



Posudek na disertační práci Mgr. Rudolfa Kupčíka s názvem

## **New materials and techniques for separation and analysis of clinically important proteins**

Disertační práce je obhajována na Fakultě chemické technologie Univerzity Pardubice, školitelkou byla Prof. Zuzana Bílková, konzultantem Dr. Pavel Řehulka. Po formální stránce jde o kombinaci autorského textu a příloh s publikovanými vědeckými texty a bibliografickými údaji autora. Celkový rozsah je 212 číslovaných stran, seznam citované literatury čítá bez mála 300 položek. Text má všechny potřebné náležitosti, tedy adekvátní členění, úpravu a slohovou úroveň. Zvoleným jazykem je angličtina, kterou z pohledu nerodilého mluvčího mohu hodnotit jako dobře srozumitelnou bez výrazných stylistických i gramatických prohrěšků. Disertace obsahuje anotaci, shrnutí v jazyce anglickém i českém, seznam použitým zkratk. Nejdůležitějšími částmi jsou: 1) úvod s výsledky rešerše odborné literatury; dále 2) experimentální část, kde jsou představeny cíle a přehled řešených výzkumných projektů s dosaženými výsledky, vše je doplněno přílohami publikací; 3) formulování závěrů a budoucích vizí. Přílohových publikací je 7, jde o 6 článků v časopisech a 1 patent. Rudolf Kupčík je 3x prvním autorem článku (Applied Materials and Interfaces, Journal of Separation Science, ACS Omega), 1x druhým autorem (Analyst), 2x ostatním spoluautorem (Process Biochemistry, FEMS Yeast Research). Tyto články jsou v časopisech s impaktovým faktorem, tedy s garancí standardní kvality recenzního řízení. Dále je prvním autorem zmíněného patentu. Mimo hlavní části disertační práce jsou v příloze doloženy i další spoluautorské publikační počiny včetně patentové žádosti a několika příspěvků na vědeckých konferencích.

Hlavním zaměřením je využití separačních metod pro studium proteinů s fokusem na fosfoproteiny a fosfopeptidy. V úvodu disertační práce se popisuje význam, fyziologické a patologické souvislosti posttranslačních modifikací proteinů, zejména fosforylace. Dále jsou zmíněny umělé modifikace proteinů a jejich možné využití, např. pro afinitní chromatografickou purifikaci. Moderní materiály (např. polymery, oxidy kovů, magnetické nanočástice), používané nejen pro chromatografii, jsou pak představeny v následujících textových pasážích. Další kapitoly jsou věnovány technikám pro obohacení fosfoproteinů a fosfopeptidů. Konečně se komentují postupy proteinové analýzy v proteomice včetně chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Jedná se o vyčerpávající text s bohatým citováním originálních zdrojů, nicméně bych byl býval uvítal zpracování některých výrazně popisných částí spíše ve formě tabulek.

Komentáře a dotazy k této části disertační práce:

- *Odpovídá citace 6 skutečně odkazovaným sestřihům mRNA? Odpovídají citace 111 a 115 odkazům na SiO<sub>2</sub>?*
- *Citace 73 není citována v pořadí.*
- *V přehledu citovaných zdrojů není jednotné psaní velkých písmen v názvech.*
- *Na str. 42, jak je myšleno, že z jedné MS analýzy lze identifikovat tisíce proteinů? Nemyslí se tím jedna (n)LC-MS analýza?*

Výsledky jsou prezentovány v kapitolách spojených s odpovídajícími přílohovými texty. Cíle jsou formulovány jako snaha vyvíjet nové metodické přístupy pro přečištění biomolekul ze složitých směsí, včetně modifikování dostupných materiálů, nebo využití materiálů nových. Specifikem byla práce s fosfopeptidy pro analýzu fosfoproteinů a použití nanotrubičkového materiálu na bázi oxidu titaničitého včetně varianty s vázanými nanočásticemi oxidu železato-železitého. Klíčovou detekční metodikou byla hmotnostní

spektrometrie. Vzájemné propojení všech dílčích projektů velmi zdařile ilustruje schéma na obr. 10. Dalšími cíli byla izolace bazického proteinu hydrofobinu a optimalizace použití imobilizovaných proteinů ve výzkumu.

