

## Oponentský posudek disertační práce

Mgr. MUDr. Davida Kostroucha

**The role of evolutionarily conserved proteins BIR-1/Survivin and SKP-1 in the regulation of gene expression”**

Předložená disertační práce se zabývá aktuálním tématem současné biologie, poznáním regulace genové exprese na úrovni transkripce a funkcí nukleárních receptorů (transkripčních faktorů). V posledních letech dochází k rychlému růstu poznatků ukazujících na to, že funkce transkripčních faktorů je ovlivněna signálními kaskádami, dalšími transkripčními faktory a jejich buněčnou lokalizací. Předložená disertační práce se zabývá úlohou proteinů SKP-1 a BIR-1/survivin, které jsou funkčně spojeny s jaderným receptorem NHR-23, v regulaci genové exprese na modelovém organismu *Caenorhabditis elegans*. Zvláštní pozornost je věnována identifikaci nových interakčních partnerů k těmto proteinům. SKP-1 je transkripční kofaktor, který interaguje s řadou jaderných receptorů, BIR-1 je homolog survivinu, jenž představuje anti-apoptotický protein a má důležitou roli v mitóze. Disertační práce byla vypracována v Laboratoři molekulární patologie, Ústavu buněčné a biologie a patologie 1. Lékařské fakulty UK. Toto pracoviště má dlouholeté zkušenosti při analýze jaderných receptorů u *C. elegans* a dosáhlo řady prioritních výsledků.

Disertační práce je napsána *in extenso* v anglickém jazyce a má členění typické pro vědecké publikace: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Supplementary Material. V úvodní části jsou přehledně uvedeny především současné poznatky o organizaci a regulaci chromatinu, transkripčních faktorech, nukleárních receptorech, regulaci genové exprese a proteinech SKP-1 a BIR-1. Cíle práce stanovené v kapitole „3.1. Thesis statements and synopsis: goals and hypothesis“, byly splněny. V přehledu literatury je uvedeno 258 citací. Obsáhlou část tvoří dizertační práce tvoří přílohy (34 stran). Podle mého názoru jsou nejdůležitější výsledky předložené práce následující:

1. Průkaz nových interaktorů proteinů SKP-1 a BIR-1. Byly identifikovány jak cytoskeletální a ribozomální proteiny, tak i proteiny které regulují transkripci a translaci.
2. Zvýšená exprese BIR-1 vede ke změnám na úrovni proteomu.
3. Průkaz účasti proteinů SKP-1 a BIR-1 v signální dráze při ribozomálním stresu.
4. Vyslovení hypotézy, že SKP-1 a BIR-1 jsou součástí sítě, která propojuje stav proteomu s genovou expresí. SKP-1 a BIR-1 by tak mohly představovat senzory proteomu.

Práce je napsána dobrou angličtinou s minimem překlepů. Úvodní část by šlo publikovat samostatně formou přehledného článku. K řešení vytčených úkolů byly použity adekvátní metody. Oceňuji užitečný přehled zkratk. Po formální stránce mám drobné poznámky. Bylo by dobré uvést jaký byl podíl autora na výsledcích uvedených v předložené disertační práci. Není uveden původ protilátky proti myosinu a není jasné proč byla k jeho fluorescenční detekci použita jak anti-králičí tak i anti-myší protilátka (str. 51). U Obr. 4 a Obr. 6 nejsou měřítka, Obr. 4E je rozostřen. V části literatura by citace mohly mít jednotnou formu; některé mají DOI (Digital Object Identifier), u některých není uveden. Supplementary figures S1-S8 měly být vytištěny barevně. Závěrečná kapitola „7. Conclusions“ je podle mne příliš stručná.

Protože výsledky disertační práce byly částečně publikovány v J. Proteomics a publikace prošla náročným recenzním řízením, což je zárukou její kvality, nemám konkrétní dotazy k publikovaným výsledkům, ale předkládám několik podnětů k obecné diskusi.

1. Jakým způsobem byla ověřena úroveň deplece proteinů po RNAi? Jaké byly kontroly k vyloučení “off-target” efektů? Bylo by možné provést rescue experimenty?
2. Krátkodobá exprese BIR-1 v nedělících se buňkách vedla ke zvýšené expresi proteinů mikrofilament a středních filament. Pozorovali jste nějaké změny na úrovni mikrotubulárních proteinů ( $\alpha\beta$ -tubuliny,  $\gamma$ -tubulin, proteiny asociované s mikrotubuly)?
3. V savčích buňkách survivin reguluje v průběhu buněčného cyklu dynamiku mikrotubulů a jejich nukleaci. Co je v současné době známo o regulaci mikrotubulů pomocí BIR-1 u *C. elegans*?
4. Survivin má podstatně zvýšenou expresi v nádorových buňkách. Vzhledem k tvorbě proteinových komplexů obsahující jak BIR-1 tak i SKP-1, jaká je představa autora o roli proteinu SKP-1/SKIP při karcinogenezi?

**Závěr:** Autor prokázal dobrý přehled odborné literatury, aplikovala při svém studiu spektrum molekulárně biologických, biochemických, proteomických i cytochemických technik a získal důležité prioritní poznatky v oblasti regulace genové exprese u *C. elegans*. MUDr. David Kostrouch je prvním autorem v práci publikované v renomovaném časopise a prokázal tak tvůrčí schopnosti a má předpoklady k samostatné vědecké práci. Práci doporučuji k obhajobě a při splnění dalších podmínek doktorandského studia a úspěšné obhajobě navrhuji udělení titulu PhD za jménem.