

MASARYK UNIVERSITY
FACULTY OF SCIENCE
NATIONAL CENTRE FOR BIOMOLECULAR RESEARCH
Doc. Stepanka Vanacova, PhD
University Campus Bohunice, ILBIT, Building A4
Kamenice 5, 62500 Brno
Czech Republic
Phone: +420 549 49 5042
Fax: +420 549 49 2556
vanacova@chemi.muni.cz

Brno, 13.8. 2010

Věc: Posudek disertační práce Mgr. Martiny Huranové nazvané “Assembly and recycling of functional splicing complexes *in vivo*”

Předložená disertační práce zahrnuje převážně mechanistická studia sestřihu pre-mRNA *in vivo* a jako modelový nástroj používá lidské tkáňové kultury. Autorka, pod vedením Dr. Davida Staňka, využila moderních metod fluorescenční mikroskopie, které dnes již umožňují pozorování jednotlivých molekul nukleových kyselin a proteinů a studium jejich vzájemných interakcí v čase a prostoru. Disertace tvoří soubor tří již opublikovaných prací a jednoho rukopisu v recenzním řízení. Všechny čtyři práce se týkají aktuálních tématik v oboru sestřihu pre-mRNA, ať již z funkčního či metodického pohledu.

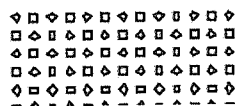
Odstranění spliceosomálních intronů je u metazoi esenciálním krokem potřebným pro vyjádření většiny genů formou proteinů. Alternativní sestřih pak hraje klíčovou úlohu pro rozšiřování rozmanitosti např. lidského proteomu. Malá, neplánovaná odchylka v sekvenci či sestřihu může mít fatální následky na buněčné i organismální úrovni. Sestřih pre-mRNA je zajišťován ribonukleoproteinovým aparátem “spliceosomem”, který se skládá z pěti tzv. snRNP. Přestože byl sestřih pre-mRNA rozpoznán již v sedmdesátých letech minulého století a většina klíčových komponent spliceosomů popsána v nadcházejících dvaceti letech, stále zůstává množství otázek, zvláště mechanistického rázu, nezodpovězených. Původní práce zabývající se kompozicí a funkcí jednotlivých složek spliceosomů předpověděly model, v němž se jednotlivé snRNPs postupně skládají v důsledku vazby na pre-mRNA. Novější práce z posledních let ale popsaly pozorování tzv. penta-snRNP a navrhly model, kdy se spliceosomy seskupují ještě dříve než se setkají s pre-mRNA. Mgr. Huranova a spoluautoři zde elegantně pomocí fluorescenční mikroskopie, konkrétně moderních metodik FRAP a FRET umožňujících sledovat chování individuálních snRNP v čase a prostoru, ukázali, že různé snRNP mají rozdílný rezidenční čas na pre-mRNA, čímž jejich výsledky podpořily původní model postupného sestavování spliceosomů na moleculu mRNA. snRNP se skládají z snRNA a proteinů, které jsou buňkami produkovány konstantně ve vysokých množstvích. Proto se obecně rozumělo, že většina spliceosomů je tvořena z nově vytvořených komponent. Zde, předkladatelka a spoluautoři naopak ukazují, že významná část snRNP je tvořena starými recyklovanými molekulami a setrvává v místě sestavování spliceosomů, v tzv. Cajal bodies. Pro budoucí výzkum pak autorka vyvinula metodiku pozorování přímých interakcí mezi proteinem a RNA *in vivo*, tzv. RB-FRET a ověřila její funkčnost na známém modelu proteinu hnRNPH a jeho substrátové RNA. V neposlední řadě se pak jedna část věnuje jinému důležitému aspektu studia mRNA sestřihu, a to mutaci AD29 v sestřihovém faktoru Prp31, která byla objevena u pacientů s retinitis pigmentosa. Autorka odhalila, že studovaná mutace vede k defektům ve skládání komplexu a k destabilizaci proteinu Prp31.

