

*Mgr. Katarína Molnárová*

Hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia v analýze intaktných glykopeptidov

Disertační práce Mgr. Kataríny Molnárové se zabývá analýzou glykopeptidů, produktů enzymatického štěpení glykoproteinů. To jsou látky, které hrají roli v mnoha biologických procesech, například buněčné signalizaci nebo imunitní odpovědi, a jsou proto studovány v souvislosti se závažnými chorobami. Rozvoj analytických metod otevírá nové možnosti pro hlubší porozumění struktuře a fungování glykoproteinů, což je klíčové pro vývoj nových léčebných přístupů a diagnostických metod. Téma disertační práce je proto velmi aktuální a důležité.

Disertační práce je napsaná ve slovenském jazyce a je koncipovaná jako komentovaný soubor sedmi odborných publikací. Má celkem 72 stran, obsahuje 23 obrázků a cituje 141 literárních pramenů. Její součástí jsou kopie sedmi autorčiných publikací, z nichž 5 již bylo otištěno, 1 byla přijatá k publikování a 1 je v recenzním řízení.

V první kapitole disertační práce jsou definovány její cíle, které směřují k analýze a přípravě vzorků glykopeptidů. Následuje literární přehled, ve kterém autorka představuje glykoproteiny, jejich strukturu a biologické funkce, a podrobně rozebírá chromatografické metody v glykoproteomických aplikacích. Text je formulován srozumitelně, čtivě a je vhodně doplněn obrázky. Čtenáře nenechá na pochybách o autorčině rozhledu ve studované problematice. Další kapitola je sestavena z komentářů, ve kterých jsou shrnuty nejdůležitější výsledky a závěry publikovaných prací. Obrázky, grafy, chromatogramy, spektra a tabulky přispívají ke snadnému pochopení prezentovaného materiálu. Výsledky působí přesvědčivě a jejich interpretace je správná, což je bezpochyby i názor recenzentů, kteří doporučili přijmout diskutované práce k otištění v renomovaných časopisech. Předposlední kapitola je závěrečným shrnutím, ze kterého je zřejmé, že bylo dosaženo hodnotných a zajímavých výsledků. Poslední kapitola je seznamem citovaných prací a dále následují přílohy s plnými verzemi autorčiných publikací.

Po formální stránce nemám k disertační práci výhrady, v práci jsem objevil jen minimum překlepů a chyb. Dovolím si však upozornit na poměrně široce rozšířený názvoslovný prohřešek, kterému se neubrání ani autorka této práce. Je jím použití názvu rozpouštědla izopropanol. Podle názvoslovných pravidel IUPAC se jedná o 2-propanol, případně lze použít název isopropylalkohol. Název izopropanol (isopropanol) je nesprávnou kombinací různých názvoslovných systémů. Jde však jen o drobnost, která nikterak nesnižuje vysokou úroveň zpracování disertační práce.

Celkově hodnotím disertační práci velmi kladně. Výsledky ukázaly přednosti systému HILIC pro chromatografickou separaci a prekoncentraci glykopeptidů a odhalily faktory, které ovlivňují interakce mezi analyzovanými molekulami a stacionárními fázemi. Získané poznatky jsou důležité pro analytické aplikace v oblasti glykoproteomiky.

*K předložené disertační práci mám několik dotazů:*

1/ Prosím o bližší objasnění štěpení PNGasou F v případě metody založené na reakci s hydrazidem zmíněné v kapitole 2.4.2. Z textu vyplývá, že po odmytí neglykosylovaných proteinů a proteolýze se peptidy uvolní působením PNGasy F. Jedná se enzymatické štěpení hydrazonu, tedy C=N vazby?

2/ Disertační práce se zabývala spíše chromatografickými separacemi, přesto bych se chtěl zeptat na hmotnostně-spektrometrickou detekci. Hmotnostní spektra na obrázku 10 ukazují, že mnoho důležitých fragmentů je na úrovni šumu. Interpretace takových spekter je zřejmě obtížná. Jakým způsobem byla tato spektra interpretována, byl k dispozici nějaký specializovaný software? Jaké ionty byly fragmentovány (tj. co byl prekurzor)? Je možné ze spekter získat také informace o sekvenci aminokyselin?

3/ V disertační práci jsou pro některé dvojice píků vypočítány hodnoty rozlišení, např. pro píky na obrázku 11F bylo spočítáno rozlišení  $R=0,43$ . Prosím o vysvětlení, jak se tyto hodnoty počítaly. Mám za to, že obě koelující látky měly stejnou hmotnost a nebylo tedy možné využít různých hodnot  $m/z$  pro vykreslení každého píku zvlášť.

4/ Velmi se mi líbila práce zabývající se predikcí retenčního času *N*-glykopeptidů. Relativní retenční časy byly vztaženy ke glykoformě A2G2, což bylo vysvětleno dobrým zastoupením této formy ve vzorcích. Nabízí se otázka, proč nebyla jako reference použita neglykosylovaná forma peptidu. Zajímalo by mne, jestli by bylo možné vytvořit podobně spolehlivý predikční model i pokud by se RRT počítaly k neglykosylované formě.

5/ Poslední dotaz je obecného charakteru. V práci je značná pozornost věnovaná vysvětlení retenčního chování glykopeptidů na různých typech stacionárních fází, přičemž se bere v úvahu polarita či hydrofobicita peptidů. Zajímalo by mne, jestli je možné polaritu či hydrofobicitu peptidu vyjádřit nějakým číselným parametrem, který by se dal vypočítat ze struktury (glyko)peptidu.

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Kataríny Molnárové je významným příspěvkem k rozvoji separačních věd a jejich aplikacím v analýze glykopeptidů. Uchazečka podle mého názoru plně prokázala připravenost k samostatné tvůrčí činnosti, a proto její disertační práci **doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 15. března 2024

.....  
doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.