

Oponentský posudek na habilitační práci

Mgr. Karel Kubíček, Ph.D.

„NMR-based Structural Biology for Studying Biomolecular Interactions.“

Předložená habilitační práce se sestává z 31 stran textu a 8 kopií originálních článků, které se vztahují k tématu habilitační práce. Práce je napsána v angličtině a jejím tématem je využití NMR spektroskopie pro studium interakcí biomolekul. Textová část práce je rozdělena do čtyř hlavních kapitol. První kapitola je úvod, druhá se zabývá představením pěti různých biologických systémů, na kterých autor studoval vzájemné interakce biomolekul. Třetí a čtvrtá kapitola je laděna spíše prakticky a autor v ní popisuje experimentální stránku NMR spektroskopie se zaměřením na studium interakcí biomolekul.

Jak jsem již zmínil, úvod práce obsahuje představení pěti biologických systémů, konkrétně tubulinu, RNA polymerázy II, třetí kapitola je věnována C-terminálním doménám RNA polymerázy II, čtvrtá cis-platině a jejím derivátům a poslední kapitola pojednává o RNA vázicích proteinech. Na tomto místě bych si dovilil malou výtku k obsahu výše zmíněných kapitol. Obecné představení každého systému je naprosto v pořádku pro uvedení čtenáře do zpracovávané problematiky. Podle mého názoru by však rozhodně nebylo na škodu rozšířit tyto kapitoly o stručný popis výsledků, které autor dosáhl, a které jsou dále detailněji popsány v kopiích publikovaných článků. Mnohdy by stačilo jen poněkud rozšířit stručný, jednovětný úvod před každým článkem alespoň na rozsah paragrafu., který by mohl obsahovat i autorovo hodnocení těchto výsledků (na což není prostor v abstraktech článků).

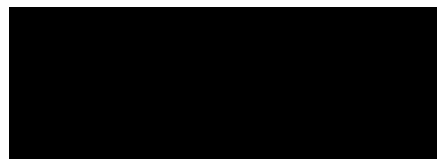
Moje další připomínka se týká volby témat v kapitolách tři a čtyři, kde autor popisuje nástroje a postupy NMR spektroskopie, které jsou využívány pro studium interakcí biomolekul. Místo poněkud rozvláchného odvození disociační konstanty bych na tomto místě preferoval spíše zmínku o moderních metodách typu CEST, případně relaxační disperze, které se v dnešní době čím dále více využívají právě pro studium interakcí biomolekul. Na druhou stranu však uznávám, že výběr popisovaných témat v habilitační práci je plně v kompetenci autora, jen mi to nedalo se o tom nezmínit.

Z předložené práce vyplývá, že se autorovi podařilo dosáhnout mnoha, velmi kvalitních výsledků, které byly publikovány v renomovaných periodikách. Dnešní moderní strukturní biologie není o jedné metodě, nýbrž o kombinaci výsledků různých experimentálních metod, např. cryo-EM, X-ray, SAXS a dalších, spolu s využitím bioinformatiky a sofistikovaných výpočetních metod. A právě takovýto přístup je patrný z autorových publikací, kdy využívá špičkové vybavení svého mateřského pracoviště a dovedně kombinuje experimentální výsledky instrumentálních a biochemických metod, spolu s výpočetními metodami za účelem maximalizování výsledného efektu v podobě co největšího množství informací o studovaném systému. Mgr. Kubíček je autorem 19 publikací s celkem 479 citacemi a h-indexem 10.

Závěrem svého posudku rád konstatuji, že Mgr. Karel Kubíček, Ph.D. je velmi nadaným představitelem nové generace strukturních biologů, kterému se podařilo

dosáhnout pozoruhodných výsledků ve svém oboru. Na základě výše uvedených skutečností se domnívám, že uchazeč jednoznačně splnil zákonné požadavky kladené na habilitační práce v oboru biofyzika, a proto doporučuji jeho práci přijmout jako podklad pro další řízení vedoucí k udělení titulu docent.

V Praze, dne 27.2. 2020



prof. Ing. Richard Hrabal, CSc.

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Karel Kubíček, Ph.D.
Habilitační práce	NMR-based Structural Biology for Studying Biomolecular Interactions
Oponent	Prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Pracoviště oponenta, instituce	Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Habilitační práce Mgr. Karla Kubíčka, Ph.D. se zabývá využitím metod jaderné magnetické rezonance (NMR) při studiu biomolekulárních interakcí. Metody NMR mají v rámci strukturní biologie široké využití, zejména pak při studiu interakcí proteinů či nukleových kyselin s různými vazebnými partnery. Habilitant v rámci své dosavadní vědecké kariéry využil metody NMR při studiu řady systémů včetně charakterizace interakcí protein-ion, protein-protein, protein-RNA či strukturní charakterizaci modifikované DNA nebo ligandu navázaného na protein a tomu odpovídá i výběr publikací, které dr. Kubíčka začlenil do svého habilitačního spisu.

V rámci úvodních kapitol své habilitační práce dr. Kubíček detailněji diskutuje: (i) Objasnění struktury Tubulysinu A navázaného na protein tubulin, který je základní složkou mikrotubulů. Tubulysin A je peptidická sloučenina, která destabilizuje polymeraci tubulinu a vykazuje výrazné antiangiogenní vlastnosti.; (ii) Strukturní charakterizaci interakcí domén interagujících s C-terminální doménou RNA Pol II (CTD). Tyto domény patří mezi tzv. CTD-readers, tedy proteiny rozpoznávající CTD nesoucí unikátní pattern post-translačních modifikací.; (iii) Strukturní charakterizaci aduktů derivátů cisplatin s duplexem DNA; a (iv) Vyřešení struktury komplexu RNA s RNA-vazebnou doménou proteinu Nab3 (nuclear polyadenylated RNA-binding protein), který spolu s proteinem Nrd1 tvoří komplex hrající klíčovou roli v regulaci RNA Pol II.

