



## Masarykova univerzita

### Fakulta

Přírodovědecká fakulta MU

### Habilitační obor

Molekulární biologie a genetiky

### Uchazeč

Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

### Pracoviště

Biofyzikální ústav AV ČR

### Habilitační práce

Charakteristika vazebných vlastností proteinů se zaměřením na křížové struktury

### Oponent

prof. RNDr. Lubomír Tomáška, DrSc.

### Pracoviště

Přírodovědecká fakulta UK, Bratislava

## Text posudku

Mgr. Václav Brázda, Ph. D. (ďalej uchádzač) je jedným z pokračovateľov renomovanej brnianskej vedeckej školy zaoberajúcej sa štruktúrnou analýzou nukleových kyselín. Úvodom treba poďakovať, že všetko nasvedčuje tomu, že na tradície tejto školy úspešne nadviazal. Potvrdzujú to výsledky jeho doterajšej (stále relatívne krátkej) vedeckej kariéry, z ktorých v habilitačnej práci prezentuje len jednu časť. Tá je v širšom zmysle venovaná prepojeniu štruktúrnych vlastností, ktorými disponujú niektoré časti genómu, s ich fyziologickou úlohou, realizovanou predovšetkým prostredníctvom väzby špecializovaných DNA-väzbových proteínov. Ako uchádzač konštatuje hneď v úvode textu, informácia zakódovaná v DNA nie je iba lineárnou postupnosťou nukleotidov, ale dynamickou inštrukciou modulovanou okrem iného aj DNA-proteínovými interakciami. Detailné porozumenie týchto interakcií je jedným z kľúčov k porozumeniu fungovania zdravých i patologicky pozmenených buniek.

Habilitačný spis je komentovanou zbierkou 17 pôvodných prác, ktoré spája problematika štúdia DNA-väzbových vlastností viacerých proteínov (p53, 14-3-3, BRCA1 a IFI16), ktoré rozpoznávajú rôzne typy nekanonických štruktúr DNA (křížové väzby, triplexy, kvadruplexy, ľavotočivá DNA). Tieto typy uchádzač stručne popisuje v úvode svojho súhrnu a aj keď nejde o strhujúcu beletriu, text je informatívny a dáva čitateľovi dobrý základ pre čítanie ďalších častí práce. V druhej časti úvodu sa autor venuje stručnej charakterizácii proteínov, ktoré rozpoznávajú rôzne typy štruktúr DNA, pričom predstavuje predovšetkým tie z nich, na ktorých štúdiu sa podieľal. Predovšetkým v prípade proteínu p53 je veľmi zložitú vyabstrahovať z literatúry (PubMed eviduje takmer 80 000 prác o p53) to najpodstatnejšie a tieto informácie skondenzovať do niekoľkých odsekov textu. Hoci nie som špecialista v oblasti p53, domnievam sa, že uchádzač vybral skutočne to najdôležitejšie a prezentuje dobrý prehľad o študovaných proteínoch. Vo výsledkovej časti potom komentuje práce podľa riešenej problematiky. Z výsledkov sa mi zdali najzaujímavejšie (1) pozorovanie, že p53 sa preferenčne viaže na superšpiralizovanú DNA (bez ohľadu na smer vinutia); (2) rozdielny vplyv fosforylácie p53 rôznymi proteín kinázami na väzbu proteínu na DNA;

a (3) využitie monoklonálnych protilátok na štúdium väzby p53 na DNA. Ostatné prezentované práce sú však tiež pekné a to, že v komunite zarezovali dokumentuje aj fakt, že veľká časť z nich bola už (miestami hojne) citovaná.

Na väčšine publikácií (10/17) je uchádzač v pozícii prvého, resp. korešpondujúceho autora, čo ilustruje, že sa na nich zásadnou mierou podieľal. Na druhej strane, vzhľadom k tomu, že ide o práce mnohoautorské, stálo by za úvahu v komentároch k publikáciám explicitne uviesť, aký bol jeho konkrétny príspevok (tak, ako to v súčasnosti vyžadujú aj mnohé časopisy). Kvalite spisu by to nepoškodilo a zároveň by to spoluautorom umožnilo tieto publikácie (s rovnakou podmienkou) využiť pre ich kvalifikačný rast.

### Dotazy oponenta k obhajobe habilitačnej práce

1. Na str. 26 je údaj odvodený z prác 1-4, že okrem centrálnej oblasti p53 sa na väzbe na DNA a vyhľadávaní sekvencií na dlhých molekulách podieľa aj C-terminálna doména. Na druhej strane, práca 6 ukazuje, že protilátky k C-koncovkej doméne p53 ho aktivujú k sekvenčne-špecifickej väzbe. Z prvoplánového pohľadu je to prekvapivé pozorovanie, keďže by sa asi dalo predpokladať, že väzba protilátky bude skôr inhibovať prístup domény k DNA. Má autor nejakú hypotézu, ako by vysvetlil mechanizmus tejto aktivácie?
2. Uchádzač sa podieľal na vyriešení 3D štruktúry proteínu IFI16, ktorý moduluje aktivitu p53 (veľmi pekná práca v *Structure* 19: 418-429 (2011)). Zo štruktúry vyplýva, že proteín obsahuje OB-fold subdomény, ktoré sa často vyskytujú u proteínov viažúcich jednovláknovú DNA. V práci Brázda *et al.* (2012) je popísaná väzba IFI16 na superšpiralizovanú dvojitú DNA (ds) DNA a sú citované ďalšie práce, naznačujúce väzbu IFI16 na dsDNA. Vie sa niečo o úlohe OB-fold subdomén pri väzbe proteínu na dsDNA, resp. ktorá časť proteínu IFI16 je zodpovedná za väzbu na dsDNA?
3. Z náhodných účastí na seminároch týkajúcich sa BRCA1 mám dojem, že je pomerne ťažké získať dostatočné množstvo dostatočne čistého BRCA1, resp. jeho skrátenejších foriem. V práci 15 boli analyzované 4 formy BRCA1 purifikované z *Escherichia coli*, nie je však uvedený obrázok SDS-PAGE gélu, ktorý by ilustroval ich čistotu. Na stanovenie koncentrácie proteínov je využívaná Bradfordovej metóda, ale pokiaľ je preparát kontaminovaný inými polypeptidmi (pričom stupeň znečistenia by sa mohol medzi jednotlivými formami líšiť), nie je celkom možné stanoviť pomer proteín:DNA. Má autor predstavu o čistote proteínov, ktoré v analýzach použil?

### Záver

Habilitačná práca Václava Brázdu „Charakteristika vazebných vlastností proteínů se zaměřením na křížové struktury“ *spĺňa* požiadavky štandardne kladené na habilitačné práce v odbore Molekulárna biológia a genetika.

Bratislava, dňa 24. augusta, 2015

prof. RNDr. Ľubomír Tomáška, DrSc.