



## Posudek oponenta na diplomovou práci

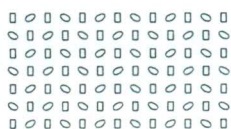
Autor práce: **Bc. David Hartmann**

Název práce: **Charakterizace a funkce Faktoru C z klíštěte *Ixodes ricinus***

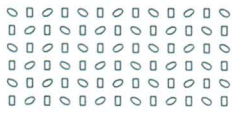
Předložená diplomová práce zpracovává na 47 stranách zajímavou problematiku přirozené imunity klíšťat, konkrétně se zabývá Faktorem C a jeho průkazem pomocí metod molekulární biologie a bioinformatických nástrojů. Práce je standardně členěná, po stručné úvodní části a vytyčení cílů následuje popis používaných metodik. Dosažené výsledky jsou dokumentovány obrázky a grafy. Diskuze a závěr shrnují stručně dosažené výsledky, nejdůležitějším výsledkem je, že Faktor C popsany u ostrorepa a klíštěte *I. scapularis* se nachází také u klíštěte *I. ricinus*. Byla určena jeho sekvence, exprese v hemocytech a vytvořeny specifické protilátky. Funkce Faktoru C u *I. ricinus* v koagulaci hemolymfy a fagocytóze naznačují data jiných autorů uvedená v diskusní části. Diplomová práce je napsána srozumitelně s malým množstvím překlepů, zdroje jsou řádně citovány.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- Nejslabší částí je Úvod o imunitě bezobratlých na prvních šesti stranách diplomové práce. Místo utříděných informací společných pro většinu bezobratlých a srovnání s imunitou obratlovců používá autor útržkovité údaje, je obtížné určit, co se vztahuje obecně na bezobratlé a co na imunitu ostrorepů a klíšťat. Chybí základní dělení na buněčnou a humorální složku imunity, o melanizaci, nodulaci a enkapsulaci se dozvídáme spíše náhodně, není ujasněn komplementový systém (stručný popis u obratlovců, cesty aktivace kaskády, analoga u bezobratlých, u jakých taxonomických skupin se vyskytuje, funkční nebo strukturní homologie...). Kromě ostrorepů by měly být zmíněny i hmyzí modely koagulace hemolymfy.
- Obr. 2 a 3 uvádí to samé, místo duplikace informací mělo být uvedeno srovnání ještě s koagulací hmyzu. Přítomnost TG (uvedená na obr. 2 ale chybějící na obr. 3) u klíšťat je uvedena v jinak odtrženém odstavci na str. 6, známé části koagulační kaskády by měly být vyznačeny např. schématem a porovnány s jinými taxony. Obrázky s anglickými popisky by měly být v česky psané práci přeloženy.





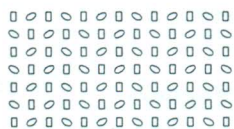


- Str. 2: „Velmi důležitá jsou granula, která jsou přítomna v 99% hemocytů tzv. amoebocyty.“ Z věty vyplývá chybné tvrzení, že granula = amoebocyty.
- Str. 2: „V ostrorepech byly nalezeny komponenty naznačující přítomnost komplementového systému, který iniciuje fagocytózu...“. U obratlovců komplement lyzuje pomocí MAC mikroorganismy a jejich zbytky jsou odstraňovány fagocytózou, jedná se zde opravdu o přímou stimulaci fagocytózy, jakým mechanismem by k tomu docházelo?
- Str. 3: „Humorální imunita je pravděpodobně úzce spojena s buněčnou imunitou, konkrétně s primitivním komplementovým systémem.“ Komplement patří do humorální imunity, ne do buněčné, propojení buněčné a humorální imunity je již bráno jako prokázaný fakt.
- Bezobratlí živočichové dokážou specificky rozpoznávat antigeny (např. IrFC také), proto bych se vyhnul tvrzení, že bezobratlí nemají specifickou imunitu, vše záleží na definicích, co si pod tímto termínem představíme, v použitém kontextu to je zavádějící.
- Jaké jiné druhy klíšťat se vyskytují v ČR (na str. 1 se píše, že to je zejména *I. ricinus*)?
- V materiálu nejsou uvedeny zdroje všech použitých chemikálií.
- Autor používal řadu náročných metod molekulární biologie, není ale zcela jasný podíl autora na jednotlivých výsledcích. Nejsou uvedeny optimalizace metod, autor tedy asi postupoval podle zavedených protokolů, pracoval samostatně?
- Diskuse je velmi krátká, navíc obsahuje výsledky jiných autorů (ty patří do výsledkové části diplomové práce, není k nim uvedena metodika, autor uvádí tyto výsledky i v závěru a anotaci). Faktor C je diskutován pouze u klíšťat a ostrorepů, proč ne u hmyzu?
- Srovnání sekvence IrFC je na obr. 14 s IsFC (podle informací v závěru query cover 100%) a na obr. 35 s ostrorepem *T. tridentatus* (podle informací v závěru query cover 98%), proč není uvedeno srovnání všech druhů v jednom obrázku? Chybí podobné srovnání s ostrorepem *C. rotundicauda* (podle informací v závěru query cover 98%).
- Str. 45: Chybně uveden Journal of innate immunity – správně J. Innate Immun.

