

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Kateřiny Mikulíkové

***Posttranslační modifikace proteinů –  
jejich analýza a fyziologické aspekty***

Předkládaná dizertační práce si klade za cíl vyvinout účinné metody a postupy pro analýzu posttranslačních modifikací proteinů, zaměřit se na proteiny albumin a kolagen a studovat jejich reaktivitu s oxo-sloučeninami *in vivo* a *in vitro*.

Spojením separačních technik s hmotnostní spektrometrií, optimalizací podmínek a využitím informačních databází lze získat informace nejen o identitě proteinů, ale také o jejich primární struktuře, existenci izoform, typu a lokalizaci posttranslačních modifikací, případně kvantitě a funkci analyzovaného proteinu. Vzhledem k ohromné diverzitě proteinů se jedná o velice náročný a obsáhlý úkol. Dizertantka se ve své práci zaměřila na studium neenzymatické glykace vybraných proteinů spolu se strukturní analýzou látek při této reakci vznikajících.

Mgr. Mikulíková v úvodní části své disertační práce stručně a přehledně informuje o struktuře a funkci albuminu a kolagenu. V části 2.2.1. bych vytkla malý počet a hlavně kvalitu literárních zdrojů (cit. č. 8-10). Teoretická část obsahuje i základní přehled metod, které jsou nástrojem pro realizaci zadaných cílů práce. Vzhledem k analytickému zaměření práce považuji kapitolu 2.5. (str. 52-55) za velice stručnou a nedostatečně propracovanou. V této části textu bych očekávala hlubší rozbor obtíží spjatých např. s přípravou vzorků (stabilita PTM), s vlastní analýzou posttranslačních modifikací, jaká je dostupnost databází apod., vždy s odkazem na původní práce a rešerše touto problematikou se zabývající. Některé informace podobného charakteru se objevují až v kap. 6.2.2.2. na str. 122-123. V závěrečné části práce (kap. 6, Diskuze) by se autorka měla více zaměřit na diskuzi o vlastních výsledcích právě v souvislosti se správnou volbou separační(ch) metod(y).

Text je psán srozumitelně, působí kompaktním dojmem, bez větších formálních chyb. Pouze musím upozornit na nižší kvalitu některých převzatých schémat a obrázků (str. 42, 44, 45, 48,49, 54, 83), na důsledné psaní termínů *in vivo* a *in vitro* kurzívou, na chyby v psaní čárek v souvětí (např. už v poděkování), na nepřesný termín pro elektroforeogram (str. 110), na anglikanismy (degasér, autosampler). V experimentální části chybí charakterizace enzymu Proteinázy K, nepřesné psaní 2000  $\times$  g při centrifugaci (str. 63), nestandardní termín „kolonka byla promyta vzorkem“ (str. 62).

Jako významnější formální chyby považuji nedostatečné a nepřesné popisky u obrázků obsahující spektra (chybí uvedení instrumentace, parametrů separace nebo MS analýzy, jako vzorový příklad uvedu obr. č. 37, týká se to však téměř většiny spekter včetně hmotnostních). Také název obrázku HPLC/MS, kde je zachyceno pouze spektrum HPLC (obr. č. 29-34), nebo CE-MS (str. 46) je nepřesný a matoucí. Ve výsledkové části práce nebo alespoň v příloze postrádám MS spektra parentních iontů, které byly poté fragmentovány (např. str. 110, 3 CML peptidy). V mnoha případech chybí informace o počtu opakování analýz, příp. statistické vyhodnocení získaných dat. Tabulka č. 3 a 4 jsou z mého pohledu nepřehledné. V přehledu publikačních aktivit dizertantka cituje nepřesně místo a název akce, kde byly výsledky prezentovány (str. 129).

V další části hodnocení dizertační práce uvedu drobné připomínky a náměty k diskuzi:

- 1) Co si dizertantka představuje pod termínem mikrocharakterizace proteinů (str. 54)?
- 2) Prováděla dizertantka identifikace a strukturní analýzy proteinů metodou hmotnostní spektrometrie sama?

- 3) Proč se dizertantka rozhodla použít pro fragmentaci analyzovaných proteinů enzymy, které štěpí v místě oxo-sloučeninami modifikovaných lysinů?
- 4) Na základě čeho byly voleny výchozí koncentrace modifikátorů, byla provedena optimalizace, v tabulce č. 7 chybí také údaj o typu pufru, jeho molaritě, pH. Na str. 69 chybí údaj o výchozí koncentraci kolagenu („koncentrovaný vzorek byl naředěn...“).
- 5) Ke kapitole 5.2.3 a hlavně k interpretaci získaných výsledků mám větší výhrady. U obr. č. 48-53 chybí informace, zda se jedná pouze o výsek spektra či absorpční spektra byla měřena v celém vlnovém rozsahu, chybí údaje o výchozích koncentracích látek v měřeném roztoku obsažených, údaje o kontrolách a případné interferenci látek. Také označení absorpčních maxim ve spektrech (např. obr. č. 48 A,B,C) je nejednoznačný. Domnívám, že vyhodnocení a závěrečná tvrzení týkající se této kapitoly nejsou podložena dostatečnými a adekvátními měřeními. Nepovažuji zdůvodnění, proč není kolagenáza vhodným enzymem pro štěpení proteinu v souvislosti se změnami v absorpčním spektru („nemá výrazná absorpční maxima“) za dostatečné. Prosím o dizertantku o odpověď na výše uvedené připomínky a na otázku, čím si vysvětluje posuny v absorpčních spektrech u modifikovaných molekul kolagenu.
- 6) Dizertantka se ve své práci málo zmiňuje o pozici bioinformatiky a dostupnosti databází pro identifikaci a strukturní charakterizaci hledaných proteinů. Zajímalo by mne, jaké jsou dnes v oboru proteomiky dostupné databáze, zda jsou specializované databáze zaměřené na jednotlivé podobory proteomiky tj. expresní proteomika, strukturní proteomika, funkční proteomika, studium protein-proteinových interakcí a tvorby multiproteinových komplexů již vytvořeny a zpřístupněny odborné veřejnosti.

Uvedené připomínky a náměty nesnižují odbornou úroveň předložené práce. Řešená problematika jednoznačně odpovídá současným trendům v daném oboru. Autorka ve své práci prokázala schopnost kompilace odborného textu, zvládla náročnou instrumentaci (HPLC, CE, MS) a prokázala schopnost validní výsledky nejen získat, ale i interpretovat. Její práce významně přispěla k řešení vybraných kroků analýz vysoce

heterogenní skupiny posttranslačních modifikací proteinů. Potvrzuje to i počet publikací prezentovaných v zahraničních časopisech s vysokým impakt faktorem. Autorka dospěla k zajímavým výsledkům a rozkryla tak nové podněty pro další výzkum v této oblasti.

Dizertantka splnila vytčené cíle. Její vědecká i publikační aktivita je v souladu s požadavky pro úspěšné obhájení a ukončení postgraduálního studia spolu s udělením titulu Ph.D.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji práci přijmout k obhajobě.

V Pardubicích 13. 9. 2007

Doc. RNDr. Zuzana Bilková, Ph.D.