

## Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Františka Musila „Možnosti a limity RNA interference u klíštěte *Ixodes ricinus*“

Předložená práce má včetně příloh 55 stran a zachovává klasické členění diplomových prací. Její úvod je přehledný, jasný, čtivý a srozumitelný. Formulování cílů práce působí však překvapivě. Ani z rešerše nevyplývá a ani v tomto bodě není nijak zdůvodněno, proč byl zvolen právě chitin vázající protein a proč cathepsiny B1 a B2, proč byla studována právě tato trojice. Žádná pracovní hypotéza, nic, přičemž by stačilo jen pár slov. Ta nenalezneme ani v diskusi, ani v závěru. Místo toho je v cílech práce věta více méně metodického charakteru psaná v nevhodném čase a o prvním úkolu práce se dozvídáme až ve výsledcích na str. 27 a na str. 45 v závěru.

Kapitola materiál a metody je rozepsána na 12 stránkách. Popis je velmi přehledný, detailní a cenný pro kohokoli, kdo by se chtěl touto problematikou zabývat. Přesto některé části se zdají být nedostatečně popsány. Nedozvíme se nic o stáří, pohlaví, línii a dodavateli morčat. Ani v kapitole výsledky nezmoudříme a tak nevíme, zda na morčeti byl vždy jeden, či více kloboučků s klíšťaty. Jelikož předpokládám, že jeden a to vždy s celou studovanou skupinou, pak vyvstává naléhavě otázka inbrednosti morčat a toho, že sání na jiném morčeti probíhá za odlišných podmínek. Vzhledem k tomu, že inbrední SPF morčata je obtížné sehnat, je třeba experiment vhodně uspořádat a maximálně využít možnosti statistiky. Uspořádání experimentu, které bylo (jak předpokládám) použito, neumožňuje vliv různých morčat eliminovat, statistické vyhodnocení počtu sajících a odpadlých klíšťat není možné.

Kapitola výsledky přináší cenné poznatky a velmi kladně hodnotím důkladný průkaz toho, zda došlo k RNA interferenci či ne. Horší je to s biologickým testem. U CBP se píše, že výsledek (odpadnutí části klíšťat) naznačoval možný negativní dopad eliminace CBP na schopnost sání a mortalitu testovaných samic. To jsou dva pojmy, snad by šlo mezi nimi rozlišit a prostudovat odpadlá klíšťata jak biologicky (životnost resp. pravděpodobná příčina úhynu), tak i molekulárně biologicky (zjištění, zda došlo k RNA interferenci a v jakém rozsahu, stejně tak, jak bylo učiněno u sajících klíšťat). Vliv RNA interference nebyl jednoznačný, místo 7 odpadlo 12 klíšťat a to pravděpodobně na jiném morčeti, nelze to statisticky hodnotit, tudíž podrobnější analýza by byla na místě. Hodnotit však šlo průměrné váhy klíšťat po sání. Je udána jen průměrná váha, chybí směrodatná odchylka a chybí vyhodnocení statistické významnosti rozdílu.

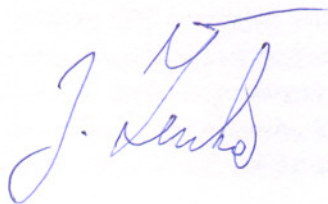
Statistické vyhodnocení alespoň váhy klíšťat chybí i při studiu RNA interference u cathepsinů B1 a B2. Jsem rád, že autor dochází k závěru, že studoval přeživší jedince, tedy jedince, kde se vlastně ani RNA interference nemusela uplatnit, tedy subpopulaci klíšťat možná více méně z hlediska úspěšnosti interference nedostatečně povedenou. Autorova věta, že úspěšné snížení projevu cathepsinu B1 a B2 bylo s velkou pravděpodobností hlavní příčinou úhynu samic v průběhu rané fáze sání je z důvodu nedostatečného prostudování odpadlých klíšťat málo podložena. Nezávislý pozorovatel si totiž může představit, jak u RNA interferencí ovlivněných klíšťat díky neexistenci dvou enzymů chybí koncové produkty.

