



## Oponentský posudek

Předkládaná disertační práce Mgr. Michala Rosůlka s názvem „Preparation and characterization of functionalized surfaces for desorption-ionization mass spectrometry“ vychází z 5 publikací v kvalitních recenzovaných vědeckých časopisech; u jednoho z článků je předkladatel prvním autorem, u jednoho sdíleným prvním autorem. Jedná se o zkrácenou formu práce, která sestává z podrobnějšího, obecného úvodu a souhrnného komentáře k přiloženým publikacím. Ty by se daly zahrnout do dvou souvisejících tematických celků.

Prvním je příprava terčů pro hmotnostní spektrometrii s MALDI ionizací, na jejichž povrch jsou za atmosférického tlaku nanášeny proteolytické enzymy pomocí elektrospreje. Štěpení proteinů před hmotnostně-spektrometrickou analýzou tak probíhá přímo na terčů, a nalézá uplatnění při experimentech s částečnou proteolýzou. Této problematice se věnují 2 z předkládaných publikací. Kandidát navíc v samostatné kapitole práce uvádí nepublikované výsledky testování funkcionalizovaných terčů k určování struktury proteinů pomocí vodík-deuteriové výměny. Kandidát zjistil, že pro tyto typy experimentů lze terčů rovněž použít, nicméně i po důkladné optimalizaci měly dosažené výsledky nižší prostorové rozlišení, než je tomu v případě zavedeného postupu v LCMS uspořádání.

Druhý tematickým zaměřením práce je vyhodnocování hmotnostně-spektrometrických dat s vysokým rozlišením pocházejících z různých typů experimentů používaných při určování prostorové struktury proteinů a jejich interakcí. Jeden z předkládaných článků se přímo věnuje úspěšnému vývoji softwarového nástroje, v dalších dvou publikacích předkladatel takovýto nástroj prakticky využívá při určování struktury a interakce receptoru Nkrp1b a určování vlivu chemického síťování na strukturu karbonické anhydrázy I.

Práce je sepsána v anglickém jazyce a kvalitativně sestává ze dvou diametrálně odlišných částí. Obecný úvod v rozsahu 16 stran vyčerpávajícím způsobem shrnuje současné přístupy určování různých úrovní proteinové struktury. Je přehledně strukturovaný, srozumitelně formulovaný, a gramaticky ani odborně k němu nemám výhrady.

Naopak ke Kapitole 4 „Výsledky a diskuze“ mám hned několik připomínek. Jsou v ní nevhodně používány anglické výrazy a sousloví, které byly pravděpodobně původně zamýšleny jinak, a stavba vět ne vždy odpovídá anglické gramatice, což obojí znesnadňuje pochopení textu. V řadě případů jsem si význam textu spíše domýšlel nebo si jej ověřoval v přiložených

**Přírodovědecká fakulta UK**

**adresa:** Albertov 6, 128 00 Praha 2

**telefon:** 221 951 111

**e-mail:** prirodovedecka@natur.cuni.cz

**ičo:** 00216208, **dič:** CZ00216208

**fax:** 221 951 125

**web:** www.natur.cuni.cz



publikacích. Zejména v případě kap. 4.2 shrnující nepublikované výsledky se domnívám, že je to škoda.

Co se týká obsahové stránky, tak kapitola obsahuje podrobné popisy postupů (např. 2. a 3. odstavec na str. 33), které by se spíše hodily do kapitoly „Metody“ nebo bylo možné je vynechat. Na ušetřeném místě by pak bylo možné výsledky lépe zasadit do kontextu (např. zda výsledky na Obr. 10 a 11 odpovídají předpokladu; jak lze srovnat vyvinutý software s do té doby využívanými alternativami co do výpočetní náročnosti, počtu identifikací či jiných charakteristik; co za další signály lze očekávat ve spektrech, když na Obr. 6 neodpovídají majoritní signály peptidům štěpeného proteinu) nebo výsledky více konkretizovat namísto neurčitých vyjádření jako „the sequence coverage was improved as expected“ (str. 34), „an observed deuterium back exchange exceeded our expectations“ (str. 35), „our surfaces were proved efficient enough“ (str. 37). Na rozdíl od přiložených publikací, které tímto neduhem netrpí, musím bohužel také konstatovat, že popisované výsledky jsou jen málo uváděny do širšího kontextu s vědeckou literaturou, o čemž mimo jiné svědčí, že na 21 stranách kapitoly je pouze 10 citací, z nichž dvě jsou na publikace v této práci obhajované.

