

Oponentský posudek

na diplomovou práci Martiny Hálové „Efektory chromatinových modifikací a jejich vztah k regulaci transkripce na modelu *Saccharomyces cerevisiae*“

Martina Hálová se ve své práci zaměřila na roli kvasinkového proteinu Prp45 v regulaci transkripce. Jedná se o zbrusu nový směr výzkumu, protože do této doby byla funkce kvasinkového Prp45 analyzována jen vzhledem k pre-mRNA sestřihu. Jelikož se jedná o neprobádanou oblast, autorka správně využila předností kvasinkového modelu a sledovala genetickou interakci mezi mutantní variantou Prp45 a známými transkripčními faktory při regulaci modelových genů. Jako modelové geny Martina použila Pho5 a Pho84, jejichž regulace je poměrně dobře popsána a je závislá na množství dostupného fosfátu.

V obsáhlém literárním přehledu autorka podrobně zpracovává téma regulace genové exprese na úrovni chromatinových modifikací. Úvod je napsán čtivě a Martina prokázala, že umí pracovat s literaturou o čemž svědčí množství citací původních vědeckých článků.

Z metodického hlediska se jedná o „klasičtější“ práci na poli genetiky kvasinek, kdy mutantní termosensitivní alela Prp45 je kombinována s kvasinkovými kmeny, které nesou delece jednotlivých transkripčních faktorů. Tato genetická část je doplněna analýzou RNA pomocí RT-qPCR, kterou autorka zavedla, a která oproti Northern blotu představuje zrychlení analýzy jednotlivých kmenů. Co se týče metod, tak mám jednu výhradu. U některých pokusů je prezentován výsledek který byl docílen jen na základě jednoho biologického experimentu. Zvláště u zajímavých výsledků, např. pozitivní interakce mezi Set1 a Prp45 (obr. 4.23), bych očekával minimálně dva a spíše více biologických opakování. Nicméně chápu, že čas vyměřený na diplomovou práci je limitován a občas ho na dlouhé a náročné experimenty nezbyvá.

Výsledky jsou popsány poměrně obsáhle a do další vědecké kariéry bych Martině doporučil pracovat na zestručnění psaného projevu. Nicméně musím autorce pogratulovat k množství odvedené práce. Martina zvládla připravit a otestovat několik kmenů nesoucích mutantu Prp45 a deleci vybraného transkripčního faktoru. Navíc nalezená negativní interakce s Rad6 a pozitivní s Set1 jsou nesmírně zajímavé. Ještě jednou gratuluji a doufám, že si brzy přečtu na toto téma článek! Ty výsledky určitě stojí za to je dotáhnout do konce a publikovat.

V diskuzi se autorka zaměřuje na roli jednotlivých transkripčních regulatorů při expresi Pho5 a Pho84. Doporučil bych více diskutovat roli Prp45 a jeho vztah k Set1 a Rad6 a nebát se přijít s vlastními teoriemi a modely, jak by mohl celý regulační systém zahrnující Prp45 fungovat.

Celkově hodnotím celou práci jako velmi zdařilou a doporučuji k obhajobě.

Dílčí připomínky a otázky:

1. Proč se liší relativní exprese Pho5 u WT kvasinek mezi jednotlivými experimenty? Např. obr. 4.21 je po 60min indukce ~80 a u obr. 4.20. po stejné indukci jen 16.
2. Autorka detailně popisuje přípravu kmenů *prp45(1-169) Δ set1* a *prp45(1-169) Δ bur1*. Jak byly připraveny/získány další kmeny nesoucí *prp45(1-169)* alelu a současně delecí *Bur2*, *Paf1* a *Rad6*?
3. V úvodu autorka popisuje, jak jsou regulovány jednotlivé nukleosomy v Pho5 a Pho84 promotoru. Plánuje autorka testovat, jak probíhá přestavba nukleozomů v promotoru zmíněných genů u *prp45(1-169)* kmene v nepermissivní teplotě popřípadě u dvojitých mutantů *prp45(1-169) Δ rad6* a *prp45(1-169) Δ set1*?
4. Liší se chromatinové modifikace na Pho5 a Pho84 genech u kmenu *prp45(1-169)* oproti divokému kmenu?

V Praze dne 16.9.2011

David Staněk
Laboratoř Biologie RNA
Ústav molekulární genetiky AVČR