



Prof. Michal Hocek, Ph.D., DSc.

Head of Research Team in Bioorganic and Medicinal Chemistry

Oponentský posudek na diplomovou práci

Bc. Šimona Pospíšila

Fenotypizace proteolytických aktivit pomocí fluorogenních knihoven

Pan Šimon Pospíšil ve své diplomové práci měl za úkol vyvinout metodiku fenotypizace peptidových knihoven a to dvěma způsoby: (1) fluorogenními knihovny obsahujícími fluorofor a zhášec a (2) DNA kódováním knihoven. Oba tyto přístupy jsou v principu známé, ale jejich aplikace pro konkrétní peptidové knihovny na pevné fázi bylo netriviální a v laboratoři školitele se jednalo o zcela nové téma, kde chyběly zkušenosti. Z tohoto hlediska se mi téma jeví až nepřiměřeně obtížné a riskantní pro diplomovou práci (odpovídalo by to spíše práci disertační). Diplomant se musel naučit mnoha novým technikám a obrnit se trpělivostí a odolností vůči frustraci z neúspěšných experimentů.

V první části zkonstruoval knihovnu (1,4 milionu) peptidů na pevné fázi, které obsahovaly fluorofor a zhášec, kde úspěšné štěpení peptidového řetězce pepsinem rozsvítilo fluorescenci. Bohužel se nepodařilo peptidy identifikovat pomocí MS kvůli nízkému množství vzorku a nepodařilo se tyto peptidy štěpit furinem a faktorem Xa. Z obou těchto důvodů byla strategie změněna na DNA-kódování knihoven napřed na pevné fázi a potom v roztoku. To vyžadovalo zvládnutí dalších technik, např. DNA ligace a PCR. U vzorového peptidu na pevné fázi se podařilo DNA-tag amplifikovat PCR a osekvenovat. Nakonec se podařilo i syntetizovat DNA-kódovanou knihovnu v roztoku, byť v nízkém výtěžku. V projektu bude skupina Dr. Míška pravděpodobně pokračovat a studovat proteolytické enzymy. Pan Pospíšil udělal první (velice nevděčnou) část projektu tím, že prozkoumal a prošlapal různé cesty, které k cíli nevedly, a nakonec zřejmě ukázal cestu, která po optimalizaci bude fungovat (DNA-kódované knihovny v roztoku).

Diplomová práce je napsána klasickým způsobem a na některých místech je vidět, že byla psána ve spěchu (pravděpodobně se diplomant snažil do poslední chvíle rozchodit syntézy v roztoku). Nicméně jde o práci velmi kvalitní a výsledky, přestože nedotažené do konečné aplikace, jsou pro další výzkum ve skupině Dr. Míška nepochybně velmi důležité. Diplomant se naučil širokou paletu technik od organické syntézy po biochemii a prokázal, že umí překonávat překážky a úspěšně řešit i obtížný projekt.

Pro diskuzi mám jednu otázku, aby diplomant vysvětlil design peptidové knihovny ze Schematu 8 – není zřejmé, proč bylo v druhém řetězci použito 20% D-aminokyselin a jak se to projeví ve výsledné fluorescenci po štěpení proteázou.

Celkově lze jednoznačně diplomovou práci hodnotit jako velmi kvalitní a zcela odpovídající nárokům na tento typ prací. **Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení výborně.**

V Praze 4. 9. 2019

Prof. Ing. Michal Hocek, CSc. DSc.