

## Posudek školitele na diplomovou práci

Název práce: Nekovalentní interakce tryptofanu ve struktuře proteinu

Autor: Albert Sokol

Diplomová práce Alberta Sokola navazuje na problematiku, která se již delší dobu experimentálně řešila v naší laboratoři. Konkrétně šlo o úlohu dvou tryptofanových zbytků ve struktuře a funkci proteinu FrpC, který vykazuje unikátní samoštěpící aktivitu. Tyto tryptofany jsme zkoumali pomocí spektroskopických metod a podařilo se nám vypočítat, v jaké jsou od sebe vzdálenosti a jakou mají nejpravděpodobnější vzájemnou orientaci. Poměrně zásadní otázka byla, jestli je takové nalezené uspořádání Trp reziduí pro strukturu proteinu stabilizující, jestli je typické i pro jiné proteiny, nebo zda se jedná o spíše unikátní konfiguraci. Nejjednodušším způsobem, jak nalézt věrohodnou odpověď (kromě literární rešerše) byl průzkum dostupných vyřešených proteinových struktur v databázi PDB. Naopak výpočet volné energie nalezeného Trp-Trp komplexu pro nás nebyl reálně proveditelný. Albert tedy analyzoval všechny dostupné modely struktur proteinů z PDB a narazit při tom na celou řadu zásadních problémů, z nichž se odvozovaly jednotlivé průběžné cíle a úkoly. Kromě výzkumu Trp-Trp komplexu zkoumal i veškeré ostatní aminokyseliny v okolí tryptofanu. Prvním úkolem bylo vyjmout z analýzy opakující se homologní proteiny, protože by takový „uměle obohacený“ výskyt konkrétní konfigurace aminokyselin znemožnil nalézt skutečné reprezentativní preferované uspořádání. Albert vyvinul vlastní postupy pro hledání homologních proteinů. Postup je zaměřený na sekvenci bezprostředního okolí zkoumaného rezidua (nebo na prostorově blízké aminokyseliny), kdy je naopak ignorována vzdálená část proteinu. Výsledkem bylo velmi dokonalé odstranění nadbytečných homologních proteinů, ale množství zkoumaných dat zůstalo stále obrovské. Díky tomu následná analýza mohla odhalit i relativně vzácné konfigurace reziduí, což v jiných pracích nebývá běžné. Další zjištění například bylo, že nemá cenu zkoumat reprezentativní orientace u reziduí, která jsou v sekvenci příliš blízko, neboť sterické zábrany nedovolí výskyt energeticky nejvýhodnějšího uspořádání postranních řetězců aminokyselin. Albert proto zkoumal konfigurace reziduí, pouze pokud jsou v sekvenci vzdálenější, než deset reziduí. Další konkrétní průběžné cíle práce a otázky jsou uvedeny v práci na straně 3. Např.: Existují skutečné tendence jednotlivých aminokyselin vyskytovat se v blízkosti indolu? Nemohou sekvencně blízké aminokyseliny narušovat výsledky analýz? Jaký vliv mají sekundární struktury proteinů? V jaké nejdelší vzdálenosti se dá prokázat „nenáhodnost“ uspořádání dvou tryptofanů?

Práce byla vytvářena poměrně dlouhou dobu, je psána velmi pečlivě a s jednoznačnou snahou, aby byly pochopeny detaily prováděného postupu. Albert sám vyžadoval pravidelné a časté konzultace. Práce obsahuje více než 60 obrázků a schémat, která dobře znázorňují pracovní postup a získané výsledky. Albert se projevil jako velmi pečlivý a precizní člověk, který potřebuje mít zcela pod kontrolou systém, který zkoumá. S výzkumem izolovaných proteinů in vitro tedy naprosto nebyl spokojen.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:** Co se týká splnění konkrétních cílů, tak je situace poněkud složitější. Při častých diskuzích nad získanými výsledky se objevilo značné množství nápadů, hypotéz a otázek, na které Albert zatím nedokázal odpovědět. Většinou by byla potřeba další podrobná analýza dat. Poměrně velká část již získaných výsledků i teoretických úvah tedy není v diplomové práci ani obsažena. Samotná práce by tedy vlastně musela být ještě o něco rozsáhlejší, aby byla opravdu kompletní. Albert se také úmyslně vyhýbal některým kvantifikacím a statistickému hodnocení a vystačil si s grafickým znázorněním nalezených trendů.

**Předloženou práci pokládám za jednoznačně kvalitní, doporučuji ji k obhajobě a hodnotím ji stupněm „výborně“.** Velmi mě mrzí, že se Albert rozhodl nepokračovat v doktorském studiu. Výsledky, ale i samotné metody, z jeho diplomové práce plánujeme každopádně publikovat.

Kromě výše zmíněného, řeší Albert v naší laboratoři celou řadu poměrně náročných úkolů, které spolu mnohdy příliš nesouvisí. Do této chvíle je spoluautorem dvou publikací:

Gabriela Seydlová, Albert Sokol, Petra Lišková, Ivo Konopásek, Radovan Fišer, Daptomycin pore formation and stoichiometry depends on membrane potential of target membrane, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2018).

Tereza Dolejšová, Albert Sokol, Juraj Bosák, David Šmajš, Ivo Konopásek, Gabriela Mikušová, Radovan Fišer, Colicin U from *Shigella boydii* forms voltage-dependent pores, *Journal of Bacteriology* (v recenzním řízení).

V těchto člancích se Albert zasloužil o vývoj programu pro analýzu vodivostních dat z planárních lipidových membrán. Dále připravil program pro tvorbu pokročilých histogramů s logaritmickým tříděním dat a s použitím metody Kernel Density Estimation. Tyto programy jsou v naší laboratoři využívány prakticky každý den.

V Praze dne 23.8.2019

Radovan Fišer, školitel