

Posudek školitele na diplomovou práci Evy Ničové: “Funkce proteinu Slu7 v sestřihu pre-mRNA *Saccharomyces cerevisiae*”.

Diplomová práce Evy Ničové je součástí dlouhodobého projektu laboratoře, který si klade za cíl objasnit roli proteinu Prp45 v sestřihu kvasinky *S. cerevisiae*. Práce tak těží z metodického zázemí a výsledků získaných v předchozích diplomových a doktorských pracích. Eva rozpracovala jeden z nálezů učiněných před několika lety v laboratoři při charakterizaci deleční mutanty tohoto proteinu. Zjistili jsme tehdy, že delece v ORF genu PRP45, zachovávající jednu třetinu z celkové délky proteinu, je synteticky letální s dvěma bodovými mutacemi, oběma mapujícími do konzervovaného motivu proteinu Slu7, esenciálního sestřihového faktoru, který má vliv na výběr akceptorového místa.

Cílem práce Evy Ničové bylo připravit pomocí techniky primery řízené mutagenese několik aminokyselinových záměn v konzervovaném a testovat jejich efekt na fenotyp v různém genetickém pozadí a na sestřih.

Zadané cíle práce Eva splnila. Připravila bodové mutace v genu SLU7, testovala jejich vliv na fenotyp v jinak divokém genetickém pozadí a na pozadí výše jmenované mutace PRP45. Testovala rovněž důsledky kombinace mutací Slu7 s různými mutantami genu PRP22, kodující helikázu klíčovou pro druhý krok sestřihu a výběr 3' sestřihového místa. Dále technikou „primer extension“ testovala vliv mutací slu7 na úpravy několika různých sestřihových substrátů s cílem identifikovat změny v jejich procesování. Při sledování cílů provedla řadu dalších podpurných experimentů, například amplifikovala a klonovala mutantní promotory genu PRP22, připravila kmeny, ve kterých pak testovala interakce zmíněných mutací, konstruovala plasmid nesoucí tři různé kvasinkové geny, překlonovala kazety určené k testování sestřihu mezi plasmidy, aj. To všechno představuje značný objem „neviditelné“ práce.

Během čtyř let pobytu v laboratoři Eva osvojila sterilní práci bakteriemi a kvasinkami, postupy klasické kvasinkové genetiky, základní i pokročilé techniky genových manipulací, jako je klonování, konstrukce plasmidových vektorů, restriční mapování, „primer-directed mutagenesis“, PCR amplifikaci, a další. Zvládla rovněž pokročilou analytickou techniku „primer extension“, představující práci s RNA a použití radioaktivního značení nukleových kyselin. Zkušenost získala i s analýzou sekvencí za použití programu Gene Runner, Vector, Clone Manager a dalších dostupných on-line.

Předloženou práci Eva sepsala samostatně. Práce je velmi pěkně graficky vyvedena, text je přehledný a čtivý.

Eva při experimentální práci i při přípravě textu prokázala, že je studentkou inteligentní, pečlivou, vytrvalou a přemýšlivou. Byť se jí ne vždy dařilo tak, jak bychom si oba přáli, svoji vůlí a nasazením byla schopna nezdary překonávat. Experimentální práci si dobře plánovala a vzorně dokumentovala. Na výsledky dokázala nahlížet kriticky a přemýšlet o jejich implikacích.

Na závěr bych chtěl zdůraznit a ocenit až sebezníčující snahu dotáhnout experimenty a dobrat se informací z nich plynoucích. Práci doporučuji k přijetí.

V Praze, dne 11.6.2012

doc. RNDr. František Půta, CSc.