

<b>Posudek oponenta na diplomovou práci</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Tomáš Mašek
	Datum: 3.6.2014
Autor: <b>Adriana Roithová</b>	
Název práce: <b>Transport U2 snRNA do Cajalových tělísek</b>	
<b>Cíle práce:</b> Adriana Roithová vypracovala svojí diplomovou práci v laboratoři Biologie RNA v ÚMG AVČR pod vedením Doc. Davida Staňka. Za téma své diplomové práce si vybrala lidskou U2 snRNA a její cílení do jaderných Cajalových tělísek, které jsou konečným místem její maturace. Cílenou mutagenézí a následnou mikroinjektáží modifikovaných U2 snRNA do HeLa buněk se rozhodla testovat, které sekvenční a proteinové determinanty jsou rozhodující pro cílení U2 snRNA do Cajalových tělísek.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO, ale ne bez výhrad</b> Rozsah práce (počet stran): <b>69</b> Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? <b>ANO</b> Je uveden seznam zkratk? <b>ANO</b>	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? <b>ANO</b> Je napsán srozumitelně? <b>ANO</b> Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? <b>ANO</b> Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? <b>ANO</b>	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? <b>NE</b> Kolik metod bylo použito? <b>Dostatečné množství. Práce s tkáňovými a bakteriálními kulturami, propagace plasmidů, PCR a in vitro transkripce, cílená mutagenese, fluorescenční mikroskopie a mikroinjektáž RNA do lidských buněk.</b> Jsou metody srozumitelně popsány? <b>ANO, ale ne bez výhrad</b>	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? <b>ANO</b> Je dokumentace výsledků dostačující? <b>Ne plně</b> Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? <b>ANO</b>	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? <b>NE</b> Jsou výsledky porovnávány s literaturou? <b>Minimálně</b> Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? <b>NE</b>	
<b>Závěry (Souhrn) :</b> Jsou výstižné? <b>Závěry nejsou samostatnou kapitolou.</b>	
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Bohužel musím konstatovat, že formální úroveň práce je nedostačující. Literární přehled je napsán přehledně, avšak působí poněkud těžkopádně v mnoha jeho pasážích. Práce především obsahuje velké množství překlepů, gramatických chyb, či jiných nedostatků. Už samotný jednostránkový úvod na straně 10 obsahuje 3 gramatické chyby! Gramatické chyby se zejména objevují v gramatických jevech jako je skloňování a psaní čárek. V kapitole „Metody“ autorka podlehla hovorovému žargonu molekulárních biologů. S dalších častých nedostatků uvádím např. psaní měrných jednotek ihned za hodnotou (a jinde s mezerou) a psaní latinských jmen bez kurzívy (a jinde kurzívou). Zde uvádím pouze některé příklady: 1. SMN protein se skládá z 294 aminokyselin a je produkován ve všech metazoi...(str. 25)	

2. ...a pICln disociuje pryč...(str. 24)
3. Jedním z nejdůležitějších procesů odehrávající se v buňce je sestřih pre-mRNA ..(str. 10).
4. Nejprve jsme očistila skla (75 mm spací Biorad)jarem s vodou a etanolem, do kterých jsem potom nalévala gel... Opět jsem buňky omyla pomocí PBS a vložila na primární protilátku (str. 43).

### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Cíle, které si Adriana Roithová vytýčila ve své diplomové práci, také bezezbytku splnila. Delece vazebných míst pro faktory SF3a, U2A' a U2B'' nacházejících se ve vlásenkách I a IV U2 snRNA prokázala, že tyto proteiny neovlivňují schopnost U2 lokalizovat v Cajalových tělískách, ale mají vliv na míru její akumulace. Naproti tomu se ukázalo, že vazebné místo pro Sm proteiny je z tohoto hlediska zcela zásadní. Tento poznatek autorka dále potvrdila deplecí proteinů SmB/B' pomocí siRNA a dále odstraněním vazebného místa pro komplex SMN, jehož funkce spočívá v sestavování kruhu Sm proteinů na molekule snRNA. Vysoce hodnotím zejména mikroinjekci RNA do cytoplazmy a jádra HeLa buněk, jakožto vysoce náročnou metodu, která se svými nároky na šikovnost, trpělivost a zkušenost vymyká běžným metodikám.

