



Biologické centrum AV ČR, v. v. i.

**Parazitologický ústav**

Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

tel.: 385 310 351; fax 385 310 388

e-mail: jan.dvorak@img.cas.cz

**Posudek školitele diplomové práce vypořádané Bc. David Opavským**

**Název práce: Molecular and biochemical characterization of serine protease SmSP1 in *Schistosoma mansoni***

Předem se omlouvám za poněkud delší posudek, ale vzhledem ke své absenci na obhajobě a komplikovanému vzniku práce to považuji za nutné.

David Opavský nastoupil na podzim roku 2009 do nově vznikající laboratoře molekulární helmintologie na Parazitologickém ústavu AVČR. Start naší malé laboratoře nebyl jednoduchý a jako začínající vedoucí jsem považoval za nutnost ho předem upozornit na všechna úskalí s tímto spojená. Budiž mu přičteno k dobru, že ho tato situace neodradila. Začínali jsme v ne zrovna optimálních podmínkách, bez většího zázemí. Trvalo delší čas, než jsme byli schopni zavést životní cyklus parazita a začínali jsme též pracovat na novém tématu.

David měl během své diplomové práce v rámci našeho výzkumu serinových proteáz motolice *Schistosoma mansoni* za úkol započít pilotní rekombinantní exprese na jediné částečně charakterizované proteáze zvané SmSP1. Zadání bylo připravit rekombinantní protein vhodný pro produkci protilátek, pokusit se o získání aktivního rekombinantu využitím několika expresních systémů a pokusit se vyhodnotit expresní profil SmSP1 v rámci celého životního cyklu parazita. Je nutno předem ocenit, že David se hned pustil do práce a osvojil si rychle řadu pro něj nových metodik v oblasti molekulární biologie a biochemie. Měl také štěstí, že mu byl záhy umožněn tříměsíční pobyt na University of California v San Francisku, kde se pokoušel docílit genových „knockdownů“ několika serinových proteáz *S. mansoni* včetně SmSP1 pomocí RNAi. To je obecně a u schistosom obzvláště nejistá a velmi komplikovaná práce. Dr. Conor Caffrey, který mu byl v supervizorem, velmi pozitivně

oceňoval jeho pracovní nasazení. Další komplikací bylo pro Davida v posledním roce to, že jsem nastoupil na ÚMG v Praze. Díky tomu jsme se viděli méně, což mě jako školitele práce samozřejmě nemůže těšit. David se na počátku svého usilí věnoval laboratorní práci intenzivně a bylo na něm vidět nadšení. Jediné co bych mu mohl vyčíst, byla absence větší míry samostatnosti a také málo zvědavosti - To co by mělo být základní vlastností každého vědce. V každém případě jsem byl s jeho prací v prvotním období velmi spokojen.

V základním zadání David Opavský svou laboratorní práci v zásadě splnil. Podařilo se mu připravit rekombinant, který byl využit na následné imunolokalizační studie. Též otestoval řadu postupů včetně refoldingu a několika různých expresních systémů. Taktéž se podílel na evaluaci expresních profilů dané proteázy a jí podobných trypsinů z *S. mansoni* a optimalizoval či spíše testoval podmínky pro RNAi knockdown. Ten se mu sice nepovedl v podstatě u žádného studovaného genu, ale jeho studie později vedla k vylepšení dané metodiky a částečným úspěchům. Bohužel se nepodařilo získat aktivní rekombinant, a snad by to vyžadovalo mnohem intenzivnější úsilí. Tady k mé lítosti mé pozitivní hodnocení musí skončit. Možná se na něm podepsala ve větší míře frustrace díky mnoha negativním výsledkům, ale v závěrečné fázi začal David přistupovat ke svým povinnostem velmi ležerně a lajdácky! Mé pochybnosti se začaly objevovat v loňském roce řešení, kdy jeho přístup začínal být více volný. Nakonec jsme se shodli, že by bylo lepší kvůli sepsání diplomové práce odložit obhajobu o půl roku. Dohodli jsme se, že během odkladu výrazně zapracuje na molekulární charakterizaci splice variant produktů *smsp1* genu. Zde jsem neviděl moc pracovního nasazení, a nepodařený experiment vždy znamenal konec usilí. Toto velmi nešťastné období vyvrcholilo jeho neschopností sepsat diplomovou práci na podzim roku 2012. Proto jsme se dohodli na dalším odkladu s tím, že jsme si narýsovali jasný itinerář a dohodli se na průběžných konzultacích. Nic z toho se nezdařilo. Skončilo to emailovým a telefonickým naháněním a dokonce vyprošováním prvních verzí práce. Výsledný produkt, ačkoliv student musí mít možnost volné tvořivosti, je spíše nekvalitním a nevyváženým polotovarem, kde nebyly opraveny ani ty nejkřiklavější chyby a nedostatky na které jsem opakovaně upozorňoval a které jsem opakovaně opravoval. To se týká zejména prezentovaných obrázků, citací, školáckých chyb v latinských názvech či slovosledu. Celkové posouzení diplomové práce přenechám však na oponentech. Pozitivní by snad bylo, že se David rozhodl sepsat práci v anglickém jazyce, což se bohužel díky ledabylému a na konci hektickému

přístupu také podepsalo na kvalitě výsledného díla. Aspoň musím ocenit, že při té všeobecné mizérii, se mu podařilo sepsat ve spěchu v zásadě trochu smysluplnou diskuzi, kde ke škodě nebylo více času na jakékoliv vylepšování. V závěru tohoto hodnocení si nejsem úplně jist, zda by nebylo lepší celou práci přepracovat a obhájit později. Každopádně přes mou nespokojenost má práce i jisté kvality. Jestli tyto kvality převažují nad zápory, musím v této fázi přenechat oponentům a komisi. Taktéž bude záležet na tom, zda obhajoba povede k napravení reputace již velmi pošramocené. Jako školitel se bohužel nemohu zúčastnit obhajoby z důvodu mého dlouhodobě plánovaného pobytu v USA. Doufám však, že David bude schopen předvést slušnou obhajobu, která napraví ne příliš dobrý dojem z jeho diplomové práce.

V Praze dne 16. 5. 2013



Jan Dvořák (školitel)