

## POSUDEK OPONENTA

Název práce: A role of the 5' cap in Sm-class snRNA biogenesis

Role 5' čepičky v biogenezi snRNA typu Sm

Autor: Bc. Hana Petržílková

snRNA molekuly, které tvoří jádro jednotlivých spliceosomálních snRNP, v průběhu svého zrání prochází celou řadou ko- a post-transkripčních úprav a postupného navazování proteinových faktorů, což vede k vytvoření funkčních podjednotek spliceosomu schopných angažovat se v sestřihu pre-mRNA. Bc. Hana Petržílková si ve své diplomové práci s názvem A role of the 5' cap in Sm-class snRNA biogenesis vytýčila dva cíle. Prvním cílem bylo popsat vliv N6-metylce a demetylce prvního nukleotidu na biogenezi snRNA. V druhé části své práce se pokusila mapovat osud artificiálně zkrácených snRNA, jejich lokalizaci a schopnost získat plně maturovanou 5' TMG čepičku.

Práce je psána v anglickém jazyce a je klasicky členěná do osmi kapitol a podkapitol. Po krátkém Introduction následuje kapitola Literature overview (18 stran), která nás seznamuje se základním přehledem sestřihu pre-mRNA a strukturou a složením snRNP. Hlavní důraz je kladen na detailní popis biogeneze snRNP. Kapitola je napsána velice kvalitně, logicky a čtivě. Obsahuje vše důležité pro pochopení následujících částí práce. Následuje kapitola Aims and outlook ve které jsou popsány cíle práce. V kapitole Materials a methods (14 stran) je kompletní seznam použitého materiálu a celkem 16 metod využitých při řešení práce. Metody jsou sepsány stručně, ale kvalitně, v dostatečném detailu pro zopakování experimentů. Kapitole Results je věnováno 25 stran, výsledky jsou velmi pěkně popsány a dokumentovány, částečně i bezprostředně diskutovány a zasazeny do kontextu. Hlubší zamýšlení nad výsledky se nachází v kapitole Discussion (7 stran). Výsledky jsou zde diskutovány velmi podrobně a z různých pohledů. Prakticky všechny otázky, které mě v průběhu čtení napadaly a řada dalších, jsou zde řešeny. Rovněž jsou zde navrhovány další experimenty a směry kterými by se mohl ubírat další výzkum. Po jednostránkovém Conclusions následují References s téměř 200 položkami.

Co se dosažených výsledků týče, v první části práce byl sledován vliv nefunkční demetylázy FTO, která je odpovědná za odstranění N6 metylce prvního adenosinu, a to jak na velikost Cajalových tělísek, ve kterých se odehrává část biogeneze snRNA, tak na lokalizaci pěti snRNA. Nejvýraznější efekt byl pozorován v lokalizaci U2 snRNA, která byla méně přítomná v Cajalových tělískách, a to ve všech třech použitých liniích v porovnání s wt buňkami.

V druhé části této práce autorka potvrdila, že arteficiálně zkrácená U4 snRNA, váže komplex IFIT1/2/3, o kterém je známo, že váže 5' čepičky, které nemají 2'-O metylaci, případně RNA, které 5' čepičku postrádají. Toto zjištění zde bylo rozšířeno i na zkrácenou U2 snRNA. Obě zkrácené snRNA také měly problém projít plnou maturací. Zároveň se autorka, mimo jiné, zabývala tím, jakým způsobem ovlivní maturaci a lokalizaci snRNA MS2 vlásenka, která byla do sekvence U4 snRNA vložena z důvodu značení. Ukázala, že tato vlásenka pravděpodobně nemá přímý vliv na pozorované defekty v maturaci snRNP. Ve spolupráci s laboratoří Dr. Hany Macíčkové Cahové, následně zjistila, že se v buňkách se zkrácenou U4 snRNA nachází větší množství molekul s nedostatečně metylovanou 5' čepičkou, a naopak menší množství U4 snRNA s plně zralou TMG čepičkou. Cíle práce byly v rozsahu, který se od diplomové práce očekává, určitě naplněny.

Celkově se jedná o velice kvalitní práci jak po formální, tak obsahové stránce. Autorka jasně prokazuje, že se naučila používat a kvalitně provádět celou řadu metod a je schopná výsledky jimi dosažené promyslet a diskutovat. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Připomínky:

Některá review jsou označena jako reviewed in a některá ne.

Při popisu sestřihu mohla být použita novější literatura reflektující současné poznatky získané z cryo-EM (např. v popisu sestřihového cyklu a kinetického modelu). Zároveň zde postrádám informaci o NTC komplexu.

V kapitole metody chybí detaily transformace bakterií a popis izolace plazmidů.

Samotný výraz „restriction“ pro analýzu štěpením restričními endonukleázami je příliš zkrácený laboratorní slang.

U Fig. 5.8 chybí citace, v textu však je.

Otázky:

Proč byla transfekce pro RNAi dělána 2x?

Jaká je výhoda použití různých druhů lipofectaminů, čím se liší?

Jaké jsou známé konkrétní RNA (kromě snRNA), které demetyluje *in vivo* FTO demetyláza?

Pro analýzu obrazu byla použita pouze Cajalova tělíska splňující určitá kritéria, což je pochopitelné. Chtěla jsem se zeptat, kolik zhruba procent jich mohlo být z analýzy vyloučeno? Lišilo se toto množství mezi liniemi?

Ve Strašicích dne 2.9. 2022

Kateřina Abrhámová