



UNIVERZITA KARLOVA, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE  
ALBERTOV 6, 128 43 PRAHA 2  
ČESKÁ REPUBLIKA

## Oponentský posudek

**na doktorskou disertační práci Ing. Martina Malého nazvanou:**

**„Optimization of computational methods of macromolecular crystallography in studies of biotechnological proteins“**

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce byla optimalizaci postupů upřesňování krystalových struktur a jejich aplikace při studiu proteinů, které souvisejí se vznikem rezistence na antibiotika. Doktorand spolu se svými kolegy vytvořil program PAIREF, který umožňuje automatické párové upřesňování krystalových struktur. Toto párové upřesňování umožňuje na základě strukturního modelu určit optimální difrakční limit dat pro data s vysokým rozlišením. Správné určení tohoto limitu má značný vliv na kvalitu strukturního modelu, tedy finálního výsledku rentgenostrukturní analýzy a proto téma této disertační práce považuji za aktuální a velmi zajímavé. Kvalitu předložené práce dále zvyšuje demonstrace využití této metody upřesňování na řadě referenčních dat včetně autorem vyřešené struktury enzymu modifikujícího tetracykliny z patogenní bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*. Struktura tohoto enzymu navíc ukázala významné rozdíly ve struktuře aktivního místa v porovnání s jinými enzymy z rodiny tetracyklinových destruktas.

Disertační práce Ing. Martina Malého je psána anglicky standardním způsobem. V přehledu literatury autor shrnuje základní princip rentgenostrukturní analýzy a maloúhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS). Kapitola s výsledky je rozdělena na dvě části, v první se autor zabývá vývojem metod pro automatické párové upřesňování krystalových struktur a experimentální fázování, což vyústilo v již zmiňovaný PAIREF a dále program SHELIXIR pro automatické experimentální fázování pomocí programů SHELXC/D/E. V druhé části výsledků se autor zabývá studiem struktury enzymu modifikujícího tetracykliny z bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*. Tato část popisuje přípravu proteinu, jeho biochemickou a biofyzikální charakterizaci, krystalizaci a vyřešení krystalové struktury včetně využití párového upřesňování. Výsledky biochemické a strukturní analýzy naznačily, že studovaný enzym pravděpodobně preferuje jiné substráty než tetracykliny.

Předložená disertační práce jasně ukazuje, že výsledky Ing. Martina Malého představují významný příspěvek k vývoji automatizovaných metod řešení krystalových struktur a pochopení vztahů mezi strukturou a funkcí enzymů zodpovědných za rezistenci na antibiotika.

Z hlediska formální podoby je práce psána přehledně s minimálním výskytem překlepů či formulačních nejasností. Výsledky práce byly publikovány ve třech kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Na dvou z těchto publikací je Ing. Martin Malý prvním autorem.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. Lze párové zpřesnění použít v případě zdvojených dat, tedy u tzv. twin refinementu?
2. Co je příčinou posunu křivek na obr. 13d na str. 84. Bezrozměrný Kratkyho výnos, tedy  $(qR_g)^2 I(q)/I_0$  vs  $qR_g$  umožňuje porovnávat proteiny různé velikosti, přičemž maximum křivky by u globulárních rigidních proteinů bez ohledu na velikost mělo mít hodnotu 1.104 pro hodnotu  $qR_g = 1.73$ . Tomu přibližně odpovídá černá křivka (vzorek bez DTT), ale křivka vzorku s DTT je výrazně posunuta – co je důvodem tohoto offsetu?
3. Jaká je dle vašeho názoru optimální hodnota  $CC_{1/2}$  pro stanovení rozlišení dat v případě, kdy není používáno párové zpřesnění?
4. Jsou tetracyklindestruktasy schopny modifikovat Tigecycline? Šlo by chemické modifikaci derivátů tetracyklinu zabránit prostřednictvím objemné modifikace, která by blokovala jejich vazbu do aktivního centra destruktasy?

#### **Závěrem konstatuji:**

Předložená doktorská disertační práce Ing. Martina Malého představuje cenný přínos k vývoji automatizovaných metod řešení krystalových struktur a pochopení vztahů mezi strukturou a funkcí enzymů zodpovědných za rezistenci na antibiotika. Práce je psána srozumitelně, všechny výsledky práce byly publikovány. Autor ve své doktorské disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Jelikož předložená práce Ing. Martina Malého vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně **doporučuji** její přijetí k obhajobě.

V Praze 7. listopadu 2022

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.  
Katedra fyz. a makromol. chemie  
Přírodovědecká fakulta UK, Praha