

Oponentský posudek

doktorské disertační práce Mgr. Evy Stejskalové

Disertační práce „Formation of splicing machinery in the context of the cell nucleus“ Mgr. Evy Stejskalové se zabývá vybranými problémy regulace sestřihu mRNA. Ke studiu molekulárních detailů složitého biologického procesu, jakým regulace sestřihu bezesporu je, přistupuje s využitím komplexní škály experimentálních metod, s důrazem na *in situ/in vivo* lokalizaci, studium dynamiky a interakcí zúčastněných proteinů a makromolekulárních komplexů pomocí fluorescenční mikroskopie. Práce obsahuje řadu původních vědeckých nálezů. Kvalita nemalé části z nich byla již ověřena nezávislými oponenty v recenzovaných časopisech.

Formálně jde o kvalitně zpracovanou práci s přehledným a účelným členěním. Začíná obsáhlým Úvodem, který ve stručnosti a úplnosti poskytuje nezbytný základ pro čtení výsledkové části. Dalších rozšiřujících informací se čtenáři dostane v Diskusi, a to až v nezvyklé míře. Osobně bych téměř celé úvodní dvě stránky Diskuse (str. 73-4, s výjimkou posledního odstavce), které nediskutují naměřená data, připojil spíše ještě k Úvodu. Totéž platí pro úvodní dva odstavce druhé části Diskuse (str. 75-6) a pro obsáhlý odstavec popisující přehled interakcí Brd2 (str. 79). Vzhledem k rozsahu využití metod fluorescenční mikroskopie v experimentální části práce jsem velmi ocenil zejména kapitolu 1.4 Úvodu, která přehledně shrnuje dosavadní stav poznání o prostorovém uspořádání biogeneze snRNP komplexů *in situ*.

Část věnovaná výsledkům je rozdělena na tři kapitoly tematicky zaměřené po řadě na tři hlavní cíle práce. Toto členění je striktně dodrženo i v Diskusi a Závěrech, což sice usnadňuje čtení textu, zároveň se však poněkud vytrácí jednotící prvek celé práce. To nikterak neznamena, že práce je tematicky roztříštěna. Naopak, např. kapitoly 1 a 2 jsou spojeny velice úzce, a to společným interakčním partnerem pro SMN komplex (kapitola 1 Výsledků) a RBM39 (kapitola 2), U1-70K. Jen tyto syntetické poznámky nejsou v textu práce patřičně zdůrazněny.

Práce je psána poměrně dobrou angličtinou s pouze drobnými chybami. Jako mnoho dalších českých autorů, autorka například volně zaměňuje adjektiva „fluorescent“, tedy schopný fluorescence, event. fluoreskující, a „fluorescence“, tedy fluorescenční, využívající jevu fluorescence apod. Tak se např. na str. 7, 8 a 39 píše o „fluorescent microscopy approaches“, na poslední jmenované stránce pak též o „fluorescence *in situ* hybridization“, ale i o „fluorescent *in situ* hybridization“. Rovněž některé odborné termíny jsou poněkud nešťastně volené: např. "FRET microscopy" (str. 61) - podle kontextu lze soudit, že byla použita fluorescenční mikroskopie k detekci FRET. Běžně se nepoužívají fluorescenční mikroskopy úzce specializované pouze na FRET měření, proto pojem „FRET microscopy“ považuji za zmatečný. Na některých místech textu je nepřesnost termínů ještě více matoucí: například, kapitola 2.2 Úvodu se jmenuje "Intron definition" (str. 22, 23). V textu kapitoly však tento termín chybí - čtenář se dozví pouze o "exon definition" (v textu i v obrázku 11), případně o "intron recognition" (v textu). Je ponecháno na něm, aby rozhodl, zda jde o synonyma. Rovněž v případě pojmů "diffusing fraction" a "unbound fraction" použitých při popisu modelu pro analýzu RICS dat není jasné, zda jde o dva nezávislé parametry (jak lze pochopit na základě textu na str. 68), přestože jejich pojmenování je významově fakticky totožné. Význam slovního spojení (str. 73): "majority of protein higher eukaryotes coding genes" je nejasný a přiznávám, že z věty (str. 78): "Moreover, a sigmoidal response resulting from subtle changes in splicing factors levels in such a cooperative network would enable nearly digital regulation of alternative splicing." jsem byl zcela zmaten. Podle mne pojem „digitální“ označuje veličinu nespojitou, tedy něco, co lze „spočítat na prstech“. Souhlasím sice, že strmé sigmoidální charakteristiky složitějších regulovaných soustav mohou mít quasi-digitální charakter, v textu je však tato poměrně komplikovaná poznámka uvedena naprosto bez souvislostí. I přes tyto připomínky však text hodnotím jako čitelný a kvalitně formálně zpracovaný.

