
Oponentský posudek dizertační práce**Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice****Doktorský studijní program:** Analýza biologických materiálů**Uchazečka:** Mgr. Rudolf Kupčík**Název dizertační práce:** New materials and techniques for separation and analysis of clinically important proteins**Školitel:** prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**Konzultant:** RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.**Oponent:** prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.**Pracoviště oponenta:** Regionální centrum aplikované molekulární onkologie,
Masarykův onkologický ústav, Brno

Předložená dizertační práce je vypracována v angličtině jako komentovaný souhrn pěti publikovaných článků (součet IF je vysoký 19,656), jednoho rukopisu a jednoho patentu. Práce je členěna klasicky do pěti kapitol (Úvod; Experimentální část; Závěry a výhledy; Publikační aktivita uchazeče a Reference). V úvodu jsou popsány proteiny i jejich charakterizace, na to navazuje detailní seznámení s materiály, které se používají k obohacování vybraných typů proteinů/peptidů (rekombinantní nebo fosforylované), jejich analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. V této kapitole mi chybí jedna zásadní část pojednávající o hodnocení a interpretaci hmotnostně spektrometrických dat a aplikaci bioinformatických nástrojů, které bezpochyby autor práce využíval. V další kapitole, Experimentální část, jsou komentovány jednotlivé publikace a patent, na kterých Mgr. Kupčík spolupracoval. V kapitole Závěry a výhledy jsou shrnuty dosažené výsledky spolu s dalšími možnostmi využití magnetických částic, mikro- i nano- materiálů v separačních a analytických metodách, jež mohou dál posunout hranice poznání v biologických procesech mikro- i makro- organismů. V poslední části je uvedeno téměř 300 literárních citací, kterými je dizertační práce podpořena.

Cílem dizertační práce bylo využití nových materiálů pro analýzu proteinů i peptidů, ustavení optimálních postupů umožňujících jejich cílené obohacení a studium jejich struktury (např. posttranslačních modifikací). To považuji za velice přínosné pro proteomickou obec. Otevírají

se tak další možnosti detailnějšího poznání proteomu eukaryotických i prokaryotických organizmů.

Práce je psána srozumitelně, výsledky jsou jasně interpretovány v návaznosti na příložené originální články. V úvodu bych měla drobné výhrady k podkapitole 1.3.3.1 The Orbitrap based mass spectrometers (str. 41), ve které je uveden orbitrap jako analyzátor. Pokud je myšlen jako hmotnostní analyzátor (což vyplývá z dalšího textu), pak je přesnější a správnější uvést název orbitální iontová past. Dále na té samé stránce je uvedeno, že přístroj Orbitrap Elite má kombinaci kvadrupólového a orbitrapového hmotnostního analyzátoru, což není pravda. Jedná se o kombinaci lineární iontové pasti a orbitální iontové pasti.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky z provedených analýz jsou nové, kvalitní a originální. To dokazuje jejich zveřejnění v časopisech s IF s přísným recenzním řízením. Zvláště bych chtěla vyzdvihnout článek uveřejněný v prestižním časopise „Applied Materials & Interferences“, ve kterém jsou popisovány výsledky obohacování fosfopeptidů s využitím 1D TiO₂ nanotrubiček pokrytých nanočásticemi Fe₃O₄, jenž lze také použít k purifikaci rekombinantních proteinů. Těchto výsledků bylo možné dosáhnout pouze ve spolupráci s dalšími pracovišti, kombinací vhodných experimentálních přístupů a pílí studenta. Není pochyb, že studie popsáné v dizertační práci byly náročné na přípravu, provedení analýz, hodnocení dat a hlavně jejich interpretaci, která by bez porozumění a perfektní orientaci Mgr. Kupčíka v této oblasti nebyla možná.

Dotazy k obhajobě dizertační práce

1) Proč je práce psaná v anglickém jazyce?

2) Lze popisované postupy využít pro obohacování fosforylovaných N-glykoproteinů? Mohou být očekávána sterická omezení vysoce komplexních glykanů? Je snadnější obohacovat fosfoproteiny nebo fosfopeptidy?

3) V článku II, str. 65 (Kupčík R. et al. Selective isolation of hydrophobin SC3 by solid-phase extraction with...) je popsána izolace hydrofobinu z modelové směsi deseti standardních proteinů. Byl vyvinut postup přípravy vzorku s následnou hmotnostně spektrometrickou

analýzou. Když byla zvládnuta tato část, bylo by možné izolovat a analyzovat tento protein z reálného biologického materiálu? U některých peptidů identifikovaných MALDI Orbitrap je uveden v Tabulce 1 v originálním článku větší počet neštěpených míst (3 nebo 4 missed cleavages). Jak by se to dalo vysvětlit?

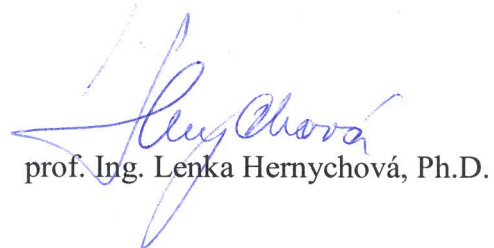
4) V článku III (Slováková M. et al. Application of trypsin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ core/shell nanoparticles for protein digestion.) popisujete vývoj nového magnetického materiálu vhodného pro enzymatické štěpení proteinů trypsinem. Zajímalo by mě jaká je životnost a aktivita těchto částic, zda je možné je používat opakovaně, případně jak probíhá jejich regenerace, zda je náročná manipulace při jejich použití a zda aktivita a chování materiálu závisí na šarži částic?

5) Mohl byste ukázat jeden příklad bionformatického nástroje vhodného pro interpretaci hmotnostně spektrometrických dat fosforylovaných proteinů (např. lokalizace míst fosforylace v peptidových sekvencích)?

Závěr

Mgr. Rudolf Kupčík ve své práci prokázal tvůrčí vědecké schopnosti, je prvním autorem dvou článků a manuskriptu, spoluautorem tří článků a patentu s přímým vztahem k tématu dizertační práce (IF se pohybuje od 2,529 do 8,097). Během svého studia aktivně prezentoval získané originální výsledky na mnoha tuzemských i zahraničních vědeckých konferencích. Použité metodické přístupy byly adekvátní, vedly ke splnění cílů disertační práce a ukázaly další možnosti studia dané problematiky. **Mgr. Rudolf Kupčík prokázal tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu, a proto doporučuji předloženou dizertační práci k obhajobě. Na základě úspěšné obhajoby pak navrhuji udělení akademického titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.**

V Brně 14.6. 2019


prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.