

## Oponentský posudek

doktorské disertační práce Mgr. Martiny Huranové  
„Assembly and recycling of functional splicing complexes *in vivo*“

Předložená disertační práce je věnována vybraným aspektům molekulárního mechanismu sestřihu mRNA v jádře eukaryotických buněk. Soustřeďuje se na efekty destabilizace křehké rovnováhy vysoce dynamických procesů *de novo* syntézy, skládání a zpětné recyklace snRNP komplexů. Prezentované experimenty představují zdařilou ukázkou využití moderních metod fluorescenční mikroskopie při lokalizaci, popisu dynamiky a molekulární podstaty biologických procesů. Práce obsahuje řadu původních vědeckých pozorování, která přispívají k pochopení dynamického charakteru strukturně funkčního uspořádání buněčného jádra a mají potenciální aplikační přesah, například v klinickém výzkumu.

Po formální stránce práce působí dojmem, že na její sepsání nebylo dost času. Nejedná se v žádném případě o vážná pochybení, jde výlučně o drobné odchylky v textu a v doplňujících údajích. Vzhledem k tomu, že jejich výskyt pozitivně koreluje s frekvencí překlepů, přičítám je čistě na vrub temperamentu autorky. Nicméně, při čtení působí rušivě a přimlouval bych se, aby se jich autorka v budoucím písemném projevu pokusila vyvarovat:

- Členění textu práce je podřízeno faktu, že kapitoly 2 – 5 jsou přepisem čtyř nezávislých odborných publikací. Textová část práce dále obsahuje všeobecný úvod (kapitola 1) a diskusi (kapitola 6). Text je psán srozumitelnou a po odborné stránce korektní angličtinou. Vzhledem ke zmíněnému odlišnému původu jednotlivých částí práce je pochopitelná jistá stylistická odlišnost jejích kapitol. Nedobře však na čtenáře působí, že kapitoly 1 a 6 jsou psány britskou transkripcí (behaviour – str. 7, 12, 13, 119, 120; multicolour – str. 12; labelled – str. 13), navíc nepříliš důsledně (labeled – str. 18; modeling – str. 10, 13), zatímco kapitoly 2 – 5 americkou transkripcí, patrně v souladu s požadavky časopisů, ze kterých jsou převzaty (behavior – 19, 29, 53, 58, 59, 61, 62, 88, 89; color – 19, 116; labeled – 26, 46, 75; modeling – 21, 35). Napříště by asi bylo vhodnější, např. s pomocí automatické kontroly pravopisu, text po této stránce sjednotit.
- Seznam zkratk obsahuje řadu chyb a nepřesností:
  - Zkratka pro monomerní červeně fluoreskující protein je uvedena jako mRED. Doporučoval bych nahradit zavedenou formou mRFP. Poměr četnosti výskytů obou zkratk je asi 51/71300 v neprospěch mRED (Google).
  - siRNA je chybně přepsáno jako „silencing RNA“. Má být „small interference RNA“.
  - PA-GFP: správný přepis je „photoactivatable GFP“.
  - DAPI má být „4',6-diamidino-2-phenylindole“.
  - Zkratka difúzního koeficientu  $D_f$  je neobvyklá, s nejasnou etymologií.
  - Seznam je neúplný (např. E5-RFP, ECFP, EYFP)
- V textu se vyskytují sousloví „fluorescent microscopy“ (str. 6), „fluorescent levels“ (str. 23), „fluorescent signal“ (str. 30, 38, 89), „fluorescent reduction“ (str. 43), „fluorescent recovery“ (str. 57), která nedávají smysl.
- Formát citací, uvádějící jména prvních dvou autorů, je velice neobvyklý.

K obsahu práce mám následující komentáře:

- Podstatnou část práce tvoří odborné publikace, které jsou kolektivním dílem celkem 18 autorů. Velkým nedostatkem práce je fakt, že autorka opomněla výslovně uvést svůj příspěvek k jednotlivým publikacím. Spoléhám na to, že toto opomenutí napraví během obhajoby.
- Součástí práce je i všeobecný úvod (kapitola 1). To je naprosto v pořádku a rozhodně by neměl chybět. Jeho „biologická“ část je však, v kontextu obsahu dalších kapitol, poněkud redundantní.

Každá z kapitol 2 – 5 má svůj vlastní úvod a kdo si pozorně přečte kapitolu 1, může v následujících kapitolách přeskokovat celé odstavce. Velice pozitivně oproti tomu hodnotím metodickou část úvodu věnovanou metodám fluorescenční mikroskopie, které jsou páteří experimentů v celé práci. Škoda jen, že i vybrané biologické metodiky, jako např. siRNA nebo BAC technologie, které jsou v práci využity, nebyly uvedeny podobnou formou.

Odborně se jedná o velice kvalitní práci, která vrchovatě splňuje kritéria pro udělení doktorské hodnosti. Uvítal bych, kdyby během obhajoby autorka mohla zodpovědět následující dotazy:

1. Jaká je podle Vašeho názoru biologická funkce jaderných skvrn (speckles)? Na obr. 3.5C je jasně patrná akumulace různých GFP-značených snRNP proteinů v místech přepisu vneseného genu E3. Na třech ze čtyř presentovaných obrázků je fluorescenčně mikroskopický obraz těchto míst srovnatelný s jadernými skvrnami. Srovnajte předpokládanou jemnou strukturu obou jaderných kompartmentů.
2. Jak velký zásah do uspořádání jaderného materiálu představuje masivní exprese vneseného genu? Komentujte obr. 3.5C s přihlédnutím např. k práci Li et al., J Cell Biol 140(5):975-89, 1998.
3. Na straně 81 se praví, že „U4/U6 and U4/U6-U5 snRNP formation and recycling occur primarily in the nuclear inclusion called the Cajal body...“. Uvedte stručný přehled pozorování, která opravňují k takovému závěru.
4. Porovnejte obecně metody FRAP a FCS s přihlédnutím k hlavním zdrojům možných artefaktů.

Podotýkám však, že její odpovědi nebudou mít vliv na mé celkové hodnocení předložené disertační práce. Autorka jednoznačně prokázala předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji proto, aby jí na základě této práce byl udělen titul PhD.

V Praze, 15. 6. 2010

  
RNDr. Jan Malínský, PhD.

Ústav experimentální medicíny AV ČR  
Víteňská 1083  
142 20 Praha