

**Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Ondřeje Gahury s názvem
"Regulation of pre-mRNA splicing in *S. cerevisiae*: where RNA co-operates with proteins."**

Doktorská disertační práce je napsána anglicky, má rozsah 132 stran a klasické členění na Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Závěrečný souhrn výsledků a Seznam použité literatury. Práce je založena na třech odborných textech publikovaných, respektive zaslaných do recenzního řízení, v kvalitních časopisech s IF. U dvou již publikovaných prací je Ondřej Gahura uveden jako první autor. Jako oponent mám tak velmi zjednodušenou pozici, protože lze předpokládat, že velká část uvedených a diskutovaných výsledků prošla náročným oponentním řízením v redakčních radách časopisů. Též nemohu v této chvíli zamlčet, že přednáška Ondřeje Gahury "Intron secondary structure mediated 3' splice site recognition in yeast", se kterou seznámil účastníky RNA klubu 2011, byla oceněna jako jedna z nejlepších a získala prestižní cenu udělovanou the RNA Society.

Zhodnocení formální úrovně práce.

Práce je napsána velmi čtivě, přehledně a úpravně. Je zřejmé, že formální úpravě práce byla věnována značná pozornost. Vědom si svých vlastních nedostatků, rozhodně se neodvažují hodnotit detailněji úroveň anglického jazyka. Přesto bych chtěl autora upozornit na občasné chyby ve větěné skladbě a především, dle mého soudu, na nekonzistentní a často poněkud chaotické používání členů, zejména členu určitého. Pro případné další použití v publikacích nebo prezentacích doporučuji též revizi obrázku 1.4 na straně 19. Způsob, jakým je obrázek nakreslen, navozuje dojem rotace Exonu1 vzhledem k jeho 5' a 3' koncům.

Dotazy a komentáře k odborné stránce práce.

1. V literárním přehledu autor uvádí, že součástí spliceosomu je i protein Hsp27. Z profesního hlediska by mne velmi zajímalo, pokud by autor mohl krátce shrnout roli Hsp27 v sestřihu pre-mRNA.
2. Na straně 50 autor uvádí, že teplotní sensitivita kmene nesoucího exklusivně *prp45(1-169)* alelu je závislá na genetickém pozadí s tím, že data nejsou uvedena. Přimlouval bych se za předvedení těchto dat, případně, není-li to možné, za bližší komentář k jednotlivým genotypům a odpovídajícím výsledkům. Zde bych požádal též o názor autora na rozdílné výsledky získané při pokusu o komplementaci delece *PRP45* lidským SNW/SKIP v porovnání s autory Figueroa a Hayman, 2004 (strana 100). Lze nějak diskutovat rozsah delece použité v obou pracech, genetické pozadí použitých kmenů atd.?
3. Práce Gahura et al., 2009 ukazuje statistickou analýzu buněk synchronizované kultury kmene *prp45(1-169)* po inkubaci v nepermisivní teplotě. Lze definovat nějaký terminální fenotyp i u nesynchronizované kultury inkubované v nepermisivní teplotě?
4. Na obrázku 3.7 na straně 58 je v panelu A výrazně méně reportérové pre-mRNA u mutantního kmene *prp45(1-169)* než u kmene kontrolního. Domnívám se, že toto snížení nekoresponduje s množstvím produktu, respektive meziprojektu sestřihu, a s množstvím kontrolní U1 snRNA. Prosím o vysvětlení.
5. Různá míra suprese teplotní sensitivity kmene *prp45(1-169)* pomocí heterologní exprese ortologů *PRP45* je hezký výsledek, který by při systematickém testování ortologů z většího počtu

organismů a následném srovnání jejich sekvencí mohl pomoci poměrně rychle určit domény a konkrétní aminokyselinové zbytky Prp45 nezbytné pro tuto supresi. Uvažujete o podobné práci?

6. V obrázku 3.29 na straně 86 autor uvádí, že délka druhého exonu nijak neovlivňuje sestřih intronu *COF1*. Dle obrázku se mi však zdá, že druhý exon o délce ≥ 1000 nt přece jen při porovnání s množstvím prekurzoru a U14 kontrolou snižuje množství správně sestřiženého produktu. Může autor tento můj dojem nějak komentovat, jsou případně k dispozici příslušná denzitometrická měření?
7. Proč byla pro analýzu prezentovanou v kapitole 3.3.6. použita vzdálenost 50 nt mezi BP a 3'ss jako základ pro třídění intronů uvedené v Fig. 3.31.
8. Zkoušeli jste nalézt v databázích kultivační podmínky, které by vedly k rozdílné expresi genů s dBP introny tak, jak je popsáno pro teplotní šok a gen *APE2* (str. 104)? Pokud ano, našli jste nějaké kandidátní geny, respektive kultivační či stresové podmínky?

Předložená disertační práce mne zaujala a rád jsem si ji přečetl. Je tedy závěrem mojí velmi milou povinností říci, že podle mého soudu disertační práce a publikace, o které se opírá, splňují jako celek veškeré odborné i formální požadavky kladené na doktorskou disertační práci. Doporučuji aby práce byla přijata k obhajobě a stala se podkladem pro udělení titulu Ph.D.

12. února 2012, Dolní Lipová

RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.