

## Posudek diplomové práce

Autor: Šimon Pospíšil

Oponent: RNDr. Jiří Míšek, PhD.

Název diplomové práce: **Fenotypizace proteolytických aktivit pomocí fluorogenních knihoven**

Výchozím bodem předkládané práce byly autorovi výsledky jeho práce bakalářské, ve které ukázal možnost přípravy fluorogenních peptidů na sférických částicích porézního skla a možnost jejich štěpení nescifickými proteázami. Cílem práce diplomové bylo využít tohoto přístupu k přípravě kombinatoriální knihovny fluorogenních peptidů na pevné fázi porézního skla a následné použití této knihovny k určení substrátových specifit jednotlivých proteáz a jejich komplexnějších směsí např. krevního séra. Takovýto nástroj by umožnil velmi efektivní sledování proteolytických aktivit ve fenotypech souvisejících s různými chorobami.

Autor tedy využil techniky split-and-mix pro přípravu kombinatoriální knihovny fluorogenních peptidů na porézním skle. Tato knihovna se ukázala jako efektivní při testování aktivity trávicích proteáz. Nicméně velmi malé množství peptidů zbývajících na částicích porézního skla znemožnilo určení přesné sekvence peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Proto autor přistoupil k paralelnímu kódování peptidové sekvence pomocí DNA. Tento přístup zajistil snadnou detekci signálu z jediné částice pevné fáze. Při testování knihovny s proteázami s vyšší specifitou se ovšem ukázalo, že ke štěpení peptidů nedochází, a to patrně vlivem blízkosti peptidu ke kotvící pevné fázi. V tento moment jsme se rozhodli změnit celou strategii a DNA kódovanou knihovnu peptidů připravit v roztoku bez přítomnosti pevné fáze. V této části autor prokázal možnost přípravy peptidové knihovny kódované pomocí DNA. Přesto, že výtěžek této knihovny je velmi nízký, poskytl tento projekt velmi cenný základ pro další studium těchto knihoven v naší laboratoři.

Autor si při tomto multidisciplinárním projektu osvojil řadu technik syntézy na pevné fázi i ve vodných roztocích a též biochemických experimentů a práce s DNA. Autor se aktivně a samostatně podílel na řešení tohoto projektu a prokázal schopnost se vypořádat s nemalými překážkami, který tento projekt přinesl. Samotná diplomová práce je sepsána standardním způsobem a členěna do tradičních kapitol.

Z formálního hlediska práce splňuje všechny předpoklady a doporučuji ji tímto k dalšímu řízení a navrhuji hodnocení stupněm výborně.

V Praze dne 13. 9. 2019

RNDr. Jiří Míšek, PhD.