Chybějící zpětná vazba vede k nekontrolovanému sání klíšťat se stěží předvídatelnými důsledky, možná reversibilními po odeznění interference.

V diskusi bych očekával, že začne diskutabilními body, jako je zejména dynamika potlačení obou cathepsinů apod. Tyto otázky, včetně způsobu aplikace dsRNA jsou sice diskutovány, ale trošičku neuspořádaně, nemá to ten řád, na který si čtenář zvykne z předchozích částí. Hlavně však jsou diskutovány až v druhé části kapitoly až po úvahách o perspektivách RNA interference, kterými by měla kapitola končit a ne začínat.

Co se týče závěru, snad by bylo vhodnější uvést dosažené výsledky v bodech, to je však jen na zvážení.

Přes uvedené výhrady práci hodnotím pozitivně. Studium RNA interference bylo provedeno velice dobře, množství a kvalita odvedené práce jsou obdivuhodné a práce určitě v mnoha ohledech nejen naplňuje ale i výrazně převyšuje požadavky kladené na magisterskou práci. Svými připomínkami jsem se snažil pouze upozornit na to aby skvěle zvládnuté geniální metodiky výzkumu nebyly znehodnocovány podceněním dalších okolností jejich použití. Je mi jasné, že biologický pokus na morčatech byl něčím druhotným, v tom případě však neměl být ani včleňován a práce mohla zůstat v rovině metodické.



RNDr. Jan Ženka, CSc.

V Českých Budějovicích dne 27.5.2009



Mgr. Robert Fedič, PhD.

Biology Centre of the Academy of Sciences  
of the Czech Republic, v. v. i.  
and  
Institute of Entomology, Czech Academy of Sciences  
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice



Phone: (+420) 38 777 5220  
e-mail: rfedic@entu.cas.cz

**Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Františka Musila:  
"Možnosti a limity RNA interference u klíštěte *Ixodes ricinus*".**

Předkládaná magisterská práce obsahuje celkem 55 stran a skládá se z anotace, úvodu, části materiál a metody, vlastních výsledků, diskuze, závěru, seznamu použité literatury a 4 stran příloh. Samotná práce je napsána velice přehledně a srozumitelně s minimálním počtem překlepů a chyb a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na magisterskou diplomovou práci.

Autor řeší ve své práci zajímavé a rozhodně ne jednoduché téma a pro dosažení vytyčených cílů zvládl široké spektrum molekulárně-biologických metod. Získané výsledky interpretuje autor velmi fundovaně a případné otázky které v průběhu čtení magisterské práce vyvstaly zodpověděl poměrně zdatně v diskuzi své práce.

K předkládané magisterské práci nemám žádné zásadní faktické připomínky. Pouze pro ujasnění žádám autora o vyjádření k následujícím připomínkám a dotazům:

1. U seznamu použitých zkratk by bylo přehlednější je řadit abecedně, plus některé chybí (Th1, AK, SGE, PM, HBP).
2. V části metody se vyvarovat užívání anglických termínů pro pufr, směs a enzym.
3. V části výsledky označit velikost DNA standardů pro snadnější orientaci.
4. Strana 2 - Klíště *I. ricinus* patří mezi 3 – hostitelské druhy (Singh a Girschick, 2003). Zde by bylo možná vhodnější to upřesnit.
5. Strana 17 – Jaký aktin použil autor jako vnitřní kontrolu?
6. Strana 18 – Autor uvádí že: „Vpich byl prováděn do hemolymfy mezi I. a II. kyčelním kloubem na vertikální straně klíštěte.“ Tak by mě zajímalo která je vertikální strana klíštěte?
7. Strana 35 – U protilátky RaX cathB1: Zda je schopna rozlišit CathB1 od CathB2?

I přes výše uvedené připomínky jsem zcela přesvědčen, že předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 24.5.2009

Robert Fedič