

## Posudek školitele

diplomová práce

**Bc. Anna Jordáková - Charakterizace vazby transkripčních faktorů CSL na DNA v kvasince *Schizosaccharomyces pombe***

Anna Jordáková do naší laboratoře nastoupila v roce 2013. Vypracovala u nás svou bakalářskou práci a poté pokračovala na projektu diplomovém. Nejprve v týmu s tehdejší PhD studentkou Martinou Oravcovou, později projekt dál rozvíjela samostatně. Úkolem Aničky původně bylo pomocí standardních metod homologní rekombinace připravit kmeny kvasinky *S. pombe* s modifikacemi genů pro transkripční faktory Cbf11 a Cbf12 – vnést značku umožňující jejich detekci/purifikaci a mutovat aminokyselinový zbytek důležitý pro vazbu těchto proteinů na DNA. Tyto nástroje jsme hodlali využít pro objasnění komplexního působení transkripčních faktorů CSL v kvasinkových buňkách. Realizace tohoto zdánlivě jednoduchého zadání se v případě genů CSL ukázala jako technicky velmi obtížná a v důsledku toho i časově náročná. Anička musela prodlužovat studium, zavádět nové metody, ale nakonec se jí podařilo připravit 3 ze 4 potřebných kmenů s TAP epitopem a analyzovat jejich fenotypy. Zbývající konstrukt je na dobré cestě k dokončení.

Anička zvládla základní i pokročilé postupy pro kultivaci *S. pombe* (např. synchronizace buněčného cyklu) a různé fyziologické testy (rychlost růst, míra adheze, citlivost na stresory). Dále se naučila izolaci nukleových kyselin a proteinů a jejich analýzu (např. PCR, qPCR, western blot), včetně stanovení vazby proteinu na DNA pomocí chromatinové imunoprecipitace. V laboratoři zavedla novou metodu editace genomu využívající systém CRISPR/Cas9, což projekt významně posunulo a celkově pro nás bylo velkým metodickým přínosem. Oproti ostatním studentům v laboratoři potřebovala Anička o trochu výraznější vedení školitelem, nicméně v průběhu let v tomto ohledu udělala velký pokrok. Anička vždy pracovala pečlivě a svědomitě, k výsledkům požadovala odpovídající dokumentaci a vytrvale se snažila nacházet řešení (mnoha) technických problémů, se kterými se průběžně potýkala.

Kromě svého hlavního tématu se krátce věnovala i práci na paralelním projektu týkajícím se problematiky proteinů CSL a je spoluautorkou článku v časopise *Cell Cycle* (2016; PMID: 27687771).

Spis diplomové práce vznikl pozvolna a s častými konzultacemi se školitelem. Mimo jiné nebylo snadné najít strukturu, která by umožňovala začlenění popisu slepých uliček – informace důležité pro naši laboratoř. V zevrubném literárním přehledu autorka dobře reflektuje pleiotropismus proteinů CSL a připravuje si půdu pro později využívané fenotypické testy připravených mutantů. Využívá i nové články, doposud nezpracované v dřívějších DP z laboratoře. Text je doplněn pěknými schémata vlastní výroby. Výsledková část obsahuje velmi pečlivou obrazovou dokumentaci, opět včetně návodných schémat. Autorka poctivě dokumentuje slepé uličky, negativní výsledky i pilotní pokusy, které bude nutné v budoucnu zopakovat. V diskuzi poskytuje praktický návrh řešení konstrukce chybějícího kmene Cbf11-DBM-TAP a správně navrhuje další návazné a doplňující experimenty v projektu, které bude moci provést v rámci svého PhD studia.

Diplomová práce Anny Jordákové podle mne splňuje veškeré nároky a proto ji doporučuji k obhajobě.

RNDr. Martin Převorovský, Ph. D.  
školitel

Katedra buněčné biologie  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Karlova  
Viničná 7, 128 43, Praha 2  
prevorov@natur.cuni.cz  
Tel.: +420 22195 176