

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Františka Filandra

Disertační práci s názvem **Structural characterization of biotechnologically and medically important proteins** autora Mgr. Františka Filandra jsem měl k dispozici v elektronické formě. Práce je obhajována v doktorském studijním programu Biochemie, školitelem byl Dr. Petr Man. Formální stránka je v pořádku, práce je psána anglicky, text je kombinovaný, tedy kromě vlastní autorské části obsahuje *in extenso* přílohy publikovaných odborných vědeckých článků a článku v recenzním řízení. Text má obvyklé členění se shrnutími v anglickém i českém jazyce, úvodem s rešerší související odborné literatury, přehledem cílů práce, použitých metod a postupů, částí výsledkovou spojenou s diskusí, závěrem a bibliografickými údaji. Diskutované výsledky jsou odkazem na přiložené publikace a prošly již standardní vědeckou recenzí. Pokud mohu jako nerodilý mluvčí posoudit úroveň jazyka, považuji jej za bezproblémově srozumitelný. Text je věcný, s ověřenými a opodstatněnými tvrzeními. Chyby, jsou-li nějaké, vyplývají pouze z editace textu, viz následující příklady:

Zkratky – psát kurzívou latinské názvy organismů, HDX-MS vysvětleno se záměnou slov;

zkratky v tabulce 1 na str. 20 nejsou vysvětleny;

legenda k obr. 6, správně „dependence“, „are not shown“;

legenda k obr. 8., správně „Scheme“;

Str.40, správně „leach“ namísto „leech“;

na str. 12 v přílohové publikaci III (rukopis) je uvedena hodnota $40\pm 50^\circ$, předpokládám, že se jedná o překlep.

V úvodu se autor zabývá strukturou proteinů a jejími úrovněmi (primární až kvarterní), vztahem mezi strukturou a funkcí proteinů a patologickými procesy odvislými od chyb v proteinové struktuře. Následuje kapitola o metodách studia prostorové struktury proteinů s důrazem na rentgenovou krystalografii, NMR spektroskopii a kryoelektronovou mikroskopii. Vysvětleny jsou výhody i nedostatky. Přestože nebyly tyto metody využity v rámci experimentální práce, zdá se mi jejich popis příliš stručný. V případě rentgenové krystalografie postrádám záležitosti řešení fázového problému, u NMR mohl autor více rozepsat obecné záležitosti měření vícerozměrných spekter a korelaci spekter více typů jader. Takto se omezil víceméně na definici této spektrální techniky. V souladu se zaměřením je těžiště úvodní části v popisu použití hmotnostní spektrometrie (MS) shrnujícím měkké ionizační techniky, MS intaktních proteinů a spojení MS s kovalentním značením proteinů a izotopovou výměnou H/D. Tato část úvodu je napsána vyčerpávajícím způsobem. Důraz je kladen na izotopovou výměnu a její důležitost pro posuzování dynamiky proteinové struktury jako doplnění fundamentálních dat např. z rentgenové krystalografie a to včetně metodických variant. Vše je uzavřeno částí o biodegradaci dřeva, struktuře celulosy a ligninu, dřevokazných houbách a celulólytických enzymech nebo fotoreceptorových doménách proteinů (a jejich strukturně-funkčních aspektech). Tím je čtenář plnohodnotně uveden do řešené problematiky.

DOTAZ: Na jakých jiných biologických akceptorech, kromě lytické polysacharidové monooxygenasy (LPMO), může končit přenos elektronů z cytochromové domény celobiosadehydrogenasy (CDH)? A naopak, jaké jiné proteinové (enzymové) donory pro LPMO, kromě CDH, jsou známy?

Metodická část je podána jen stručně s odkazem na přílohové texty publikací, s čímž nelze jako s řešením nesouhlasit. Cíle práce jsou přehledem naplánovaných experimentů pro posouzení strukturních vlastností zvolených proteinů.

