



Posudek doktorské disertační práce Mgr. Petra Pospíšila

**“ Fluorescence Spectroscopy: Advanced methods and their defined applications in protein science”**

Disertační práce Mgr. Petra Pospíšila prezentuje sadu pěti různých aplikací pokročilých metod fluorescenční spektroskopie v oblasti biofyziky a fyzikální chemie. Jak již napovídá název, práce neobsahuje systematický výzkum jednoho vědeckého problému, ale jde spíše o vybraný soubor dílčích problematik/projektů provázaných spolupracemi a metodikami praktikovanými v laboratořích školitele. Zde je nutno podotknout, že pouze 4 z 5 uvedených aplikací mají přímý vztah k proteinovému výzkumu, jak by bylo možno očekávat z názvu práce. Zbývající aplikace popisuje fotochemii tetrapyrrolových makrocyclů v přítomnosti těžkých atomů a schématu se vymyká. Přínos práce vidím kromě specifických výsledků jednotlivých podprojektů i v osvětě čtenářského fóra v oblasti aplikovatelnosti ne zcela běžných fluorescenčních technik.

Práce je napsána v anglickém jazyce a obsahuje přiměřený počet relevantních citací. Formálně je členěna do tří hlavních sekcí. Úvodu, popisu experimentálních metodik a výsledkové části. Úvod popisuje dostatečně široce jev fluorescence a poskytuje teoretický základ pro pochopení většiny využitých principů. Drobnou výhradu mám k umístění citací u rovnic, kdy často není citace k rovnici jednoznačně přiřazena. Též mám výhradu k používání termínu „average lifetime“ pro veličinu definovanou rovnicí 1.16 na str. 10 a dále v textu. Rovnice popisuje „mean lifetime“ počítaný dle definice střední hodnoty pomocí prvního momentu. Občas v literatuře používaný „average lifetime“ má jinou definici a jiný fyzikální význam.

Experimentální část dostatečně popisuje obecné principy použitých metodik, detaily je možno najít v příložených publikacích. Zde mám následující výhrady. U vysvětlujícího textu pod rovnicí 2.5 (str. 28) je nešťastně použito tečky tak, že není jasné, zda se jedná o násobení v nekorektní rovnici nebo o konec věty. V rovnici 2.25 na str. 39 je veličina FRa nesprávně označována jako „percentage“ evokující rozsah 0-100. Jelikož jde o číslo z intervalu  $<0,1>$  mělo by být lépe označeno termínem “fraction”.

Výsledková část disertační práce je založena na 3 hodnotných publikacích v recenzovaných zahraničních časopisech (impaktní faktor 3.2 - 12.0), jedné publikaci v přípravě (rukopis přiložen) a jedné FCS studii stručně popsané v předložené práci. O dobrém ohlasu vědecké komunity svědčí 14 nalezených citací (wos). Mgr. Pospíšil je prvním autorem u jedné z publikovaných prací. Jelikož je v disertační práci a příložených publikacích prezentován vysoce kolaborativní výzkum (6-9 spoluautorů, minimálně 3-4 vědecké instituce – mnohdy zahraniční), je žádoucí, aby doktorand specificky a detailně popsal vlastní participaci a přínos k jednotlivým příloženým publikacím a výsledkovým sekcím. Z textu není podíl na prezentovaných výsledcích explicitně jasný.

V závěru práce je zařazen seznam zkratk, který bohužel není vyhotoven důsledně a řada netriviálních použitých zkratk tam není uvedena, namátkou IVR, LSCM, CT, apod.

K obsahu práce mám následující otázky a připomínky:

- V abstraktu práce je uvedeno: „...various fluorescence techniques were developed and applied...“. Které z použitých metod byly autorem nově vyvinuty? Z textu práce to není zřejmé.
- Na str. 22 je uvedeno, že poměr signál/šum (SNR) u dohasínání fluorescence obvykle převyšoval hodnotu 1000. Jak byl SNR počítán? Dle zavedené definice  $SNR = \sqrt{I_{max}}$  vyplývající z Poissonova rozdělení šumu by v maximu dohasínání ( $I_{max}$ ) mělo být minimálně  $10^6$  pulzů. Obrázky na straně 54 tomu však zdaleka neodpovídají. Jde o zmíněnou výjimku?
- Dipólové momenty základního a excitovaného stavu jsou vektorové veličiny. V Lippertově rovnici 2.2 na str. 25 však jejich vektorový charakter není zahrnut. Jelikož rozdíl vektorů je jistě obecně jiný než rozdíl jejich velikostí, zanedbání ovlivní výsledek. Jaká je korektní forma Lippertovy rovnice dle původních zdrojů?
- V popisu konstrukce a zpracování časové relaxace spekter (TDFS) jsem nenašel proceduru korigující na časovou konvoluci s funkcí odezvy aparatury, která jistě získané relaxační časy, především ty kratší, ovlivní. Dekonvoluce je přitom běžná při vyhodnocování fluorescenčních dohasínání. Proč nebyla použita?
- Tab. 3.2, str. 53: Se vzrůstající teplotou obvykle doba života fluorescence klesá. Zde u všech studovaných systémů signifikantně stoupala. Vysvětlíte prosím.
- Jak správně měřit dobu života fluorescence u systémů s relaxujícím spektrem, kde je obecně na každé emisní vlnové délce průběh dohasínání odlišný?
- Sekce 3.5, obr. 3.19 a 3.20: Je možno bez negativní kontroly v případě použité střídavé (PIE) excitace jednoznačně tvrdit, že je pozorovaná kroskorelace výsledkem formace komplexu (např. str. 86 dole)?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce přináší řadu původních vědeckých poznatků významných pro širší vědeckou komunitu a autor prokázal schopnost samostatné vědecké činnosti. Předložená práce jistě splňuje kritéria kladená na doktorskou disertační práci, a proto ji doporučuji jako podklad k obhajobě pro udělení titulu PhD.

V Praze 29. 8. 2017

prof. RNDr. Petr Heřman, CSc.  
MFF UK