

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Viola Vaňková Hausnerová
	Datum: 30. 5. 2019
Autor: Jitka Vojáčková	
Název práce: Functional analysis of the TSSC4 chaperone during snRNP formation Analýza funkce chaperonu TSSC4 při formování snRNP částic	
<b>Cíle práce</b> Hlavním cílem diplomové práce bylo charakterizovat protein TSSC4 z hlediska jeho interakcí v rámci U5 snRNP, funkce při maturaci U5 snRNP a tri-snRNP. Dále autorka provedla analýzu efektu deplece proteinu TSSC4 na proteinové složení U5 snRNP a tri-snRNP a analýzu lokalizace TSSC4 v buňce pomocí fluorescenční mikroskopie.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO</b> Rozsah práce (počet stran): 80 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Hodnotím velice kladně. Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO.	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
<b>Závěry (Souhrn) :</b> Jsou výstižné? ANO	
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Velice dobrá. Práce je napsaná kvalitní angličtinou, s minimem překlepů a stylistických chyb. Některé obrázky v literárním úvodu by mohly mít lepší rozlišení. <b>Obrazová</b>	

dokumentace výsledků je na vysoké úrovni.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Vzhledem k náročnosti zvoleného tématu (minimum znalostí o funkci proteinu TSSC4, komplexnost problematiky) bych považovala cíle práce za splněné. Ačkoliv se ve většině dosažených výsledků nejedná o přímé důkazy ale o korelace, je práce přínosná z hlediska studia funkce a dynamiky sestřihového aparátu v lidských buňkách a lze ji považovat za zdroj nových poznatků s potenciálem pro publikaci v recenzovaném impaktovaném časopise. Autorka prokázala, že je schopná zvládnout celou řadu základních i pokročilých technik molekulární a buněčné biologie, provést experiment s vhodně zvolenými kontrolami a kriticky zhodnotit jeho výsledek. Celkově hodnotím práci velmi kladně, doporučuji ji k obhajobě a autorce přeji mnoho štěstí v její další vědecké kariéře.

**Otázky a připomínky oponenta:**

V metodické části práce mě zarazilo použití fráze “transfection to bacteria“. Domnívám se, že se jedná spíše o transformaci.

Str. 41: Ocenila bych informaci o poměru molekul vektor:insert (molar ratio) v ligačních reakcích.

Str. 48: Chybí informace o koncentraci prób použitých v experimentech RNA FISH.

Str. 50: Konstrukt pro expresi TSSC4 – je GFP připojeno k proteinu na C nebo na N konci?

Str. 53: Obrázek 5.5, IP. Víte, jaká byla transfekční účinnost u jednotlivých konstruktů pro expresi delečních mutantů TSSC4-GFP? Víte, jaká je úroveň exprese jednotlivých delečních mutantů na úrovni mRNA? Pokud chcete v tomto případě porovnávat míru interakce mutantů s dalšími komponenty spliceosomu, myslím, že by bylo vhodné ukázat jednak kontrolu stejnoměrného nanesení vzorků na gel (loading control), jednak kvantifikaci intenzity jednotlivých bandů.

Str. 54: Obrázek 5.6, RNA gel. Zdá se mi, že TSSC4-GFP váže také U1 a U4 snRNA, máte pro to nějaké vysvětlení?

Str. 56: Obrázek 5.7. K vašemu komentáři, že mutant  $\Delta 201-250$  má částečně cytoplasmatickou lokalizaci, bych měla připomínku, že jde zřejmě o sesterské buňky v časně G1 fázi (domnívám se tak na základě signálu pro DAPI) a že tudíž pravděpodobně nebyl ještě vřechen protein transportován zpět do jádra po mitóze.

Str. 59, 60: Obrázky 5.10, 5.11. Možná je na vině mé špatné chápání návržení těchto experimentů, ale pokud jste pracovala se stabilní linií s integrací PRPF8-GFP do genomu a dále ji transfekovala konstruktem exprimujícím TSSC4-GFP, nemůžete určit, který ze dvou fúzních proteinů precipitujete protilátkou proti GFP. Můžete prosím vysvětlit, jaká je tedy funkce kontroly s plasmidem TSSC4-GFP?

Dále k obrázku 5.10. Zde se snažíte prokázat sníženou míru interakce PRPF8 a SNRNP200. Jelikož se jedná o důležitý výsledek z hlediska celého projektu, opravdu bych ocenila kvantifikaci signálu z Western blotu a případně srovnání s opakováními tohoto experimentu, aby byla prezentace výsledku přesvědčivější. Pokusila jste se prokázat tento efekt deplece TSSC4 na interakci PRPF8 a SNRNP200 i pomocí jiných metod, např. FRET?

Str. 63: Obrázek 5.14 Experiment B. Zde evidentně nefungoval knock-down proteinu TSSC4, takže je nutné celý experiment posuzovat velmi opatrně. Ocenila bych kvantifikaci jako profil intenzit jednotlivých bandů napříč frakcemi. To samé platí i pro obrázek 5.15. Ze stručného slovního hodnocení takto komplexního výsledku nelze pro neznalého čtenáře pochopit, co experiment skutečně prokázal.

Ještě mám následující otázky: Myslíte si, že je akumulace molekul U snRNA v Cajalových tělíčkách po knock-downu TSSC4 důsledkem pomalejší recyklace komponent post-katalytického spliceosomu? Máte nějaká data o dynamice spliceosomových proteinů po

knock-downu TSSC4? Je možné, aby například panovala v této situaci špatná stechiometrie komponentů spliceosomu, která by vedla k akumulaci v CBs?  
Víte, jestli exprese TSSC4  $\Delta$ 51-100, který má zeslabenou interakci s PRPF8, rovněž vede k akumulaci U snRNAs v CBs, případně jestli by exprese některého delečního mutantu mohla naopak zvrátit fenotyp po depleci TSSC4?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: