

Oponentský posudek disertační práce

„Structural biology approach to biotechnological problems“

Autorka: Iulia Iermak

Práce je fakticky souborem publikací, z nichž část je dosud nepublikovaná. Na úvod je uveden výčet čtyř článků použitých do dizertace, z nichž u tří je Iulia Iermak první autorkou. Publikace zaměřená na krystalizaci studovaných látek vyšla v Acta Crystallographica F, další zaměřeny na analýzu transportních kanálů u halogenalkandehalogenas pak v prestižním časopise ACS Catalysis. U dalších dvou článků jsem pochopil, že jsou v přípravě. V obecném úvodu jsou hned částečně naznačeny cíle práce resp. dva projekty – strukturní a funkční charakterizace glyceraldehyde dehydrogenasy z *Thermoplasma acidophilum*, která je je jedním z klíčových enzymů pro bezbuněčnou přípravu etanolu a isobutanolu z glukózy a optimalizace strukturně řízeného inženýrství halogenalkandehalogenas LinB. Myslím, že formálně vhodnější pro disertaci je začít o něco širším přehledem současného stavu, ze kterého následně vyplyne motivace pro danou práci a formulovat pak cíle jasně v samostatné, třeba krátké, kapitole.

V úvodu je první část věnována bioprodukci chemikálií, zejména bezbuněčné biosyntéze a významu halogenalkandehalogenas při ochraně životního prostředí, pro biodegradaci různých halogenovaných polutantů, optimalizaci halogenalkandehalogenas LinB z *Sphingobium japonicum* UT26 pro biosanaci. V další části úvodu je podán stručný přehled krystalizačních technik, schematický popis struktur proteinových krystalů a popis hlavní techniky jejich studia – rtg difrakce.

Ve druhé části – Materiály a metody jsou popsány použité krystalizační metody, podmínky sběru dat rtg difrakce jak v laboratoři, tak na synchrotronu BESSY v Berlíně a konečně i metody a software použité pro řešení a validaci struktur. V této souvislosti by mě zajímalo, zda data získaná v laboratoři na Venture D8 sloužila pouze k výběru dostatečně difrakčních krystalů či byla nějakým způsobem použita i pro další fázi studia.

Tyto úvodní části pokládám za vcelku výstižně a stručně formulované bez zřejmých faktických chyb. Práce s literaturou se mně jeví adekvátní.

Nejdůležitější třetí část – Výsledky a diskuse fakticky sestávají z výše uvedených čtyř článků. V tomto formátu se tedy některé věci opakují. Významnými výsledky jsou především vyřešené struktury, z nichž některé byly deponovány do databáze PDB. V článku z Acta Cryst. F jsou uvedeny podmínky krystalizace i struktura jedné nativní formy enzymu TaAIDH vyřešená v grupě P2₁ a dvě formy mutantu (F34M, S405N, grupa P1 a C2). Ve druhém článku, zatím nepublikovaném) se objevuje další forma nativního enzymu (grupa C222₁) a další forma mutantu (F34M, Y399C, S405N, grupa P4₁,2₁,2). Přitom první forma (P1) již není zmíněna. Mohla by to autorka nějak okomentovat i s tím, jestli mají různé krystalové formy nějaký vliv na molekulární strukturu resp. jestli existence více krystalových forem nemůže naopak pomoci při řešení této struktury. U třetího článku, který byl publikován, není studentka první autorkou, ale v úvodu je specifikováno na čem se podílela, tedy obdobně jako v dalších pracích – krystalizaci, sběru dat a rafinaci struktury. Článek se zabývá především počítačovým návrhem a vývojem transportního mechanismu v halogenalkandehalogenase a jeho studiem pomocí krystalografické analýzy a simulací molekulární dynamikou. Objemem tvoří důležitou část disertace (přes 50 stran). Posledním je článek v přípravě o strukturách dvou mutantů dehalogenasy LinB (12 stran).

Disertace je zakončena souhrnem výsledků práce na výše zmíněných dvou projektech. Zajímalo by mě, jakou část práce považuje autorka za nejnáročnější obsahově, časově a jaké své výsledky považuje za nejvýznamnější.

Práce je psána anglicky. Jazyk je akceptovatelný, bez zjevných chyb. Téma práce je aktuální a význam studovaných látek důležitý pro praktické užití.

Studentku znám z účasti na několika akcích i jako velmi schopnou organizátorku. V roce 2015 obsadila první místo ve studentské přehlídce prací z oboru krystalografie a strukturální analýzy pravidelně pořádané na konferenci Struktura organizované Krystalografickou společností pro odborníky z dané oblasti v České i Slovenské republice.

Studentka ve své práci ukázala schopnost samostatné i tvůrčí práce a po obsahové stránce předložila kvalitní disertaci. Za nedostatek považuji, že její vcelku důležitá část zatím nebyla publikována. Při obhajobě by měla podat informaci, v jakém stavu jsou připravované publikace a do jakých časopisů byly či budou zaslány.

