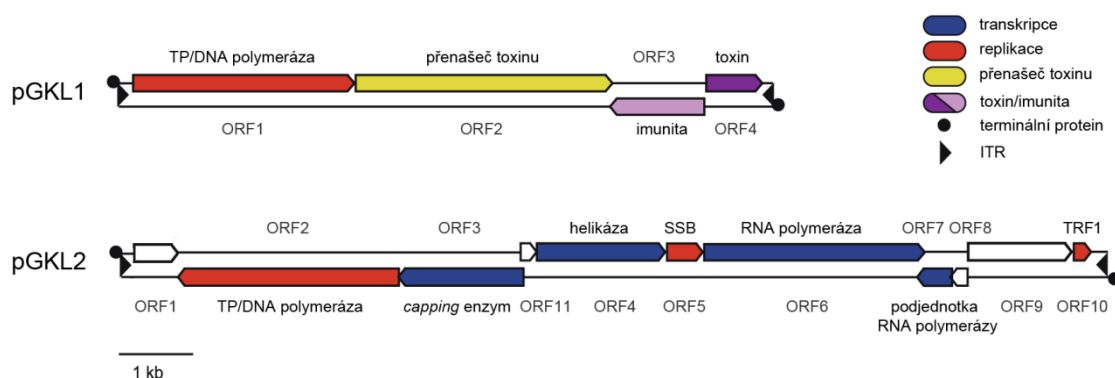


Nabídka diplomové práce na Katedře genetiky a mikrobiologie

Charakterizace proteinů kódovaných lineárními kvasinkovými plasmidy

Cílem tohoto magisterského projektu je prohloubení znalostí a detailní charakterizace proteinů kódovaných cytoplasmatickými lineárními plasmidy kvasinky (nazvanými pGKL 1 a pGKL2) *Kluyveromyces lactis*. Tyto unikátní plasmidy se zdají být naprosto samonosné, minimálně ve smyslu jejich replikace a transkripce. O replikaci pGKL plasmidů není známo téměř nic, přesné složení tohoto unikátního transkripčního aparátu bylo popsáno teprve nedávno, stejně tak jako velká podobnost transkripčního aparátu výše uvedené kvasinky s transkripčním aparátem viru vakcinie (Sýkora *et al.*, 2018; Vopálenský *et al.*, 2019), což rázem činí kvasinkový model cytoplasmatické transkripce, a obecně vlastně celý systém lineárních kvasinkových plasmidů, atraktivnějším a umožňujícím jejich využití jakožto neinfekčního systému mimikujícího některé viry infikující lidské buňky (Vopalensky *et al.*, 2024). V této práci se plánujeme zabývat zejména hladinou exprese jednotlivých genů kódovaných lineárními pGKL plasmidy o čemž jsou v současné době pouze mlhavé znalosti. Plánujeme využít metody real-time PCR v kombinaci se stanovením množství reálně produkovaného konkrétního proteinu. Jelikož proti proteinům nejsou k dispozici protilátky, půjdeme cestou fúzních proteinů, tj. každý z proteinů kódovaných pGKL plasmidy přidáme fúzní značku, pravděpodobně Twin-Strep-tag pro ověření reálné produkce daného proteinu. Alternativně uvažujeme o přípravě reportérových konstruktů *in vivo* nesoucích gen pro Renilla luciferázu pod kontrolou promotorů všech pGKL plasmid specifických genů. Dalším cílem této diplomové práce bude alespoň částečná charakterizace replikace pGKL plasmidů se zaměřením na plasmidy kódovanou DNA polymerázu. Díky tomu, že máme k dispozici kodonově optimalizovanou verzi této dosud necharakterizované DNA polymerázy, můžeme tuto polymerázu produkovat ve vybraných expresních systémech a následně ji biochemicky či strukturně charakterizovat.



- 1/ Vopálenský V, Sýkora M, Mašek T, Pospíšek M. (2019) Messenger RNAs of Yeast Virus-Like Elements Contain Non-templated 5' Poly(A) Leaders, and Their Expression Is Independent of eIF4E and Pab1. *Front Microbiol.* 2019 Oct 30;10:2366. doi: 10.3389/fmicb.2019.02366. eCollection 2019.
- 2/ Sykora M, Pospisek M, Novak J, Mrvova S, Krasny L, Vopalensky V (2018) Transcription apparatus of the yeast virus-like elements: Architecture, function, and evolutionary origin. *PLOS PATHOGENS* Volume: 14 Issue: 10 Article Number: e1007377 Published: OCT 2018
- 3/ Václav Vopálenský, Michal Sýkora, Zora Mělková, Tomáš Mašek, Martin Pospíšek (2020) Transcripts of vaccinia virus postreplicative genes do not contain a 5' methylguanosine cap. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.204867>