

Oponentský posudek dizertační práce ing. Michala Pohludka: "Functional genomics of nuclear hormone receptors and their cofactors: Connection between metabolism and development by diversified nematode nuclear hormone receptors."

Předložená dizertační práce přináší výsledky dvou studií zaměřených na hlubší porozumění funkce genu nhr-40 a genu nhr-60. Tyto geny jsou na základě bioinformatických dat klasifikovány jako geny pro jaderné receptory *C. elegans*. Práce využívá hojně proteomickou analýzu.

Předložená dizertace splňuje formální kritéria. Je psána dobrou angličtinou a je přehledná. Má celkem 86 stran, 19 obrázků a 3 tabulky. Formálně je dělena do kapitol úvodu, metod, výsledků, diskuse a závěru, přičemž ty jsou operativně děleny dle studovaného genu. V samotném začátku práce jsou uvedeny cíle práce a použité strategie řešení. Na závěr práce jsou uvedeny tabulky, jakož i vlastní publikace a prezentace Michala Pohludky. Vedle publikací zpracovaných v dizertaci je ing. Michal Pohludek spoluautorem i dalších impaktovaných publikací.

Hlavní částí dizertace je proteomická studie porovnávající celkové proteomy kontrolních larev s proteomem larev nesoucích mutaci ve studovaném genu nhr-40. Tato část práce je dovedena do dobrého stavu propracování. Proteomická analýza identifikuje metabolismus jako hlavní pravděpodobný cíl ztráty funkce genu (metabolický fenotyp) a manipulace s metabolismem formou snižování teploty nebo sníženým přísunem potravy skutečně zvyšuje důsledky ztráty funkce studovaného genu. Z práce vyplývá, že komparativní proteomika je dostatečně sensitivním přístupem ve studiu funkce genů.

Druhá studie, ve které jde o charakterizaci genu nhr-60, je rovněž částečně proteomická a ukazuje zajímavý rozdíl mezi charakterizací genu nhr-60 na úrovni transkriptu a na úrovni proteinu. Tento receptor se vymyká běžným představám již svou intracelulární lokalizací. Je totiž lokalizován převážně na jaderné periférii, což je lokalizace pro transkripční factor nezvyklá a pro jaderný receptor, pokud je mi známo, také. I na proteinové úrovni vykazuje jaderný receptor NHR-60 zvláštnost. Je asi o 14 kDa větší než lze odvodit z jeho transkriptu. Protein o očekávané velikosti lze detegovat jen při použití velkého množství výchozího materiálu. To by pravděpodobně nasvědčovalo tomu, že protein je rozsáhle a efektivně posttranslačně modifikován. Na této úrovni je však studie ukončena, aniž by přinesla výsledky, které by posttranslační modifikaci potvrdily a blíže ji charakterizovaly.

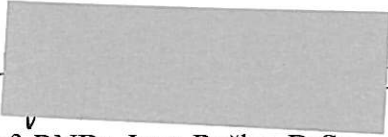
Mám na Michala Pohludka několik otázek a (zcela formálních) připomínek:

- Je NHR-60 transkripční aktivátor nebo represor? Co soudíte o jeho intracelulární lokalizaci? Je NHR-60 detegován v oblasti euchromatinu? V jadérku?
- Protilátka, která byla použita k detekci NHR-60 rozpoznává jak modifikovanou, tak nemodifikovanou formu NHR-60. Pokusil jste se o immunoprecipitaci NHR-60 a jeho charakterizaci hmotnostní spektrometrií?

- Jste si jistý, že se nejedná o další imunochemicky příbuzný protein a že jde skutečně o novou formu jaderného receptoru?
- Mění se úroveň modifikovaného a nemodifikovaného NHR-60 v závislosti na příjmu potravy?
- Psaní velkých a malých písmen v seznamu zkratk není plně ujednoceno, pro danou zkratku jsou používány i jiné názvy.
- Seznam obrázků na konci práce je zbytečný.

Závěrem: Jedná se o kvalitní, ideově a metodicky náročnou dizertační práci. Závěry práce jsou dobře podloženy provedenými experimenty, získanými výsledky a jejich interpretace má také dobrou úroveň. Práci doporučuji k obhajobě a v případě její úspěšné obhajoby doporučuji, aby ing. Michalu Pohludkovi byl dle platných předpisů udělen titul PhD.

V Praze dne 29. května 2009


Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.