

TOMÁŠ VOMASTEK, PhD

Mikrobiologický ústav AVČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha-4

E-mail: vomy@biomed.cas.cz
tel: (+420) 241 062 166

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Adriany Roithové „Kontrola kvality skládání snRNP částic“

Disertační práce Mgr. Adriany Roithové byla vypracována na Oddělení biologie RNA, Ústavu molekulární genetiky pod odborným vedením doc. Mgr. Davida Staňka, PhD. Disertační práce je prezentována v plné, nezkrácené verzi a je podložena dvěma publikovanými články. Z hlediska autorství vědeckých článků se jedná o prvoautorskou publikaci v *Nucleic Acid Research* a publikaci v *Cell Reports*, kde je Mgr. Roithová uvedena jako spoluautor. V disertační práci je jednoznačně definovaný autorčin podíl na jednotlivých publikacích.

Autorka se soustředila na určení mechanismu, který se podílí na vzniku a zrání malých jaderných ribonukleoproteinů a jak jsou nezralé ribonukleoproteinové částice transportovány a udržovány v Cajalových tělískách. Výsledkem pak je model komplexního procesu, kdy sekvenčně specifická asociace různých proteinů se snRNA určuje osud snRNP částic. Vazba Geminu 3 tak může vést k rozvolnění stabilní sekundární struktury snRNA a vzniku formy kompetentní k vazbě Sm proteinů. Sm proteiny pak skrze GR domény navigují nezralé částice do Cajalových tělísek, kde maturují. Defektní částice jsou rozeznávány Lsm proteiny a určeny k degradaci v P-bodies.

Předkládaná disertační práce je psána v anglickém jazyce a drží se zavedeného členění na kapitoly *Abstract/Abstrakt, Introduction, Aims, Literary review, Material and Methods, Results, Discussion and Summary*. Závěrečná část pak obsahuje přehled literatury. Po jazykové stránce je disertační práce jako celek velmi dobře zpracována, nicméně v kapitolách literární přehled a materiál a metody je větší, ale tolerovatelný výskyt překlepů, chyb a nepřesností, např. obrázky 9 a 19 nejsou v textu vůbec zmíněny. Zdá se, že tato část byla dokončována v časové tísně a z tohoto pohledu by si práce, zasloužila důkladnější „quality control“. Vybrané příklady chyb jsou uvedeny v příloze k tomuto posudku. Jsou určeny pro autorčinu informaci a reflexi a nepovažují za nutné, aby byly zodpovězeny během obhajoby

Disertační práce Mgr. Roithové reflektuje snahu pochopit skutečné mechanismy fungování tak složitého fenoménu, jakým je sestřih pre-mRNA na mRNA. Je svým způsobem překvapující, jak zásadní otázky v tomto kontextu zůstávají nezodpovězeny. V tomto směru přináší práce celou řadu nových poznatků, které podstatným a netriviálním způsobem rozvíjejí řešenou

problematiku. Po výsledkové stránce hodnotím tedy předloženou práci jako výbornou. Kvalitu dosažených výsledků dále dokumentují dvě původní publikace v respektovaných vědeckých časopisech. Uvedená práce a publikované výsledky rovněž demonstrují, že autorka zvládla pokročilé metody molekulární a buněčné biologie, a že je schopna navrhnout experimentální postup a interpretovat získaná data.

Na základě kvality disertační práce Mgr. Adriany Roithové doporučuji, aby tato práce byla přijata pro řízení o udělení vědecké hodnosti *Philosophiae doctor*.

K disertační práci Mgr. Adriany Roithové bych měl několik více či méně obecných dotazů:

1. Zajímalo by mě, jaká je stochiometrie jednotlivých snRNPs a zdali je funkce sestřihových komplexů regulována (v práci je zmíněna pouze Ran GTPáza a fosforylace proteinu PHAX, které regulují nukleocytoplazmatický transport snRNPs během maturace). Je možné odhadnout poměr sestřihových komplexů a mRNA? Dochází k regulaci aktivity sestřihových komplexů v závislosti na množství mRNA (např. dormantní vs. aktivně proliferující buňky, které mají rozdílnou produkci mRNA)?
2. Sekvestrace/skladování mRNA ribonukleoproteinových komplexů ve stresových granulích je jedním z důležitých regulačních mechanismů translace RNA. Toto slouží za zejména stresových podmínek ke skladování a následné reutilizaci mRNA. Biogeneze snRPS v cytoplazmě přímo nabízí, že by jejich funkce mohla být regulována obdobným způsobem. Je známo, zdali snRNPs lokalizují do stresových granulí?
3. Jeden z velmi zajímavých výsledků naznačuje roli proteinu Gemin 3 v rozvolnění struktury U2 snRNA. Předpovězená stabilní struktura U2 je v práci ukázána (str. 83), nicméně by bylo vhodné obdobným způsobem prezentovat i strukturu maturované U2 snRNA (snad ukázána na str. 61, popř. na str. 86?). Chtěl bych autorku poprosit, zdali by mohla podrobněji prezentovat Geminem 3 regulované změny ve struktuře U2 snRNA během její maturace.
4. Z obrázku 21 a výsledků počínajících na str. 62 je zřejmé, že samotná mikroinjekce zvyšuje počet Cajalových tělísek. Je tomu opravdu tak a pokud ano, tak proč k tomu dochází?

Příloha k posudku na disertační práci Mgr. Adriany Roithové „Kontrola kvality skládání snRNP částic“

V obsahu je špatně očíslována kapitola 3.1. (1.9.3.1).

Str. 9: „*Each snRNP consists from RNA...*“ by mělo být „*Each snRNP consists of RNA...*“.

Str. 12: Překlep „*devided*“.

Str. 17: Použití obratu „*bound by*“ (ve větě „*These RNA elements...are bound by regulatory proteins...*“) není vhodné, protože má trochu jiný význam.

Str. 24, Figure 7: V obrázku je nesprávně uvedeno „*Export to the nucleus*“, předpokládám, že mělo být uvedeno „*Export from the nucleus*“.

V mé verzi disertační práce není obrázek pochopitelný, protože je pravděpodobně složen z navzájem se překrývajících panelů.

Str. 29: Nadbytečné „*it*“ ve větě „*also in the nucleus, where it SMN complex accumulates in...*“

Str. 30: Domnívám se, že označení YG doména není přesné a v literatuře se častěji uvádí označení YG box.

Str. 30. Bylo by vhodné sjednotit názvosloví – jednou je arginin-rich doména označována jako GR, potom jako RG.

Str. 34: Překlep „*Upon nuclear reentry, snRNPs appeares in the nuclear structures...*“.

Str. 35: Neshoda jednotného a množného čísla „*This modifications are...*“. Podobně též na str. 73 (... *SMN complex play ...*) a str. 89 (...*these phenotype...*).

Str. 50: Nerozdělené slovo „*preparedby*“

Str. 53: Ve větě „*HeLa cells were grown on 10 cm Petri dish were placed on ice...*“ je nadbytečné první „*grown*“.

Str. 55: Překlep „*horseradish perowidase*“

Str. 59: Chybějící „*of*“ ve větě „*The Cajal bodies are a place the final snRNP maturation.*“

Str. 99: Domnívám se, že autorka chtěla ve větě „*leaving the molecular mechanism of coilin-snRNP interaction resolved.*“ použít slovo „*unresolved*“.