

## Posudek na doktorskou dizertační práci

**Autor: Ing Johana Kollárová**

**Název: Regulace genové exprese na posttranskripčních úrovních**

Předkládaná práce Ing. Johany Kollárové využívá modelu hád'átka *Caenorhabditis elegans* ke studiu úlohy potenciálních regulátorů transkripce na úrovni celého organismu. Studium molekulárních mechanismů na úrovni celého organismu přináší řadu výzev a *C.elegans* je z tohoto pohledu jistě dobrou volbou.

Práce je klasicky členěna, v úvodu jsou nastíněny dílčí cíle. Následuje literární přehled uvádějící čtenáře do problematiky regulace genové exprese. Přehled se věnuje převážně oblastem relevantním pro následující kapitoly, je tak místy trochu kusý, nicméně vzhledem k šíři problematiky regulace exprese na různých úrovních to lze pochopit. Poměrně velký prostor je věnován posttranskripčním modifikacím a typům regulačních RNA, ve výsledcích pak tato témata ale nejsou až tak stěžejní. V metodické části jsou dostatečně popsány techniky, které autorka během své práce využívala. Kapitola Výsledky je rozdělena na dvě části, první se zabývá charakterizací genové exprese v případě, kdy je v hád'átku zmutován gen *gei-8* kódující ortolog transkripčního korepresoru NCOR. Hlavním výsledkem je seznam genů se sníženou a zvýšenou expresí oproti kontrolám. Mezi geny se zvýšenou expresí je gen *sqrd-2*, v jehož sekvenci se nacházejí rovněž sekvence pro 21U-RNA. Autorka uzavírá, že 21U-RNA se mohou podílet na regulaci vývoje gonád, jednoho z orgánů, jehož vývoj je poškozen ztrátou *gei-8*. Tento závěr je spíše spekulativní, předložená data dle mého názoru nelze takto jednoznačně interpretovat (viz Otázky). Druhá část výsledků je věnována analýze exprese a funkce tRNA methyltransferázy kódované genem *alkb-8*. Hlavním výsledkem je demonstrace vlivu umělé nadprodukce ALKB-8 na délku života a na snížení rozsahu LRO kompartmentu pozitivního na barvení Nilskou červení ve střevě. Výsledky první části jsou zahrnuty v publikaci v časopise PLoS One, druhá část výsledků je obsažena v manuskriptu přijatém k publikaci v časopise Folia Biologica, kde je Johana Kollárová první autorkou. Obě publikace jsou přiloženy jako příloha dizertační práce. Dizertační práce tak splňuje požadavky na publikace předepsané oborovou radou.

K práci mám dvě hlavní výhrady, jednu k rozsahu, druhou k obsahu. Přestože práce splňuje publikační požadavky oborové rady, na dizertační práci je poměrně výsledkově chudá, od dizertace bych čekala bohatší nálož byť třeba nepublikovaných výsledků. Co se týče obsahu, název práce je „Regulace genové exprese na posttranskripčních úrovních“, samotného popisu regulace exprese je ale v práci poskrovnu. Větší část je zaměřena na popis vizuálně pozorovatelných fenotypů způsobených ztrátou *alkb-8* nebo *gei-8*, což je důležitý a nezbytný základ. K mechanismům, které by tyto fenotypy na (post)transkripční úrovni objasňovaly, se však práce příliš nedostává. Pokud nejsou potřebná data k dispozici, čekala bych alespoň hlubší zamyšlení o možných regulačních mechanismech v diskuzi, to se ale moc neděje.

### Otázky k diskuzi:

- 1) Poznatky o funkci *alkb-8* jsou z velké části založeny na snížení exprese genu pomocí RNA interference. Delece v *alkb-8* způsobuje letalitu a sterilitu, žádný z těchto fenotypů nebyl pomocí RNAi pozorován. Čím si to vysvětlujete? Navrhněte způsob, jak ověřit účinnost *alkb-8* RNAi.
- 2) Zvolený způsob detekce exprese *alkb-8* sice překonává některé obtíže spojené s detekcí exprese genů organizovaných v operonech, nicméně použitý konstrukt stále nemusí obsahovat všechny potřebné

regulační sekvence, pozorovaná exprese tak nemusí odpovídat expresi endogenní. Jakým způsobem by bylo možné detekci exprese zpřesnit?

3) Není mi příliš jasný mechanismus, kterým by protein ALKB-8 měl ovlivňovat funkci LRO. Můžete to blíže vysvětlit? Čím si vysvětlujete, že po aplikaci *alkb-8* RNAi je nárůst signálu Nilské červeni pozorovatelný jen v proximálních enterocytech?

4) V textu dizertace (kapitola 3.1.3) přímo v názvu kapitoly tvrdíte, že 21U-RNA se podílí na vývoji gonád. To je na základě předložených dat velmi odvážné tvrzení, v textu dizertace (a přímo v publikaci) jsou výroky opatrnější, ale stále velmi spekulativní. Použité experimenty dle dostupných údajů v metodické části podle mě nevylučují, že pozorované fenotypy jsou způsobeny výhradně změnou exprese *sprd-1* nebo *sprd-2*, nikoliv regulací exprese 21U-RNA. Jakým způsobem by bylo možné tuto hypotézu dále testovat?

5) V kapitole 3.1.3 také tvrdíte, že *sprd-2* RNAi v *gei-8* pozadí vede k modifikaci fenotypu, v Diskuzi (kapitola 4.2) pak ale stojí, že *sprd-2* RNAi vede k částečné reverzi fenotypu *gei-8* mutantů. Můžete to prosím vysvětlit?

6) Protein GEI-8 interaguje s jaderným receptorem NHR-60, lze tedy předpokládat, že společně regulují stejné vývojové procesy. Lze něco takového usuzovat z fenotypových projevů *gei-8* a *nhr-60* mutantů?

7) Ne všechny geny se změněnou expresí identifikované pomocí microarray analýzy jsou pravděpodobně přímé cílové geny. Navrhněte postup, jak soubor deregulovaných genů zúžit na potenciální přímé cílové geny.

**Závěr:** Předložená práce i přes výše zmíněné nedostatky splňuje požadavky na doktorskou dizertační práci stanovené oborovou radou. Autorka prokázala schopnost samostatně vědecky pracovat a výsledky zpracovat pro publikaci. Práci Ing. Johany Kollárové proto doporučuji k obhajobě jako podklad pro udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Praze 28.8.2018

Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.