



Posudek disertační práce Mgr. Jana Fíly

Katedra experimentální biologie rostlin, PřF UK Praha

Úloha fosforylace proteinů v progamické fázi vývoje samčího gametofytu tabáku.

Předložená disertační práce se zabývá proteomickou a bioinformatickou analýzou fosfoproteomu aktivovaného pylu tabáku (*Nicotiana tabacum*), jakožto dlouhodobého modelu studovaného v laboratoři školitele. Navazuje na předchozí diplomovou práci autora. Jedná se o unikátní problematiku, spočívající na pečlivě vyvinuté a aplikované metodice obohacení proteinového extraktu a následnou separaci a identifikaci pomocí kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií.

Práce je členěna na 35 stran česky psaného úvodu do problematiky a souhrnu oddiskutovaných publikovaných výsledků, doplněné kopiemi čtyř publikovaných impaktovaných článků, z nichž na dvou je kandidát prvním autorem. Jelikož výsledky práce byly publikovány v impaktovaných publikacích, kde prošly rigorózním oponentním řízením specialistů v daném oboru, není práci v podstatě co vytknout. Jedná se o významné publikace což je odraženo i v impakt faktorech daných časopisů. Přesně je uvedeno jaký byl podíl autora, a ve většině případů se jednalo o celkové provedení experimentů i sepisování publikace.

V literárním úvodě je na 15 stranách přehledně představena problematika životního cyklu krytosemenných rostlin, vývoje pylu a především problematika fosforylace proteinů a jejich metod studia. Možná by nebylo na škodu více rozepsat kapitulu aktivace pylu, kde by bylo zřejmé jak komplikovaný a přesně regulovaný tento proces je. Je škoda, že v laboratoři školitele v minulosti intenzivně studovaný proces glykosylační modifikace proteinů je zcela vynechán. Nicméně nepochybuji, že se autor v dané problematice orientuje a jeho snahou bylo spíše cílení na vlastní studované téma práce. Za zmínku stojí, že např. fosfoproteiny byly zjištěny jako klíčové v procesu inkompatibility máku (de Graaf et al. Nature 2006). *Je něco více známo o interakci pylu resp. pylové láčky a blizny u tabáku, z proteomického hlediska?* Rovněž z pohledu dalšího „využití“ disertační práce pro následující studenty pracující mimo laboratoř školitele by nebylo na škodu zařadit kapitulu týkající se metodiky tj. vlastní separace a analýzy proteinů, které nejsou do detailů publikovány, a věřím že na této metodické části autor strávil nemalou část svého studia.

Cílem práce bylo zachycení změn ve fosforylaci proteinů během dvou vybraných časových úseků aktivace pylu tabáku. Následovala bioinformatická analýza kinázových motivů. Tyto cíle byly splněny, jak je patrné z recenzovaných publikačních výstupů práce. Celkem bylo identifikováno 471 fosfopeptidů a na nich pak 432 fosforylačních míst v celkem 301 různých proteinech. *Zde bych měl dotaz, jaký je kvalifikovaný odhad autora, zachycené části z celkového proteomu pylu? V recentní práci Chao et al. 2016 v Plant Mol. Biol. se u pylu kukuřice podařilo identifikovat více než 100 000 peptidů z 6750 proteinů a 5292 fosforylovaných míst v celkem 2257 fosfoproteinech.*

Identifikované fosfoproteiny byly podrobeny bioinformatické analýze a zařazeny do funkčních kategorií. Je pravděpodobné, že jak vyvinutá metodika tak již získané výsledky budou dále zhodnoceny, i díky pokračující anotaci genomu tabáku. Oceňuji část diskuse, která není rekapitulací publikovaných částí, ale přináší autorův pohled včetně spekulací a hypotéz, což umožňuje práce formát disertační práce a může být inspirací k dalšímu studiu.

Zde mám dotaz, jak si autor představuje zmíněné využití T-DNA inzerčních linií? Zde by se pak jednalo spíše o kompletní vyřazení funkce daného proteinu, nebyly by spíše zajímavější (ale samozřejmě i obtížněji získatelné a analyzovatelné) bodové mutace? Lze očekávat, že takto životně důležité genu budou reprezentovány třeba spíše genovou rodinou a proto nebyly doposud při mutantních skríních zachyceny?

Celkově práce vhodně kombinuje experimentální a analytické postupy, což svědčí o zkušenosti autora v dané problematice, a naznačuje jeho vědecký potenciál a invenci pro další práci. Výsledky práce byly publikovány v impaktovaných mezinárodních časopisech Genome Biology (IF 10,8), Mol Cell Proteomics (IF 6,5), Plant Reproduction (IF 2,6) a Bioch. Soc. Transactions (3,2) plus předchozí publikace z diplomové práce (Proteomics IF 3,8, Amino Acids IF 3,3), kde je autor prvním nebo dalším autorem. Autor prezentoval své výsledky na celkem 12 mezinárodních konferencích. Již nyní tak kandidát disponuje h-indexem 3, se 76 citacemi, což je velmi dobrý výsledek a odráží vědecký potenciál. V neposlední řadě oceňuji autorovu čtivou formu českého jazyka. Oceňuji aktivitu v popularizaci práce.

Závěrečné shrnutí práce:

Autor prokázal schopnost samostatné experimentální práce, analýzy a interpretace dosažených výsledků. Celkově se domnívám, že předložená disertační práce je na vysoké úrovni a splňuje požadavky pro obhajobu doktorského titulu Ph.D.

Vypracoval:

Ing. Petr Smýkal Ph.D., Katedra botaniky, PřF Univerzita Palackého v Olomouci

V Olomouci dne 12. srpna 2016