Po formální stránce považuji práci za zdařilou, jen bych doporučil umístit Obr. 13 až za odstavec, ve kterém na něj je odkaz, a u Obr. 14 v popisku zdůraznil, že se jedná o grafický výstup z jiného než vyvíjeného software, o němž je řeč v doprovodném textu. Na základě seznámení se s protokolem antiplagiátorské aplikace „TURNITIN“ také mohu potvrdit, že předložená práce je práce originální.

K práci mám několik otázek či podnětů k diskusi:

1) U experimentu s vodík-deuteriovou výměnou s následným štěpením proteinu na funkcionalizovaném čipu u Obr. 9 uvádíte, že výsledky 5minutového štěpení jsou oproti 2minutovému velmi neuspokojivé. Co byste ještě považoval za uspokojivé? Jaké je na Obr. 9 procento deuterace po 2 a 5 minutách, a jak vypadá srovnání s experimentem v LCMS uspořádání (obdobně jako u Obr. 10 a 11), pokud máte tyto výsledky k dispozici?

2) Co přesně myslíte harmonizačním procesem na str. 39 u částečné proteolýzy na MALDI čipu? Porovnávali jste pro jednotlivé proteasy např. jejich aktivitu na čipu v porovnání s jejich aktivitou v roztoku, který byl na čip aplikován (po přepočtu na stejné množství enzymu)? Jak se liší aktivita mezi jednotlivými pozicemi čipu? Jak rychle klesá aktivita enzymů

**Přírodovědecká fakulta UK**

**adresa:** Albertov 6, 128 00 Praha 2

**telefon:** 221 951 111

**e-mail:** prirodovedecka@natur.cuni.cz

**ičo:** 00216208, **dič:** CZ00216208

**fax:** 221 951 125

**web:** www.natur.cuni.cz



sprejovaných na terčích, a po jak dlouhé době od funkcionalizace je možné terčích ještě spolehlivě použít?

3) Zohledňuje vámi zavedený parametr „Relative Amino Acid Cleavage Incidence“ (RCI) různou ionizovatelnost peptidů s odlišnou aminokyselinovou sekvencí? Je možné jej na jeho základě odhadnout, do jaké míry jsou jednotlivá štěpná místa za daných podmínek stíněná či nepřístupná, nebo lze na jeho základě pouze určit, že v dané oblasti proteinu došlo ke změně oproti referenci?

4) Řádově jaké jsou vaše náklady na výrobu funkcionalizovaného čipu s různými enzymy?

5) Kolik času odhadem zabral vývoj vyhodnocovacího software, a kolik času byste si ušetřil, pokud byste začínal s jeho vývojem znovu se současnými zkušenostmi?

Závěrem konstatuji, že výzkum poskytl velké množství originálních výsledků a byl splněny hlavní cíle disertační práce, a to jak příprava povrchů funkcionalizovaných proteolytickými enzymy, umožňujících štěpení proteinů a následnou analýzu peptidů pomocí MALDI hmotnostní spektrometrie *in situ*, tak vývoj softwaru usnadňující interpretaci hmotnostně-spektrometrických dat pocházejících z principiálně odlišných typů experimentů. Autor nepochybně prokázal schopnost plánovat a samostatně provádět laboratorní experimenty, včetně jejich vyhodnocení a kritického uvedení do kontextu s odbornou literaturou, čímž splnil předpoklady pro vypracování vědeckého spisu. I přes uvedené připomínky k vlastnímu textu disertační práce ji doporučuji k obhajobě před odbornou komisí, a po úspěšném obhájení udělení titulu Ph.D. kandidátovi.

V Praze dne 7. března 2025.

RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

Katedra biochemie  
Přírodovědecká fakulta UK  
Hlavova 8, Praha 2  
tomas.jecmen@natur.cuni.cz  
Tel.: 224 95 1281

**Přírodovědecká fakulta UK**

**adresa:** Albertov 6, 128 00 Praha 2

**telefon:** 221 951 111

**e-mail:** prirodovedecka@natur.cuni.cz

**ičo:** 00216208, **dič:** CZ00216208

**fax:** 221 951 125

**web:** www.natur.cuni.cz