



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

28. května 2024

Školitelský posudek magisterské práce Jana Říhy

Jan Říha vypracoval pod mým vedením magisterskou práci s názvem **tRNA syntetázy jako potenciální RNA čepičkovací enzymy**. Studie vycházela z poznatků mojí laboratoře (objev nové třídy RNA čepiček na bázi dinukleosid polyfosfátů v bakteriích) a výsledků publikovaných skupinou Joela Belasca z NYU v Molecular Cell.

Cílem této práce bylo prověřit, zda bakteriální tRNA syntetázy mohou formovat RNA čepičky na bázi dinukleosid polyfosfátů přímo na RNA. Nejdříve Jan klonoval a následně exprimoval a purifikoval čtyři tRNA syntetázy z *E. coli*. Dále bylo jeho úkolem najít podmínky, za nichž budou tyto enzymy syntetizovat in vitro diadenosin tetrafosfát (Ap₄A) a porovnat aktivitu a selektivitu těchto enzymů. Hlavním cílem práce bylo ověřit, zda jsou tyto enzymy schopny vytvořit Ap₄A čepičku přímo na RNA, jak bylo reportováno skupinou J. Belasca.

Jan úspěšně připravil všechny čtyři enzymy ve výborné čistotě. Našel vhodné podmínky, za nichž tRNA syntetázy vytvářely Ap₄A, diadenosin trifosfát a adenosin-guanosin tetrafosfát. Porovnal úspěšně jejich aktivitu a zjistil, že lysinová tRNA syntetáza U je nejefektivnější v produkci Ap₄A. Následně aplikoval tyto podmínky na různé typy in vitro syntetizované RNA. Nicméně, v žádném experimentu a ani za žádných jiných podmínek nepozoroval vznik Ap₄A-RNA. Sám vyvinul aktivitu a pokusil se za pomoci Dr. Martina Lepšíka vysvětlit toto pozorování. Za využití molekulárně-dynamických simulací zjistil, že oblast vstupu druhého ATP pro syntézu Ap₄A je na povrchu enzymu natolik negativně nabitá, že pravděpodobně dochází k odpuzování negativně nabitě molekuly RNA a ta nemůže být akceptována jako substrát. V závěru své laboratorní práce využil svoje znalosti lysinové tRNA syntetázy a její enzymové aktivity při přípravě izotopicky značeného ¹⁵N Ap₄A, který bude využíván jako standard při kvantifikaci Ap₄A-RNA z různých buněčných linií. Byť se nepodařilo dosáhnout kýženého cíle, tzn. čepičkování RNA pomocí tRNA syntetáz, Jan odvedl skvělou laboratorní práci. Negativní výsledek navíc není jeho chybou, ale očividně nekvalitně provedenou vědeckou prací publikovanou v prestižním časopise. Hlavním závěrem jeho práce je tedy fakt, že tRNA syntetázy nejsou a ani nemohou být RNA čepičkovacími enzymy.

Jan patří mezi velmi talentované studenty a v předkládané práci se mu podařilo dosáhnout zadaných cílů nad rámec rozsahu průměrných magisterských prací. Jan sám aktivně vyhledával literární zdroje a sám navrhoval různý design experimentů na základě těchto zdrojů. Práce je velmi dobře a logicky členěná s detailně popsanou úvodní a teoretickou částí odkazující na adekvátní množství literárních zdrojů (124). Následuje popis použitého materiálu a metod a část popisující výsledky. Práce je uzavřena diskuzí a závěrem. Nutno podotknout, že student při vypracovávání magisterské práce ovládl široké množství metod od klonování, bakteriální kultury, purifikaci proteinů na FPLC, přes in vitro přípravu RNA, analýzu pomocí HPLC, molekulárně-dynamické simulace až po enzymovou syntézu ve velkém měřítku.

Jakožto školitelka jsem s předkládanou magisterskou prací spokojena a jsem velmi ráda, že jsem Jana mohla školit. Věřím, že má potenciál stát se v budoucnu úspěšným vědcem.

Proto navrhuji ohodnotit předkládanou magisterskou práci známkou výborně.

Dr. Hana Cahova
Junior Research Group Leader
IOCB Prague
Flemingovo nám. 2.
166 10 Praha 6, ČR

tel: +420 220 183 124
cahova@uochb.cas.cz

Flemingovo nám. 2
166 10 Praha 6
Czech Republic

+420 220 183 333
uochb@uochb.cas.cz
www.uochb.cz

IČ: 61388963
DIČ: CZ61388963