Školitelský posudek na práci Barbory Singerové

Barboru znám od konce roku 2009, kdy se přihlásila na nabídku laboratoře genomiky a proteomiky vektorů, kterou v tomtéž roce otevřel dr. Kotsyfakis a stala se první bakalářskou studentkou v této laboratoři. V souladu se zaměřením laboratoře jsem pro Barboru vybral projekt, ve kterém by se pomocí molekulárních metod pokusila charakterizovat jeden protein se slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. Projekt byl zaměřen na charakterizaci jednoho zástupce multigenní rodiny inhibitorů proteáz nesoucích jednu Kunitzovu doménu, a to především proto, že u těchto proteinů se dá přibližně odhadnout jejich potenciální funkce. Vedle asi obecného účelu bakalářské praxe, tj. seznámení se s laboratorní prací, bylo úkolem Barbory osvojit si některé základní metody molekulární biologie, naučit se používat bioinformatické zdroje, jako např. NCBI GenBank nebo nástroje pro predikci vlastností proteinu podle primární struktury a nakonec také pracovat s literaturou při zpracovávání rešerše k danému tématu.

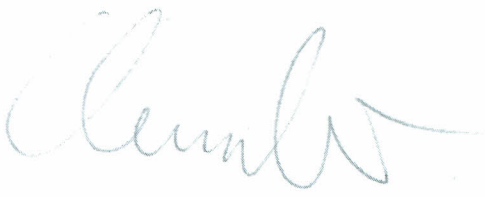
Barbora se zhostila projektu zodpovědně a musím ocenit, že vzhledem k vytíženosti bakalářských studentů studijními povinnostmi pracovala na projektu intenzivně a věnovala mu velkou část svého času. Prvním úkolem byla příprava dsRNA pro RNA interferenci. Kvůli problémům s jedním vláknem musela Barbora několikrát opakovat purifikaci RNA pomocí fenol-chloroformu, což mělo sice špatný vliv na její náladu, ale díky tomu si tuto metodu skutečně osvojila. Nakonec se podařilo připravit dostatečné množství dsRNA na jeden pokus který byl proveden na podzim 2010 na konci klíštěcí sezóny. Zároveň s klonováním DNA do RNAi vektoru, připravila Barbora konstrukt pro expresi rekombinantního proteinu v bakteriálním systému. Během ověřování pozitivních klonů se ukázalo, že místo cíleného transkriptu byly zaklonovány dvě jiné izoformy, resp. dva členové stejné multigenní rodiny. Využili jsme toho, že oba byli v expresním vektoru a tak Barbora část analýzy, především bioinformatickou část, provedla s oběmi izoformami.

Naneštěstí se nám nepodařilo najít optimální podmínky pro refolding a purifikaci rekombinantního proteinu a proto se imunizace musela provést proteinem izolovaným z polyakrylamidového gelu. Ze získaného séra připravila Barbora čistou imunoglobulinovou frakci a s tou provedla několik Western blotových analýz, kde se pokusila detekovat nativní protein v klíštěcích tkáních a slinách.

Barbora byla díky zodpovědnému přístupu a píli schopná se během asi roku a půl, který u nás v laboratoři strávila, naučit celé řadě laboratorních technik –molekulární klonování, příprava RNA, exprese rekombinantního proteinu v bakteriálním systému a jeho izolace z inkluzních tělísek, SDS-PAGE nebo Western blot. Další techniky, jako např. FPLC nebo injikaci dsRNA do klíšťat měla možnost si alespoň vyzkoušet. Vedle laboratorní práce se Barbora seznámila s bioinformatickým přístupem. Kromě zvládnutí orientace v genové databázi NCBI a vyhledávání příbuzných sekvencí pomocí BLASTu se naučila používat několik predikčních serverů a programů, díky kterým získala informace o fyzikálně-chemických vlastnostech, potenciálních posttranslačních úpravách a nakonec i o terciární struktuře zkoumaných proteinů. Výsledky, které získala a metody, které používala, shrnula Barbora ve své bakalářské práci spolu s velmi obsáhlou rešerší týkající se skupiny Kunitz-inhibitorů, na které je vidět, že Barbora věnovala mnoho času studiu literatury a aktivní práci s ní.

Ze zkušenosti ostatních kolegů s bakalářskými (a i magisterskými) studenty musím u Barbory vyzdvihnout především její zodpovědnost, pečlivost a snahu porozumět tématu projektu, vlastnosti, které jsou u studentů bohužel čím dál vzácnější. Dle mého názoru splnila Barbora Singerová požadavky kladené na bakalářské studenty nad rámec povinností a věřím, že úspěšně projde jak státními zkouškami, tak obhajobou své práce. Troufnu si tvrdit, že ať se Barbora rozhodne pokračovat v magisterské práci v Laboratoři genomiky a proteomiky vektorů nebo kdekoliv jinde, bude mít z bakalářského studia solidní základy, a to především díky svému přístupu jak k samotnému studiu, tak k vlastnímu výzkumnému projektu.

Bohužel nemohu být osobně přítomen na této obhajobě, a tak alespoň písemně velice doporučuji práci Barbory Singerové k obhajobě a přeji jí mnoho úspěchů jak při dnešních zkouškách, tak i do budoucna.

V Drážďanech 23.5.2011

Jindřich Chmelař