

**Oponentský posudek na diplomovou práci Marty Ptáčkové:
DNA vazebné vlastnosti proteinů rodiny CSL ve *Schizosaccharomyces pombe*.**

Diplomová práce Marty Ptáčkové pojednává o rodině CSL transkripčních faktorů v jednobuněčné kvasince *Schizosaccharomyces pombe*. Tento organismus úspěšně slouží jako laboratorní model pro řadu fundamentálních procesů probíhajících v eukaryotické buňce jako např. buněčný cyklus či buněčná signalizace. Pro zvolené téma CSL proteinů představuje tato kvasinka navíc unikátní systém umožňující studium CSL proteinů mimo Notch signální dráhu, která se objevuje až u metazoi. Projekt navazuje na předchozí práce této laboratoře úspěšně publikované v nedávných letech. Z těchto důvodů se jedná o velmi vhodně zvolené téma.

Literární přehled je pro neseznalého čtenáře čtivý a srozumitelný a uvádí přehled výskytu, struktury, funkce a DNA-vazebných vlastností CSL proteinů a také informace o částečné charakterizaci dvou proteinů CSL proteinů, Cbf11 a Cbf12, u *S. pombe*. Nevýhodou literárního přehledu, která se stejně tak objevuje i v části diskuze je nedostatek jednotlicí informace, kterou by čtenář obdržel na závěr (tj. výskyt – struktura – funkce CSL proteinů v přírodě). To ale může být způsobeno útržkovitými informacemi z různých buněčných systémů. Jako celek však působí literární přehled zdařile.

Část Materiál a metody považuji za zevrubnou a vyčerpávající. Ukazuje na komplexní využití technik od nezbytné rutinní kultivace, PCR a SDS-PAGE až po náročnější metody EMSA a ChIP. Autorka ve své práci využila i práci s genomovou databází pro získání základního datasetu.

Tím je také uvedena část Výsledky. Autorka analyzovala 5' nekódující oblasti 5424 genů pro přítomnost vazebných elementů pro CSL proteiny a identifikovala celkem 566 možných cílových genů. Součástí prezentace těchto dat by mohla být i distribuce motivů v nekódujících oblastech, tj. histogram vzdálenosti od počátku transkripce či translace, tabulka s těmito daty je přitom jako příloha práce. Kombinací s transkripčními daty získanými Dr. Převorovským byl sestaven konečný dataset 61 genů s možným místem pro Cbf proteiny. Jako trochu nešťastné považuji porovnání 61 motivů pomocí NJ analýzy. Vhodnější by možná bylo rozřídění jednotlivých motivů do subtypů, třeba s charakteristickým sekvenčním logem.

Pro funkční vazebné studie autorka připravila N-terminálně zkrácenou verzi proteinu Cbf12, který tak, jak autorka správně předpokládala, nabyl *in vitro* DNA vazebných vlastností během EMSA. Afinita Cbf11 a Cbf12DN k vybraným DNA motivům byla stanovena právě pomocí EMSA, při níž bylo úspěšně identifikováno několik specificky vázaných motivů jak Cbf11 tak Cbf12DN. Dále bylo zjištěno, že tyto proteiny váží jednotlivé elementy s odlišnou afinitou a zřejmě také i s odlišnou specifitou.

Na základě těchto výsledků autorka použila tagovaný Cbf11 pro chromatinovou imunoprecipitaci spojenou s následnou kvantitativní PCR. Cílem bylo odhalit nativní Cbf11 vázané úseky DNA a v nich pak otestovat přítomnost vytipovaných oblastí. Využitím kontrolního kmene autorka s úspěchem otestovala experimentální design pro tuto náročnou techniku, avšak ve vlastním získaném vzorku nezjistila obohacení charakterizovaných úseků DNA.

Autorka závěrem diskutuje přítomnost CSL proteinů v *S. pombe*, a také důvody neúspěchu v ChIP experimentu. Diskuze působí, že autorka problematice rozumí a je si vědoma experimentálních úskalí projektu. Šíře původních literárních zdrojů využitých v této práci navíc napovídá o teoretickém zvládnutí problematiky. Z formálního hlediska mi chybí jasně formulované cíle práce. Celkově považuji práci za zdařilou a doporučuji ji k obhajobě.

Otázky:

1. Vzhledem k evoluční příbuznosti améb se skupinou hub a živočichů, jsou CSL proteiny (nebo alespoň jejich částečné homology) přítomné u skupiny např. u *Dictyostelium discoideum*?
2. Existuje, byť třeba vzdálená, podobnost N-terminální domény Cbf12 s jinými s jinými proteiny?
3. Není možné, že by se CSL-vazebná místa vyskytovala také uvnitř kódujících oblastí genů?
4. Jak se stanovuje síla adheze kolonií na plotně?
5. Mají mitochondriální geny nějaké promotory?