

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Marcely Holé: Mechanismy reparace DNA u mechu *Physcomitrella patens*

Disertační práce Mgr. Marcely Holé je sepsána v podobě komentovaného souboru publikací v mezinárodních odborných časopisech, s velmi zdařile zpracovanou společnou úvodní částí a Diskusí v češtině. Autorka v úvodu poskytuje ucelený, aktuální a srozumitelný přehled o zkoumané problematice a použitém modelovém organismu *Physcomitrella patens*. Rovněž po formální stránce je úvodní část na kvalitní úrovni, s přijatelnou frekvencí překlepů, anglicismů a drobných nepřesností, z nichž některé uvádím níže:

str. 16 - „...a díky tomu udržují konce DNA ve vzájemné juxtapozici...“

str.17 – „...zřejmě jako prevence ztráty heterozygosity...“

Na str. 17 autorka uvádí, že protein RAD51 má v *Arabidopsis* jeden paralog. Je tomu skutečně tak?

Str. 22 – „V laboratorních podmínkách simuluje Bleomycin efekt působení ionizačního záření, protože se dokáže vázat k DNA a za přítomnosti redukčních iontů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) a kyslíku indukovat štěpení DNA...“. Jak působí Cu^{2+} jako redukční iont? Na co se přitom oxiduje?

Str 24 – „...způsobuje modifikaci DNA přidáváním metylační skupiny mechanismem SN2...“

Str. 27 – „Ranné stadium protonemy...“

Výsledková část práce se skládá ze dvou prvoautorských a tří spoluautorských publikací (jedna ze spoluautorských prací je konferenčním příspěvkem publikovaným v recenzovaném časopise *Frontiers in Genetics*).

V práci Holá et al., *BioMed Research International*, 2013, je pomocí kometového testu analyzována kinetika odpovědi na poškození DNA indukované Bleomycinem u standardních a mutantních *lig4* linií *P. patens*. Výsledky ukazují, že k opravě dvouvláknových zlomů DNA dochází i v nepřítomnosti funkční LIG4, zatímco oprava jednovláknových zlomů je vážně narušena. Analýza indukovaných mutací ukázala, že za citlivý fenotyp a zastavení růstu a vývoje může akumulace mutací a nikoli přetrvávající (neopravená) poškození DNA.

V další prvoautorské práci Holá et al., *Plant Physiol Biochem*. 2015, studovali autoři odpověď protonemálních kultur standardních a mutantních linií *P. patens* (v genech pro faktory opravy DNA) na záření UVB. U linií, které mutací získaly rezistenci k 2-

Fluoroadeninů díky mutaci v adenosin-fosfotransferázovém genu (APT) byly sekvenací určeny mutace a současně byla analyzována oprava dvouvláknových zlomů a odstranění cyklobutanových dimerů indukovaných UV zářením. K tomu byl využit opět kometový test kombinovaný v případě testu odstranění cyklobutanových dimerů s použitím T4 endonukleázy V, která je specifická k pyrimidinovým dimerům indukovaným UV zářením. Výsledky ukázaly, že UVB indukuje rozsáhlou mutagenní opravu, která způsobuje vysokou frekvenci mutací, v porovnání s pomalou dráhou bezchybné nukleotidové excizní opravy.

Spoluautorská práce Šmídková et al., Biol Plant 2010, je metodickou prací, v níž byla etablována metodika účinné biolistické transformace *P. patens* na pracovišti kandidátky. Dalším spoluautorským příspěvkem kandidátky je práce Kamisugi et al., Nucleic Acids Res. 2012. V této práci byl prokázán podíl funkce MRE11 a RAD50 na cílené reparaci a manipulaci genů (*gene targeting*), zatímco faktor NBS1, který dle současných představ vystupuje ve stejném komplexu MRN, není k tomuto procesu nezbytný. K této práci publikované ve vysoce prestižním časopise autorka přispěla izolací *apt* mutant po působení bleomycinu a identifikací mutací v sekvenci lokusu genu APT u *wt* a *pprad50* mutant rezistentních k 2-FA. Článek v konferenčním sborníku publikovaném ve zvláštním čísle časopisu Frontiers in genetics (Kozák et al., 2015) pak podává přehled o vývoji metody kometového testu a o poznatcích, kterých bylo s přispěním této metody dosaženo, především při měření kinetiky oprav dvouvláknových a jednovláknových zlomů DNA a specifických typů lézí (CPD) u rostlin.

Následuje souhrnná diskuse, která shrnuje obecné rozdíly mezi živočišnými a rostlinnými systémy a především výhody rostlinných modelových systémů spočívající v životaschopnosti mutant v reparačních faktorech. Hodnotí různé možnosti transformace u *P. patens* a dosavadní výsledky získané studiem indukce a reparace mutací u tohoto organismu. Diskuse je rozsahem přiměřená také s ohledem na to, že specifické výsledky jsou diskutovány již v původních pracích. Práce je zakončena stručným a výstižným Závěrem a seznamem použitých citací.

K práci nemám – kromě již zmíněných poznámek k úvodní části – žádné další dotazy a připomínky, což je v souladu s tím, že všechny publikace, jejichž soubor tvoří disertační práci, již prošly úspěšně recenzními řízeními v mezinárodních odborných časopisech.

Dovolím si na závěr jen jeden obecný dotaz: na řadě míst autorka správně uvádí přednosti modelového systému *P. patens*, k jehož zavedení do výzkumu reparací DNA svou prací významně přispěla. Vidí autorka také nějaké negativní nebo problematické rysy tohoto systému při jeho využití ke studiu oprav DNA a funkce genů? A pokud ano, jakým způsobem lze tyto problematické stránky minimalizovat nebo obejít?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce je vysoce kvalitní, přináší originální poznatky i metodické pokroky ve svém oboru, a splňuje nároky kladené na disertační práci.

Práci doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 18. 11. 2015

Prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.

Přírodovědecká fakulta MU a CEITEC