

Posudek školitele na diplomovou práci Bc. Pavly Luxové

Analýza mutantů Rpg1/ eIF3a v *Saccharomyces cerevisiae*

Téma, kterým se Bc. Pavla Luxová ve své diplomové práci zabývala, navazuje na problematiku dlouhodobě řešenou v Laboratoři reprodukce buňky Mikrobiologického ústavu v Praze týkající se úlohy proteinů asociovaných s cytoskeletem v morfogenezi kvasinkové buňky. V předkládané práci je pozornost věnována genu *RPG1* kódujícího velkou podjednotku translačního iniciačního faktoru eIF3 v buňkách *Saccharomyces cerevisiae*.

Cílem práce bylo charakterizovat fenotypy doposud nepublikovaných mutantů eIF3a/Rpg1 - *rpg1-2* a *rpg1-3* a porovnat je s již publikovaným mutantem *rpg1-1* v různých genetických pozadích z hlediska jejich růstových vlastností, citlivosti ke zvýšené teplotě - *ts* fenotypu a fáze buněčného cyklu, ve které se zastaví i analyzovat vliv Rpg1 a jeho mutantů na uspořádávání mikrotubulů v živých kvasinkových buňkách. V závěru práce autorka stihla ověřit recentně publikovanou informaci o genetické interakci Rpg1 s kinázou Bub1.

Během experimentální práce se autorka seznámila a osvojila si celou řadu základních technik buněčné a molekulární biologie kvasinek od transformace a křížení buněk po analýzu proteinů pomocí protilátek a fluorescenční mikroskopii. Experimenty prováděla svědomitě a s nasazením bez ohledu na dobu jejich trvání, ve většině případů i s několika variantami provedení a v mnoha opakováních.

Také při sepisování práce prokázala svou výdrž a svědomitost, i když by pro vyznění výsledků práce bylo určitě lepší nechat si pro sepisování delší čas, ale to bude jistě pro autorku velkým ponaučením do budoucna. V literárním přehledu shrnula nejdůležitější poznatky o genu *RPG1* *S. cerevisiae* a jeho funkci v iniciaci translace mající vztah k cílům práce. To zmiňuji proto, že iniciace translace a její regulace je po dlouhá léta velmi studovaným tématem a literatura je velmi rozsáhlá. Stejně tak jsou uvedena základní data o mikrotubulárním cytoskeletu u kvasinek a dostupné informace o funkci kinázy Bub1 v mitotickém kontrolním bodu. Metodická část je také dostatečně rozepsána a bude možné podle ní experimenty prováděné v rámci diplomové práce v případě potřeby zopakovat. Výsledky získané experimentální prací jsou prezentovány přehledně a v logickém sledu. Pouze diskuse by si zasloužila podrobnější zpracování, ke kterému bohužel nedošlo z důvodu časového tlaku před odevzdáním práce. Závěry práce jsou ale srozumitelné a vystihují hlavní získané výsledky.

Autorčiny výsledky dobře ukazují jak důležitý vliv má genetické pozadí na chování proteinu a jeho mutantních variant, jako je to v případě Rpg1/eIF3a. Z mého pohledu nejzajímavějším výsledkem je zjištění, že funkční iniciace a tím i celá translace je v kvasinkových buňkách potřebná pro zdárný průběh mitózy, zřejmě pro přechod z metafáze do anafáze. Na rozdíl od savčích buněk, u kvasinek o tomto tématu není téměř nic známo, ale jsou indicie, že se na něm intenzivně pracuje i v jiných zahraničních laboratořích. Bude třeba zjistit hladinu jakých proteinů je třeba za mitózy udržovat novou syntézou a zda tento způsob regulace stojí i za syntetickou genetickou interakcí mutantů proteinů Rpg1 a Bub1. Doufáme, že se toto velmi zajímavé téma podaří v rámci laboratoře v dohledné době dokončit a výsledky publikovat.

Po formální i obsahové stránce diplomová práce Bc. Pavly Luxové splňuje požadavky kladené na diplomové práce. Vzhledem k získaným výsledkům a jejich sepsání doporučuji práci k obhajobě a hodnotím ji známkou velmi dobře.

V Praze dne 9. 9. 2014

RNDr. Ivana Malcová, CSc.