

## Posudek školitele diplomové práce

Jméno a příjmení uchazečky: Bc. Kateřina Krejčová

Název práce: Molekulární mechanismus regulace opravné dráhy Fanconiho anémie fosforylací proteinu FANCI

**Hodnocení jednotlivých aspektů práce** (označte známkou ve standardní stupnici 1 až 4)

### 1. Samostatnost uchazečky

Ve fázi zpřesňování tématu práce	1
Při práci s literaturou a databázemi	1
Během zpracování zadaného tématu	1
Při sepisování práce	1

### 2. Komunikativnost, schopnost spolupráce: 1

### 3. Zájem o práci a pracovní nasazení uchazečky: 1

### 4. Spolehlivost a plnění zadaných úkolů: 1

Případný slovní komentář k bodům 1. až 3. :

Bc. Kateřina Krejčová vypracovala svoji diplomovou práci pod mým vedením na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. Seznámila se zde s extenzivním množstvím metod, které zvládla na výbornou a její výsledky a provedení by mohli jít učebnicovým příkladem pro použitou metodiku.

Velmi obsáhlým tématem diplomové práce studentky bylo studium vlastností a mechanismů opravné dráhy Fanconiho anémie. Tato dráha je zodpovědná za opravu tzv. meziřetězcových kovalentních spojení v DNA (z angl. interstrand crosslink) a je spouštěna při zastavení replikačního aparátu právě v místech těchto poškození. Geny a proteiny této dráhy se zpravidla označují zkratkou *FANC* resp. *FANC* (z angl. Fanconi Anaemia Complementation Group), jelikož mutace v jejich genech vede k nefunkční opravě a ke genetické chorobě zvané Fanconiho anémie. Klíčovým dějem ve spouštění této dráhy je monoubiquitylace *FANCD2* regulována fosforylací vazebného partnera *FANCI*.

Cílem diplomové práce byla příprava a studium mechanismů, kterými fosforylace *FANCI* spouští monoubiquitylaci a opravu DNA.

V první fázi diplomové práce se studentka seznamovala s mutagenesní přípravou konstruktů pro expresi cílených mutantních proteinů. Mutace v jednotlivých konstruktech byly vybrány samotnou studentkou po studiu dostupné literatury. Řada článků byla zveřejněna v průběhu práce, čemuž bylo téma přizpůsobováno.

Studentka připravila 8 různých konstruktů proteinů. Zejména se jednalo o různé mutanty fosforylačních a ubiquitylačních míst proteinů *FANCI* a *FANCD2*. Celkově připravila 12 proteinů. Expresy probíhaly v hmyzích buňkách *Sf9* pomocí bakulovirového expresního systému. Studentka se tedy naučila přípravu bakmidové DNA, transdukcii a infekci

hmyzích buněk a velkoobjemovou přípravu rekombinantních proteinů.

Studentka se naučila samostatně purifikovat a biochemicky charakterizovat proteiny. Samostatně prováděla tyto chromatografické techniky: afinitní, aniontové, afinitní heparinové a gelové permeační.

V další fázi byly biofyzikální a enzymologické studie a měření. Ani zde studentka nezůstala pozadu, naopak excelovala a **velmi svědomitě, samostatně a zodpovědně** přistupovala k zadané problematice. Testování vazby proteinů na DNA v nativních polyakrylamidových gelech bylo studentkou optimalizováno až **dosáhlo reprodukovatelného a bezchybného vzhledu na úrovni publikování v impaktovaných časopisech**. Jednalo se skutečně o náročnou práci, ve které se porovnávala vazba komplexů mutantů FANCI a FANCD2 s DNA o výsledné molekulové hmotnosti cca 350 kDa. Komplementárně byla vazba na DNA měřena pomocí anizotropie fluorescence.

V enzymologické části se studentka soustředila na vliv fosfomimetických mutantů proteinu FANCI na rychlost monoubiquitylačních reakcí. Studentka ukázala, že mutanty FANCI mimikující fosforylaci nemají vliv na vazbu tohoto proteinu na DNA. Zároveň studentka ukázala, že nemají vliv na rychlost a ani účinnost monoubiquitylace FANCD2 za měřených podmínek, přestože je známo, že tyto fosforylace FANCI jsou naprosto esenciální pro monoubiquitylaci FANCD2 a opravu DNA v buňkách. Toto je velmi zajímavé zjištění, které posunuje centrum našeho studia a porozumění regulace této dráhy vpřed. Zároveň v podobě připravených mutantů FANCI a FANCD2 studentka připravila nepostradatelné reagencie pro současnou budoucí práci na této opravné dráze.

**Studentka si počínala velmi pečlivě a neúnavně při studiu dostupné odborné literatury a často přicházela s návrhy dalších experimentů**, které byly součástí nejen její diplomové práce, ale i navazujících projektů. Její samostatnost v laboratorní práci byla nekompromisní a dbala na provedení veškerých experimentů samostatně.

Samostatnost sepisování práce je v naší laboratoři samozřejmostí. Rozsah a členění jsou přiměřené a odpovídají požadavkům na diplomovou práci. Zároveň je teoretický úvod psán velmi stručně a výstižně, což hodnotím výborně. Rozsah naučených a použitých metod je na výborné úrovni.

**Zájem studentky o práci byl přímo nadstandartní**, což bylo potvrzeno nejen pečlivou teoretickou přípravou a čtením odborných či metodických prací, ale rovněž počtem hodin strávených experimentální činností. Časový rozsah věnovaný práci zdaleka převýšil očekávaný čas magisterského studenta.

Stanovisko k opravě chyb v práci: opravný lístek/oprava v textu **NENÍ** podmínkou přijetí práce

### **C. Celkový návrh**

Navrhovaná celková klasifikace: **Výborně**

Datum vypracování posudku: 11. 5. 2019

Jméno a příjmení, podpis školitele (SIS): RNDr. Jan Šilhán. PhD