



AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

Laboratoř reprodukce buňky

Vídeňská 1083

14220 Praha 4

RNDr. Ivana Malcová, CSc.

janatova@biomed.cas.cz

241062769

V Praze 13. 9. 2010

Oponentský posudek na diplomovou práci Lenky Senohrábkové Interakce proteinů Prp45 a Prp22 ve spliceosomu pučící kvasinky

Diplomová práce Lenky Senohrábkové se týká velmi zajímavého a v posledních letech velmi studovaného světa RNA a jejího osudu v eukaryotické buňce. V rámci své práce, která je součástí dlouholetého výzkumu školící laboratoře se zaměřila na studium dvou proteinů Prp45 a Prp22a jejich vzájemného působení v sestřihu pre-mRNA v kvasinkové buňce.

V první části své práce, v literárním úvodu, autorka přináší velmi srozumitelným a přehledným způsobem s množstvím obrázků dosavadní poznatky o studované problematice včetně její návaznosti na předchozí studie školitelské laboratoře. Takto zpracovaný literární úvod umožňuje čtenáři snadnější pochopení studované problematiky. Jen poznámka k obr. 13, kde je uvedený přehled delečních mutantů Prp45. U jedné je uvedený rozsah delece 1-168, i když dále v textu je mutantka vždy označována 1-169.

V navazující kapitole na více než 20 stranách autorka popisuje použitý materiál a metody způsobem, který umožní komukoliv tyto metody snadno použít a experimenty zopakovat, což bude jistě přínosem pro následující studenty. Z této kapitoly je vidět, že autorka musela zvládnout nejen základní molekulárně-biologické techniky práce s DNA a proteiny, ale i často nesnadnou metodiku práce s RNA a radioaktivními izotopy.

Ve své experimentální práci se autorka v první části věnovala charakterizaci mutantních forem proteinu Prp22 a jejich vzájemnému ovlivnění s proteinem Prp45 v sestřihu pre-mRNA, kdy použila techniky Western blotu a tzv. primer extension. Podařilo se získat nové informace o rozsahu 5' regulační oblasti genu PRP22, která významně ovlivňuje expresi tohoto genu. Dále zjistila, že v případě kombinace mutantů studovaných proteinů Prp22 a Prp45 v jedné buňce dochází k ovlivnění sestřihu suboptimálních substrátů v závislosti na sekvenci druhého exonu.

V druhé části pak autorka studovala genetické interakce několika N-koncových delecí proteinu Prp22 s C-koncovou deleční variantou proteinu Prp45. Pro tento druh analýz musela zkonstruovat řadu plazmidů a kvasinkových kmenů nesoucích příslušné kombinace studovaných genů. V této části práce zjistila, že odstranění prvních až 261 aminokyselin z proteinu Prp22 nemá ani v přítomnosti mutované formy proteinu Prp45 velký vliv na růst buněk. Odstranění téměř třetiny proteinu Prp22 (350 aminokyselin) z jeho N-konce ale již buňky nejsou schopny tolerovat jak v přítomnosti intaktního tak i mutovaného proteinu Prp45 při hladině normální hladině exprese delece. V případě nadprodukce deleční varianty pak v přítomnosti intaktního proteinu Prp45 jsou buňky schopné růst, ale v přítomnosti mutované formy Prp45 je tato kombinace mutovaných proteinů synteticky letální.

Výsledky získané experimentální prací jsou prezentovány celkem přehledně a jsou dokumentovány řadou obrázků. Přesto mám k této části pár poznámek a dotazů:

- Domnívám se, že v obr. 19 na straně 53 došlo k chybám v označení kmene v části A, měl by být zřejmě označen prp22-158T. dále mě překvapuje **rozdílná exprese Prp22 v kmeni AVY11 v obou částech obrázku, prosím o vysvětlení**. Dále bych navrhovala zkontrolovat popis drah, nízká exprese, vysoká exprese, prázdný plazmid, pokud je popis správný, potom v textu popsany výsledek nevychází z tohoto obrázku.

- V popisu obr. 22 je uveden kmen, AVY11, který se mi nepodařilo na obrázku identifikovat. Popis kmenů EGY48 a EH2 by bylo dobré dát i do seznamu kmenů v části Materiál a metody.

- V druhé experimentální části by pro srozumitelnost textu bylo vhodnější nejdříve popsat konstrukci plazmidu s celým genem PRP22 a pak teprve jeho deleční deriváty. Stejně tak i v části konstrukce kmenů by pro srozumitelnost bylo lepší nejdříve popsat tvorbu hostitelských kmenů pro transformaci a pak teprve získané klony. Moje otázka zní **proč vytvořené hostitelské kmeny LYS05-08 nejsou teplotně senzitivní, když nesou mutaci proteinu prp45(1-169), která termosenzitivní je jak je uvedeno v literárním úvodu i v první experimentální části?**

Kapitola Diskuse je vedena velmi zdařile a čtivě a autorka srozumitelným způsobem zasazuje získaná experimentální data do kontextu nastudované literatury i do vztahu s předchozími výsledky laboratoře.

- **Moje otázka se týká diskutované interakce proteinů Prp22 a Prp45. Byly použity i jiné metody kromě techniky dvojitého hybrida pro identifikaci interakce těchto proteinů, a jaké části proteinů se na interakci podílejí? Mají deleční varianty proteinů Prp22 a Prp45 zvláště ty s ovlivněnou vzájemnou interakcí změněnou lokalizaci v buňce?**

V závěru práce autorka přehledně shrnuje výsledky. Někdy je však jejich stručnost na škodu, protože pak vyjádření úplně nevystihuje získané výsledky. Např. v posledním bodu souhrnu autorka píše, že deleční mutanty prp22 Δ 301 a Δ 350 jsou synteticky letální s mutantou prp45(1-169). Toto je však pravda pouze pro případ nadprodukce těchto delečních variant Prp22. V případě produkce z jedné kopie jsou tyto mutace letální samy o sobě.

Celkově hodnotím diplomovou práci Lenky Senohrábkové jako pečlivě připravenou, včetně úpravy i jazykové stránky. Mám jen několik poznámek spíše z hlediska čtenářského. Doporučovala bych doplnit zkratky do seznamu např. DEAH, NTPáza, NTC. Pak bych navrhovala sjednotit způsob psaní, který používá progresivní výrazy jako glukóza, diskuze, pak bych také psala plazmid a ne plasmid. Vyhnula bych se také používání anglicismů jako Watson-Crickovský pár, introdukovan nebo downstream, upstream oblast (možno nahradit 5' nekódující oblast).

Po formální i obsahové stránce však tato diplomová práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou výborně.

RNDr. Ivana Malcová, CSc.