Odborně se jedná o kvalitní práci, která splňuje kritéria pro udělení doktorské hodnosti. Mgr. Stejskalová je spoluautorkou celkem pěti prací v odborných časopisech se sumárním IF > 22. Autorka v

úvodní části Výsledků uvádí rozsah svého příspěvku k těmto publikacím. K věcnému obsahu práce mám následující komentáře:

- Negativní kontrola ve FRET experimentu (obr. 23, str. 52) se nezdá být vhodně zvolená. I v případě, že by U1C interagoval se SMN, byla by, vzhledem k nízké koncentraci U1C v gems (obr. 22), naměřená hodnota FRET mnohem menší než v případě U1-70K, který se v gems silně akumuluje (obr. 20). Vysoká naměřená hodnota FRET v případě U1-70K by naopak mohla být právě jen důsledkem vysoké koncentrace donoru v gems. Další prezentované výsledky (obr. 24) jasně ukazují, že tomu tak není a že závěry uvedené autorkou jsou korektní. Samotný obr. 23 k takovému závěru však nestačí z výše uvedeného důvodu.
- Hodnota difúzního koeficientu při RICS analýze (str. 68) byla dle textu zafixována podle stoprocentně pohyblivého BD-mut1+2. Je zavádějící tuto hodnotu opakovat v tabulce (Tab. 2), kde to vypadá jako opakovaně získaná shodná hodnota volného parametru.
- Uvádět v Tab. 3 (str. 70) disociační konstantu i vazebnou dobu je redundantní, vzhledem k tomu, že se jedná pouze o reciproční hodnoty téhož parametru. Namísto toho bych uvítal uvedení hodnot ostatních parametrů použitého modelu, tj. difúzní konstanty a mobilní frakce.
- Jak autorka správně uvádí v textu, je vazebná doba v případě BD-mut1+2 extrémně krátká, a to i při inhibici HDAC (str. 70). Nepřekvapuje proto, že pokusy analyzovat FRAP křivky neinhibovaného vzorku, kdy bude vazebný potenciál mutovaného Brd2 ještě nižší, se nepodařilo. Tak rychlé kinetiky budou zjevně nad rámec FRAP metody, není tedy třeba při hodnocení experimentu volit zklamaný tón. Za jak dlouho po vybělení bylo lze nasnímat první obrázek vybělené oblasti? Toto bude kritický parametr experimentu. V metodické sekci se pouze píše, že bylo pořízeno 65 obrázků za 5 min, a z obrázku 36 je patrné, že časová prodleva mezi jednotlivými obrazy se postupně zvyšovala. Neuvádí se okamžik sejmutí prvního obrázku. Nepředpokládám však, že by to bylo za dobu srovnatelnou s vazebnou dobou, kterou lze v tomto případě očekávat někde kolem jedné stovky ms.
- Není jasné, proč jsou v obrázku 36 (str. 72) uváděny obrazy jednotlivých analyzovaných buněk - obrázky nejsou komentovány nikde v textu a nelze z nich jednoznačně vyčíst jakoukoli souvislost mezi tvarem FRAP křivky a distribucí fluorescence v rámci jádra.

Na autorku práce nemám doplňující otázky. Nicméně, následující úvaha by mohla inspirovat diskusi po skončení obhajoby:

V kapitole 2 Úvodu se víceméně mlčky předpokládá, že skládání spliceosomu se děje povětšinou kotranskripčně, a tedy v místech probíhající PolII aktivity. V kapitole 3 se ale hovoří i o posttranskripčním splicingu. Kde v rámci jaderné architektury k němu dochází? Jakým způsobem se snRNP komplexy dostávají z míst vzniku na místa funkčního uplatnění? Pokud se to děje prostou difúzí, jakou roli může sehrát fakt, že různé části spliceosomu vznikají v různých jaderných kompartmentech, např. v regulaci alternativního sestřihu? Nabízí se srovnání s kinetickým modelem regulace alternativního sestřihu.

Závěrem lze říci, že autorka nepochybně prokázala předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji proto, aby jí na základě této práce byl udělen titul PhD.

V Praze, 25. 2. 2015

RNDr. Jan Malínský, PhD.

Ústav experimentální medicíny AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4