakoncentrováním glykoproteinů před hmotnostně spektrometrickou analýzou pomocí lektinové afinitní chromatografie?

23. 5. 2014, vypracoval Jan Havlíš