Podíl Rudolfa Kupčíka na dosažených publikačních výstupech disertační práce je nesporný a pro úspěch s publikováním zásadní případně velmi důležitý, jak je dokumentováno. K izolaci modelového rekombinantního proteinu s histidinovou kotvou byl optimalizován postup zachycení a eluce na novém nanotrubičkovém materiálu pokrytém magnetitovými nanočásticemi. Získán byl čistý (homogenní) protein, a to i z komplexního buněčného lyzátu. Materiál byl potvrzen jako vhodný i pro purifikaci fosfopeptidů pro proteomické analýzy. Jeho využití je i podstatou českého/mezinárodního patentu, pro jehož zkompletování byly autorem disertační práce provedeny a optimalizovány demonstrační analýzy a odpovídající protokoly. Vypracována byla dále účinná a selektivní metoda pro izolaci vysoce hydrofobního proteinu (hydrofobin) z houby klanolístky obecné (*Schizophyllum commune*). Principem byla interakce s teflonovými mikročásticemi v mikrokolonce. Tento postup umožnil následující charakterizaci intaktního proteinu i štěpných peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Trypsin imobilizovaný na nanočásticích pokrytých magnetitem byl úspěšně využit pro proteolýzu a ve srovnání s komerční imobilizační strategií bylo dosaženo vyšší aktivity a specifičnosti štěpení. Imobilizované kinasy byly s pozitivním efektem vyzkoušeny pro fosforylaci peptidových substrátů a rekombinantního proteinu tau, což je biomarker Alzheimerovy choroby. Byly analyzovány rekombinantní domnělé kvasinkové fosfatasy, nepotvrdilo se, že enzym defosforyluje fosfopeptidy, nicméně byly nalezeny jiné nízkomolekulární sacharidové substráty.

Komentář k výsledkům:

- *Ve vysvětleních autorského příspěvku jsou věty bez přísudku.*

Dotazy:

- 1) *Proč nebylo možné použít pro izolaci hydrofobinu nějaký zavedený chromatografický materiál, například s fenylowymi, nebo oktylovými funkčními skupinami?*
- 2) *Jak se dá vysvětlit nestabilita rekombinantních fosfat, které bylo nutné pro zjištění substrátové specifičnosti podržet v imobilizovaném stavu? Byla důvodem exprese v prokaryotním organismu bez možnosti posstranlašních modifikací?*

Závěry disertační práce konstatují, že bylo dosaženo cílů spojených s inovativními přístupy proteinové analýzy s využitím moderních materiálů pro zpracování vzorku. Autor se zabýval komplexní problematikou na rozhraní několika vědních oborů, analytické chemie, biochemie, proteomiky a biotechnologie. Nanotrubičky byly úspěšně využity pro záchyt fosfopeptidů a rekombinantních proteinů s histidinovou kotvou. Podobně byl na teflonových částicích získán protein hydrofobin. Úspěšné byly i experimenty s imobilizovanými enzymy. Autor konstatuje výhodnost multioborové spolupráce a předpovídá budoucnost separací na mikro- a nanočásticích, jejichž spektrum se neustále rozšiřuje díky mnoha týmům, které se problematice celosvětově věnují.

Autor disertační práce předvedl schopnost kritické práce s odbornou literaturou, samostatné plánování a provádění laboratorních experimentů, včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Cením si zejména konzistence dílčích vědeckých projektů, které se drží nosného tématu separace a analýzy proteinů. Mgr. Rudolf Kupčík prokázal jednoznačným způsobem tvůrčí schopnosti v oblasti výzkumu a splnil tak předpoklady pro úspěšné zakončení doktorského studia. Disertační práci proto doporučuji k obhajobě.

Prof. Marek ŠEBELA

V Olomouci dne 15. 6. 2019