

Oponentský posudek na disertační práci **Mgr. Romany Filandrové**
„Structural characterization of interaction between transcription factors and DNA“

Předložená disertační práce Mgr. Růženy Filandrové se zabývá využitím hmotnostní spektrometrie při studiu struktury proteinů a jejich komplexů s vazebnými partnery. Přestože se nejedná o primární metodu studia 3D struktur biomolekul a lze ji považovat za spíše metodu s nižším rozlišením ve srovnání např. s rentgenovou difrakcí, NMR či kryoelektronovou mikroskopií, i tato disertační práce ukazuje, že je schopná přinést nové informace především na místech, kde zvyšně zmíněné metody selhávají.

Těžiště disertační práce je zaměřeno na studium vybraných transkripčních faktorů a jejich interakcí s rozpoznávanými DNA vazebnými motivy s primárním zaměřením na DNA-vázající doménu TEAD1 proteinu a posléze rozšířena i na transkripční faktor FOXO4.

Kromě optimalizace podmínek pro HDX-MS analýzy vodík/deuteriových výměn a jejich využití při studiu, byl charakterizován vliv okolí rozpoznávaného motivu na DNA (M-CAT) na vazebné vlastnosti TEAD1 faktoru, a také byla objasněna podstata a afinita jeho interakce s invertovaným motivem.

Práce má obvyklou strukturu a členění zahrnující český i anglický souhrn, teoretickou část, popis jednotlivých projektů, získaných výsledků a jejich diskuze. Práce je psána v anglickém jazyce na velmi dobré jazykové úrovni, v souhrnu teoretické a experimentální části o rozsahu 80 stran. K disertaci jsou připojeny publikované výsledky, což umožňuje jednodušší orientaci v dosažených výsledcích. Velmi oceňuji čtivou a přehlednou teoretickou část, která představuje základní studovanou problematiku od obecného představení transkripčních faktorů a jejich roli v regulaci transkripce, detailního přiblížení rodin transkripčních faktorů TEAD a FOXO a jejich struktur až po základní charakteristiku používaných metod při 3D studiu biomolekul.

Cíle práce jsou vhodně definovány a dostatečně charakterizují záměr, čeho práce měla za obecný cíl dosáhnout. Velmi oceňuji jejich formulaci, a sice že nejsou pouze bodově uvedeny, ale jsou koncipovány v dalších souvislostech.

Metodická část je představena pouze jako seznam použitých metod s komentářem, že detaily lze nalézt v příložených publikacích. I když pominu, že část DP nebyla dosud publikována, a tudíž detailní metodologie není tím pádem k dispozici, toto řešení shledávám nešťastným. Bylo by vhodné ke každé metodě přidat alespoň pár vět, ať již s popisem, ve které části disertační práce byly použity anebo u každé uvést alespoň odkaz na konkrétní publikace, ve kterých lze tyto detaily nalézt. Nemyslím, že by měl čtenář prohledávat čtyři publikace, ve které z nich najde příslušné detaily či alespoň náhled na obecné provedení.

Výsledková část velmi logicky shrnuje dosažené výsledky. Začíná jako rozepsaný komentář výsledků, které lze najít v publikovaných výsledcích. Velmi příjemně se tato kapitola čte, věci na sebe logicky navazují, práci neustále provází velmi pochopitelná linka, co a proč se v danou chvíli řešilo. V disertaci mi trochu splynul přechod od publikovaných k nepublikovaným výsledkům, ale to je spíše drobnost. Oceňuji správné popisy obrázků, které jsou dostatečně detailní a není potřeba dohledávat příslušné

informace v textu, a také shrnutí výsledků, které není pouze obecným popisem, čeho se podařilo dosáhnout, ale zahrnuje všechny dílčí klíčové poznatky, které tvoří podstatu předložené disertační práce.

Mgr. Růžena Filandrová dosud publikovala tři vědecké práce a jeden metodický článek. Je spoluautorkou článků v *Analytical Chemistry a Biomolecules*, a první autorkou článku v metodické sérii *Methods in Molecular Biology* a především vědeckého článku ve velmi kvalitním časopise *Structure*, kde mohla zúročit všechny optimalizační a „proof_of-concept“ dílčí výsledky. Mohu konstatovat, že Růžena Filandrová prokázala, že je schopna samostatné vědecké práce, a to nejen v úzce zaměřené oblasti vědy. Navíc práce je velmi dobře sepsána, všechny výsledky do detailů diskutovány se současnými poznatky v oblasti a já mohu pouze doktorandce pogratulovat k velmi kvalitním výsledkům a novým poznatkům, která práce přinesla.

Otázky do diskuse:

1) Imobilizované proteasy vedli k následnému lepšímu pokrytí sekvence štěpených proteinů. Čemu to přisuzujete? Dochází podle Vás k lepšímu kontaktu mezi proteiny či se uplatňuje zvýšená stabilita proteinů? Nezkoušeli jste stabilitu proteas v roztoku/imobilizovaných blíže testovat?

2) Testováním různých proteas jste prokázali, že štěpení je přes optimalizace stále spíše protein-dependentní. Jednak by mne zajímalo, kolikrát byla opakována digesce jednotlivých proteinů – respektive, dochází při opakovaném postupu ke stejnému počtu a stejných identifikovaných peptidů? Myslíte, že lze do budoucna nalézt „svatý grál“ – univerzálně použitelné proteasy. Má smysl se zaměřovat na štěpící enzymy s nějakou konkrétní specifitou?

3) Ve článku v časopise *Structure* mne zaujalo, že v citacích na HDX a chemické síťování proteinů jsou uvedeny tři domácí články. Znamená to, že patříme ke světové špičce na tomto poli?

4) Píšete, že pomocí MS přístupů nelze řešit struktury proteinů a je vždy potřeba templát pro homologní modelování. Myslíte, že se tento handicap někdy podaří v budoucnosti zlomit? Jak vysoká sekvenční podobnost je nutná pro vyřešení 3D struktury homologního proteinu (ve Vašem případě jste používali stejný protein, ale kdybyste chtěli řešit čistě příbuzný protein)?

V souhrnném hodnocení mohu konstatovat, že studentka úspěšně zvládla celou řadu pokročilých experimentálních metod, s jejich využitím byl získán rozsáhlý soubor cenných výsledků v rámci vědeckých projektů jejího pracoviště, a které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech.

Na základě výše uvedeného, doporučuji disertační práci Mgr. Růženy Filandrové k obhajobě a aby jí byl po absolvování úspěšné obhajoby udělen akademický titul Ph.D.

V Brně 4. června, 2021

Prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.