

Posudek na disertační práci Mgr. Růženy Filandrové „ **Structural characterization of interaction between transcription factors and DNA**“.

Zvolené téma disertační práce pokrývá poměrně široké spektrum metod a přístupů k objasnění specificity transkripčních faktorů a jejich vazby na DNA. Je potřeba hned na počátku konstatovat, že jak téma práce tak i cíle disertace jsou ambiciózní a vyžadují zvládnutí širokého spektra molekulárně biologických metod a technik. O to více oceňuji jak přístup studenta tak i jeho vedení školiteli.

Práce se zabývá studiem transkripčních faktorů – tedy proteinů, které zprostředkovávají regulaci genové exprese prostřednictvím interakcí s DNA a dalšími molekulami. Hrají klíčovou roli v mnoha biologických procesech, jako je kontrola progresu buněčného cyklu, diferenciace buněk během vývoje nebo imunitní reakce. Pro pochopení těchto procesů je nezbytná znalost 3D struktury transkripčních faktorů spolu s mechanismem jejich interakce s DNA. Celý problém specificity je ovšem zkomplikován faktem, že přítomnost vnitřně nestrukturovaných oblastí těchto molekul, činí stanovení 3D struktury běžně používanými metodami s vysokým rozlišením náročným někdy dokonce nemožným. Strukturní hmotnostní spektrometrie (MS) je částečnou odpovědí na tyto problémy, protože může přinést pochopení strukturního základu interakce transkripční faktor-DNA.

Práce má 2 hlavní části, které souvisejí s vytčenými cíli zadání. Tyto cíle jsou:

- 1) Příprava a charakterizace panelu proteinů kompatibilních s HDX-MS, které se použijí ke zlepšení sekvenčního pokrytí komplexních proteinových systémů - zejména integrálních membránových proteinů a komplexů protein-DNA
- 2) Prozkoumání potenciálu nativní MS pro rychlé vyhodnocení tvorby komplexu transkripční faktor-DNA a jejich třídění podle vazebné afinity
- 3) Zjištění, zda a jak postupný kontext motivu M-CAT ovlivňuje jeho interakci s TEAD1-DBD
- 4) Vysvětlit různé afinity motivu M-CAT a jeho obrácené verze k TEAD1-DBD

Struktura disertace včetně přiložených publikací dokumentuje splnění zformulovaných cílů. Výsledky se dají rozdělit na 2 hlavní části, v první z nich byla optimalizována a testována sada metod strukturní hmotnostní spektrometrie s hlavním zaměřením na hmotnostní spektrometrii pro výměnu vodík / deuterium (HDX-MS) na dvou komplexech transkripční faktor-DNA a jejich DNA vazebných motivech schopných poskytnout strukturální informace o regionech transkripčních faktorů nepřístupných klasickými metodami s vysokým rozlišením a také o strukturální dynamice komplexu transkripční faktor-DNA.

V druhé části práce byly metody strukturní hmotnostní spektrometrie spolu s dalšími technikami, jako je smFRET, gelový posun nebo fluorescenční anizotropie, použity ke zkoumání, zda a jak sekvenční kontext motivu M-CAT a jeho orientace ovlivňuje jeho interakce s doménou vázající DNA transkripčního faktoru TEAD1 (TEAD1-DBD). Získané výsledky ukázaly, že sekvence oblastí DNA obklopujících motiv M-CAT ovlivňují jeho vazebnou afinitu k TEAD1-DBD a navíc bylo zjištěno, že transkripční faktor je schopen vázat se také na invertovaný 5'-CCTTA-3' motiv M-CAT, i když s nižší afinitou. Tato nízkoafinitní interakce byla poté strukturně charakterizována

a mohla by představovat potenciální způsob regulace aktivity transkripčního faktoru. Nakonec byla studována vazebná kooperativita transkripčních faktorů FOXO4 a TEAD1.

Předložená disertační práce obsahuje závažné a nové výsledky studia pro obě zmíněné části a je pečlivou dokumentací vhodnosti zvolených přístupů. Výsledky jsou originální a původní, což mimo jiné dokladuje seznam přiložených publikací, na kterých je předkladatelka 2x prvoautorem a 2x spoluautorem. Samotný výčet cílů a přístupů k řešení je důkazem, že jde skutečně o adresování otázky strukturní charakterizace interakcí TF a DNA a jejího zodpovězení.

