



POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI Bc. Jiřího Františka Potužníka

Ap₄A-RNA in IgE activated mast cells

Předložená dizertační práce je zaměřena na velice aktuální téma úprav RNA, které je v současné době jednou z nejbouřlivěji se rozvíjejících oblastí molekulární biologie s mimořádně důležitými imunologickými přesahy. Kolíčí laboratoř se dlouhodobě zaměřuje na pochopení molekulárních mechanismů úprav 5' konců RNA, včetně hledání funkce nově objevených modifikací, kombinujících svět eukaryot i prokaryot.

Za účelem realizace diplomového projektu si Jiří František Potužník musel osvojit celou řadu pokročilých metodik (včetně pokročilých hmotnostně-spektrometrických přístupů), které ve své práci velice dobře popsal. Z výsledkové části je zřejmé, že autor je s jejich pomocí schopný získat vysoce kvalitní experimentální data. Obhajovaná práce je unikátní v tom, že se autorovi podařilo objevit nové fenomény – nové typy „čepičkových“ struktur, které odkazují na možné nové „příběhy“ buněčné biologie, zde konkrétně fungování jednoho z důležitých typů imunitního systému – žírných buněk. Výsledková část je poměrně krátká, ale předložená data opravdu stojí za to. Jak je tomu v obdobných případech zřejmé, v práci je jistě jen „vrchol“ ledovce veškeré odvedené experimentální práce, které předcházelo množství optimalizačních přípravných experimentů, včetně nalézání slepých uliček. Kladem práce je schopnost data interpretovat a postavit experimenty s vhodnými kontrolami tak, aby získaná data byla robustní a měla obecnější platnost. Téma práce i použité metodiky se pohybují na samých hranicích poznání, navíc ve vysoce kompetitivní oblasti molekulární biologie a genetiky.

V předložené práci se dále kombinuje obsahová kvalita s kvalitou formální. Jiří František Potužník se formátu své práce zhostil velice dobře, sepsal ji čtivě s minimem formálních nepřesností (v celé práci jsem našel pouze dva překlepy!). Samostatným formálním tématem je mimořádně vysoká kvalita použitého anglického jazyka, který autor bezpochyby zvládá lépe, než pisatel tohoto posudku. Citovaná literatura je reprezentativní, počtem jednoznačně dostačující, v podstatě vyčerpávající sevržené a dobře definované téma. Kladem práce je velice kvalitní diskuse, která se nejen zamýšlí nad získanými daty, ale též je vhodně uvádí do kontextu publikovaných prací.

K práci bych měl několik dotazů a dalších specifických komentářů:

1. Na straně 10 píše, že vysokoafinní receptory pro IgE se uplatňují při chemotaxi. Jaký je mechanismus?
2. Na straně uvádíte do problematiky $Np_{(n)}N$. Nemohly by mj. sloužit jako úložiště osmoticky neaktivních fosfátů. Jak je to s „makroergností“ jednotlivých vazeb v těchto sloučeninách?
3. Na straně 14 píšete o „moonlighting functions of aminoacyl tRNA synthetases“, o jaké funkci se jedná?
4. Na straně píšete: „given the size of mononucleotides, their interaction with the enzyme does not cause a large conformational change“. Musí tomu tak být ve všech případech?
5. Na straně 16 popisujete sofistikovanou LysRS-Ap₄A-MITF signální dráhu. Zajímalo by mne, o jak evolučně konzervovanou molekulární strategii se jedná? Je možné v evoluci vysledovat její vznik. Jak to vypadá s fenotypem absence některé z komponent?



6. Na straně 18 zmiňujete, že koncentrace Ap₄A v jádrech aktivovaných žírných buněk dosahuje 700 mikromolů. Zajímalo by mne, jak byla tato koncentrace určena.
7. Zajímavé je využití NAD jako jedné z alternativních RNA čepiček. Mohla by taková struktura reagovat na různé redoxní stavy buňky (otázka je motivována schopností této molekuly přenášet redukční ekvivalenty v metabolických drahách)?
8. Obr. 5 ve výsledkové části ukazuje mírně odlišné mobility u prostředního bandu ve srovnání mezi IRNA ctrl a IRNA IgE. Jaká je pro to interpretace?
9. Na straně 43 zmiňujete výběr mRNA pro chymázu-1 jako vhodný cíl pro hledání nekanonických čepiček. Zajímalo by mne, jak přesně jste ji zvolili, měli jste ve výběru více kandidátů?
10. Pro experimenty jste využili potkaní buněčnou linii RBL. Neuvažovali jste o využití primárních žírných buněk, popř. diferencovaných s hematopoietických prekurzorů?
11. Neuvažovali jste o identifikaci Ap₄A vazebných proteinů na koloně s imobilizovaným Ap₄A? Jednalo by se pak o vhodné nástroje pro izolaci Ap₄A-čepičkovaných mRNA. Popř., neuvažovali jste o přípravě Ap₄A-specifických protilátek?

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce je mimořádně kvalitní a zajímavým příspěvkem k důležitému obecně biologickému tématu. Práce je sepsána čtivě, formálně na solidní úrovni, a co je důležité zmínit, pomocí kombinace metodik vhodně zvolených pro testování příslušné hypotézy. Tuto práci doporučuji k obhajobě s výborným hodnocením.

Prof. RNDr. Jan Černý Ph.D.