

Magisterská práce Violy Hausnerové je zaměřena na studium formování počátečního sestřihového komplexu nebo-li E komplexu. Hlavním a jednoznačným výstupem diplomové práce je první *in vivo* důkaz, že vazba U2 snRNP a U2AF35 na 3'konec sestřihové místo je závislá na přítomnosti 5'konce sestřihového místa a že vazba U1C je částečně snížena po mutaci 3'konce sestřihového místa.

Diplomová práce je napsána dobrou angličtinou, má 83 stran a cituje přes 113 prací. Úvod do problematiky sestřihu autorka zpracovala svědomitě a cíleně se zaměřila na popis spolupráce sestřihových faktorů během rozpoznávání intronu a formování počátečního sestřihového komplexu. Přesto bych autorce doporučila, aby příště při citacích rozlišovala mezi původními články a review.

Z diplomové práce je patrné, že autorka prošla mnoha experimentálními neúspěchy, které jí však vedly k zvládnutí a aplikaci obtížnějších metod (jako je FRET nebo RNA-immunoprecipitace). Autorka se tak během krátké doby naučila mnoha metodám, které jsou přehledně zpracovány v kapitole 4 „Materials and Methods“.

Výsledky jsou rozpracované do čtyř logicky na sebe navazujících podkapitol a 21 obrázků. Celkově je experimentální část zpracována svědomitě a precizně, nicméně musím poznamenat, že účel některých experimentů není dobře vysvětlen a že legendy k obrázkům jsou pouze popisné a nevypovídají o prezentovaném experimentu. Legenda by měla být napsána tak, aby byl experiment pochopen i bez bližšího prostudování textu výsledků. Dále bych autorce doporučila se příště více zaměřit na lepší obrazové zpracování imunofluorescenčních dat a jejich jasnější popis. Nicméně popis legend nesnižuje hodnotu dobře provedených experimentů.

V diskuzi autorka prokázala, že umí získané výsledky kriticky hodnotit, porovnat s dosavadními známými daty a zároveň navrhnout další návazné experimenty.

Dle mého názoru je tato práce vynikající vizitkou autorky a doporučuji ji k přijetí. Viola Hausnerová prokázala, že je houževnatá, cílevědomá, vytrvalá a nenechá se odradit počátečními neúspěchy. K ocenění je i její schopnost se rychle učit novým a náročným metodám jako je FRET a RNA-immunoprecipitace. Bez povšimnutí také nesmí zůstat, že prezentovaná data Violy Hausnerové otevírají cestu novým a zajímavým projektům, jak i sama autorka poznamenala v diskuzi.

Otázky do diskuse

1. Obr. 5.4 – Autorka konstatuje, že na výřezu gelu nedetekovala nesestříženou variantu jednoho mutovaného reporteru (E3_del-in1-M2) pomocí mRNA primerů, ale pouze pomocí pre-mRNA primerů. Jelikož intron 2 má 1034bp, nevěšila si např. autorka delšího PCR produktu putujícího výše na gelu v originálních datech?
2. Strana 49 – Autorka poukazuje na nesrovnalosti v detekci množství amplifikované mRNA z qPCR (5.6) a RT-PCR (5.4). Přesvědčila se autorka, že během qPCR získává pouze jeden produkt? (např. detekce PCR produktu na gelu nebo controla melting curve)
3. Obr. 5.6 – Chybí chybové úsečky. Byl experiment opakován?
4. Obr. 5.7 – Co přesně autorka zobrazila v panelech „C“? Které panely odpovídají wt, M1 a M2 vektorům? Z popisku to není jasné.
5. Obr. 5.21 – Autorka zde prokázala, že U2B se váže na wt reporterovou pre-mRNA a že tato vazba byla zrušena po dvojitě mutaci 5'konce sestřihového místa. Provedla autorka také experiment s reporterovým vektorem, který má pouze jednu mutaci na 5'konci sestřihovém místě (E3_del-in1 M1 vector)? Pokud tento experiment provedla, byla vazba U2B snížena?
6. Diskuze – Autorka v této části diskutuje další sestřihové *cis* elementy jako je „branch point site“ nebo „polypyrimidine tract“, které mohou ovlivňovat koordinaci sestřihových faktorů během rozpoznávání intronu. Byly tyto *cis* elementy přítomny i v intronech, které autorka používala při svých experimentech?