V následující kapitole pak dr. Kubíček popisuje přípravu vzorků pro NMR měření a obecné principy studia molekulových interakcí metodami NMR. Habilitační spis dále obsahuje osm vybraných publikací dr. K. Kubíčka a jeho spolupracovníků týkající se diskutovaných témat a celkové shrnutí. Vybrané práce byly publikovány ve velmi kvalitních zahraničních časopisech, např. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *EMBO Reports*, *Molecular Cell*, *Nucleic Acids Research* či *Angewandte Chemie Int. Ed.*

Dle údajů z listopadu 2019 Dr. Karel Kubíček zatím publikoval 19 prací, které získaly 386 citačních ohlasů bez autocitací, Hirschův index kandidáta byl 10. Mezi nejvíce citované patří publikace v *PNAS USA* týkající se úlohy Cu-vázajících proteinů na tvorbě kvarterní struktury bakteriální cytochrom c oxidasy (citována 61×), *Genes and Development* týkající se interakce RNA Pol II s proteinem Nrd1 (citována 55×), *Angewandte Chemie Int. Ed.* týkající se interakcí tubulinu s epothilonem (citována 54×) a *Molecular Cell* týkající se koordinace terminace transkripce a degradace nekódující RNA (citována 45×). To vše svědčí o tom, že dosavadní práce Dr. Karla Kubíčka a jeho spolupracovníků významně přispěla k problematice studia interakcí biomolekul a získala značnou pozornost vědecké komunity v oboru.

Předložená habilitační práce jednoznačně ukazuje, že Dr. Karel Kubíček patří mezi zkušené strukturní biology s vynikajícími výsledky. Je expertem na strukturní analýzu proteinů a jejich

komplexů pomocí metod NMR. Metodický záběr Dr. Karla Kubíčka je však širší, kromě NMR využívá např. i metody kryoelektronové mikroskopie.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

K předložené habilitační práci mám několik dotazů, které jsou spíše náměty do diskuse:

1. Ovlivní zavedení NMR spektrometrů s vodíkovou frekvencí 1.2 GHz zásadním způsobem další rozvoj metod, které využíváte v rámci svého výzkumu?
2. Dostaly se nějaké sloučeniny analogické tubulysinu (inhibitory polymerace tubulinu) do klinických zkoušek či dokonce do klinické praxe? Jaká je toxicita těchto látek?
3. Jaký je poslední vývoj v oblasti derivátů cisplatinu a jejich klinického využití?
4. Při studiu interakcí Nab3 s RNA (JBC 283, 3645-3657) či Nrd1p CID s CTD RNA Pol II či Trf4p NIM (Mol. Cell 55, 467-481) byly vazebné afinity určeny na základě měření změn stacionární anisotropie fluorescence. Proč nebyly vazebné afinity určeny z příslušných NMR titrací? Pokud byly, jak se shodovaly s výsledky fluorescenčních titrací?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Karla Kubíčka, Ph.D. „NMR-based Structural Biology for Studying Biomolecular Interactions“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Biofyzika.

V Praze dne 4. března 20



.....
podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Karel Kubíček, Ph.D.
Habilitační práce	NMR-based Structural Biology for Studying Biomolecular Interactions
Oponent	Ing. Václav Veverka, Ph.D.
Pracoviště oponenta, instituce	Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR

Předložená práce je souborem převážně vysoce kvalitních vědeckých publikací spojených jednotčím úvodem. Ten vymezuje místo pro NMR spektroskopii v rámci metod strukturní biologie, přináší biologický kontext pro studované systémy a podrobněji se věnuje nejčastější aplikaci biomolekulární NMR spektroskopie – studiu interakcí. Práce je zakončena poučenou diskuzí budoucího směřování strukturní biologie.

Výsledky - vědecké publikace - prošly náročným recenzním řízením, proto nemám žádné připomínky ani negativní komentáře. Jak Dr. Kubíček sám uvádí, nejdůležitější rolí nejen NMR spektroskopie ale i celé strukturní biologie je přinášet odpovědi na zásadní biologické otázky. Proto bych uvítal bližší diskuzi během obhajoby zaměřenou na molekulární interakce v regulaci eukaryotní exprese, kterým se Dr. Kubíček dlouhodobě věnuje. K tomuto účelu mám několik konkrétních dotazů (viz níže).

Závěrem konstatuji, že předložená práce tvoří dobrý základ pro úspěšné habilitační řízení a těším se na diskuzi během obhajoby.

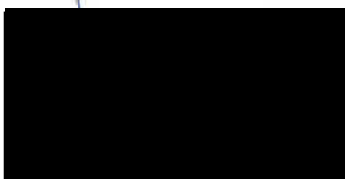
Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

- 1) Jakým způsobem přispívají nejnovější strukturní studie k pochopení fungování eukaryotické transkripce?
- 2) Nejvíce publikací se věnuje C-terminální doméně RNA polymerázy II. Můžete shrnout nejvýznamnější výsledky, které navazují na tyto dříve publikované práce? Jaké z Vašich závěrů byly potvrzeny? Co bylo naopak upřesněno?
- 3) Jaký máte expertní názor na vliv fázové separace na funkci C-terminální domény RNA polymerázy II a další procesy probíhající v jádře buněk?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Karla Kubíčka, Ph.D. „NMR-based Structural Biology for Studying Biomolecular Interactions“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Biofyzika.

V Praze dne 29. února 2020



podpis oponenta