



ÚOCHB ^{AV}
^{ČR}
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Oponentní posudek na disertační práci Mgr. Tomáše Pazderky

„Study of protein structure and dynamics by means of optical spectroscopy“

Předložená disertační práce je zaměřena na hlubší pochopení struktury a dynamiky proteinů studované pomocí metod vibrační spektroskopie. Práce shrnuje nový a originální výzkum, jehož výsledky byly publikovány v renomovaných vědeckých časopisech (7 publikovaných článků v impaktovaných časopisech a jednu práci zaslanou, přičemž u tří je předkladatel zároveň prvním autorem.). Práce je zpracována jako relativně ucelený text shrnující podstatnou část kandidátova výzkumu, je logicky strukturovaná a přiměřeně dlouhá. Rozsah výsledků odpovídá několikaleté samostatné práci. Celkový dojem je nadprůměrný, práce je graficky dobře zpracovaná a dojem neruší žádné nepřesnosti, nelogičnosti nebo nejednoznačné definice. Práce je napsána velmi kvalitní angličtinou.

Disertace je rozdělena do několika oddílů. Teoretická část obsahuje stručný úvod do struktury a dynamiky proteinů a přehled použitých experimentálních metod, jejich princip a použití. Trochu mi zde chybí širší rešerše na publikované práce na studium chování proteinů pomocí VCD a ROA. Samotná práce zpracovává jak metodiku pro rozšířené použití zvolených metod (intenzitní korekce pro Ramanovu a ROA spektroskopii, 2DCoS) při studiu proteinů, či vývoj nových postupů (VCD mikroskopie), tak se zabývá praktickými příklady použití jednotlivých metod pro studium proteinů, či jejich částí (neplanarity amidů, Ramanova spektroskopie aminokyselin, interakce proteinů s ligandy nebo studium struktury fibril). Práce posouvá možnosti použití chiroptických metod při studiu biomakromolekul (zejména bych vyzdvihl pilotní studii na VCD mikroskopii, studium oligomerizace pomocí 2D spektroskopie, nebo DCDR), což může přinést nové poznatky o chování proteinů za různých, často i extrémních podmínek. Nutno podotknout, že většina experimentálních postupů je provedena s extrémní precizností, což kvalitu práce jen zvyšuje. Možná bych jen trochu vytknul tematickou neucelenost, kde se střídají jak použité techniky (Raman, ROA, VCD), tak studované jevy (neplanarity, ligand binding, tvorba fibril). Možná by bylo lepší vybrat dvě témata a studovat je zejména pomocí kombinace různých metod a zapojit nově vyvinuté postupy.

K předkládané práci mám jen drobné dotazy, či připomínky, které by měly spíše otevřít prostor k diskusi nad zajímavým a důležitým tématem a neměly by být brány jako výrazná kritika předkládané práce.



ÚOCHB ^{AV}
^{ČR}
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Otázka 1: Při použití VCD instrumentu s dvěma extra čočkami pro mapování fibril (kapitola 2.1.2) byly nejprve použity f/3 čočky, poté byl stejný vzorek mapován za použití f/1 čoček. Jaká je stabilita fibril v čase? Nezmění se za dobu jednoho měření struktura vzorku? Proč jsou VCD spektra u obrázku 2.8 přerušena v oblasti kolem ca. 1500 cm^{-1} , zatímco IR spektra jsou kontinuální v celém rozsahu? Jak autor vidí možnost využití ROA pro obdobné účely? Fibrily byly zkoumány pomocí ROA například v Kessler et al. PCCP 2017, 19, 13614.

Otázka 2: V kapitole 2.1.3 autor rozebírá neplanaritu amidů a zmiňuje, že byly nalezeny charakteristické signály pro detekci neplanarity u amidů. Které to jsou? Autor rovněž zmiňuje, že publikovaný dataset lze využít jako testovací nástroj pro studium anharmonických korekcí v C-H a C-D oblasti ROA spekter. Zajímalo by mě, zda autoři provedli nějaké anharmonické výpočty pro modelové spirosloučeniny. Závěrem kapitoly se píše, že práce byla provedena na silně rigidních systémech a že dalším krokem by mělo být studium flexibilních systémů. Jelikož byla práce publikována v roce 2013, zajímalo by mě, jakým směrem se tedy autoři vydali.

Otázka 3: V kapitole 2.1.4 o Ramanově spektroskopii aminokyselin autor porovnává Ramanova spektra v krystalové formě, v roztoku a ve formě amorfního „skla“. Nemám zkušenosti s Ramanovými spektry krystalů. Zajímalo by mě, zda je autor schopen rozpoznat např. různé polymorfní formy krystalů, případně rozeznat monokrystal od solvátu nebo kokrystalu. Při pohledu na prezentovaná spektra by mě zajímalo, proč nejsou spektra vodných roztoků změřena ve stejném rozsahu jako krystalů (tedy pod 500 cm^{-1}). Spektra byla měřena za použití dvou různých přístrojů s dvěma různými laser (532 a 632 nm). Má rozdíl nějaký vliv na výsledek? Spektra Tyrosinu a Prolinu mi připadají v porovnání s ostatními daleko více strukturovaná (výraznější a ostřejší pásy). Čím si to vysvětlujete?

Otázka 4: Kapitola 2.2.1 se zabývá 2D korelační analýzou VOA spekter, nicméně praktické použití při studiu oligomerizace proteinů je ukázáno za pomoci IR a Ramanovy 2DCoS. Jak autor vidí možnosti použití ROA a VCD pro stejné účely ve formě 2DCoS?

Otázka 5: Kapitole 2.2.3 se zabývá studiem vlivu interakce ligandu s proteinem na jeho stabilitu a dynamiku pomocí Ramanovy spektroskopie. V související publikaci se autor letmo zmiňuje o vlivu glykosylace na ligand binding u AGP. Můžete to blíže vysvětlit? Bylo by možné pro studium teplotní stability použít i například ROA? Jak stabilní musí být protein-ligand komplexy aby je bylo možno studovat popisovanou metodou?

Je dobré si uvědomit, že kandidát strávil podstatnou část roku 2012 a 2013 na pracovištích společnosti BioTools Inc., kde pracoval pod vedením např. prof. Nafieho, který je přední osobností v oboru vibrační optické aktivity, což se na kvalitě předkládané práce



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

jistě podepsalo. Závěrem bych konstatoval, že předkládaná práce splňuje veškeré požadavky kladené na disertační práci, a proto ji s potěšením doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.

V Praze dne 27. 08. 2018

Ing. Jakub Kaminský, Ph.D.
ÚOCHB AV ČR
Flemingovo nám. 2
166 10 Praha