



Vážený pan

prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Předseda oborové rady DSP Biologie a patologie buňky

3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

Oponentský posudek na dizertační práci MUDr. Markéty Kostrouchové „Regulace genové exprese a biologického chování buněk: potenciál podjednotky 28 Mediátorového komplexu“

Předkládaná práce má 89 stran plus přílohy, které tvoří tři výsledkové články v impaktovaných časopisech. Práce je srozumitelně sepsána kvalitní angličtinou. Teoretická část popisuje základní mechanismy regulace genové exprese s důrazem na Mediátorový komplex a lyzinovou acetylaci. Krátce jsou zmíněny lipidové kapky a perilipiny, které byly také předmětem studia. Po metodické stránce je dizertační práce velmi bohatá, od základní kultivace *Caenorhabditis elegans* a mikroskopického pozorování, přes přípravu transgenních linií pomocí CRISPR/Cas9 a genové editace, po analýzu lyzinové acetylace a *pull-down* experimenty. Hlavní část výsledkové části je věnována dříve necharakterizovanému proteinu F28F8.5, u kterého se pomocí detailních analýz a komplexního přístupu podařilo prokázat, že se jedná o ortholog savčí podjednotky 28 Mediátorového komplexu (zkratka MDT-28). V mezinárodní databázi Wormbase však byl již dříve jako MDT-28 označen jiný protein W01A8.1. Detailní analýza tohoto proteinu ukázala, že se ve skutečnosti jedná o ortholog savčího perilipinu. Oba tyto prioritní výsledky se podařilo opravit v databázi Wormbase a především publikovat v již zmiňovaných třech výsledkových článcích. Doktorandka je také prvoautorkou jednoho impaktovaného review a spoluautorkou dalších čtyř impaktovaných prací.



Dotazy:

1. Protein MDT28 jste detekovala v jádře i cytoplazmě buněk sledovaných hlístů. Existují hypotézy o způsobu translokace tohoto proteinu mezi těmito buněčnými kompartmenty a o jejich biologickém významu? Je popsána iniciace a způsob translokace pro jiné komponenty Mediátorového komplexu?
2. Na stranách 73-74 diskutujete rozdílný fenotyp hlístů s kompletně chybějícím MDT28 ve srovnání s hlísty se sníženou expresí pomocí RNA interference. Kromě chybějících gonád a kompletní sterility byly projevy genetické eliminace relativně menší, což vysvětlujete přenosem maternálního MDT28 do vajíčka a potažmo do embrya. Je známo, jaká je stabilita jednotlivých podjednotek Mediátorového komplexu nebo přímo savčího MED28? Jakým způsobem byste mohla otestovat stabilitu MDT28 ve vašem modelu?
3. Výraznější změny fenotypu jste pozorovala při použití RNA interference. Tyto změny jste zachytila na velkém počtu jedinců (u 1127 z 2567 hlístů), ale byly relativně heterogenní (str. 50). Lze očekávat homogenní přenos siRNA do jednotlivých buněk při mikroinjekci do gonád? Je možné zhodnotit tzv. *off-target* efekt u vámi použité siRNA? Ověřila jste snížení hladiny MDT28 po RNA interferenci pomocí western blotingu?
4. Na obrázku 16 (str. 62) demonstrujete podobné rozložení organizovaných (alfa-helix, beta-list) a neorganizovaných oblastí savčího MED28 a MDT28 u hlístů. Jakým způsobem mohou přispívat „neorganizované oblasti“ k flexibilnímu sestavování Mediátorového komplexu a přitom zachovávat jeho funkčnost v aktivaci transkripce?

MUDr. Markéta Kostrouchová předkládá velmi kvalitní práci, ve které jasně prokazuje své tvůrčí schopnosti a splňuje požadavky pro udělení titulu Ph.D. v oboru Biologie a patologie buňky.

V Olomouci 7.června 2019

Doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Ústav klinické a molekulární patologie LF UP