

Oponentský posudek Diplomové práce Bc. Jany Konířové: Sestřih intronu *TUB3* v buňkách mutantních v genu *PRP45*

Předkládaná diplomová práce se zabývá charakterizací vlastností buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které obsahují v genomu mutantní zkrácenou verzi genu *PRP45*. Gen *PRP45* kóduje esenciální jaderný protein, jež se pravděpodobně účastní procesu sestřihu pre-mRNA. V práci bylo potvrzeno, že exprese zkrácené verze proteinu Prp45 dlouhé 169 aminokyselin (z původních 379) vede ke zvýšené citlivosti buněk k mikrotubulárnímu inhibitoru benomylu a k fluorescenčnímu barvivu calcofluor white. Z genomové banky *S. cerevisiae* byl izolován gen *TUB3* kódující tubulin α , jehož zvýšená exprese v buňkách s mutací *prp45*(1-169) vedla k potlačení citlivosti buněk k benomylu. Dále bylo sledováno u mutantních buněk *prp45*(1-169), jaký vliv mohou mít na jejich termosenzitivitu a citlivost k benomylu delece intronů v genech *TUB1*, *TUB3* a *COF1*, jež kódují cytoskeletární proteiny. V poslední části předkládané práce byl pomocí metody RT-qPCR sledován vliv mutace *prp45*(1-169) na expresi genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* a také vliv mutace v intronu genu *COF1* na expresi tohoto genu.

Práce má 97 stran a je psána spisovnou češtinou téměř bez pravopisných chyb či překlepů. V textu se občas vyskytují anglické výrazy, které by bylo možné nahradit českými ekvivalenty (např. strana 28 třetí odstavec). Také bych doporučovala sjednotit psaní *s* a *z* v odborných výrazech jako jsou např. plasmid nebo cytoplasma. Ke každé kapitole uvádím dotazy a připomínky zvlášť.

Literární přehled (19 stran) je rozdělen do pěti podkapitol, ve kterých jsou popsány poznatky o proteinu Prp45p, sestřihu pre-mRNA, o genech (a jejich intronech) kódujících proteiny, jež jsou součástí buněčného cytoskeletu. Autorka prostudovala celou řadu vědeckých publikací, o čemž svědčí i seznam celkem 93 citací. Jednotlivé kapitoly však na sebe logicky příliš nenasazují a text působí neuceleně. Obsažené informace nejsou uváděny od obecnějších ke konkrétnějším, místy jsou velmi podrobné a místy velmi stručné.

Připomínky:

1. V textu literárního přehledu jsem postrádala
 - více obecných informací o transkripci, struktuře a sestřihu intronů, úpravě RNA
 - souhrnné detailnější informace o struktuře proteinu Prp45 a jeho zkrácené verze dlouhé 169 aminokyselin – popis sekvence, jednotlivých motivů, případné interakce s dalšími proteiny (zmínka je např. až na str. 83), významu C-konce proteinu
 - samostatnou kapitolu o mikrotubulárních inhibitorych a jejich mechanismu účinku v buňkách (částečně jsou tyto informace uvedeny ve výsledcích)
 - na závěr literárního přehledu chybí alespoň odstavec o tom, co z dosud známých poznatků vyplývá a co autorka očekávala od experimentální části práce
2. Obr. č. 2 a 6 jsou ponechány v angličtině a popisky pod obrázkem nejsou srozumitelné bez dohledání informací v textu.

V kapitole **Materiál a metody** jsou popsány materiál a metody používané v experimentální části práce a má 24 stran. Ze seznamu metod je patrné, že autorka si během diplomové práce osvojila řadu mikrobiologických a molekulárně biologických postupů včetně kvantitativní RT-PCR. Metody jsou místy popsány dost stručně formou protokolů používaných v laboratoři, což mi pro diplomovou práci nepřipadá vhodné. Postrádala jsem vysvětlení některých kroků. Např. při izolaci pDNA či proteinů bych považovala za vhodné uvést, co se nachází v supernatantu nebo v sedimentu.

Připomínky a dotazy:

1. Chybí seznam použitých přístrojů a materiálu.
2. Tabulka kmenů *S. cerevisiae* na str. 30 je značně nepřehledná. Kmeny se stejným genetickým pozadím by měly být lépe vyznačeny. Chybí i citace.
3. Proč byl do média pro kvasinky přidáván ampicilin?
4. V kap. 3.2.2 a 3.2.3 jsou uvedeny dva způsoby izolace plasmidové DNA z kvasinek. Která metoda byla kdy používána?
5. Jaká metoda byla použita pro transformaci genomovou knihovnou? Odkud byla knihovna získána?
6. V metodách není uvedena metoda „replica plating“.
7. V popisu Western blotu je nutné uvést, co je katoda a co anoda a u imunodetekce teploty, při kterých byla inkubována membrána, ve všech krocích.
8. Popis metody RT-qPCR je velmi stručný. Zejména, co se týká zpracování naměřených hodnot. Bylo by vhodné zde nebo ve výsledcích zařadit obrázek(y) s příkladem, jakým způsobem byla naměřená data vyhodnocována.

