

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor: Bc. Pavla Luxová

Název práce: **Analýza mutantů Rpg1/eIF3 v *Saccharomyces cerevisiae***

Cíle práce: Cílem práce bylo charakterizovat fenotypy dosud nepublikovaných mutantů *Rpg1/eIF3a* a analyzovat možnou úlohu Rpg1 v organizaci mikrotubulů v průběhu buněčného dělení. Dalším cílem byla příprava nových kmenů s mutantní formou *Rpg1* v kombinaci s delecí genu *BUB1* a jejich charakterizace.

Struktura a formální úroveň práce: Diplomová práce v rozsahu 116 stran má standardní strukturu, s výjimkou kapitoly Cíle, která je netradičně zařazena až za Literární přehled a Materiál a Metody. Ve srozumitelně napsaném *Literárním přehledu* jsou na 15 stranách uvedeny základní poznatky o Rpg1 proteinu, jeho úloze v translaci, o mikrotubulárním cytoskeletu *S. cerevisiae* a o mitotickém kontrolním bodu buněčného cyklu konkrétně o roli *BUB1* kinázy v kontrole mitózy. Jsou použity relevantní literární odkazy, které jsou v práci citovány, celkový počet literárních odkazů v diplomové práci je 60. V podrobné části *Materiál a metody* (21 stránek) jsou uvedeny všechny použité chemikálie, organismy, materiály a postupy, které byly aplikovány v experimentální části. Šíře použitých metodik je dostačující a metodiky jsou adekvátní cílům práce a odpovídají prezentovaným výsledkům. *Ve výsledkové části*, která má 53 stran, jsou vysvětleny cíle jednotlivých pokusů a dosažené výsledky. Dokumentace výsledků je adekvátní a množství provedených experimentů dostačující. K dokumentaci výsledků je přiložena řada grafů a mikroskopických obrázků. *V diskusi*, která je velmi stručná, jsou dosažené výsledky porovnány s dostupnou literaturou. Často však diskuse sklouzává k popisu vlastních výsledků a postrádám předložení nějakých hypotéz a na základě dosažených výsledků a jejich diskuse pak návrhy na další řešení problematiky. Také větší množství překlepů a nedokonale formulovaných vět svědčí o tom, že diskusi bylo věnováno méně pozornosti, než ostatním částem diplomové práce. *Závěry* diplomové práce jsou výstižné. Celkově je možno říci, že práce má dobrou grafickou a jazykovou úroveň a je sepsána pečlivě.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle diplomové práce byly splněny. Byla připravena řada kmenů *S. cerevisiae*, které sloužily k vlastní podrobné analýze. Byly charakterizovány nové mutanti *Rpg1-2* a *Rpg1-3*, kde bylo potvrzeno, že u nich nedochází podobně jako u mutantů s dříve charakterizovanou mutací v genu *rpg1* k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, ale blok se objevuje i v jiných fázích cyklu. U nově charakterizovaných mutantů nebyla zjištěna citlivost k benomylu, ani defekty mikrotubulů organizovaných nově po depolymerizaci nokodazolem. Detailnější studium buněčného dělení v mutantních buňkách ukázalo, že je narušen přechod do anafáze a vystoupení z mitózy. Na roli Rpg1 proteinu v buněčném dělení *S. cerevisiae* ukázala další série experimentů, které prokázaly syntetický růstový defekt genů *BUB1* a *Rpg1*. Výsledky dosažené v rámci řešení diplomové práce naznačují význam translace v pochodech spojených

s buněčným cyklem, zejména v kontrole přechodu z mitózy do cytokineze. Práce je metodicky bohatá a výsledky se jistě uplatní jako součást komplexního výzkumu v oblasti buněčné role translačních faktorů probíhajícího v Laboratoře reprodukce buňky MBÚ AVČR.

Otázky a připomínky:

- 1) Vaše pozorování, že mutanti *Rpg1-2* a *Rpg1-3* u kterých jste potvrdili sníženou translaci mají problémy s uvolněním do anafáze a ukončením mitózy považují za zajímavé. Jaké mohou být mechanismy této funkční interakce translace s kontrolním bodem (kontrolními body) buněčného cyklu?
- 2) Výsledky naznačily možnou přímou či nepřímou souvislost mezi funkcí BUB1 a Rpg1v buněčném dělení. Jaké možné další přístupy a nástroje byste použila k dalšímu prohloubení znalosti o této interakci.
- 3) Jaké mechanismy a proteiny mohou hrát roli v defektním chování mikrotubulárního mitotického vřeténka v přechodu z metafáze do anafáze? Byly absence tvorby anafázního vřeténka a neobvyklá uspořádání mikrotubulů kolem SPB, pozorovány pouze u *Rpg1* mutantů po uvolnění buněk z nokodazolu? V mutantech bez předchozí depolymerizace mikrotubulů podobné defekty mikrotubulů, třeba v menším rozsahu, pozorovány nebyly?
- 4) Proč jste vybrala k depolymerizaci mikrotubulů *S. cerevisiae* nokodazol, které další látky by mohly být použity k ověření hypotézy, že pozorované efekty byly spojeny s depolymerizací a následnou polymerizací mikrotubulů.

Návrh hodnocení oponenta: velmi dobře

V Praze 8.9.2014

Doc. RNDr. Pavla Binarová, CSc