



Posudek oponenta na diplomovou práci

Oponent: RNDr. Jan Blahut, Ph.D.

Autor práce: Bc. Zuzana Osifová

Školitel: doc. RNDr. Martin Dračinský, Ph.D.

Název: Mezimolekulové vodíkové vazby studované pomocí NMR spektroskopie¹

Navrhované hodnocení: výborně

V předložené diplomové práci se autorka věnuje studiu interakcí mezi deriváty dusíkatých bází, především adeninu a thyminu. Kombinuje přitom několik metod založených na nukleární magnetické resonanci (NMR) a kvantově chemické výpočty (DFT). Celkově je práce velmi dobře a konzistentně sepsána a téma je zpracováno do hloubky umožňující brzkou publikaci v odborném periodiku.

Úvod práce obsahuje několik podkapitol zahrnujících solidně shrnuté teoretické základy NMR spektroskopie, podrobnější analýzu vlivy symetrických výměnných procesů na NMR spektrum a především rozsáhlou kapitolu věnovanou vodíkovým interakcím a jejich významu pro strukturu nukleových kyselin. V poslední části je pak shrnuta již zavedená NMR metoda pro studium těchto interakcí. Ta je založená na výpočtu rovnovážných konstant vzniklých komplexů vázaných vodíkovou vazbou (dále jen komplexů) na základě relativních změn integrálních intenzit signálů rotametrů jednoho z vazebných partnerů.

V části věnované výsledkům a diskuzi je tato metoda aplikována na několik *N*-methyl derivátů adeninu. Takto jsou získány termodynamické parametry bráněné rotace *N*-methylových skupin a rovnovážné Gibbsovy energie vniku komplexu adeninu s thyminem. Autorka následně upozorňuje na limitace této metody a dále se věnuje studiu stability supramolekulárních komplexů analýzou změn chemických posunů. Tou dospěje k obdobným termodynamickým parametrům pro celou řadu derivátů adeninu i thyminu, díky čemuž dokáže odlišit jednotlivé typy komplexů (Watson-Crick či Hoogsteen).

Rozsáhlá závěrečná část výsledků a diskuze je věnována teoretickým simulacím. Zde autorka s velkou pečlivostí prostudovala vazebné energie všech možných dvousložkových komplexů derivátů adeninu a thyminu a také vliv vzniku těchto komplexů na chemický posun atomu vodíků zahrnutého ve vazbě. Získané vazebné energie sice kvantitativně neodpovídají pozorovaným veličinám, avšak kvalitativně poukazují na stejné trendy, což je v práci adekvátně diskutováno.

K textu práce mám jen několik drobných výhrad, jejichž zohlednění by, mimo jiné, přispělo srozumitelnosti patřičných kapitol:

- 1) Modely použité pro analýzu dat nejsou vždy kompletně vysvětleny. Především rovnice 1.10 (str. 25) pro závislost rovnovážné konstanty (K_2) vzniku komplexu na analytických koncentracích a rovnováze mezi rotaméry není všeobecně známý vztah a vychází z některých předpokladů, jež nejsou v práci zmíněny. Především autorka neuvádí zanedbání vzniku komplexu interakce jednoho z rotametrů ($[AL] = 0$). Odvození rovnice 1.10 je sice možné

¹ Práce je zpracována v anglickém jazyce, avšak v rámci jazykové konzistentnosti během obhajoby přednesené v češtině je vypracován česky.



nalézt v ESI reference 67, ale v diplomové práci, jakožto souhrnném díle, by mělo být také naznačeno. Zároveň není hlouběji popsána analýza závislosti chemických posunů na koncentraci (str. 43). Přestože autorka uvádí, že samotné „fitování“ prováděl kolega, očekával bych alespoň nastínění použitého matematického modelu.

- 2) Některá tvrzení nejsou podložena referencí do literatury ani dokázána experimentálně. Například (str. 28): „Four-bond correlations are usually observed when the bonds between the coupled nuclei have the shape of “W”. Prosím tedy obhajují o nastínění příčiny tohoto jevu.
- 3) Při DFT výpočtu vazebných energií komplexů jako rozdílu v energiích komplexu a jednotlivých jeho komponent není zmíněna chyba vyvolaná využitím konečné báze, rozdílně velké v jednotlivých výpočtech (tzv. Basis set superposition error, BSSE). Jakým způsobem autorka postupovala při eliminaci této chyby?
- 4) V obrázcích 3.24 a 3.25 chybí jednotky energie. Pokud se, jak předpokládám, jedná o kJ/mol jsou pozorované rozdíly velmi malé a prosím autorku aby diskutovala typickou spolehlivost energií získaných použitým funkcionálem hustoty (popř. bází).
- 5) V textu není nikdy zmíněna metoda použitá pro výpočet tenzoru chemického stínění σ na základě elektronové hustoty získané DFT výpočtem. Jak byl tento výpočet proveden?
- 6) Přestože výsledkem práce jsou jak experimentální chemické posuny vodíkových atomů v jednotlivých komplexech, tak teoreticky předpovězené stínící konstanty úzce spojené s chemickým posunem vztahem 1.6 a 1.7, autorka nikdy tyto dva parametry nesrovnává. Jaká je jejich shoda, případně jak a proč se liší? Stejně tak postrádám porovnání rovnovážných konstant či Gibbsových energií získaných pomocí integrace teplotně závislých spekter a regresí ze změn chemických posunů.