Kapitola **Výsledky** má 24 stran včetně 18 obrázků a je rozdělena do tří podkapitol. Popis pokusů, obrázků i získaných výsledků je opět velmi stručný.

První část výsledků je věnována testování citlivosti buněk nesoucích mutaci *prp45(1-169)* k toxickým látkám benomylu a calcofluoru white a hledání proteinu, který by při zvýšené expresi potlačoval citlivost buněk k těmto látkám.

Připomínky a dotazy:

1. V kapitole 5.1.2 nejsou uvedeny podmínky transformace a selekce (použité koncentrace benomylu a calcofluoru), účinnost transformace genomovou knihovnou, počty získaných kolonií, kolik bylo izolováno celkem plasmidů atd.?
2. Obr. č. 5, 6, 9 – bylo použito selekční médium vhodné pro buňky obsahující plasmidy?
3. Z genomové banky získaný plasmid obsahoval tři celé geny, *YML122c*, *PHO84*, *TUB3* a fragment genu *GTR1*. Jaké jsou funkce proteinů, které tyto geny kódují? V práci, kromě genu *TUB3*, to není nikde diskutováno, přestože gen *PHO84* byl dále analyzován. Chybí také uvedení velikostí klonovaných fragmentů.

V druhé kapitole výsledků byla zkonstruována série kmenů, které obsahovaly delecí intronu jednoho z genů *TUB1*, *TUB2* nebo *COF1* v kombinaci s mutantní verzí genu *PRP45*, *prp45(1-169)*. Byl zjišťován vliv delece intronů u těchto genů na termosenzitivitu a citlivost buněk *prp45(1-169)* k benomylu.

Připomínky a dotazy:

1. Proč byly vybrány právě tyto geny pro cytoskeletární proteiny? Proč nebyl zvolen jako kontrola také nějaký gen, který nekóduje cytoskeletární protein?
2. Správná integrace deleční kazety do genomu by měla být doložena alespoň jedním obrázkem PCR nebo Western blotu.
3. Obr. 11 – není uvedeno, jak dlouho byly buňky inkubovány při 30°C a 37°C? Jaké bylo použité médium? Kdo připravoval kmeny AVY19, 45 a 47 (to je uvedeno až na str. 70).

Ve třetí kapitole výsledků byl sledován vliv mutace *prp45(1-169)* na expresi genů *TUB1*, *TUB3*, *COF1* a *ACT1* a také vliv mutace v intronu genu *COF1* na expresi tohoto genu pomocí metody RT-qPCR. Navržením různých druhů oligonukleotidů hybridizujících v oblastech exonů nebo intronů bylo možné stanovit v buňkách množství celkové RNA, mRNA, pre-mRNA nebo RNA obsahujících intron v různé fázi sestřihu. Ve všech případech mutace

prp45(1-169) způsobovala nahromadění pre-mRNA. Největší vliv měla mutace *prp45(1-169)* na expresi genu *COF1*.

Připomínky a dotazy:

1. str. 74 – v textu chybí odkazy na obr. 15 a 16
2. Obr. 17 – hodnoty pro kmeny AVY jsou identické jako na obr. 14. Byly pokusy dělány nezávisle? Obdobně to platí také pro obr. 18A a obr. 13 a 14?
3. Kmen AV11#31 není uveden v seznamu kmenů.

Kapitola **Diskuze** má devět stran a je nejlépe zpracovanou částí práce. V porovnání s ostatními kapitolami je sepsána uceleněji a všechny získané výsledky jsou dobře diskutovány.

Připomínky a dotazy:

1. Ze získaných výsledků vyplývá, že buňky *prp45(1-169)tub3Δi* jsou méně senzitivní ke zvýšené teplotě a zároveň obsahují zvýšenou hladinu mRNA genu *TUB3* v porovnání s buňkami s mutací *prp45(1-169)*. Máte nějakou hypotézu, k čemu v buňkách obsahujících zkrácenou verzi proteinu Prp45p a postrádajících intron genu *TUB3* dochází? Má tedy protein Prp45p nějaký vliv na sestřih intronu genu *TUB3*?
2. Jakým směrem se bude studovaná problematika dále ubírat?

Ačkoliv autorka v experimentální části práce prokázala schopnost samostatné vědecké činnosti, osvojila si zejména možnosti metody kvantitativní RT-PCR a získala dostatek zajímavých výsledků, dle mého názoru by předkládaná diplomová práce vyžadovala kvalitnější propracování textu a proto navrhuji, aby byla hodnocena jako velmi dobrá.

V Praze, dne 17. září 2010

Ing. Olga Zimmermannová, PhD.
Fyziologický ústav AV ČR, Praha