

OPONENTSKÝ POSUDOK

dizertačnej práce **Mgr. Anety Vávrovej** na tému:

ROLE OF THE POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN THE FUNCTION OF PREGNANE X RECEPTOR

(školiteľ: Prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc. et Ph.D.)

V predloženej dizertačnej práci autorka prezentuje pôvodné metodické prístupy, ktoré umožnili získať autorke dizertácie významný počet pôvodných výsledkov týkajúcich sa výskumu post-translačných modifikácií vo vzťahu k funkčnosti jadrového pregnan X receptora (PXR) – transkripčného faktora indukovateľného množstvom chemikálií endogénneho ako aj exogénneho charakteru. Autorka dizertácie v teoretickej časti dizertácie uskutočnila precízny rozbor o súčasnom stave problematiky, čo svedčí o jej veľkom rozhlade v danej vednej oblasti. Navyiac, autorka dizertácie pracovala na renomovanom pracovisku v prostredí s výborným vedomostným a metodickým zázemím, čo tiež veľmi priaznivo prispelo k vysokej úrovni predkladanej práce.

Základnými cieľmi dizertačnej práce bolo priniesť nové výsledky, týkajúce sa úlohy treonínových a tyrozínových zvyškov aminokyselín v molekule PXR vo vzťahu k jeho funkčnosti ako transkripčného faktora.

Aktuálnosť zvolenej témy:

Aktuálnosť zvolenej témy je nepopierateľná, nakoľko významne prispieva k objasneniu súvislostí medzi reguláciou exprese cieľových génov zúčastňujúcich sa metabolizmu zlúčenín endogénneho alebo exogénneho charakteru prostredníctvom PXR ako aj ďalších regulačných signálnych dráh. Výsledky, ku ktorým autorka dizertácie experimentálnym spôsobom dospela a ktoré precíznym spôsobom prezentuje v predkladanej dizertačnej práci jednoznačne dokumentujú vysokú aktuálnosť riešenia zvolenej témy.

Plnenie cieľov dizertácie:

Náročnosť cieľov a široký diapazón rôznych riešení, ktorými autorka dizertácie prispela k objasneniu modulácie transkripčnej aktivity PXR pomocou post-translačných modifikácií uvedeného jadrového receptora. Autorka dizertácie sa zamerala hlavne na analýzu fosforylačných reakcií PXR s dôrazom na vybrané špecifické aminokyseliny, ktoré sú schopné sa týmto spôsobom modifikovať. Pomocou bioinformatickej analýzy potenciálnych fosforylačných miest na molekule receptora, navrhli sa cielene mutantné formy PXR. Dôsledný interdisciplinárny experimentálny prístup k riešeniu jednotlivých stanovených cieľov na školiacom pracovisku považujem za veľké pozitívum aj tejto predkladanej práce. Napriek náročnosti stanovených cieľov, široká paleta pôvodných

výsledkov autorky dizertácie naznačuje, že ciele dizertácie boli splnené v plnom rozsahu definovanom v predkladanej práci.

Zvolené metódy výskumu:

V práci bola použitá široká paleta náročných najmodernejších metodických prístupov, kde dominujú konvenčné ale i vysoko špecifické metódy molekulárnej a bunkovej biológie (reverzná transkripcia s následnou polymerázovou reťazovou reakciou – RT PCR, „Western blotting“, „Reproter gene assay“, „Electrophoretic mobility shift and supershift assay – EMSA“, „Co-immunoprecipitation“ reakcie) ako aj *in silico* analýzy, t.j. špičkové a sofistikované metodické prístupy ktoré vyžadujú kvalitné a finančne náročné materiálové a prístrojové zázemie.

