



Posudek disertační práce

Mgr. Tomáše LIĐÁKA

„Identifikace a funkční charakterizace nových substrátů cullin-RING ubiquitin ligáz“

Doktorská práce Mgr. Tomáše Lidáka je členěna na literární úvod, definování cílů práce, část metodickou, prezentaci výsledků, vlastní diskusi a shrnutí. Text je psán velmi dobrou a srozumitelnou angličtinou, po formální stránce nemám k práci žádné výhrady, ba naopak, považuji práci z formálního hlediska za velmi zdařilou. V úvodní části shrnuje Tomáš Lidák čtivou formou aktuální poznatky o problematice specifické degradace proteinů závislé na ubikvitinu s důrazem na E3 ubikvitin ligázy, s detailním přehledem dosud známých molekulárních mechanismů a biologických funkcí zatím stále velmi málo prozkoumaných ligáz CRL4^{DCAF4} a CRL4^{DCAF12}. Ústředním motivem výsledků experimentální části – jak již vyplývá z názvu disertace – je pak identifikace a validace nových substrátů výše zmíněných ligáz, konkrétně CRL4^{DCAF4} a CRL4^{DCAF12}, což přispívá k pochopení jejich širší biologické role a to nejen při selektivní degradaci proteinů. S využitím proteomického přístupu byla identifikována široká škála potenciálních substrátů. Následně byla provedena podrobná funkční charakterizace vybraných substrátů v souvislosti s příslušnými ligázami. K prozkoumání biologické role DCAF4 a DCAF12 byly připraveny buněčné linie a myší modely s vyřazeným genem pro tyto E3 ligázy, které jsou dále v laboratoři školitele studovány.

K vlastním publikačním výstupům předkládané disertační práce:

Článek I

V prvním článku autoři pomocí proteomických metod identifikovali možné substráty CRL4^{DCAF12} závislé na C-koncovém degronu, včetně MOV10, archaického komplexu RNA helikázy, který se podílí mimo jiné na umlčování retrotranspozice. Autoři ukázali, že DCAF12 kontroluje hladinu proteinu MOV10 prostřednictvím svého C-terminálního degronu a to způsobem závislým na proteazomu a CRL4. Dále autoři zkoumali fenotyp myši s vyřazeným genem pro DCAF12, které pro tento účel připravili. Ukázali, že *in vitro* aktivované DCAF12-deficientní T buňky vykazují destabilizaci MOV10 a zvýšenou hladinu aktivovaných kaspáz. Dále prokázali

biologickou relevanci interakce DCAF12-MOV10 při spermatogenezi a aktivaci T buněk. Jedná se o prvoautorskou práci Tomáše Lidáka.

Článek II

Jedná se o souhrnný článek, který podává ucelený přehled o regulaci signálních drah Wnt, TGF- β a Notch prostřednictvím ubikvitin proteasomového systému se zřetelem na E3 ubikvitin ligázy zapojené v regulaci těchto signálních faktorů. Článek poskytuje o dané problematice ucelený přehled v kontextu myších modelů a zajisté bude hojně citován. Student je uveden jako druhý autor z celkových tří.

Otázky do diskuse:

1. Jaký byl podíl cytoplasmatických versus jaderných (či jiných) proteinů mezi potenciálními substráty DCAF12 z proteomické analýzy? Z vašich výsledků vyplývá, že pro interakci DCAF12 s MOV10 je nezbytná lokalizace DCAF12 v jádře a že se DCAF12 v cytoplasmě vyskytuje jen přechodně. Tušíte, jaký faktor případně reguluje buněčnou lokalizaci DCAF12? Ví se, jakým způsobem je kontrolována stabilita samotného DCAF12?
2. Ukázala proteomická analýza přítomnost ubikvitinu na potenciálních substrátech? Mohly TAGy v tomto experimentu případně inhibovat ligační aktivitu? Případně, byl mezi TAGy rozdíl v přítomnosti ubikvitovaných substrátů? Prokázali jste u některých vámi identifikovaných substrátů jejich přímou ubikvitinaci pomocí zkoumaných ligáz, případně za jakých podmínek?
3. Vaše *in silico* analýza C-konců potenciálních substrátů DCAF12 odhalila alternativní degron (-EL). Proč proteiny s nejvyšší intenzitou (např. ADAR či XIAP) klasický i alternativní C-koncový degron postrádají? Řešili jste u potenciálních substrátů také přítomnost argininu v -3 pozici (R-3 motiv), kritického pro některé Cul4 E3?
4. Prokázaly některé vaše proteomické experimenty s DCAF12 přítomnost proteinů rodiny MAGE? Uvažovali jste o podrobení vámi generovaných *Dcaf12* KO myší experimentům s nutriční deprivací?
5. Podrobili jste někdy kvantitativní proteomické analýze vámi generované KO DCAF12 či KO DCAF4 linie ve srovnání s parentálními liniemi? Pokud ano, překrývala se množina potenciálních substrátů se substráty identifikovanými pomocí tandemové afinitní-MS/MS?
6. Nedívali jste se, zda-li je DKC1 nabohacen ve vašich myších s vyřazeným DCAF4, např. v MEF odvozených z těchto myší? A zda-li CRL^{DCAF4} přímo ovlivňuje jeho stabilitu?

Závěr:

Disertaci Mgr. Tomáše Lidáka hodnotím jako velmi kvalitní a bylo mi potěšením ji číst. Z experimentálního hlediska je třeba vyzdvihnout, že předkladatel zvládl široké spektrum metodických postupů zahrnující metody proteomické a samozřejmě celou řadu molekulárně biologických technik. Není pochyb o tom, že během postgraduálního studia vykonal obrovský kus práce a přispěl tak k rozšíření poznání v daném tématu. Student prokázal tvůrčí schopnosti a předkládaná práce splňuje požadavky kladené na disertační práce v daném oboru. Celkově hodnotím publikační aktivitu a disertační práci studenta jako velmi dobrou a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě. Autorovi pak přeji mnoho úspěchů pracovních i životních.

V Praze dne 15.1. 2022



Mgr. Klára Grantz Šašková, Ph.D.