Diplomová práce **Davidu Hartmanna** je aktuálním souhrnem informací o Faktoru C u některých bezobratlých, splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji **doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou**. Vzhledem k mým připomínkám navrhuji známku „2“, výsledné hodnocení ale určí komise s přihlédnutím k průběhu obhajoby.

Oponent: **RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.**

V Brně 7.1.2014





## Obhajoby magisterských prací 23.1.2014

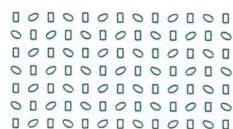
Vážený pane předsedo,

zasílám vypracovaný posudek na diplomovou práci **Bc. Davida Hartmanna** na téma „Charakterizace a funkce Faktoru C z klíštěte *Ixodes ricinus*“. Diplomová práce splňuje požadavky kladené na tento typ prací, a proto ji **doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou „2“**, **výsledné hodnocení určí komise dle průběhu obhajoby**. Zároveň se omlouvám, že se obhajob 23.1.2014 osobně nezúčastním kvůli pracovní vytíženosti v Brně.

S pozdravem,

**RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.**

7.1.2014  
V Brně .....





Posudek na magisterskou práci Bc. Davida Hartmanna

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

## Charakterizace a funkce Faktoru C z klíštěte *Ixodes ricinus*

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.

Předložená magisterská práce je vypracována v českém jazyce, obsahuje 47 stran, je logicky členěna na Úvod, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi, Závěr a Použitou literaturu.

Je psána srozumitelně, i když některé formulace a věty by zjevně potřebovaly doladit, obsahuje malé množství chyb a překlepů.

Cílem práce bylo hlavně dosekvenovat "full clone" klíštěcího Faktoru C, stanovit jeho expresní profil, připravit protilátky proti tomuto proteinu, zjistit jeho lokalizaci pomocí WB a pokusit se o KD tohoto genu pomocí metody RNAi. Cíle práce se víceméně podařilo naplnit.

### Poznámky a otázky

Úvod - je rozdělen do několika podkapitol a obsahuje úvod do problematiky klíšťat, imunity bezobratlých a imunity klíšťat, včetně zkoumaného Faktoru C.

Strana 1 - vývoj každého klíštěcího stádia netrvá přibližně jeden rok.

Strana 1 - ostrorepi nejsou fylogeneticky nejpříbuznějším druhem klíšťat v rámci *Chelicerata*.

### Materiál a metody

Strana 12 - transformace plasmidu do *E. coli* pomocí metody "heat shock" - špatná formulace.

Strana 15 - nedošlo k ligaci a přesekvenování celé délky Faktoru C z jednoho klonu - sekvence byly skládány z více přesekvenovaných kusů po RACE PCR - hrozí zde riziko variability mezi jednotlivými transkripty.

Strana 17 - Freundovo adjuvans nebylo použito dle návodu - proč chybí první vakcinace kompletním Freundovým adjuvans? Také chybí údaj, jak byl králík imunizován (subkutánně)?

Strana 19 a 20 - chybí údaje o koncentraci použitého plasmidu, PCR produktu a enzymu (U).

### Výsledky

Strana 33 - Obr. 25 - grafy výsledků qRT-PCR jsou nejednotné, popisy os nejsou podle mně správné.

Může autor vysvětlit rozdíl mezi relativní a absolutní kvantifikací exprese?

Strana 27 - Obr. 27 - tento WB by bylo třeba zopakovat.

Strana 35 - funguje tedy králičí protilátka proti Faktoru C? Je možno vůbec proteázu detekovat? Jaké velikosti produktů lze očekávat?

### Diskuze

Strana 39 - genom klíštěte byl složen na základě sekvenace gDNA a cDNA.

Strana 40 - Obr. 35 - červené rámečky neobsahují cysteiny (cys-rich region), není vysvětleno, co je to EGF\_3 doména?

Strana 42 - Obr. 38 - chybí statistika (ne jenom zde)

Obr 43 - podle mně ne zcela vhodná prezentace výsledků - je tedy signál vně nebo uvnitř hemocytů?  
Kde je okraj hemocytů?

Závěr

Strana 44 - co je to "query cover"? Jak je možné, že je 100% pro Factor C mezi *I. ricinus* a *I. scapularis*? Lze tuto sekvenci najít u jiných klíšťat?

Literatura - v pořádku

V rámci obhajoby požadují vysvětlení:

1) Strana 40 - Obr. 35 - červené rámečky neobsahují cysteiny (cys-rich region). Není vysvětleno, co je to EGF\_3 doména?

2) Strana 33 - Obr. 25 - grafy výsledků qRT-PCR jsou nejednotné, popisy os nejsou správné. Může autor vysvětlit rozdíl mezi relativní a absolutní kvantifikací exprese?

Předloženou práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 15/1/2014



RNDr. Ondřej Hádušek Ph.D.