



Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika

IČO: 67985904, DIČ: CZ67985904

ID Datové schránky: tw6hm2a

T: 315 639 532, F: 315 639 510

E: uzfg@iapg.cas.cz, URL: <http://www.iapg.cas.cz>

RNDr. Petr Šolc, Ph.D., Laboratoř integrity DNA, Pigmod Centrum, E: solc@iapg.cas.cz, T: 315 639 561

Oponentský posudek na dizertační práci

Název práce: **Function of nuclear phosphoinositides and their binding partners in gene expression**

Funkce jaderných fosfoinozitidů a jejich vazebných partnerů v genové expresi

autor: **Mgr. Livia Uličná**

školitel: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Předložená dizertační práce se zabývá funkcí jaderných fosfoinozitidů především v regulaci genové exprese. Práce je sepsána v anglickém jazyce jako komentovaný souhrn tří prací v impaktovaných časopisech, které již vyšly tiskem, a čtvrté práce, která je předložena formou manuskriptu. Práce má standardní členění na úvod (*Introduction*), cíle práce (*Aims*), vědecké práce (*Research papers*), diskuzi (*Discussion*), shrnutí a závěry (*Summary and conclusions*), budoucí směřování (*Future prospects*) a seznam použité literatury (*References*).

V úvodu jsou zmíněny funkce jak jaderných tak i cytoplasmatických fosfoinozitidů. Tento úvod obsahuje velké množství informací s odkazy na primární zdroje. Působí však na mne spíše jako seznam molekul, s kterými fosfoinozitidy v buňce mohou interagovat a chybí mi v něm určitý shrnující nadhled nad funkcí fosfoinozitidů. Jako příklad uvedu první část kapitoly *1.3.2 PI(3, 5)P2 function*, cituji:

*„A study on *Saccharomyces cerevisiae* revealed PI(3,5)P2 chromatin architecture modulating function. Han and Emr (2011) have identified Tup1 and Cti6 as PI(3,5)P2 specific interacting partners. Tup1, in a complex with Cyc-8, acts as a transcriptional co-repressor and this complex interacts with HDAC (Malave and Dent, 2006). Additionally, it is known that Cti6 is a Cyc-8 binding protein. Cti6 co-activates Tup1/Cyc-8 complex and links it with SAGA complex, which disrupts nucleosomes and promotes transcription (Papamichos-Chronakis et al. 2002). PI(3,5)P2-dependent chromatin architecture-modulating mechanism is to convert Tup1-driven repressed state to a SAGA-containing activated state, e.g. at the GAL1 promoter.“*

Zde hned na začátku jsou bez dalšího vysvětlení dané transkripční signalizace zmíněny molekuly Tup1, Cti6 a Cyc-8 a jejich interakce s PI(3,5)P2. Text tak na mne působí nepřehledně a těžko přinese dobré čitivý úvod do problematiky. Dle mého názoru by úvod disertační práce měl čtenáře, který se přímo danou problematickou nezabývá, do problematiky srozumitelně uvést, a ne ho zahlitit velkým množstvím detailů o molekulových interakcích. Je otázkou, jestli bylo v úvodu nutné se věnovat všem fosfoinozitidům, a jestli nebylo lepší podat základnější přehled metabolismu fosfoinozitidů včetně klíčových enzymů pro jejich metabolismus, a pak se více zaměřit na PI(4,5)P2, kterému se věnují z větší části i přiložené publikace. Je třeba však také zmínit, že kapitola *1.3.3 PI(4,5)P2 function* je napsána výrazně lépe srozumitelně, než předchozí kapitoly úvodu.

Cíle dizertační práce jsou jasně definované a korespondují s výsledky předloženými ve formě kvalitních tří publikovaných prací a jednoho manuskriptu. Vysoce pozitivně hodnotím velice vysoký deklarovaný podíl autorky na dvou prvoautorských publikacích včetně jejich sepsání. Kapitoly

diskuze, shrnutí a závěry jsou napsány standardně. Pozitivně též hodnotím poslední kapitolu ukazující možný výzkumný směr do budoucna.

Na autorku mám následující otázky:

1. V kapitole 1.1.4 PI(3,4)P2 uvádíte, že PI(3,4)P2 vazbou na PH doménu kinázy AKT navozuje její lokalizaci na cytoplasmatickou membránu a následnou aktivaci. Je skutečně PI(3,4)P2 hlavním fosfoinozitidem aktivující kinázu AKT? V mnoha případech po aktivaci AKT dochází k její jaderné translokaci. Váže po této translokaci PH doména AKT stále fosfoinozitidy? Je známa také pouze jaderně specifická aktivace AKT nezávislá na vazbě na cytoplasmatickou mebránu?
2. V práci *Histochem Cell Biol* 2016 uvádíte, že sice GFP fúzní konstrukty obsahující proteinové domény vázající různé fosfoinozitidy se lokalizují do jádra, neukazují však jadernou lokalizaci fosfoinozitidů do subjaderných struktur, tak jako ji ukazují protilátky. Zmiňujete, že to může být dánno overexpressí těchto konstruktů. Zkoušeli jste se podívat, jak vypadá situace v buňkách, které tyto konstrukty exprimují na velmi nízké hladině? Takovéto buňky se byť třeba v omezeném množství u transfekovaných buněk pravděpodobně vyskytovaly. Exprese PLC δ 1-PH s GFP v buňkách se neukázala jako dobrý nástroj pro detekci jaderného PI(4,5)P2, avšak značení fixovaných buněk purifikovaným PLC δ 1-PH s GFP poskytlo očekávaný jaderný signál texturou. Jak si vysvětlujete tento rozdíl?
3. V práci *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2017 na obrázku 1D ukazujete pomocí SIM mikroskopie kolokalizaci PI(3,4)P2 s PHF8. PHF8 na tomto obrázku vytváří typickou textu v jádře ve formě teček. Na obrázku S1A však pomocí konfokální mikroskopie navíc ukazujete i lokalizaci PHF8 do jadérka. Proč tato lokalizace není viditelná na SIM obrázcích?
4. V diskuzi v kapitole 4.2 uvádíte, cituji: „*The decrease of H3K9me2 levels caused by PI(4,5)P2-PHF8 interaction increases expression of pre-rRNA genes*“. Toto tvrzení mi však nezapadá do vámi navrženého modelu regulace exprese rRNA genů.
5. Ve svých pracích jasně demonstrejte roli PI(4,5)P2 v regulaci genové exprese. Existuje představa, jakým způsobem je koncentrace jaderného PI(4,5)P2, který je zodpovědný právě za regulaci genové exprese, regulován v rámci buněčných a vývojových procesů, jako je např. buněčný cyklus a diferenciace buněk?

Přes výše zmíněné výtky k části úvod konstatuji, že předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na dizertační práci. Byla splněna kritéria pro publikaci aktivity. Doporučuji tedy předloženou práci k obhajobě a následnému udělení titulu Ph.D.

V Mělníku dne 4. června 2018


RNDr. Petr Šolc, Ph.D.