Výsledky dizertačnej práce:

Za veľmi významný výsledok považujem **zavedenie a optimalizovanie nerádioaktívnej metódy EMSA**, ktorá autorke dizertácie umožnila sledovať väzbu ľudského PXR na špecifický úsek na molekule DNA, tzv. DR3 („direct repeats motif“) na promótoru génu pre CYP3A4 pri použití produktov „*in vitro*“ translácie proteínov PXR a alfa-formy retinoidného X receptora (RXR α) ako aj nukleárneho extraktu ľudských nádorových HeLa buniek krčku matrice. Rovnako významnými sú **výsledky týkajúce sa koimmunoprecipitačných reakcií** pre štúdium tzv. „proteín – proteín“ interakcií ako aj transkripčnej aktivity rôznych mutantov pregnan X receptora. Významnými prínosmi dizertácie je rad pôvodných výsledkov, týkajúcich sa **vplyvu mutantných foriem PXR na expresiu cytochróm P450 génu CYP3A4** a to mRNA ako aj proteínovej úrovni. Medzi veľmi významné výsledky rozhodne patria údaje o „**proteín – proteín**“ **interakciách medzi RXR α a mutantnými molekulami PXR.**

Prínos pre ďalší rozvoj vedy:

Predložená dizertačná práca predstavuje nepochybný prínos pre rozvoj poznania a to v náročnej oblasti molekulárnej biológie. Autorka dizertácie cieleným prístupom charakterizovala funkciu troch fosforylačných miest ľudského pregnan X receptora. Naviac, zaviedla a optimalizovala dve veľmi náročné metodické prístupy – nerádioaktívnu metódu EMSA pre sledovanie interakcie „DNA – proteín“ a koimmunoprecipitačné reakcie pre štúdium interakcie „proteín – proteín“.

Autorka dizertácie jednoznačne poukázala na význam získaných pôvodných výsledkov, ktoré sú súčasťou dizertačnej práce. Výsledkom práce a prínosom pre ďalší rozvoj vedy je aj **šesť karentovaných publikácií** prevažne v renomovaných zahraničných časopisoch s výrazným impakt faktorom (najvyšší je 4,674, druhý najvyšší je 3,303), pričom autorka dizertácie je **prvým autorom v dvoch karentovaných publikáciách**. Ďalej menovaná bola **autorkou alebo spoluautorkou 8 prezentácií**, prevažne na zahraničných ale i domácich vedeckých podujatiach.

Poznámky a pripomienky:

- Úspešný vedecký prínos vo forme nových poznatkov prispievajúcich k objasneniu súvislostí medzi PXR signálnou dráhou, sprostredkujúcej reguláciu expresie génov metabolizujúcich exogénne chemikálie (medzi ktoré patria i liečivá) má širokú využiteľnosť v mnohých vedných odboroch. V súčasnosti je známe, že existuje tzv. „cross-talk“ medzi glukokortikoidným receptorom a PXR. Aké sú konsekvencie tejto „spolupráce“ dvoch signálnych dráh (GR a PXR) z hľadiska metabolizmu liečiv v organizme?

- Malým formálnym nedostatkom je tvrdenie, že pregnan X receptor (PXR) je „orphan receptor“ (str. 12), citované sú práce z roku 1998. PXR podľa novších literárnych údajov „postúpil“ do skupiny tzv. „adopted orphan receptors“, resp. do skupiny tzv. „new receptors“ NR1I1 podrodiny nukleárných receptorov (The NC-IUPHAR Compendium on Nuclear Receptors, 2006).

Záver:

Predložená práca vypracovaná autorkou dizertácie s veľkou precíznosťou je originálnym prínosom pre vednú oblasť Biochémia a predstavuje významné dielo rozširujúce poznanie v oblasti úlohy, vlastností a funkcie pregnan X nukleárneho receptora. Predložená dizertačná práca Mgr. Anety Vávrovej spĺňa všetky náležitosti práce typu „Ph.D. thesis“. Z týchto dôvodov

n a v r h u j e m ,

aby po úspešnej obhajobe doktorandskej dizertačnej práce bola **Mgr. Anete Vávrovej** udelená hodnosť **Ph.D. v odbore P1416 Biochémia**

V Bratislave, 30.05.2013

Ing. Július Brtko, DrSc.
vedúci vedecký pracovník