



Brno, 15.9. 2017

Posudek na doktorskou práci Anny Malinové

Předložená disertační práce obsahuje velmi zajímavá, relevantní a aktuální data, která posunují hranice pochopení principů sestřihu prekurzorů mRNA v lidských buňkách. Práce se převážně zabývá dopadem mutací v klíčovém sestřihovém faktoru PRP8F, které jsou spojovány s lidským onemocněním *Retinitis pigmentosa*. Práce má požadovanou formu, která zahrnuje literární přehled, souhrn metodiky a materiálu, výsledky, diskuzi a seznam použité literatury. Anna Malinovská je prvoautorkou, respektive spoluautorkou dvou prací publikovaných v renomovaných odborných periodikách, což samo o sobě poukazuje na to, že prokázala požadavky kladené na doktorskou práci. Annu znám z četných konferencí, kde jsem měla možnost posoudit její prezentační schopnosti a být svědkem jejího vědeckého dozrávání. Proto jsem byla trochu zklamaná některými (níže zmíněnými) nedostatky předložené práce.

Úvodní část práce (literární přehled dosavadních znalostí v oboru) obsahuje velké množství množství informací, což odráží již dlouho trvající aktivní výzkum v oboru sestřihu pre-mRNA. Autorka pokryla úctyhodné množství publikované literatury. Text je bohužel psán stylem, který čtenáři mimo "sestřihový obor" evokuje spíše "telefonní seznam", bez snahy o zajímavější propojení daných poznatků. Dle mého názoru by bylo bývalo přínosnější literární přehled úžeji zaměřit na konkrétní otázky, kterým byla věnována samotná výzkumná část této disertační práce. Uvítala bych, kdyby před samotnou částí "Results" bylo znovu uvedeno, jaké byly výchozí otázky a cíle práce a co se zadařilo a co naopak ne. Takto část výsledků začíná bez jakéhokoli logického úvodu. Dále části, které evidentně nebyly součástí publikovaného textu (jako je Úvod, Souhrn, či část Výsledků) by zasloužily jazykovou korekci (například chybějící členy, či zvolené hovorové obraty).

K samotným výsledkům mám několik dotazů a poznámek.

#### 1. Část 4

Autorka připravila lidské buněčné linie exprimující verze proteinu PRPF8-LAP obsahující několik mutací spojených s *Retinitis pigmentosa*. Tyto mutace na základě předložených výsledků snižují efektivitu sestřihu pre-mRNA u několika testovaných transkriptů. Jelikož ale některé mutanty vykazují nižší hladinu výsledného proteinu PRP8F, bylo by užitečné otestovat, nakolik je sestřih samotných mutantních verzí PRPF8-LAP ovlivněn po knock downu endogenní PRP8F. Bylo toto testováno? Má autorka nějaké vysvětlení, proč mají PRP8F mutace větší vliv u některých pre-mRNA - např ROM1 versus RHO - Figure 14 F-H?

#### 2. Část 5

Autorka si položila otázku, zda mutace v PRP8F ovlivní začlenění či assembly U5 snRNP partikulí. Pro tento účel provedla immunoprecipitaci tagovaných forem PRP8 přes fúzní FLAG peptid a pomocí western blotu vyhodnotila množství koprecipitovaných složek U5 snRNP. . Podle mého názoru není možné učinit závěr o vlivu mutací na formování U5 snRNP, jelikož některé mutované verze PRP8F vykazují mnohem menší hladinu proteinu, je velmi pravděpodobné, že jsou při skládání snRNP vykompetované endogenním PRP8F (Figure 15A,B). Tato úvaha byla následně autorkou potvrzena i následujícím experimentem na obrázku 16 na pouze jednom mutantu. V tomto experimentu snížila expresi endogenního PRP8F, což vedlo ke stabilizaci mutované verze S2118F, a následně koprecipitaci U5 snRNP. Proto by bylo vhodnější zvolit opatrnější interpretaci o vlivu mutací na assembly U5 snRNP.



3. Downregulace komponent U5 snRNP, jako je PRP8F, RUVBL1 či RUVBL2 vedla dle autorčina závěru k relokalizaci, či akumulaci U5 snRNA do Cajalových tělísek (CB), což by mělo naznačovat nedokonalé sestavování U5 snRNP partikulí (Obr. 18 a 25A). Jedná se skutečně o relokalizaci, nebo spíš destabilizaci U5 snRNA v kompartmentech, jiných než CB? Měřila autorka hladinu U5 snRNA v buňkách po transfekci s siRNA targetujícími dané faktory?

Méně podstatné poznámky:

4. Hned na začátku úvodu autorka uvádí, že průměrný lidský gen se skládá z 8 malých exonů a intronů, které jsou zhruba 10x delší. Odkazuje zde na práci z roku 2001, což bylo ještě před rozkvětem masivního sekvenování nové generace. Jsou tyto údaje stále ještě platné?

5. Na straně 16 uvádí, že: "alternative splicing gives rise to enormous variety of protein products". Přesnější by bylo uvést: "alternative splicing has the potential to give rise to enormous variety of mRNAs and thus proteins".

6. Na straně 16 uvádí:

...When ready, the 2'OH of the branch point adenosine *cleaves* and binds the pre-mRNA at the 5'ss (should be 5' ss based on the p15 abbreviation), generating...

termín "cleaves" je velmi zavádějící a nepřesný.

další nepřesná formulace: Finally, the 3'OH of the 5'exon *attacks* the 3'ss...

7. strana 17: definice snRNA. Autorka uvádí, že se jedná o " non-coding RNA rich in uridines" Přesnější by bylo uvést, že se jedná o non-coding RNAs with uridine-rich regions

8. V části "Materials and methods" jsou nejednotně a nepřesně uváděny složení použitých roztoků. U řady použitých roztoků jsou uvedené koncentrace jednotlivých složek a k tomu " fill in dH2O up to..". (str. 49, 52, 53, 56, 62 atd.), což znejišťuje závěr, zda se jedná o koncentrace zásobních roztoků či konečné koncentrace. U Tris pufru na str. 53 naopak není uvedeno žádné množství ani koncentrace složek. Na druhou stranu u některých jiných roztoků nejsou uvedené finální koncentrace, ale hmotnosti.

Závěrem chci uvést, že veškerá moje kritika by však neměla snížit dojem z celkového vědeckého přínosu této práce. Na základě předložené práce, Anna Malinovská prokázala, že dozrála do samostatné výzkumné pracovnice, která je schopná si klást zajímavé biologické otázky, experimentálně je zpracovat, vyhodnotit a hlavně začlenit do předešlých znalostí dané problematiky. Proto zcela doporučuji danou práci k obhajobě.

Stepanka Vanacova