

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Barbory Landové

Structural studies of an abasic site DNA damage repair and DNA interstrand cross-link formation

Studijní program: Fyzikální chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
Školitel: Dr. Evžen Bouřa

Téma a aktuálnost práce. Doktorská disertační práce Mgr. Barbory Landové se zabývá biochemií a strukturními aspekty specifického typu poškození DNA, které může vzniknout po spontánní ztrátě báze nebo po jejím odstranění opravným enzymem jako chemické spojení řetězce bez báze s protějším řetězcem, tzv. Interstrand Cross Link, ICL. Jeden z hlavních enzymů opravujících tyto léze v bakteriích je DNA glykosyláza MutM. Vlastnosti tohoto enzymu jsou potom hlavním předmětem studia.

Řešená problematika je aktuální, protože detailní popis biochemie a strukturních aspektů specifického typu poškození DNA je nutné pro pochopení molekulárních mechanismů vzniku potenciálně nebezpečných lézí genomové DNA. Znalost vlastností těchto lézí nám pak otevírá možnost cíleně je eliminovat specifickými léčivy nebo je naopak indukovat v buňkách, které chceme likvidovat.

Zpracování, cíle a výsledky práce. Práce je založena na diskuzi výsledků ze dvou publikací, na jedné z nich je petentka první autorkou. Reprinty obou publikací jsou připojeny k práci. Práce je psána anglicky a po formální stránce členěna do tradičních kapitol. Texty jsou psané dobrou angličtinou, dobře se čtou, původní práce jsou citovány ve více než stu citacích. Mgr. Landová na 16 stranách čtenáře uvádí do spletité problematiky biologie ICL, formuluje cíle práce, stručně ale dostatečně (~6 stran) zmiňuje metodické aspekty a poté na ~25 stranách výsledky a jejich význam. Součástí výsledků jsou dvě krystalové struktury, *Neisseria meningitidis* MutM (PDB kód 6tc6) a MutM ze stejné bakterie v komplexu s DNA (PDB 6tc9).

Řešení obou struktur je jádrem cílů práce (Aims), vazba DNA na MutM je studována i biochemicky měřením kinetiky a termodynamicky interakcí MutM s oligonukleotidy asi 25 různých sekvencí o délce 20 nukleotidů. U třetího cíle, studia spontánní produkce ICL, by bylo vhodné uvést, jak má být prováděno, *in vitro*, na buněčných kulturách (zřejmě ne v *N. meningitidis*), jinak.

Na základě četby práce a obou publikací lze konstatovat, že cíle práce byly splněny.

Poznámky a otázky. Následující nemá zpochybnit celkovou kvalitu a význam práce, ale poukázat na drobné chyby a nejasnosti. V práci se objevují zbytečné gramatické chyby, například použití "data" jako singuláru, někde ve větách chybí slovesa (strana 57, konec druhého odstavce). Odstavec 8.2 obsahuje ale více a významnějších nejasností než jen gramatické chyby. Reference [99] je v textu uvedena chybně jako NAR, jde o ACS Omega, obsahově ale článek zřejmě odpovídá tomu, co je diskutováno v textu práce.

Z mého pohledu jsou nešťastné formulace na začátku druhého odstavce na straně 57:

"The data indicates that a single nucleotide near the Ap site only minimally affects the rate of Ap-ICL formation. The presence of AT-rich or GC-rich sequences around the Ap site significantly impacts ICL formation. Notably, AT-rich sequences exhibit considerably higher formation rates."

Mělo by se tu naprosto jasně vysvětlit, co se myslí nukleotidem poblíž Ap místa, protože jedním z hlavních závěrů celé studie je, že AT bohaté a CG bohaté sekvence se chovají jinak. Opět není ale jasné, sekvence v jakém kontextu, dvou, pěti, dvaceti, sta nukleotidů?

Na základě PDB validačních reportů je možné konstatovat, že obě krystalové struktury, 6tc6 i 6tc9, jsou kvalitně vyřešeny a že přispívají k pochopení mechanismů tvorby lézí typu ICL. Toho bylo dosaženo zejména proto, že bylo poprvé možné porovnat strukturu volného a vázaného MutM z jednoho organismu.

Zde bych měl jen doplňující dotaz k diskuzi struktury DNA v 6tc9. Chápu, že diskuze detailů struktury DNA není předmětem vašeho studia, ale některá tvrzení by bylo možné precizovat. Na jednom místě práce píšete, že struktura oligonukleotidu se neodlišuje od struktury normální B-DNA (strana 37: "Ap sites maintains a normal B-DNA structure"). Citaci neuvádíte, můžete vysvětlit, co myslíte termínem normální B-DNA struktura? Diskuzi ohybu DNA v 6tc9 zakládáte na NMR struktuře 1xcy (obrázek 8.1), nejsem si jist, že "přímost" (nezalomení helikální osy) duplexu je z NMR dat patrný.

Závěr. V disertační práci prokázala Mgr. Barbora Landová tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu a disertační práci doporučuji k obhajobě a udělení titulu PhD za jménem.

Ve Vestci 11. února 2024

Bohdan Schneider