



Faculty of Science
CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE



JAN ČERNÝ
Professor of Cell Biology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE
Department of Cell Biology
Viničná 7, 128 40 Praha 2
Czech Republic
Phone: (+420) 2 4106 1795
E-mail: jan.cerny@natur.cuni.cz

POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI Mgr. Jana Bražiny

POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE ADAPTOROVÉHO PROTEIN DAXX V BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA GENOTOXICKÝ STRES

Předložená dizertační práce je sepsána v dlouhé formě na aktuální téma v hlavním proudu biomedicínského výzkumu (charakterizace funkcí proteinů, zvláště těch zapojených do regulace buněčných funkcí, v tomto případě se vztahem k regulaci buněčného cyklu a buněčného osudu v rámci mnohobuněčného organismu) a to s použitím celého spektra moderních relevantních metodik. Jan Bražina se formátu práce, který osobně výrazně preferuje před krátkým formátem dizertační práce, zhostil dobře. Jednak svou dizertaci sepsal solidní češtinou s poměrně malým množstvím formálních nepřesností a v teoretickém úvodu vhodně balancoval mezi nezbytnými obecnostmi a nutností detailně vysvětlit příslušné molekulární mechanismy. Teoretický úvod tak kvalitně zpracovaný a čtivým způsobem na cca 25 stranách představuje recentní publikované informace o buněčné odpovědi na poškození DNA a samozřejmě o proteinu DAXX, jehož charakterizace je hlavním tématem práce. Použité literární zdroje jsou reprezentativním a v řadě ohledů vyčerpávajícím přehledem relevantní literatury

Jan Bražina je autorem/spoluautorem čtyř vědeckých publikací v kvalitních biomedicínských časopisech. Jedná se ve všech případech o respektované časopisy (ve třech případech IF vyšší než 4), včetně v roce 2015 etablovaného časopisu *BB Reports*. Ve třech případech je Jan Bražina spoluautorem s jasně definovaným nezanedbatelným podílem, v jednom případě je autorem prvním a to u příspěvku v oborově prestižním časopise *Cell Cycle*. Zde je třeba zmínit, že výzkum, který byl součástí vědecké výchovy Jana Bražiny se odehrává v extrémně kompetitivní oblasti a zmíněné publikační výstupy je třeba hodnotit vysoce kladně. Shrnutο, kvalita a kvantita publikovaných prací je po formální stránce (vzhledem k požadavkům kladeným na publikační výstupy studentů doktorského studia oborové rady) dostatečná pro doporučení práce k obhajobě.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, Jan Bražina sepsal svou dizertační práci dlouhou formou a rozhodl se zde tematizovat zvláště svou klíčovou prvoautorskou publikaci. Dlouhá forma umožňuje daleko lépe posoudit vědeckou kompetenci uchazečů o titul Ph.D. a to zvláště proto, že umožňuje věnovat patřičný prostor experimentální práci rozebrané do detailů, prezentovat nepublikovaná data a tak ukazovat provedený výzkum

v širším kontextu. To je v práci realizováno na přiměřených 30 stranách, které komentují 32 obrázků sumarizujících autorovy výsledky. Pro mne nejdůležitější částí práce, která jasně ukazuje autorovu kompetenci kriticky hodnotit vlastní výzkum dat je zdařilá diskuse, která na 6 stranách m. j. rozebírá časté diskrepance s již publikovanými daty.

K práci bych měl několik připomínek a dotazů:

