



UNIVERZITA KARLOVA, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE
ALBERTOV 6, 128 43 PRAHA 2
ČESKÁ REPUBLIKA

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. Marka Poláka nazvanou:

„Použití pulsního značení pro studium dynamiky proteinů a proteinových komplexů“

Předložená doktorská disertační práce je zaměřena na využití kovalentních modifikací proteinů spojených s hmotnostní spektrometrií (MS) pro studium struktury, dynamiky a interakcí vybraných proteinů a proteinových komplexů. Metodické přístupy na bázi MS jsou užitečnými a často využívanými nástroji strukturní biologie a představují komplementární metody k tradičním technikám jako je proteinová krystalografie, NMR či kryo-elektronová mikroskopie. Metody založené na MS jsou schopny poskytnou strukturní informaci i u systémů, kde je použití tradičních metod strukturní biologie problematické či přímo nemožné. Zvolené téma disertační práce proto považují za velmi aktuální.

Disertační práce Mgr. Marka Poláka je založena na čtyřech publikacích (třech již vyšlých a jednom rukopisu v přípravě) a je psána anglicky zkráceným způsobem, tedy jako komentář k publikacím. V přehledu literatury autor shrnuje principy MS metod používaných ve strukturní biologii a zejména pak metod založených na kovalentním značení proteinů s důrazem na tzv. radikálový footprinting. Kapitola s výsledky je rozdělena na čtyři části dle publikací. V publikaci I se autor věnoval testování využití tzv. rychlé fotochemické oxidace proteinů (FPOP) pro studium struktury modelového protein/DNA komplexu, konkrétně komplexu DNA-vazebné domény transkripčního faktoru FOXO4 (FOXO4-DBD) s dsDNA obsahující tzv. DAF-16 motiv. Kombinací různých přístupů sledoval konformační změnu FOXO4-DBD, která je indukována tvorbou komplexu. Na tuto práci pak navázal publikací II, ve které se zabýval výběrem nejvhodnějšího top-down přístupu analýzy proteinů modifikovaných pomocí FPOP. Publikace III, která byla v době odevzdání práce v přípravě, byla zaměřena na studium fragmentace DNA a ukázala použitelnost strukturní charakterizace DNA pomocí modifikace hydroxylovými radikály ve spojení s MS analýzou s vysokým rozlišením. V poslední publikaci se pak autor podílel na využití top-down přístupu v analýze proteinů oxidovaných působením singletního kyslíku.

Předložená disertační práce jasně ukazuje, že výsledky Mgr. Marka Poláka představují významný příspěvek k vývoji metod MS a jejich využití k řešení různých strukturně-biologických problémů. Z hlediska formální podoby je práce psána přehledně s minimálním

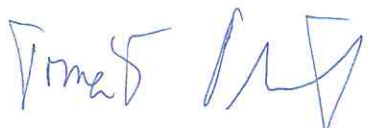
výskytem překlepů či formulačních nejasností. Výsledky práce byly publikovány ve třech kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Na dvou z těchto publikací je Mgr. Marek Polák prvním autorem, na publikaci v přípravě je také prvním autorem. U každé publikace je deklarován podíl doktoranda na příslušné publikaci.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. Data z publikace III naznačila, že interakce TEAD1 s FOXO4-DBD snižuje vazebnou afinitu FOXO4-DBD vůči oligonukleotidové sekvenci nazvané NO2. Bylo toto pozorování ověřeno prostřednictvím jiné metody?
2. Jakou biologickou funkci má interakce TEAD1 s FOXO proteiny?
3. Naznačily vaše experimenty i nějaké protein-proteinové interakce mezi TEAD1 a FOXO4-DBD v ternárním komplexu s NO2?
4. V publikaci II se vám podařilo výrazně zvýšit prostorové rozlišení top-down analýzy. Mohl byste získané rozlišení porovnat s rozlišením, kterého by u stejného systému (FOXO4-DBD/IRE) bylo možné dosáhnout pomocí HDX-MS? Můžete oba přístupy porovnat z hlediska časové a instrumentální náročnosti.
5. Jaká je přesnost identifikace vazebného motivu v DNA pomocí přístupu popsaného v publikaci III? Mohl by autor porovnat výsledky prezentované na Obr. 3-5 z publikace III s krystalovou strukturou FOXO1-DBD/dsIRE, (PDB ID: 3coa) která je podobná studovanému systému FOXO4-DBD/dsIRE?
6. Bylo by možné využít metodologii popsanou v publikaci III ke studiu 3D struktury velkých molekul RNA (např. rRNA či ribozymů)?

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Marka Poláka představuje cenný přínos k vývoji a využití metod MS pro studium struktury, dynamiky a interakcí proteinů, nukleových kyselin a jejich komplexů. Práce je psána srozumitelně, většina výsledků práce byla publikována. Autor ve své doktorské disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Jelikož předložená práce Mgr. Marka Poláka vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně **doporučuji** její přijetí k obhajobě.



prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Katedra fyz. a makromol. chemie
Přírodovědecká fakulta UK, Praha

V Praze 30. dubna 2024