



Brno, 27. února, 2015

**Věc: Posudek disertační práce Mgr. Evy Stejskalové nazvané “Formation of splicing machinery in the context of the cell nucleus”**

Předložená disertační práce se věnuje úloze několika faktorů účastnících se sestřihu pre-mRNA v lidských buňkách. Autorka, pod vedením doc. Davida Staňka, využila moderních metod fluorescenční mikroskopie kombinovaných s metodami imunoprecipitace a RNAi, aby charakterizovala intermolekulární interakce a objasnila úlohu některých sestřihových faktorů. K disertaci se vztahují tři publikace v odborných impaktovaných časopisech, přičemž na dvou z nich je Mgr. Stejskalová prvoautorkou a na jedné spoluautorkou. Dále jsou součástí práce výsledky, které jsou zahrnuty v manuskriptu, který byl v době podání disertační práce v oponentském řízení v prestižním časopise Cell Reports. Dále pak je Mgr. Stejskalová prvoautorkou, respektive spoluautorkou dvou review a dalších tří původních publikací nevztahujících se k disertaci. Z tohoto pohledu je publikační činnost předkladatelky velmi nadstandardní a úctyhodná.

Odstranění spliceosomálních intronů je u metazoi esenciálním krokem potřebným pro vyjádření většiny genů formou proteinů. Alternativní sestřih pak hraje klíčovou úlohu pro rozšiřování rozmanitosti např. lidského proteomu. Malá, neplánovaná odchylka v sekvenci či sestřihu může mít fatální následky na buněčné i organismální úrovni. Přestože byl sestřih pre-mRNA rozpoznán již v sedmdesátých letech minulého století a většina klíčových komponent spliceosomů popsána v nadcházejících dvaceti letech, stále zůstává množství otázek, zvláště mechanistického rázu, nezodpovězených. Mgr. Stejskalová popsala původně nečekanou interakci mezi SM proteiny a U1 70K komponentem U1 snRNP a odhalila, že za tuto interakci je zodpovědná N-terminální část U1 70K. Dále, v zatím nepublikované práci se věnovala studiu proteinu RBM39, u něž prokázala, že je součástí spliceosomálního komplexu E s nímž asocijuje přes interakci s proteinem U1-70K a U2AF35. Tato interakce je zprostředkována prostřednictvím domény SR proteinu RBM38. Následně však její data indikovala, že tato interakce není esenciální pro obecné sestavování spliceosomálních komplexů. Tudíž mechanismus úlohy RBM39 v regulaci alternativního sestřihu zůstává nejasný. V poslední části se věnovala proteinu Brd2, který obsahuje bromodomény, které zprostředkovávají interakci spliceosomů s chromatinem a přivádí tak zřejmě sestřihový aparát do míst transkripce. Pomocí kombinace fluorescenčních a fyzikálních přístupů pak poukázala na dynamičnost interakcí.

Mám několik málo dotazů, které budou uvedeny postupně tak, jak se vyskytují v textu.

1. Pokusili jste se testovat přímou interakci mezi N-koncem U170K a SMN in vitro?
2. RBM39 – RS doména je důležitá pro interakci s U1-70K. Zkoušeli jste se dívat, zda mutant s delecí RS domény povede ke změně alternativního sestřihu VEGF mRNA?
3. Změna poměru alternativně sestřižených forem VEGF mRNA po knock downu RBM39 není příliš výrazná. Existují nějaká data, která by poukazovala na úlohu změny poměrů v těchto izoformách?

Většina výsledků týkajících se této disertační práce byla publikována v impaktovaných



časopisech a tudíž prošla kritickým recenzním řízením a zbývající rukopis v současné době recenzním řízením prochází. Teoretický úvod, diskuze a souhrn k celé práci jsou napsané na výborné úrovni a kvalitní angličtinou. Doprovodný ilustrační materiál je adekvátně volený danému textu a citace jsou správně volené. Celkově hodnotím předloženou disertační práci a vědeckou historii uchazečky jako vysoce nadstandardní, což prokazuje předpoklady Mgr. Stejskalové k samostatné vědecké práci a k udělení titulu Ph.D.

doc. Štěpánka Vaňáčová, Ph.D.