

Oponentský posudek doktorské disertační práce

**PROTEIN CHEMISTRY AND MASS SPECTROMETRY  
IN BIOCHEMICAL RESEARCH**

Mgr. Petra Pompacha

účastníka doktorského studia na UK PřF v programu biochemie

**Obecná charakteristika**

Disertační práce v pevné vazbě formátu A4 má rozsah 89 stran (včetně 2 stran použité literatury a 3 stran se seznamem prací autora se vztahem ke studované problematice - 6 publikací, z toho 1x jako první autor, 2 publikace se připravují). Práce je členěna do kapitol zahrnujících: I. The Immune system, II. Enzymes, III. Methods, IV. Results, V. Discussion of Results, VI. References a VII. List of publications and conference presentations. Výsledková část je prezentována prostřednictvím 3 publikací a 1 rukopisu připraveného k publikaci. V této části jsou také uvedeny, v části „Poděkování“ grantové projekty, ze kterých byla disertační práce podporována.

Práce se zabývá charakterizací důležitých rozpoznávacích proteinových molekul na povrchu buněk imunitního systému, specificky T lymfocytů a NK buněk. Studium tzv. membránových mikrodomén (lipidických raftů) zahrnujících povrchové receptory, které se podílejí na přenosu signálů a regulaci aktivity buněk imunitního systému je téma jistě aktuální a souvisí se studiem imunitní odpovědi a možnosti její cílené regulace. V disertační práci je dále zahrnuto studium proteinové architektury N-acetylhexosaminidázy, důležité složky chitinolytického systému, z houby *Aspergillus oryzae*. Souhrnně je práce souborem různých metod proteinové chemie v kombinaci s proteomickými postupy, jmenovitě hmotnostní spektrometrií, aplikovaných na podrobnější studium proteinové struktury a funkce u různých biologických modelů.

**Cíle práce**

Cíle disertace nejsou jasně formulovány, lze nalézt jen velmi stručné konstatování, na co byly jednotlivé studie zaměřeny, a to ve výsledkové části v úvodech prezentovaných publikací. Tento formální nedostatek ale neznamená, že provedené studie nevedly k významnějším výsledkům, např. charakterizace CD69 proteinu NK buněk s ohledem na úlohu v přirozené a protinádorové imunitě.

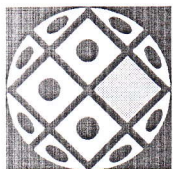
**Použitá metodika**

Metodické postupy použité v jednotlivých modelových experimentech disertační práci jsou adekvátní a zahrnují izolaci membránových mikrodomén gradientní centrifugací z T buněčné linie Jurkat, expresi a purifikaci čistého krysího CD69 receptoru NK buněk, HPLC kapalinovou chromatografií a techniky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, mikroLC-MS/MS, a FTICR MS.

**Dosažené výsledky**

Ve studii č. 1 : P. Pompach et al. “ Mass spectrometry is a powerful tool for identification of proteins associated with lipids rafts of Jurkat T-cell line“ bylo ukázáno, že kombinace účinné purifikační techniky umožňující významné obohacení membránových mikrodomén s LC-MS/MS identifikací proteinů přítomných v těchto doménách je velmi efektivní a může vést k nálezům celé řady proteinů, které nepatří k typickým proteinům membránových mikrodomén.





# ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

Rumburská 89, 277 21 Liběchov

Telefon: 315 639 582, fax: 315 639510, e-mail:kovarova@iapg.cas.cz

Studii č. 2: J. Pavlíček, D. Kavan, P. Pompach et al. „Lymphocyte activation receptors: new structural paradigms in group V of C-type animal lectins“ popisuje výsledky analýzy struktury a funkce krysího NK receptoru CD69 získané pomocí FT ICR a NMR. U CD69 byla prokázána přítomnost tří disulfidických vazeb ( FT MS) a skutečná tří-rozměrná struktura byla určena s využitím krystalografie a dvojitě značenou NMR. Dále autoři ukázali, že, vazba vápníku a oligosacharidů je u krysího CD69 velmi podobná lidskému proteinu a specifita vazby je vysoká pro větvené oligosacharidy oproti lineárním.

Studie č. 3 autorů O. Plíhal, J. Sklenář, J. Kmoníčková, P. Man, P. Pompach et al. „N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase“ demonstrovala, že propeptid beta-N-acetylhexosaminidázy je zpracováván v průběhu biosyntézy a jeho přítomnost je nezbytná pro aktivaci enzymu, jeho dimerizaci a sekreci. Zatímco katalytická doména enzymu je N-glykosylovaná, MALDI MS potvrdila, že propeptid je O-glykosylovaný a pulse-chase experimenty indikovaly, že takto modifikovaný propeptid je nutný pro plnou funkční aktivitu enzymu.

Rovněž studie č. 4 autorů R. Ettrich, V. Kopecký Jr., K. Hofbauerová, V. Baumruk, P. Novák, P. Pompach et al. „Structure of the dimeric N-glycosylated form of fungal beta-N-acetylhexosaminidase revealed by homology modeling, vibrational spectroscopy, biochemical and cross-linking studies“ se zabývá analýzou struktury hexosaminidázy. Práce je připravena k podání k publikaci, není však uvedeno do jakého časopisu. Experimentální data získaná pomocí IR a Raman spektrometrie, hmotnostní spektrometrie ( FT ICR) a biochemických studií nativních a deglykosylovaných enzymů byly v souladu s molekulárními modely.

## Splnění cílů

Domnívám se, že přes mé výhrady, které byly vedeny spíše snahou autora upozornit na důležitost formální stránky vědecké práce, byly cíle doktorandské disertační práce splněny. Tuto práci lze považovat za přínosnou z toho pohledu, že demonstruje úspěšnost propojení klasických technik proteinové chemie a novějších pokročilých technik zejména hmotnostní spektrometrie a posunuje naše znalosti biochemické podstaty mnohých biologických systémů o stupeň výše.

## Dotazy a připomínky pro diskusi

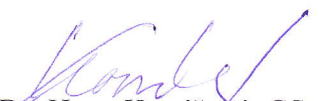
V části práce týkající se membránových mikrodomén u T buněk disertant ukazuje, že MS je velmi efektivní a může vést k identifikaci celé řady proteinů, které nepatří k typickým proteinům membránových mikrodomén. Liší se významně složení mikrodomén např. u T buněk a NK buněk? Identifikace S-100 proteinu ( calgranulinu), který jste jako první autoři identifikovali jako komponentu T-buněčných mikrodomén, je jen první krok k dalším funkčním studiím zaměřeným na tento protein? Jak by disertant pokračoval v těchto studiích?

Oponenta by zajímalo jaké přirozené ligandy NK receptorů (tedy i CD69) a jejich syntetická mimetika jsou testována jako potenciální protinádorové a immunoaktivující látky. Lze nalézt souvislost mezi těmito látkami a strukturně- vazebným charakterem CD69?

## Závěr

Mgr. Petr Pompach předložil disertační práci, která odpovídá kladeným požadavkům podle § 47 Zákona o vysokých školách 11/98 Sb. Navrhují, aby po absolvování obhajoby byl Mgr. Petru Pompachovi udělen akademický titul doktor, ve zkratce PhD.

V Liběchově, dne 29. 5. 2006

  
RNDr. Hana Kovářová, CSc.