

Posudek školitele na diplomovou práci Jiřiny Josefiové.

Jiřina Josefiová začala pracovat na své diplomové práci od podzimu roku 2003 ve svém třetím ročníku, kdy se ze začátku seznamovala se základními mikrobiologickými a molekulárně genetickými technikami. Jako téma své diplomové práce si vybrala vyhledávání genů zodpovědných za osmoadaptaci u *Bacillus subtilis* v podmínkách limitního draslíku. Tím navázala na předchozí diplomové práce řešené v laboratoři. Zvolená technika nesespecifické mutagenese obecně umožňuje vyhledávání genů podílejících se na studovaném fenotypu. Proto jsme ji zvolily i v případě osmoadaptace při limitních koncentracích draslíku. Pokračovali jsme v úsilí objevit gen pro nízkoafinitní transportní systém, neboť sekvenční homologie s doposud známým a relativně evolučně rozšířeným systémem Kdp, u *Bacillus subtilis* chybí. Přesto je tento organismus schopný růst a vyrovnávat se s osmotickým šokem i při limitních koncentracích draslíku, a jak bylo prokázáno, projevuje ATPasovou aktivitu P-typu indukovanou limitními koncentracemi draslíku ve vnějším prostředí.

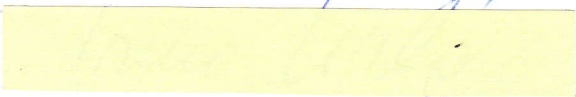
Po překonání prvních potíží a po pochopení principů mikrobiologické práce se začaly její experimenty v celku zdárně vyvíjet a projevovала píli a trpělivost ve zpracování poměrně rozsáhlého biologického materiálu, třídění mutant, izolace chromosomální DNA a hybridizace. Nejvíce zručnosti a vyspělosti v laboratorní práci pak prokázala při izolaci bakteriální mRNA, při které prověřila nový přístup v přípravě cDNA, který umožňuje nesespecifickou přípravu cDNA i s bakteriálních konsorcií. Ne zcela standardní kvalita obrázků transkripčních profilů není její chyba, neboť šlo o metodu v laboratoři nevyzkoušenou a nebyl spíše než čas, finance na zopakování izolací a hybridizací.

V tom nejdůležitějším, co by zdárně završilo její snažení, ale neměla asi šťastnou ruku ve volbě dále studovaných mutant, protože i přes několikanásobném opakování pokusů a hledání nových experimentálních přístupů se jí nepodařilo mutaci lokalizovat. Důvod proč tomu tak bylo určitě nevidím v její práci, ale chování klonů, které se jí sice podařilo vyselektovat na požadované podmínky, ale neobsahovaly plazmid s insertem, který selekční vlastnost obsahuje. Vysvětlení, které uvádí ve své diplomové práci a to přítomnost transponázového genu z *Bacillus subtilis* na insertu s inaktivovaným genem, odpovídá i databázovému hledání, kdy opravdu v okolí již popsanych (sigB operon) či nepopsanych genů účastnících se odpovědi na osmotický stres se transponázové geny nalézají.

Jiřina Josefiová poté co zvládla základní techniky pracovala samostatně, sama si vyhledávala postupy, zvláště v přípravě RNA, metody, která nebyla v laboratoři dosud zavedena. Oceňuji u ní výdrž a pevné nervy, pracovala na plný výkon až do konce, a trpělivě se stále snažila dobrat pozitivního výsledku. Doufá, že tento traumatizující zážitek neovlivní její další přístup k vědecké práci. Škoda že se pro svá další studia rozhodla pro nové pracoviště, ale asi i to odráží její energii zkoušet stále něco nového.

Práci doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 26.9. 2006


RNDr. Irena Lichá, CSc.
Katedra genetiky a Mikrobiologie
PřF UK, Praha, Viničná 5