

David Staněk, Ph.D.

Vedoucí

Oddělení biologie RNA

### **Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Ondřeje Gahury**

Ondřej Gahura se ve své dizertační práci „Regulace sestřihu pre-mRNA v *S. cerevisiae*: kooperace RNA a proteinů“ zabývá dvěma základními tématy: 1. Funkcí Prp45 v pre-mRNA sestřihu a 2. Rolí sekundární struktury při rozpoznání 3' sestřihového místa. Práce je psána velmi dobrou angličtinou a v úvodu autor čtenáře přehledně seznamuje s mechanismem pre-mRNA sestřihu a dále se zaměřuje na kvasinkový protein Prp45 a jeho homology a na roli sekundárních struktur RNA v pre-mRNA sestřihu. Jako modelový organismus Ondřej Gahura používá výhradně *S. cerevisiae* a to i v případě, kdy testuje funkci některých homologů Prp45 (např. lidského či rostlinného), kterými se snaží komplementovat depleci kvasinkového Prp45. V práci jsou plně využity výhody modelového systému, kdy genetické „screeny“ jsou doplňovány molekulárně biologickou a biochemickou analýzou sestřihované RNA a sestřihových komplexů. Jen mě jako buněčnému biologovi chybí analýza distribuce sestřihových faktorů a zvláště Prp22 u kmenu *prp45(1-169)*. Je možné, že u tohoto kmene dochází k relokalizaci Prp22 do cytoplasmy?

Výsledkově je práce založena převážně na dvou publikacích Gahura et al. (2009) *J Cell Biochem.* 106(1):139-51 a Gahura et al. (2011) *Nucleic Acids Res.* 39(22):9759-67. Obě práce mají velmi dobrou vědeckou úroveň a dizertační práce založená jen na jedné z těchto prací by byla bez problémů obhajitelná. V první části se Ondřej Gahura věnuje analýze kvasinkového kmenu, který exprimuje zkrácenou verzi Prp45 - *prp45(1-169)*. Tento kmen vykazuje sníženou viabilitu při zvýšené teplotě. Autor s tímto kmenem provedl rozsáhlou genetickou analýzu, při které našel několik mutací, které jsou synteticky letální s *prp45(1-169)*. Jedním z mutovaných genů byl i gen kódující helicázu Prp22, která patří ke klíčovým enzymům v pre-mRNA sestřihu a Ondřej Gahura ukázal, že jednou z funkcí Prp45 je integrace Prp22 do sestřihového komplexu. Jelikož Prp22 hraje roli při kontrole kvality, mutace Prp45 může primárně ovlivňovat introny, které jsou sestřihovým aparátem hůře rozpoznávány. Indicií pro tuto hypotézu je letální kombinace *prp45(1-169)* s mutací v intronu *COF1*. Genu *COF1* je věnována třetí kapitola kdy autor ukázal, jak sekundární struktura v intronu hraje rozhodující roli při správném rozpoznání sestřihových míst. Zkracuje „vzdálenost“ mezi větvicím místem a 3'sestřihovým místem a dále maskuje kryptická 3'sestřihová místa.

Výsledková část je doplněna solidní diskuzí, ve které jsou všechny nálezy diskutovány v širším kontextu. **Celou práci hodnotím jako excelentní a doporučuji k obhájení.** Mám jen pár upřesňujících dotazů:

1. Provedl autor též genetický screen, kde by hledal mutace které potlačí teplotní senzitivitu *prp45(1-169)*?
2. V obrázku 3.6. autor ukazuje, že u mutací -158T a -327A dochází ke snížení exprese Prp22, nicméně zde chybí kontrola nanášky. Udělal autor takovou kontrolu, aby snížení exprese bylo průkazné?
3. U obrázků 3.7. a 3.9.-3.15. chybí u grafů, které kvantifikují poměry jednotlivých produktů pre-mRNA sestřihu, standartní odchylka. Bylo provedeno více biologicky identických pokusů, aby bylo možno vyhodnotit průměr a standartní odchylku u poměru jednotlivých sestřihových forem a tím efektivitu jednotlivých kroků při pre-mRNA sestřihu?

V Praze dne 4.1.2012

David Staněk