### **K práci mám následující komentáře:**

1. Seznam zkratk je neúplný (chybí např. APS, TEMED, DDX6, HIV, GAR, sDMA), navíc zkratky nejsou řazeny abecedně, jak bývá zvykem.
2. V literárním úvodu bych ocenil krátký popis samotného sestřihu pre-RNA, protože autorka se na několika místech k tomuto procesu odkazuje. Dále, U2 snRNA je dlouhá 186 bází, ne párů bází (str. 15); str. 32, u faktorů CStF a CPSF jsou chybně uvedena jejich jména, chybně jsou i jejich zkratky, navíc nejsou uvedeny v seznamu zkratk; obr. 2.9, nerozumím názvu – „Schéma coilinu a jeho jaderná organizace“.
3. Zásadní připomínky mám ke kapitole „Materiál a metody“, kterou autorka sama nazvala „Materiály a metody“. V práci je uveden seznam přístrojů, avšak v mnoha případech se mi zdá informace o použitých přístrojích neužitečná, protože stejně není uveden konkrétní typ přístroje, např. u elektroforéz autorka uvádí vstupní napětí použité při elektroforéze, avšak bez uvedení konkrétního typu elektroforézy je tato informace nepodstatná (doporučuji tyto údaje uvést ve tvaru  $V/cm^{-1}$ ). Vzhledem k tomu, že těžiště práce je v mikroskopických výsledcích, zdá se mi paradoxní, že autorka neuvedla typ mikroskopu ani další jeho technická nastavení. V práci dále není zmíněn původ HeLa buněk, koncentrace antibiotik při jejich kultivaci, ani další manipulace s nimi jako je příprava konzerv nebo počet pasáží. U bakteriálních kultur není uvedeno složení LB média, ani odkaz do literatury. U protilátek chybí zásadní informace jako je jejich ředění a konkrétní zdroj. Navíc některé protilátky v seznamu chybí vůbec (proti DDX6, PML). U složení SOC média chybí konečný objem. V kapitole o PCR autorka měla na mysli směs deoxyribonukleozidtrifosfátů, ne deoxyribonukleotidů, stejné pochybení lze nalézt i v popisu *in vitro* transkripce. Dále ve složení PCR reakce je chybně použita cDNA jako typ templátu, autorka neuvádí amplifikační program. U *in vitro* transkripce chybí počet jednotek aktivity přidané DNázy I, není specifikován typ analogu čepičky, počet jednotek RNAsinu, počet jednotek pyrofosfatázy a počet jednotek T7 RNA polymerázy. Není specifikace PBS pufru. U popisu SDS PAGE není specifikováno, co je 40% akrylamidový mix, ve vzorkovém pufru není uvedena koncentrace glycerolu, množství BFM, DTT a  $\beta$ -merkaptoethanolu. U popisu metody Western blot autorka obarvila membránu ne Poncaeu, ale Ponceau S. U horizontální agarózové elektroforézy není uvedeno složení TBE pufru. Popis transfekce HeLa buněk je bezcenný, nejsou v něm uvedeny zásadní

parametry, jako je počet buněk a výsledný poměr mezi siRNA a transfekčním činidlem. Autorka neuvádí, jak barvila buňky pomocí DAPI, ačkoliv toto barvení je použito ve všech mikroskopických panelech.

4. Po odstranění vazebných míst na U2 snRNA nebyla provedena žádná kontrola, že se interakční partneři skutečně nevážou. Při *in vitro* transkripci byl použit analog monometylované čepičkové struktury. Není uvedeno, o jaký analog se jedná. Každopádně na několika místech této práce jsou výsledky interpretovány ve smyslu, že monometylovaná čepička nijak nemění parametry lokalizace. Mám za to, že přepisem *in vitro* vzniká směs "capovaných" a "necapovaných" transkriptů. Optimální poměr mezi GTP a analogem čepičky by měl být 1:9. Tento poměr však drasticky snižuje výtěžek syntézy. Při poměru 1:4 použitým v této práci však vzniká mix transkriptů. Pokud byl použit klasický analog a ne analog typu ARCA, je nutné mít těž na paměti, že část "čepiček" je do transkriptu vložena v opačné orientaci. V kapitole 5.5. autorka testovala vliv monometylované a trimetylované čepičky na import do jádra. Uvádí zde, že trimethylace je důležitá pro vstup U snRNA do jádra. V diskuzi však cituje práci z roku 2001, že U2 snRNA se importuje do jádra způsobem nezávislým na trimetylované čepičce. Myslím, že relevantní informace z literatury by měli být uvedeny rovnou a k tomu by měla být definována relevantní experimentální hypotéza. Dále musím konstatovat, že většina metodik zmíněných v kapitole "Materiál a metody" se nijak neprojevila ve výsledkové části. Autorka prezentuje pouze finální výsledky. Jako oponent nemohu například posoudit kvalitu a integritu injikovaných RNA, ani se nedozvím, kolik buněk bylo injikováno a kolik nezávislých *in vitro* transkripcí bylo použito.
5. Diskuze je spíše shrnutím výsledků.

#### **Otázky:**

1. Jaký je vztah mezi Sm proteiny a integritou Cajalových tělísek? Jak postihne deplece SmB/B' ostatní snRNA? Proč jste nepoužila SmB protilátku i pro nepřímou imunofluorescenci pro stanovení míry deplece SmB/B' a pro stanovení míry kolokalizace s U2 snRNA?
2. Na obr. 5.9 ukazujete přítomnost U2 snRNA v P-bodies. Nejedná se však jen o kolokalizaci s některými P-bodies (viz. obrázek)? Jak si vysvětlujete přítomnost U2 snRNA v těchto RNA granulích? Co bylo podmětem zkoumat přítomnost U2 snRNA v PML tělískách? Kolokalizuje s P-bodies i nemutovaná forma U2 snRNA?
3. Jaký je počet molekul U2 snRNA v buňce tkáňové linie HeLa? Jaký počet molekul jste přibližně injikovala? Zkoušela jste někdy injikovat ředící řadu U2 snRNA?
4. Ovlivňuje vpravení U2 snRNA do HeLa buněk počet, velikost, či jiné vlastnosti Cajalových tělísek?
5. Je vazba se Sm proteiny stejně důležitá i pro ostatní U snRNA a pro jejich biogenezi?

Závěrem mohu konstatovat, že diplomová práce Adriany Roithové obsahuje cenné výsledky získané navíc obtížnou metodikou. Práci proto doporučuji k obhajobě.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

