

## OPONENTSKÝ POSUDEK

K posouzení jsem dostal výtisk disertační práce s názvem **Study of conformations and conformational changes of proteins using mass spectrometric methods** (česky Studium konformací a konformačních změn proteinů metodami hmotnostní spektrometrie), kterou vypracoval **Mgr. Alan Kádek** pod vedením školitele Dr. Petra Mana v rámci doktorského studijního programu Biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Po formální stránce má disertační práce charakter spisu kombinujícího autorský text s přílohou souvisejících publikovaných vědeckých prací. Bez příloh je rozsah 58 stran, disertační práce obsahuje shrnutí v jazyce anglickém i českém, dále úvod, stručný přehled použité metodiky, výsledky s diskusí a závěr s hlavními výstupy. Citováno je 162 položek literárních zdrojů. Přílohy obsahují tři publikované práce a jeden rukopis, který byl v době sepsání v recenzním řízení. Ve všech případech jde o články prvoautorské. Jazykem disertační práce je angličtina, dle mého názoru na velmi vysoké úrovni, veškerý text je psán svižně, stručně, čtivě a srozumitelně. Nicméně jsem nacházel v textu pasáže (neplatí obecně a je to zřejmě důsledek toho, jak byl text kompilován z více původních zdrojů), kde byly nedostatky v použití gramatických členů, zejména členu určitého, což je mým námětem pro autora k zdokonalování cizího jazyka. Návrhy úprav jazyka jsem uváděl tužkou přímo v textu.

Teoretická úvodní část disertace se zabývá především metodami pro studium proteinových struktur a jejich změn v biologickém výzkumu. Píše se o rentgenové krystalografii, nukleární magnetické rezonanci a elektronové mikroskopii. V souladu se zaměřením experimentů je detailněji podána pasáž o použití hmotnostní spektrometrie, ať už se jedná o aplikaci přístrojů s iontovou mobilitou, použití činidel pro vytvoření příčné vazby mezi částmi polypeptidového řetězce, které se nacházejí v příhodné vzdálenosti, nebo využití izotopové výměny vodík/deuterium (HXMS). Úvod je zakončen texty o proteolytických enzymech z trávicí šťávy masožravých rostlin (rod *Nepenthes*) a o cellobiosadehydrogenase, což je opět uvedeno logicky se zaměřením. *Text je z mého pohledu zpracován bez připomínek, jedinou drobnou výtkou by snad bylo časté synonymní používání pojmů „metoda“ a „technika“, což považuji za chybu, neboť to není totéž, metoda totiž v principu využívá více technik. V diskusi při obhajobě by bylo vhodné o definicích a správných významech pojmů technika, metoda, metodika, technologie či metodologie pohovořit.*

Výsledková část s diskusí komentuje čtyři oblasti experimentální práce autora a jeho spolupracovníků. Šlo 1) o přípravu a charakterizaci rekombinantní proteasy nepenthesinu, kdy bylo například určeno pH optimum a stabilita vůči denaturaci; 2) imobilizaci tohoto enzymu s určením štěpné specifčnosti pro použití za účelem štěpení proteinových vzorů v protokolech HXMS; 3) analýzu konformačních změn bakteriální cellobiosadehydrogenasy (CDH) v souvislosti s interakcí dvou enzymových domén, která je modulována vápenatými ionty ovlivňujícími povrchový náboj na doménovém rozhraní; 4) využití HXMS a IMMS („iontová mobilita“) pro analýzu konformačních změn CDH při různé hodnotě pH, mírně kyselá a mírně bazická. Součástí byl i vývoj software pro zpracování dat z HXMS. *K této části bych se rád dotázal, zda je možné dát do souvislosti rozdíly mezi štěpnou specifčností nepenthesinu a vepřového pepsinu se zastoupením aminokyselinových zbytků v aktivních místech obou enzymů odvozených z krystalových struktur. Také by mě zajímalo, jaká je souvislost pH optima a konfigurace aktivního místa.*

Autor zvládl kritickou práci s odbornou literaturou, samostatné plánování a provádění laboratorních experimentů, včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Prokázal tvůrčí vědecké schopnosti v dané oblasti výzkumu a jeho práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce v daném oboru. Závěrem je moje jednoznačné doporučení k obhajobě disertační práce před odbornou komisí.

V Olomouci dne 26. 8. 2016

Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.