

**Oponentský posudek disertační práce**  
**Andrea Hušková: Odhalení molekulárních mechanismů opravy abazického**  
**meziřetězcového spojení DNA**

Předložená disertační práce Mgr. Andrey Huškové si klade za cíl studium jednoho z nejzávažnějších poškození DNA, kterým je meziřetězcové kovalentní spojení vycházející z abazického místa (Ap-ICL, z ang. „apurinic/apyrimidinic site interstrand crosslink“). Kandidátka se jednak podrobně zabývala studiem vzniku tohoto místa v řetězci DNA a zkoumala i vliv okolních bazí na proces jeho tvorby. Ve druhé části práce byla pak studována interakce DNA substrátu s doménami opravné glykosylasy NEIL3, označovanými jako GRF a Nei.

Zmíněná dvojdílnost práce je zřejmá i ze dvou skupin použitých metod. První část práce používá především metody přípravy, izolace a analýzy Ap-ICL. Naproti tomu druhá část práce zahrnuje hlavně expresi a purifikaci zkoumaných proteinových konstruktů a následné studium struktury a funkce těchto konstruktů a jejich komplexů s DNA pomocí enzymových esejí, nukleární magnetické rezonance a rentgenostrukturální analýzy monokrystalů.

Celá práce má 94 stran, je členěna obvyklým způsobem a psána je v dobré angličtině. V části Přílohy obsahuje práce texty dvou vědeckých prací publikovaných ve velice kvalitních časopisech, na kterých je kandidátka první autorkou, případně prvoautorství sdílí. Podíl práce kandidátky na jednotlivých publikacích je jasně a přehledně specifikován. Kromě toho je v disertační práci zmíněn i třetí článek kandidátky (také se sdíleným prvoautorstvím), rovněž ve velmi kvalitním časopise, který se od předchozích svým tématem odlišuje a není součástí předložené práce. Analýza celé disertační práce antiplagiátorskými programy potvrdila, že se jedná o původní dílo.

Pokud se jedná o získané výsledky, první část práce ústí do odhadů rychlosti tvorby a množství Ap-ICL vznikajících v buňce. Studium vlivu okolních nukleotidů neukázalo nějaký významnější rozdíl, kromě toho, že AT bohaté oblasti mají k tomuto typu poškození větší tendenci než GC bohaté sekvence. Druhá část práce představuje z hlediska biofyzikální chemie a strukturální biologie velice kvalitní a náročnou studii, jejíž výsledky přímo ústí do návrhu mechanismu, kterým Nei a GRF domény glykosylasy NEIL3 rozpoznávají cílové místo v kontextu dvou replikačních vidliček, tvořících strukturu podobnou písmenu X. Tyto strukturální a funkční studie jsou bezpochyby vrcholem celé práce a představují skutečně hodnotný přínos k poznání jednoho z molekulárních mechanismů opravy Ap-ICL.

K práci mám několik poznámek:

1. Část „Introduction“ je psána vcelku srozumitelně a čtivě, ale je relativně velmi krátká. Domnívám se, že by práci slušel alespoň dvojnásobný rozsah této části.

2. V práci je oddělena část „Results“ a část „Discussion“. Ve skutečnosti ale mnohé věty (např. na str. 43 a 44) ukazují, že obě části se v textu silně prolínají a popisované výsledky jsou okamžitě diskutovány. Nutno dodat, že dle mého mínění kvalitně a srozumitelně.
3. Přestože jsou v sekci „Methods“ podrobně popisovány metody exprese a izolace rekombinantních proteinů, nemají tyto kapitoly svoji protiváhu v příslušných pasážích sekce „Results“. Jinými slovy, nejsou zde prezentována data o průběhu purifikace proteinových konstruktů a množství a čistotě připraveného materiálu.
4. Při popisu některých experimentů by možná bylo na místě zajít do větších detailů. Např. při popisu krystalizace by bylo vhodné popsat, za jak dlouho krystal vyrostl, uvést jeho rozměry a přiložit jeho fotografii.
5. V některých místech textu by snad bylo vhodnější užít lepšího výrazu. Např. na str. 30 bych místo „solubility tag“ volil raději výraz „affinity tag“. Věta na str. 46 („the next question mark hung above question“) mi přijde trochu neobratná apod.

Rád bych ohledně práce položil následující dotazy:

- A. Na str. 56 a 57 se snažíte řešit otázku, jak mnoho Ap-ICL vzniká v jedné bunce za jediný den. Chtěl bych se zeptat, zda je něco známo o tom, jestli je toto množství ovlivněno transkripční či replikační aktivitou buňky?
- B. Bylo by možné prezentovat alespoň částečně data z exprese a purifikace použitých proteinových konstruktů? Zajímá mě konkrétně například výtěžek v případě přípravy izotopicky značeného proteinu za použití minimálního média.
- C. Existuje nějaký použitelný *in vitro* model přípravy dvou zastavených replikačních vidliček, který by mohl sloužit k testování interakce s NEIL3 glykosylasou?

Přes některé výše uvedené kritické připomínky považuji práci za nesmírně kvalitní a zcela naplňující požadavky, které jsem na disertační práci kladený. Doporučuji ji přijmout k dalšímu řízení a kandidátce udělit titul Ph. D.

V Praze 14. 3. 2024

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.