Disertační práci nicméně jednoznačně doporučuji jako podklad k udělení titulu Ph.D., po úspěšné obhajobě.

V Praze 10. 5. 2017



prof. RNDr. Radomír Kužel, CSc.

Institute of Molecular Genetics of the ASCR

Assoc. Prof. RNDr. Jiří Brynda PhD.
Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.
Laboratory of Structural Biology
Flemingovo nám. 2
brynda@img.cas.cz
166 37 Praha 6

Oponent review of PhD. Thesis of Iuliia Iermak:

“STRUCTURAL BIOLOGY APPROACH TO BIOTECHNOLOGICAL PROBLEMS“

The reviewed PhD Thesis work describes enhancement of the catalytic performance of two different enzymes, based on evaluation of structure – function relationship. The structural information was used to engineer favorable enzyme variants exhibiting beneficial properties for applications in biotechnology. In the thesis X-ray crystallographic analysis was successfully employed for the structure-functional characterization of the glyceraldehyde dehydrogenase from thermophilic bacterium *Thermoplasma acidophilum* (TaAIDH). This is a key enzyme in the cell-free system for the production of ethanol or isobutanol from glucose. The second part of the thesis describes optimization by structure-guided engineering of the haloalkane dehalogenase LinB from the soil bacterium *Sphingobium japonicum* UT26, which is used for the effective degradation of halogenated environmental pollutants.

Reviewed text consists of 25 pages of literature survey, Materials and Methods section and of four attached publications. Description of experimental methods is very brief, 22-25 pages are devoted to explanation of crystal growth technics, data collection, solving of phase problem and structure refinement (surprisingly, structure refinement is not described at all). Moreover, the Materials and Methods section refers to a chapter from a recycled scientific article rather than to the introduction of Theses.

There are some mistakes and typing errors, eg:

- page 20, equation (1.3) summation should be over unit cell not crystal.
- page 20, equation (1.4) V is the volume of unit cell and ϕ should be indexed as well as $|F_{hkl}|$.

However, the attached publications are of good quality and their findings are highly valuable for scientific community, what was proved by their publishing in respectable international Journals. After reading the appended publications one can conclude that the

core of thesis lays in structural studies of haloalkane dehalogenase DhaA and its mutant DhaA31. The key paper is: "Brezovsky J, Babkova P, Degtjarik O, Fortova A, Gora A, Iermak I, Rezacova P, Dvorak P, Kuta Smatanova I, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J (2016) Engineering a *de novo* transport tunnel. ACS Catalysis, 6(11):7597-7610", (paper III). So my first question is aimed to rational design toward "open" mutants and structural analysis:

1st question: In the figure S10 you have depicted the differences of structures in tunnel part. Could you comment how important was your structural data for evaluation of structure activity relationship of this set of enzyme variants?

2nd question: In the table S8, page 106, Data-collection and refinement statistics, I noticed that you used shorter wavelength 0.8123 Å for measurement of LinB-Closed^w crystal.

Did you have any particular reason for this, could you comment on it?

3rd question: In the structure of LinB73 (in paper VI) you have proved that closely placed cystein residues Cys 147 and Cys 177 do not form the sulfide bridge. What is your explanation for excellent diffraction quality of given enzyme variant that allowed you to solve the structure in atomic resolution?

I want to state, that my comments and questions in no way diminish good level of documented scientific work in papers, which also correspond to high scientific quality of laboratories cooperating in this important project. I have some objections to the length and range of the introduction. Moreover, I think that candidate could include other interesting results which were out of the scope of attached publications and discuss them to a greater extent and thus demonstrate particular knowledge in the field of structural biology of studied enzymes. My essential objections are:

- 1) The objectives of work should be summarized in a separate chapter.
- 2) No discussion of success in fulfillment of particular aims is presented.
- 3) Presenting of individual papers as numbered chapters is not usual.

In summary, though I am not able to judge if the formal requirements for PhD Thesis were fulfilled (this has to be decided by the University authorities), I would like to point out that the scientific work presented in the attached papers, of which the candidate is a coauthor, prove her scientific and communication skills and this PhD Thesis should be admitted for defense.

In Prague, 10 May 2017

Jiří Brynda



**Oponentský posudek disertační práce Iuliia Iermak, MSc
„Structural Biology Approach to Biotechnological Problems“**

Práce byla podána jako soubor čtyř prací. Cíle práce jsou popsány na straně 2 v posledním odstavci první kapitoly úvodu. V kapitole 2 (strany 21-25) je popsány použité materiály a metody. Kapitola 3 se skládá ze 4 částí z nichž každá je založena na jedné publikaci.

