

Dr. Karel Riha
Group Leader
Kamenice 753/5 Bld. A26
625 00 Brno
Czech Republic

T: +420 549 49 7836
E: karel.riha@ceitec.muni.cz

Brno, 9. března, 2016

Posudek dizertační práce „Studium mechanismů rekombinace DNA u rostlin“

Tato dizertační práce je koncipována jako sborník šesti vědeckých publikací, na kterých je Mgr. Kozák uveden jako spoluautor, doplněný úvodem a diskusí pojednávající o problematice oprav dvouřetězcových zlomů DNA u rostlin. Tento typ dizertačních prací na jednu stranu značně ulehčuje úlohu oponenta tím, že vědecké výstupy prošly rigorózním oponentním řízením v redakcích prestižních zahraničních časopisů, na druhou stranu se hůře určuje konkrétní přínos doktoranda k těmto výsledkům, protože tyto jsou výstupem kolektivu autorů.

Experimentální část této práce byla vypracována v letech 2006 – 2012 pod vedením profesora Angelise v Laboratoři biologie pylu Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Publikáční výstup je excelentní, šest publikací v renomovaných zahraničních časopisech, z toho jedna prvoautorská. Tato prvoautorská práce publikovaná v časopise *DNA Repair* je stěžejní; Mgr. Kozák v ní popisuje vypracování protokolu na detekci DNA zlomů pomocí kometového testu u rostlin. Aplikace této metody u mutantních rostlin huseníčku deficientních v různých DNA opravných mechanismech vedla k jednomu velice překvapivému zjištění. Mutace v NHEJ reparační dráze, která je považována za klíčovou u rostlin, nevykazovaly změny v kinetice opravy dvouřetězcových zlomů. Naopak důležitou pro rychlou opravu DNA se ukázal SMC6 protein, který se pravděpodobně podílí na organizaci chromatinu v okolí poškozené DNA. Kometový test vypracovaný Mgr. Kozákem byl poté použit v několika pracích zaměřených na opravy DNA u rostlin, z nichž jedna pochází z laboratoře prof. Angelise a ostatní z laboratoří v Rakousku, Velké Británii, Portugalsku a Francii. Velmi oceňuji, že dizertační práce jasně definuje příspěvek Mgr. Kozáka k těmto studiím, tedy analýzu kinetiky oprav dvouřetězcových zlomů DNA. Z výčtu publikací, které vznikly ve spolupráci s mezinárodními týmy, je také zjevné, že tato metodika není triviální a v několika případech poskytuje klíčové důkazy o zapojení studovaných genů v DNA reparacích. Například ve studii popisující linie huseníčku se sníženou expresí ligázy 1 představuje kometový test jediný experimentální důkaz o významu tohoto genu v opravách jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů (Waterworth et al., 2009). Podobně je tomu v práci o opravě DNA u mechu, kde je tato metodika stěžejní (Holá et al., 2013). Ve studii pojednávající o RAD21 odhalil kometový test roli kohezinu v rychlé opravě DNA u rostlin (da Costa-Nunes et al., 2014). Tudiž z přiložené dizertační

práce je zjevné, že experimentální činnost Mgr. Kozáka výrazně přispěla ke studované problematice a měla mezinárodní dopad.

Jedním z důležitých předpokladů obhajoby dizertační práce je prokázání schopnosti samostatně formulovat vědecké problémy, popisovat jejich řešení a obdržené výsledky dát do širšího kontextu známých vědomostí. Jak už jsem předeslal výše, toto nemusí být zjevné z opublikovaných prací, které jsou výstupem kolektivu autorů, kde se konkrétní příspěvek daného autora k napsání publikace stírá. Nicméně Mgr. Kozák prokázal tyto schopnosti skvěle napsaným úvodem k dané problematice i obšírnou diskusí, které jsou součástí této dizertační práce. Úvod velice přehledně shrnuje mechanismy oprav dvouřetězcových zlomů a uvádí i podstatné detaily které jsou relevantní pro konkrétní vědecké téma. Tato část se velice dobře čte a já sám jsem se dozvěděl několik nových věcí, které mi unikly, i když se v tomto oboru pohybuji již mnoho let. Myslím, že tato část práce si nezadá s kvalitou článků typu „review“, které jsou publikovány v mezinárodních periodikách. Moji jedinou podstatnější výtka je právě tento styl „review“ článku. Od úvodu do dizertační práce bych očekával, že v pozdějších pasážích bude čtenáře pomalu uvozovat do konkrétní problematiky, která byla v rámci PhD studia řešena a kulminuje jasným definováním problémů a otázek, kterými se tato práce zabývala. To je trochu nahrazeno kapitolou „Cíle práce“. Ale tato část je velice lakonická a odtržená od úvodu. Naopak oceňuji závěrečné shrnutí, které podává kompaktní přehled hlavních výsledků.

Závěrem mohu pouze konstatovat, že toto je vynikající dizertační práce a to jak zpracováním, tak i vědeckými výstupy, které byly publikovány v šesti renomovaných mezinárodních časopisech. Tato práce také prokazuje hluboký vhled Mgr. Kozáka do studované problematiky. Dle mého názoru splňuje tato práce všechny očekávané atributy a doporučuji ji k obhajobě.

Jelikož se obhajoby nemohu osobně zúčastnit, byl bych rád, kdyby se Mgr. Kozák vyjádřil během obhajoby k těmto otázkám:

Na straně 21 autor poukazuje na to, že zbytková ligační aktivita u mutantů deficientních v několika DNA opravných mechanismech se projevuje zvýšenou frekvencí fúzí telomer. Tento závěr mi není moc jasný. Rád bych se autora zeptal, jaký je vztah DNA dvouřetězcových zlomů a telomer, proč přirozené konce chromozomů za normálních podmínek nefúzí, a za jakých podmínek k těmto fúzím dochází.

Kapitola 1.6 pojednává o výběru typu DNA reparačního mechanismu. Autor zmiňuje, že důležitým rozhodnutím je resekce dvouřetězcového zlomu. Je autorovi známo, co řídí tuto resekci v kontextu buněčného cyklu?

Jedním z nejdůležitějších a asi také nejpřekvapivějším výsledkem této práce je, že faktory podílející se na mechanismu opravy DNA pomocí NHEJ nemají vliv na kinetiku opravy po indukci poškození DNA. Tento závěr není v souladu s etablovanou rolí NHEJ a také nekoresponduje s daty obdrženými u savčích buněk. Naopak, pro rychlou opravu DNA u rostlin se ukázaly důležité faktory, o kterých se má za to, že podporují homologní rekombinaci, která představuje časově

náročnější reparační proces. Zvažoval Mgr. Kozák také alternativní vysvětlení pro tyto výsledky? Jendou z možností je, že fragmentace pozorovaná kometovým testem nemusí nezbytně odrážet opravu DSB, ale to jak po indukci zlomů drží chromatin pohromadě. To by také podporovalo pozorování vlivu komplexů jako je kohezin či SMC5/6 komplex. Jakými alternativními metodami by se dal tento problém studovat?

Posudek vypracoval:

Mgr. Karel Říha, PhD