Celkově se jedná o velmi konzistentně zpracovanou práci, napsanou povětšinou čtivým jazykem, obsahující kompletní vědecký „příběh“. Oceňuji také autorky kritické zhodnocení experimentálních dat, v němž objektivně analyzuje jejich spolehlivost a nevyvozuje z nich přehnané závěry. Kupříkladu na straně 33 se nesnaží analyzovat reakční entalpii/entropii a přiznává nedostatečnou šířku teplotních závislostí.

Kvalita práce je celkově velmi nadprůměrná, blíží se práci dizertační a bude-li řádně obhájena, včetně zodpovězení výše uvedených otázek, doporučuji jí hodnocení nejvyšší – **výborně**.

Následující poznámky mají za účel spíše navrhnout možná zlepšení pro publikaci plnohodnotného článku, nežli zdůrazňovat chyby této nadprůměrně kvalitní práce. Nevyžadují jich kompletní diskuzi. Avšak autorka může zvážit zahrnutí některých bodů do obhajoby.

- 1) Část úvodu věnovaná metodě stanovení konstant stability pomocí integrálních intenzit je zamýšlena také jako příprava pro souhrnné review. Zvážil bych diskuzi metodiky integrace signálů. Především s ohledem na překryvy signálů a významnou dispersní komponentu přítomnou v signálu při rychlostech výměny blízkých ko-



- lescenci. Byly učiněny snahy o určení rychlosti výměny rotamérů pomoci analýzy tvaru signálů (např. skriptem Asimexfit, či podobným)? [Římal et al. *Concepts Magn. Reson. Part A*, 2011, **38A**, 117–127]
- 2) Přiřazení NMR signálů jednotlivým rotamérům adeninového derivátu **1a** a **1b** se mimo jiné opírá ^1H , ^{13}C -HMBC experiment. Závěry by jistě podpořila prezentace výřezů HMBC spekter.
 - 3) Na obrázcích 3.16–3.18 jsou zobrazeny závislosti chemických posunů na koncentraci. Především u prvních dvou jmenovaných je chemický posun uveden s velkou přesností (až tři desetinná místa) a rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi jsou malé – podobného řádu jako vlastní pološířka signálů. Bylo by proto vhodné připojit k bodům chybové úsečky zdůrazňující významnost/nevýznamnost pozorovaných závislostí a nastínit spolehlivost získané lineární regrese.
 - 4) Data prezentovaná v Tabulce 3.1 nejsou v textu diskutována a označení chemických posunů zavedené v této tabulce (NH – *pro*-H) není vysvětleno a ani se dále v textu nepoužívá.
 - 5) Některé zkratky často nejsou v textu vysvětleny ani při prvním použití (Např. SAM, SMRT etc.).
 - 6) Na straně 29 patrně došlo k překlepu měnicím význam: „lower/higher temperature“. Nebo opravdu dochází k překryvu čar znemožňujícím integraci při nižší teplotě?

Na závěr dodávám několik doplňujících témat k případné diskuzi.

- V úvodní části věnované NMR dynamických systémů (str. 11) autorka prohlašuje, že chemický posun a spin-spinové interakce mohou být v přítomnosti reverzibilních procesů závislé na teplotě. Jsou však skutečně ovlivněny tyto interakce, nebo se pouze jinak projevují v pozorovaných spektrech?
- DFT optimalizace všech studovaných geometrií byla provedena „pouze“ s implicitní simulací rozpouštědla metodou polarizovaného kontinua. V reálu je ale minimálně jeden z partnerů vázán na molekulu nukleové kyseliny, která bude mít jistě na geometrii a stabilitu vzniklého komplexu vliv. Jakým způsobem, experimentálně, teoreticky, či pomocí simulace, by autorka zahrнула tyto vlivy v případném pokračování obhajovaného projektu?
- Teoretické simulace prezentované v práci ukazují, že deriváty se methylaminovými substituenty tvoří pevnější vodíkové vazby než deriváty s primárními aminy. (str. 47) Jak si autorka tento jev vysvětluje, případně lze ho zobecnit na vztah mezi bazicitou aminů a jejich ochotou tvořit vodíkové vazby?

Jan Blahut
V Praze 29.6.2020