První článek, který popisuje krystalizaci a difrakční měření glyceraldehyde dehydrogenázy byl otištěn v Acta Crystallographica F.

Druhý článek (strana 41-55) připravovaný k publikaci popisuje výsledky stanovení třech molekulárních struktur **glyceraldehyde dehydrogenázy z *Thermoplasma acidophilum***. **Jde o dvě krystalové formy nativní formy enzymu a dva mutanty** (F34M, S405N) a (F34M, Y399C, S405N). Důvodem pro mutace je snaha o vývoj enzymu s lepšími parametry pro bezbuněčnou přípravu isobutanolu – zvýšit přípustnou hladinu koncentrace isobutanolu nad 9 %. Práce na nativní formě enzymu v prostorové grupě P21 a na výše uvedených mutantech enzymu byly dokončeny a struktury byly deponovány v PDB pod kódy: nativní enzym pod kódem 5IZD, dvojitý mutant 5J77 a a čtyřnásobný mutant 5M4X. Nejsou ale dosud uvolněny pro veřejnost.

Třetí článek (strany 55-108), na kterém autorka spolupracovala, byl publikován v časopise s vysokým impakt faktorem IF=9. Článek se zabývá analýzou funkce transportních kanálů pro substrát a pro produkt u **haloalkan dehalogenáz LinB** s cílem navrhnout účinnější enzymy například pro bezbuněčnou likvidaci halogenovaných uhlovodíků v životním prostředí. Autorka se podílela stanovením jedné ze tří molekulárních struktur mutantů enzymu (1K63, 4WDQ, 5LKA).

Čtvrtý článek (strany 109-121) je připravován k publikaci. Zabývá se stanovením molekulární struktury **dvou mutantů haloalkan dehalogenázy LinB** (D147C, L177C), (W140A, F142L, L177C, I211L). Podafilo se jí vyřešit strukturu dvojitého mutantu LinB a komplexu čtyřnásobného mutantu LinB s dibromometanem. Žádná z těchto struktur zřejmě dosud nebyla vložena do PDB.

V závěru práce (strany 122-124) autorka shrnuje práce odvedené na obou projektech TaA1DH a LinB.

Autorka by měla vysvětlit:

- proč není deponována do PDB struktura nativního TaA1DHv prostorové grupě C221. Proteiny krystalující v různých prostorových grupách jsou předmětem zájmu mnoha lidí. Z tabulky je zřejmé, že struktura se rafinovala bez problémů, měla by se též do PDB deponovat.
- V záhlaví tabulky 1 o měření LinB-73 není uvedena teplota. U měření komplexu LinB-86 s dibromometanem jsou uvedeny teploty 3 a 21 stupňů Celsia. Jde o teplotu při měření a nebo teplotu při sorpci ligandu před zamražením ?
- Jak autorka interpretuje obrovské rozdíly v teplotních faktorech u tří výše uvedených struktur B=15, B=38, B=57 ?

- Jak autorka interpretuje velkou, téměř 10 procentní změnu délky osy C u opakovaného měření komplexu LinB-86 ? Tuto změnu nelze zpochybnit a jistě nejde o teplotní roztažnost.....

Shrnutí:

Autorka vyřešila v průběhu práce šest molekulárních struktur metodami proteinové krystalografie.

Pokud jde o enzym LinB, publikovala jednu mutantní strukturu LinB v časopise s vysokým impact faktorem. Dvě struktury mutantů LinB připravuje k publikaci.

Pokud jde o TaA1DH, vyřešila strukturu nativní TaA1DH a struktury dvou jejích mutantů. Všechny tři struktury deponovala do PDB. Článek je připravován k publikaci.

Julie Iermak, MSc je spoluautorem na pěti vědeckých sdělení v mezinárodních časopisech. Jeden z nich má impact faktor IF = 9, čtyři mají IF nižší než 1. Dva články jsou v přípravě pro dobře impaktované časopisy. Prezentovala výsledky svých prací na mnoha vědeckých konferencích. Aktivně se účastnila přípravy několika vědeckých konferencí a vedení odborných projektů.

Byly splněny úkoly v zadání disertační práce. Výsledky byly a budou publikovány v mezinárodních časopisech. Lze očekávat, že výsledky tohoto základního výzkumu mohou mít uplatnění v dalších biologických oborech a v průmyslu. Je zřejmé, že autorka problematice dobře rozumí a zvládla všechny potřebné techniky přípravy krystalických proteinů a metodiku proteinové krystalografie. Získané výsledky byly zpracovány a deponovány v proteinové strukturní databázi PDB. Práce má předepsané náležitosti a zvolený formát odpovídá současným trendům.

Lze konstatovat, že předložená disertační práce Julie Iermak, MSc splňuje předpoklady kladené zákonem a doporučuji jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze 8. 5. 2017

RNDr. Jindřich Hašek, DrSc