Výsledky s diskusí tvoří dvě tematické části. V prvním případě jde o studium houbových enzymů celulólytické dráhy: LPMO a CDH. Pro strukturní analýzu vzájemného kontaktu obou enzymů byla použita

H/D výměna spojená s MS. Byla analyzována směs LPMO a CDH v přítomnosti celulosy, interagující enzymy byly štěpeny v enzymových reaktorech s proteasami. Byly získány poznatky o změnách a dynamice struktury LPMO v důsledku redukce mědi v aktivním místě a destabilizaci enzymu díky oxidační degradaci způsobené vedlejší reakcí hydroxidových radikálů generovaných aktivním místem. Na základě strukturní analýzy byla také vysvětlena stabilizace enzymu polysacharidovým substrátem snižujícím destrukční efekt reaktivních forem kyslíku. Zde bylo klíčové oddělení proteinu od nerozpustných substrátových molekul optimalizovanou rychlou filtrací. Práce s apoenzymem odhalila důležitou stabilizační roli mědi v aktivním místě. Pomocí turbidimetrie byla potvrzena role H₂O₂ jako kosubstrátu LPMO, neboť se potvrdilo, že fungování enzymu v přítomnosti donoru elektronů (askorbát, redukováná CDH) závisí na spotřebě peroxidu (ověřeno elektrochemicky). Přídavek katalasy snižoval aktivitu LPMO, naopak do jisté úrovně se aktivita zvyšována přídavkem systému generujících peroxid vodíku, např. glukosaoxidasové reakční směsi. Představena je i práce v recenzním řízení, která se zabývala přenosem elektronu mezi doménami CDH, tedy konkrétně mezi redukovaným flavinem a hemem, a přenosem mezi hemem a finálním akceptorem (=LPMO). Pro posouzení strukturních a funkčních aspektů přenosu elektronu byly připraveny čtyři chimérické proteiny odvozené od dvou variant CDH z plísňe *Neurospora crassa* se vzájemnými kombinacemi jejich mezidoménového propojení a domén s aktivními místy. Instrumentálními analýzami včetně elektrochemie a hmotnostní spektrometrie izotopové výměny se zjistilo, že přenos elektronu je závislý na strukturní komplementaritě domén a jejich propojení ovlivňujícím konformaci. Druhou tematickou částí je analýza rekombinantních LOV domén proteinu fototropinu z ovsa. Šlo o původní (WT) protein a jeho variantu s mutací cysteinu nacházejícího se v blízkosti FMN kofaktoru. Záměrem bylo ověřit a vysvětlit dříve publikované zvýšení produkce singletového kyslíku (¹O₂) při dlouhodobém ozáření. Výsledky studie prokázaly, že se tak děje uvolněním FMN kofaktoru do roztoku v souvislosti s oxidací tohoto cysteinu (oxidačně modifikováno však bylo více aminokyselinových zbytků), což bylo demonstrováno analýzou peptidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

DOTAZ: Proč byla pro purifikaci rekombinantních variant CDH použita v prvním kroku hydrofobní chromatografie, která sama o sobě není příliš účinná? Nebylo možné ji vynechat a rovnou využít ionex? Neuvažovalo se o afinitní chromatografii (např. Appl Biochem Biotechnol. 176, 1638–1658, 2015)?

DOTAZ: Co se ví o rozdílné biologické roli NcCDHIIA a NcCDHIIB?

Mohu konstatovat, že autor prokázal schopnost kritické práce s odbornou literaturou, samostatné plánování a provádění laboratorních experimentů, včetně jejich vyhodnocení a diskutování. Splnil tak předpoklady, které jsou nutné k vypracování vědeckého spisu. Nedílnou součástí celku disertační práce je i publikační aktivita autora v recenzovaných vědeckých časopisech. Osvědčil se rovněž jako člen vědeckých týmů. To vše vnímám jako doklad profesní vyzrállosti. Úplným závěrem mého posudku je doporučení disertační práce k obhajobě před odbornou komisí.



V Olomouci dne 11. 9. 2020

Marek Šebela