



**Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Petry Riegrové**

nazvané

**„Využití metody RNA interference (RNAi) ke studiu onkogenních vlastností viru Kaposiho sarkomu (KSHV)“**

Dizertační práce Mgr. Petry Riegrové vznikla na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. Lékařské fakulty UK pod vedením Mgr. Barbory Lubyové, PhD. Je věnována významné a aktuální problematice biomedicínského výzkumu v oboru molekulární kancerogeneze.

Předkládaná práce si klade za cíl:

- 1) Určit mechanismus, kterým vIRF-3 ovlivňuje stabilitu a transkripční aktivitu protoonkogenu c-Myc.
- 2) Charakterizovat vliv proteinu vIRF3 na stabilitu a funkci nádorového supresoru p53.
- 3) Nalézt siRNA specifické pro vIRF3.

Petře Riegrové se zdařilo charakterizovat mechanismus, kterým vIRF3 zvyšuje transkripční aktivitu c-Myc a objasnit dříve nedefinovanou roli, kterou vIRF-3 hraje při stimulaci ubiquitinace c-Myc a při regulaci jeho proteinové stability. Experimenty ukázaly, že vIRF-3 se váže na F-box Skp2, klíčové komponenty ubiquitinového ligázového komplexu SCF<sup>skp2</sup>. Skp2 je při tom transkripčním kofaktorem, který reguluje jak stabilitu proteinu c-Myc tak transkripci na c-Myc závislou. Při studiu vlivu vIRF-3 na stabilitu a funkci p53 Petra Riegrová definovala proces, kterým vIRF3 snižuje životnost proteinu p53 a kterým inhibuje schopnost tohoto imunosupresoru působit jako účinný regulátor klíčových buněčných drah, jejichž nerovnováha vede k deregulaci buněčného cyklu a apoptózy, a přispívá tak ke vzniku KSHV-asociované neoplazie.

Při stanovení vlivu vIRF3 na patogenezi KSHV využila Petra Riegrová moderních technik, které jí umožnily studovat danou problematiku in vitro i in vivo, v přirozeném prostředí hostitelské buňky. Předkládané výsledky přispívají k porozumění mechanismu, kterým onkogenní herpesviry ovlivňují klíčové buněčné regulační dráhy a pomohou v budoucnu poskytnout cíle pro terapii, léčbu či prevenci nádorů asociovaných s KSHV.

Po formální stránce je práce členěna na Teoretickou část, Stanovené cíle a hypotézy, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Závěr, Seznam použité literatury a Přílohy. Příloha se sestává z 3

publikací, ve všech s Petrou Riegerovou-Barešovou jako první autorkou. Důsledky vlivu vIRF-3 na p53 jsou publikovány v *Molecular and Cellular Biology* (IF=4,777), vztah vIRF-3 a c-Myc je publikován v *Journal of Biological Chemistry* (IF=4.258) a třetí přehledný článek o vztahu vIRF-3 KSHV k zánětlivé odpovědi a rakovině je publikován v *Journal of Virology* (IF=4.606). Skutečnost, že jedna z prací je přehledným článkem o dané problematice, usnadňuje výrazně četbu celého manuskriptu. V souvislosti s přehledným článkem je třeba zmínit rovněž dobře napsanou diskusi syntetizující publikované poznatky.

K práci mám několik připomínek, ke kterým by se autorka měla během obhajoby dizertační vyjádřit.

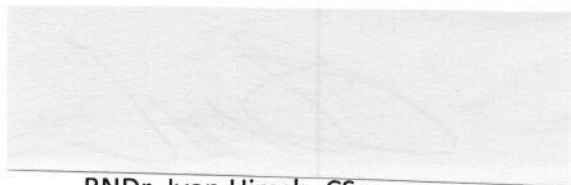
1. Oponentova úloha této práce je ulehčena tím, že práce prošla nepochybně pečlivým a přísným řízením ve třech popředních časopisech svého oboru. Vzhledem k tomu se zdá překvapivé, že autorka dizertační práce při vyhodnocování většiny experimentálních výsledků nepoužívala statistické metody (Obrázky 2, 3, 5, 9, 12, 14). V oddílu Materiál a metody statistické metody nejsou uvedeny. Přitom pokusy byly ve většině případů provedeny v počtu opakování dostatečném k výpočtu statistické významnosti. Významnost je uvedena pouze v obrázku 18, bez uvedení použitého statistického testu.
2. vIRF-3 je pleiotropní virový faktor ovlivňující regulaci apoptózy, buněčného cyklu, protivirové imunity a onkogenní transformace. Mohla by autorka dizertační práce ohodnotit, které z těchto funkcí jsou nezbytné a za jakých podmínek jednak pro produktivní infekci KSHV, jednak pro kancerogenezi?
3. Jaké jsou příčiny a následky nepřítomnosti vIRF-3 v lezích Kaposiho sarkomu ve srovnání s primárním efuzním lymfomem a Castelmanovou chorobou?
4. Jak autorka dizertační práce hodnotí roli vIRF-3 při regulaci imunitní odpovědi ve světle skutečnosti, že vIRF-3 inhibuje aktivaci transkripce IFN- $\beta$  a ISRE pomocí IRF-5, zatímco aktivuje transkripci IFN- $\beta$  pomocí IRF-3 a IRF-7? Přitom exprese IRF-5 probíhá v omezeném repertoáru buněk (B buňky, dendritické buňky a makrofágy).
5. Mohla by autorka dizertační práce představit případný scénář evoluce vIRF-3 jako negativního regulátoru imunitní odpovědi z aktivujících buněčných homologů, vzhledem k homologii vIRF-3 a buněčných IRF, jejich DNA vazebných vlastností a proteinových interakcí?

### Drobné připomínky

6. V práci není uvedeno, má-li vIRF-3 vliv na produkci IFN-lambda.
7. Str. 19, řádek 8 odspodu: nejen RSV ale řada dalších retrovirů je spojena s nádorovým bujením
8. Str. 27, řádek 14: "Tři z buněčných interferonů (IRF-3, -5 a -7)"

Závěrem lze konstatovat, že práce Mgr. Petry Riegrové vyhovuje požadavkům kladeným na úroveň dizertační práce. Dizertantka je první autorkou tří publikovaných článků, z nich jednoho přehledného. Práci doporučuji k obhajobě a podle jejího výsledku k udělení doktorského titulu.

V Praze 17. května 2017



RNDr. Ivan Hirsch, CSc