Cíle a téma disertace jsou náročné a oceňuji jak systematickosti přístupu tak i úroveň zpracování. Práce je rozdělena do úvodu, který je skvělou literární rešerší i úvodem do problematiky a 2 hlavních částí, jak bylo zmíněno výše. Samotný úvod je pojat tak důkladně, že může sloužit i jako samostatné review. Za vůbec nejdůležitější část považuji část výsledků, kde předkladatelka nazírá dosažené výsledky v kontextu problematiky a určitým způsobem dokumentuje význam MS a ostatních technik pro zodpovězení biologicky významných otázek. Práce je psána dobrou angličtinou s minimálním množstvím překlepů. O její celkové kvalitě nemám žádné pochybnosti. Velmi přesvědčivě je ukotvena na publikovaných výsledcích v impaktovaných časopisech.

Je patrné, že za dosaženými výsledky stojí i týmová práce ve skupině a zásadní podíl školitele a konzultanta na celkovém vedení. To dovoluje jednak čerpat ze zkušeností řešitelského kolektivu a zároveň definovat cíle pro samostatné vědecké bádání, které je založeno na dosažených výsledcích. Tím je i zodpovězena otázka, jak je předkladatelka schopna působit v rámci vědecké skupiny a na kolik jsou její výsledky skutečným zvládnutím dané problematiky a samostatného přístupu.

Celkově tedy hodnotím předkládanou disertační práci Mgr. Růženy Filandrové jako výbornou, a jednoznačně doporučuji k dalšímu řízení pro obdržení titulu PhD.

Rád bych, aby v diskusi a při obhajobě předkladatelka zareagovala na následující otázky a podněty:

- 1) V rámci výsledků a diskuse k publikaci 1 mě zaujal rozdílný efekt dvou denaturantů - močoviny a guanidinia HCl. V disertaci i v publikaci se uvádí, že výběr vhodných podmínek závisí do značné míry na proteinu. V případě testovaných membránových proteinů by mě zajímalo:
  - Jak si vysvětlujete z atomistického či molekulárního popisu povahu působení močoviny a guanidinia? Existuje, nebo je podle vaší zkušenosti možné, že například u globulárních proteinů by použití guanidinia naopak zlepšovalo testovanou metodiku?
  - Pokud je to možné, lze nějak fyzikálně-chemicky charakterizovat zkoumané membránové proteiny či případně provést jejich srovnání (včetně literatury) s jinými typy membránových proteinů?
  - Rozumím správně závěru, že ve 2 případech byl jasným favoritem pro štěpení pepsin, zatímco ve zbývajících případech Rhizopuspepsin? Může tento rozdíl být

někjak vysvětlen odlišným charakterem obou proteáz z hlediska jejich substrátové specifity či nároku na charakter vazebného místa?

- 2) Podobná otázka se týká použití proteolytických enzymů v případě zkoumání komplexů FOXO4-DBD/DAF16 a TEAD1-DBD/M-CAT. Zde je zajímavé zjištění, že rozdíl pouhých 2bps měl tak rozdílný efekt na peptide recovery u obou zmíněných systémů. Předpokládám, že zde je vysvětlení rozdílného působení močoviny a guanidinia jiné, než tomu bylo v předchozím případě. Nicméně, jak se zdá, zde se jako optimální postup jeví použití nejprve pepsinu a poté nepenthesinu (FOXO4) a Aspergillopepsinu (TEAD1-DBD/M-CAT). Nebylo testováno také použití proteolytických enzymů v opačném pořadí? A jaký by byl předpokládaný efekt?
- 3) Většina vysvětlení týkající se specifity TFs a vazebného motivu DNA je strukturně vysvětlitelná interakčními motivy aminokyselina-báze (cukr, fosfát). Nicméně je zde i nespecifický typ vazby (indirect readout), který může být připsán interakci například nestrukturované části proteinu s malým žlábkem. Do jaké míry je použitá metoda schopná takový typ interakce mapovat a popsat a do jaké míry souvisí s tzv. nepřímým konformačním efektem na povahu vazby?
- 4) Poslední otázka směřuje ke zjištění, že sekvence oblastí DNA obklopujících motiv M-CAT ovlivňují jeho vazebnou afinitu k TEAD1-DBD a transkripční faktor je schopen vázat se také na invertovaný 5'-CCTTA-3' Motiv M-CAT, i když s nižší afinitou. V práci se uvádí že tato interakce může představovat potenciální způsob regulace aktivity transkripčního faktoru. Podle mého soudu vše souvisí s koncentrací proteinu schopného vázat se na obě místa. Při jakých hodnotách koncentrace se tento regulační mechanismus začíná uplatňovat a jak souvisí s primárním místem vazby TF?