

Posudek disertační práce

Název práce: Příprava a charakterizace funkcionalizovaných povrchů pro desorpční hmotnostní spektrometrii

Jméno studenta: Mgr. Michal Rosůlek

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Disertační práce Mgr. Michala Rosůlka se zabývá přípravou a charakterizací proteolyticky aktivních povrchů vhodných pro aplikace ve strukturální proteomice, zejména pro metody částečné proteolýzy a vodík-deuteriové výměny (HDX). Tato práce je velmi dobře strukturovaná a detailně popisuje jak teoretické základy, tak experimentální postupy a výsledky.

V teoretické části, autor pečlivě popisuje současné metody a techniky používané ve strukturální proteomice a jejich omezení. Jeho cílem bylo vyvinout nové proteolytické povrchy kompatibilní s MALDI hmotnostní spektrometrií, které by mohly zjednodušit a zefektivnit experimentální postupy. Tento cíl se mu podařilo naplnit, jak je patrné z pěti předložených publikací v kvalitních recenzovaných vědeckých časopisech i dosud nepublikovaných výsledků.

Po formální stránce je anglicky psaný text práce dobře strukturovaný, logicky uspořádaný a srozumitelný s minimálním počtem drobných gramatických a stylistických chyb.

Metodika je pečlivě popsána a experimentální práce na špičkové úrovni. Autor využil širokou škálu metod, včetně ambientního soft-landingu, částečné proteolýzy, HDX, chemického cross-linkingu, bioinformatiky a hmotnostní spektrometrie. Tento unikátní interdisciplinární přístup je jedním z hlavních přínosů práce.

Výsledky jsou prezentovány jasně a přesvědčivě. Autor správně interpretuje data a diskutuje jejich význam v kontextu současných poznatků z oboru. Zvláště oceňuji část věnovanou částečné proteolýze, kde autor demonstruje aplikaci svých proteolytických biočipů na modelovém systému myoglobinu a transkripčního faktoru FOXO4. Tento přístup ukazuje potenciál biočipů pro rychlou a efektivní analýzu proteinů.

Přestože je práce velmi kvalitní, mám drobné výhrady ke kvalitě některých obrázků (např. Fig. 9-11 nebo Fig. 13), které jsou v PDF verzi práce velmi obtížně čitelné. Některé experimentální postupy by mohly být popsány podrobněji. Například na straně 34 podrobnější popis optimalizace HDX experimentu, včetně specifikace přesných podmínek. Na straně 45 podrobnější popis softwarových nástrojů a algoritmů použitých pro zpracování dat z hmotnostní spektrometrie, včetně specifikace parametrů pro LinX. Nebo na straně 46 podrobnější popis funkce Alternative Search a jakým způsobem uživatel definuje pravidla pro vyhledávání, včetně konkrétních příkladů aplikace této funkce na skutečná data. Rozumím, že vzhledem k neexistenci softwarových nástrojů pro anotaci cross-linking dat bylo třeba investovat významné úsilí do vývoje nástroje vlastního. Proto by tomu měla být věnována patřičná pozornost v rámci disertační práce, protože je to také velmi zajímavé téma pro další odborníky v dané oblasti. Dále by bylo vhodné věnovat více prostoru diskuzi o omezeních použitých metod a možných zdrojích chyb.

Závěrem bych se rád zeptal na několik otázek:

1. Mohl byste podrobněji vysvětlit, jakým způsobem jste optimalizoval podmínky pro ambientní ion-landing proteáz na ITO sklíčka? Jaké konkrétní parametry (např. teplota, čas, tlak) jste musel upravit, aby bylo dosaženo maximální účinnosti imobilizace enzymů?
2. Ve své práci uvádíte, že metoda HDX na MALDI biočipech vykazovala vysokou míru zpětné výměny deuteria, což vedlo k nízké reprodukovatelnosti výsledků. Jaké konkrétní kroky byste navrhl pro minimalizaci tohoto problému v budoucích experimentech?
3. Jaké jsou podle vás nejperspektivnější aplikace proteolytických biočipů ve strukturální proteomice a jaké další výzkumné otázky byste chtěl v budoucnu pomocí těchto biočipů řešit?

Disertační práce Mgr. Michala Rosůlka představuje významný příspěvek k oboru strukturální proteomiky. Autor prokázal vysokou úroveň odborných znalostí a schopnost aplikovat je v praxi. Navrhované proteolytické povrchy mají potenciál zefektivnit a zjednodušit experimentální postupy ve strukturální proteomice. Práce je hodnotná a doporučuji ji k obhajobě.

V Brně dne 18. března 2025

PharmDr. Zdeněk Spáčil, Ph.D.