Mám několik poznámek a dotazů, které budou uvedeny postupně tak, jak se vyskytují v textu.

1. V části “Introduction” na str. 9 a 51 jsou uvedeny rozdílné informace o rozpoznávání intronu a sestavování spliceosomu, konkrétně:

str. 9, druhý odstavce: U1 snRNP binds to 5' ss of the intron followed by U2 snRNP interaction with the 3' ss forming the A complex .

Oproti tomu na str. 51: “Initially, intron boundaries are recognized when the U1 snRNP interacts with the 5' splice site and the U2 snRNP and associated factors interact with the branch point.”



2. str. 10, druhá věta: "In the cytoplasm a ring of seven Sm proteins is assembled on snRNAs by the sequential action of pC11 and SMN complex" – ref. to Paushkin, Gubitz et al. 2002.

Co je míněno symbolem pC11? Ve zmíněné citaci jsem takový faktor nenalezla.

3. Kapitola 2: Na této reprodukované publikaci se podílelo osm autorů, přičemž korespondující autor je bývalá vedoucí školitele a školitel (Dr. Staněk) je prvním autorem. Předkladatelka je na čtvrtém místě. Může během obhajoby sdělit, jaký byl její podíl na této publikaci?

4. Může autorka navrhnout experiment, v němž by ověřila, že Sm proteiny se "starou" červenou (tagované E5-RFP) fluorescencí jsou skutečně funkční a reasemblují do snRNP?

5. V práci je testován vliv inhibice recyklování snRNP z mRNA na dynamiku spliceosomů. Může autorka navrhnout dodatečný experiment, v němž by otestovala vliv inhibice recyklování faktorů z vystřižených intronů, případně, je něco známo o takové inhibici?

6. Jak si vysvětlujete, že knock down hPrp22 a Ntr1 (blokující uvolnění snRNP ze sestřižené mRNA) měl pouze malý vliv na sestřih dvou testovaných mRNA? Toto by mohlo indikovat, že recyklace sestřihových faktorů nehraje klíčovou úlohu pro efektivitu splicingu.

7. Kapitola 3

Na základě zjištěných difúzních parametrů pro jednotlivé snRNP, je možné spekulovat o jejich alternativní roli v jádře?

8. Kapitola 4

Kapitola se zabývá studiem mutace A216P v proteinu hPrp31. Po kopurifikaci a analýze pomocí western blotu (Obrázek 4.3 C, D) je v extraktech z linie AD29 patrná přítomnost dodatečného fragmentu pro hPrp4, který má sníženou mobilitu, a dalšího bandu u hPrp6 o zvýšené mobilitě. Je možné, že se jedná například o alternativně sestřižené formy těchto proteinů, které následně interferují s funkcí či sestavením spliceosomů?

9. Seznam literatury; dle mého názoru byl nešťastně zvolen formát referencí. Proč byl zvolen formát, kdy se zobrazí pouze první dva autoři? Seznam literatury zřejmě neprošel ruční editací, jelikož se v něm vyskytuje množství textových chyb; např. špatně vypsána jména některých časopisů jako Embo J místo EMBO J nebo Rna místo RNA. V některých případech jsou navíc tečky (Gen Dev. – str. 135, Mol. Cell. Biol. – str.134). Citace Paushkin et al. 2002 je uvedena dvakrát.

Většina výsledků z této disertační práce již prošla kritickým recenzním řízením a byly opublikovány ve třech odborných periodikách, zbývající rukopis v současné době recenzním řízením prochází. Teoretický úvod, diskuze a souhrn k celé práci jsou napsané na výborné úrovni a kvalitní angličtinou. Celkově hodnotím předloženou disertační práci jako nadstandardní, což prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci a k udělení titulu Ph.D.



Doc. Štěpánka Vaňáčová, Ph.D.