1. Na straně 11 jsou tematizovány jednotlivé typy oprav DNA, jako např. BER, NER, RER a MMR. Zde bych se přimlouval o nejdříve popis příslušného mechanismu celoslovně (např. base excision repair) a až pak zkratkou (i když je zkratka s popisem uvedena v seznamu zkratek). Proč je DRR na straně 10 vysvětlena pod čarou a ne v seznamu zkratek jako ostatní? Osobně bych určitě zkratky používal méně, než autor práce.
2. Na straně 14 je uvedeno, že se doxorubicin váže na komplex DNA/topoizomeráza II, je tomu skutečně tak?
3. Na straně 18 je ukázána impresivní sumarizace posttranslačních modifikací p53 ve vztahu k jeho funkci. Následuje otázka více méně filosofická - je tato komplexita postranslačně modifikačního kódu spíše typická pro signalizační molekuly (kde p53 je jedním z nejlépe charakterizovaných buněčných proteinů), nebo se jedná o situaci výjimečnou a p53 si svou unikátností své místo na piedestalu (např. molekula roku 1993) mezi ostatními proteiny skutečně objektivně zaslouží?
4. Na straně 19 popisujete DAXX jako u obratlovců mezidruhově konzervovaný protein. Jaký je obecnější evoluční kontext tohoto proteinu, kam až se dá v evoluci vysledovat?
5. Na straně 20 používáte podřadici spojku pakli-že, pokud se nepletu, její správná varianta je pakliže nebo dle kontextu pakli,že ☺
6. V části věnované metodice a materiálu došlo u popisu tabulek zřejmě při formátování ke ztrátě smysluplných fontů.
7. Na straně 37 popisujete, že ozařování probíhalo v absenci kultivačního média, zajímaly by mne detaily metodiky, jak např. jak dlouho buňky nemění svůj fyziologický stav „nasuchu“.
8. K produkci lentivirů (str. 39) používáte kalcium fosfátovou transfekci, přičemž před ní měníte médium za čerstvé obsahující navíc chloroquin. K čemu je tento krok důležitý.
9. Na straně 41 popisujete permeabilizaci buněk roztokem Triton-X-100 ve vodě. Zde jen komentář - v našem případě vodný roztok (oproti roztoku v PBS) způsoboval nereaktivitu některých protilátek.
10. Na straně 43 ukazujete změny fosforylace DAXX a CHK2 po vystavení ionizačnímu záření. Jak je tomu s expresí DAXX a CHK2 jako takových? Proč jste ke studii endogenní fosforylace DAXX použili buněčnou linii U2OS a nepracovali s HEK293T z pilotního experimentu?
11. Na straně 46 popisujete, že „byla připravena protilátka specificky rozpoznávající DAXX fosforylovaný na S564“. Zajímalo by mne, zda jste se na této přípravě podílel a co bylo použito jako antigen pro příslušnou imunizaci.
12. Na straně 52 (obr. 25) ukazujete korelaci změny fosforylace DAXX na S564 s expresí fosfatázy WIP1. U IR 10 Gy po 4h je možné pozorovat vysokou hladinu fosforylace DAXX a zároveň vysokou míru exprese WIP1. Jak si to vysvětlujete? V tomto kontextu by mohla být důležitá regulační fosforylace WIP1 (Macurek L, Benada J, Müllers E, et al. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell Cycle*. 2013; 12(2):251-262. doi: 10.4161/cc.23057.), nemáte nějaká experimentální data na toto téma?
13. V práci opakovaně diskutujete nekonzistenci v datech způsobenou použitím odlišného laboratorního kmene buněčné linie. Jaké varianty používáte ve vaší práci? Jaký si myslíte, že by měl být při práci s buněčnými kulturami příklad dobré praxe, aby se minimalizovala podobná nedorozumění?

14. V práci zmiňujete, že absence DAXX v buňkách vede k ireverzibilní změně exprese genů, pravděpodobně epigenetickým mechanismem. Existuje v literatuře popsany precedent, kdy by k tomu došlo v případě jiného studovaného proteinu?

Na závěr bych chtěl konstatovat, že přes výše zmíněné připomínky je předložená dizertační práce kvalitním příspěvkem k diskusi o roli proteinu DAXX v buněčné fyziologii. Dizertační práce **POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE ADAPTOROVÉHO PROTEIN DAXX V BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA GENOTOXICKÝ STRES** splňuje požadavky kladené na Univerzitě Karlově, Přírodovědecké fakultě na kvalifikační práce doktorského studia a doporučuji ji k obhajobě.

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.