Vyjádření školitele k diplomové práci Bc. Kláry Mičulkové „Příprava rekombinantních proteinů pro použití v tkáňových kulturách“

Klára Mičulková se zabývala přípravou rekombinantní bílkoviny odvozené od sericinu 2 (jedna ze složek hedvábí) bource morušového. Velmi špatně definované směsi sericinů bource jsou komerčně dostupné jako náhražka hovězího séra v kultivačních médiích. Neví se však, která z komponent ve směsi je potřebná pro růst buněk a které složky jsou nepotřebné a možná dokonce škodlivé. Několik týmů v Japonsku, USA a dalších zemích prověřovalo účinek rekombinantních bílkovin odvozených od sericinu 1. Byly popsány různé, vesměs pozitivní účinky, a navrženy možnosti využití sericinů při rekonstrukci tkání. Pro práci K. Mičulkové jsme zvolili sericin 2, jehož gen byl zevrubně popsán v Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR. Klára připravila úsek kódující 121 aminokyselin (s vysokým obsahem lyzinu a jiných aminokyselin s nábojem). Příslušný kódující úsek cDNA byl nejprve amplifikován pomocí RT PCR z RNA izolované ze snovacích žláz. Později byl použit templát s kodony optimalizovanými pro expresi v *Escherichia coli.* V obou případech byl exprimován fúzní protein skládající se z uvedeného úseku 121 aminokyselin a z hexahistidinu, který umožnil čištění rekombinantního proteinu pomocí afinitní chromatografie na kolonce s niklem. K. Mičulkové se podařilo rekombinantní protein získat, výtěžky však byly bohužel malé bez ohledu na použité kodony. Nešťastnou shodou okolností byl rekombinantní protein stejně velký, jako lysozym, který byl součástí extrakčního pufru. Tato koincidence ztěžovala čištění.

Druhým cílem práce bylo zjistit, jak sericiny a rekombinantní produkt ovlivňují růst buněk v kultuře. Na základě pozitivních výsledků předběžných pokusů byl zvolen velmi složitý systém lidských embryonálních kmenových buněk (hESC). Byla nezbytná spolupráce s pracovištěm lékařské fakulty Masarykovy univerzity, kde se uskutečnily všechny testy. Zčásti se na nich během stáže na brněnském pracovišti podílela K. Mičulková. Protože rekombinantního proteinu bylo málo, byly rozsáhlejší pokusy provedeny jen s komerčním sericinovým extraktem. Hodnotil se jeho vliv na četnost defektů projevujících se zmnožením centrozomů. U buněčných linií CCTL 12 P59 a CCTL 14 p35 bylo prokázáno snížení frekvence defektů v přítomnosti nízkých koncentrací sericinů, což je příslibem možné identifikace sericinových komponent s výraznějším pozitivním účinkem.

Bc. Klára Mičulková se projevila jako schopná, samostatná a pečlivá studentka. Bohužel se z existenčních důvodů (placené brigády) nemohla plně věnovat svému výzkumu. Během studia zvládla řadu metod, naučila se kriticky myslet a přispěla k rozvoji poznání. Navrhuji ocenit její práci stupněm „velmi dobře“.

V Českých Budějovicích, 21. 5. 2012

F Sehnal

Prof. RNDr. František Sehnal, CSc.