Posudek na dizertační práci „Unravelling molecular mechanisms of the abasic crosslink DNA repair“

Předkladatelka: Mgr. Andrea Hušková

Školitel: RNDr. Jan Šilhán, Ph.D.

Předkládaná dizertační práce je založena na dvou rukopisech přijatých v mezinárodních časopisech “The Nucleic Acid Research” a “DNA repair”, kde je v obou případech předkladatelka prvním autorem, respektive prvním spoluautorem. Mgr. Hušková je rovněž první spoluautorkou dalšího rukopisu, který je nicméně tematicky odlišný. Práce o celkovém rozsahu 94 stran (včetně příloh) je psána v angličtině s klasickým členěním zahrnující obecný úvod, metodickou část, výsledkovou část, diskuzi a seznam citací. Formální stránka práce je velmi zdařilá s minimem překlepů a terminologických nepřesností.

Dizertační práce se zabývá molekulárními mechanismy souvisejícími se vznikem a následnou opravou abazických míst a mezivětězcových kovalentních spojení DNA. Ačkoliv jsou tato poškození velmi závažná a mohou být spojena s nádorovými onemocněními a buněčnou smrtí, molekulární mechanismy jejich oprav nejsou stále dostatečně prozkoumány a dizertační práce výrazně přispívá k jejich objasnění. Jedná se bezesporu o originální a aktuální studovanou problematiku základního výzkumu s možným přesahem do terapeutických aplikací.

K dosažení cílů dizertační práce si předkladatelka musela osvojit řadu experimentálních technik včetně metod molekulární biologie (klonování, mutageneze), heterologní exprese a purifikace rekombinantních proteinů. Pro následnou charakterizaci interakcí pak použila komplementární enzymologická a biofyzikální stanovení a rovněž techniky strukturní biologie - NMR spektroskopie a rentgenostrukturní analýzy. Pevně věřím, že takto široké metodologické portfolio bude dobrým základem pro další profesní růst předkladatelky.

Rád bych kandidátce položil následující dotazy k širší diskuzi:

1. Na obrázku 9 je ukázána kinetika časová závislost tvorby abazických míst DNA *in vitro*. Křivka časové závislosti má z mého pohledu poněkud netypický průběh s počátečním lineárním úsekem a následným rychlým přechodem do stacionární fáze. Jaké je vysvětlení náhlé změny kinetiky v čase přibližně 24 hodin? Pokusili se autoři tuto časovou závislost popsat nějakým matematickým modelem?

2. Strana 49 a obrázek 16 – v textu je popsáno, že „the binding affinity of GRF domains showed a notable preference for fork structures compared to oligonucleotides with ssDNA overhangs even though the total number of nucleotides was identical….”. Z obrázku 16 se zdá, že tato preference je cca 2- až 3-násobná. Myslíte si, že takový rozdíl je opravdu výrazný a může vysvětlit specificitu *in vivo*? Je k dispozici nějaké statistické zhodnocení zmíněných rozdílů? Jedná se o technické nebo biologické (například nezávislá příprava dvou šarží proteinů/DNA) replikáty?

3. Strana 50, obrázek 17 – „…Nei doména preferuje při opravě Ap-ICL sekvence, kdy je Ap místo na 3' rameni replikační vidlice….“. Předpokládáte, že tato preference existuje i *in vivo*, což by asi znamenalo, že Ap místa na 5' rameni replikační vidlice by byla pro opravu problematičtější? Dá se z Vašich krystalových struktur a AlphaFold modelů taková preference nějak mechanisticky vysvětlit?

Závěrem konstatuji, že předkládaná dizertační práce Mgr. Huškové splňuje všechny požadavky Oborové rady Fyzikální chemie a proto ji plně doporučuji k obhajobě.

V Praze, 24. března, 2024

RNDr. Cyril Bařinka, PhD
Laboratoř strukturní biologie
Biotechnologický ústav AV ČR
Průmyslová 595, Vestec
telefon: +420-325-873-777
e-mail: http://lsb.avcr.cz/