

Oponentský posudek na magisterskou práci Barbory Plačkové:

Touha po cukru; fyziologické procesy klíštěte *Ixodes ricinus* v závislosti na hostitelské glukóze

Školitel: Mgr. Jan Perner, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Matěj Kučera

Práce Barbory Plačkové se věnovala testování významu glukózy ve fyziologii klíšťat pomocí RNA interference glukózových transportérů GLUT1-6, přímých inhibitorů transportu glukózy a také pomocí umělé diety obsahující 2-deoxy-D glukózu, která není metabolicky využitelná. Z hlediska výsledků se bohužel nepodařilo zjistit význam jednotlivých transportérů, protože ani RNAi ani inhibitory nevykazovaly žádné statisticky průkazné rozdíly. To se však může stát a nehodnotím to jako zásadní nedostatek. U RNAi však negativní výsledky mohou být důsledkem toho, že nedošlo k vypnutí genů. Zde si myslím, že byl prostor zkusit RNAi pomocí jiných úseků a trochu víc se snažit o zlepšení samotného knock-downu, aby alespoň vypnutí genu bylo potvrzeno. Takto vlastně o vlivu transportérů nelze mnoho říci.

Po formální stránce má práce dostatečný rozsah a členění odpovídá požadavkům na magisterskou práci. Bohužel, práce samotná má mnoho nedostatků, které podle mého názoru mají společného jmenovatele – nedostatek času a pozornosti věnované jak psaní a kontrole textu, tak experimentální práci samotné. Z češtinářského hlediska se zdá, že autorka má potíže s větnou stavbou, s významem slov, někdy i se skloňováním. Několik příkladů:

„Úloha metabolismu cukrů proto hraje velmi významnou roli...“

„Dále pomocí membránového sání se podařilo vyhodnotit vliv 2-deoxy-D-glukózy, nemetabolizovaný glukózový analog, ve fyziologii samičky klíštěte během příjmu potravy.“

„Z anorganických látek jsou to (v) menší míře převážně kationty (-Na⁺, -K⁺, -Ca²⁺) a anionty (-Cl⁻, -I⁻).“

„Pacienti s T1DM vyžadují doživotní závislost na exogenní injekční aplikaci...“

„Hematofágní členovci stejně jako všichni heterotrofní organismy...“

„Posléze byla syntetizována cDNA ..., jejímž templátem bylo použito 200 ng vyizolované RNA.“

„Na obrázku 18 jsou ukázány výsledky nezbytnosti glukózy v hostitelské krvi během membránového sání.“

„Z grafu (Obr. 15) je zřejmé, že využití samotného glukózového inhibitoru a zároveň jeho různé zvolené koncentrace v krevní dietě nemělo přímý vliv na váhu samic klíštěte *I. ricinus*.“

Snůška x snůška, standartní x standardní

Výše uvedené jsou jen příklady, jejichž množství místy znesnadňuje porozumění textu. Když jsem práci četl, měl jsem celou dobu dojem, že čtu bakalářskou práci, proto jsem si říkal, že je to ještě ok, že jen upozorním na chyby, aby se v diplomové práci neopakovaly. Pak jsem však zjistil, že toto už je magisterská práce, proto nad těmito nedostatky nemohu přimhouřit oči.

Úvod:

V úvodu autorka představuje význam glukózy a její metabolismus u obratlovců, včetně poruch příjmu a metabolismu glukózy. Popisuje také funkci a význam glukózových přenašečů. V dalších kapitolách přechází k bezobratlým a nakonec ke klíšťatům. Z obsahového hlediska je úvod dostatečně informativní, i když se zde vyskytují některé nepřesnosti, na něž bych se chtěl zeptat. Někdy se autorka zbytečně opakuje: Hned v prvním odstavci autorka opakuje tvrzení ve dvou větách za sebou „Největším orgánem u klíšťat je střevo a slouží zejména jako zásobárna krve. Dochází zde ke skladování krve (Sonenshine, 1991).“ Na autorku mám k úvodu tyto dotazy:

Píšete, že nejrychlejším katabolickým procesem je zpracování cukrů. **Co označujeme pojmem cukry a jaké cukry naše tělo umí přijmout z potravy?**

Dále píšete, že organickou složku plazmy tvoří albuminy, globuliny a fibrinogeny. **Kolik různých albuminů a fibrinogenů lidská plazma obsahuje?**

Na straně 6 zmiňujete mezi glykolytickými enzymy fosfofruktózu. **Jak se nazývá enzym, který máte na mysli?**

V kapitole 2.4.2 zmiňujete klíště *Boophilus microplus*. To však již dlouho není používané jméno pro tento druh. **Jaké je správné jméno tohoto klíštěte?**

Na konci úvodu je věta: „...dochází tak ke snížení intracelulárního přenosu glukózy z důvodu, že způsobuje kompetitivní inhibici glukóza-6-fosfátu pomocí hexokinázy.“ **Prosím o vysvětlení, co co inhibuje.**

Cíle práce jsou sepsány jasně a srozumitelně.

Metody jsou popsány relativně dobře, ale i zde se vyskytuje několik nedostatků, které by už v DP neměly být. Předně v tabulkách, kde jsou popisovány reakce (restrikce, ligace, syntéza RNA) je pouze množství v ul, nikoliv koncentrace látky, což je podstatný údaj, který nesmí chybět. V metodách chybí obrázek plazmidu PLL10, na který je na str. 16 odkazováno jako na Obr. 3. Na str. 17 je dvakrát po sobě popsáno složení LB média, zatímco jiné pufrů a média nejsou z hlediska složení popsány vůbec. V tomto by měly být metody konzistentní. U metod často chybí způsob vyhodnocení, je popsán jen laboratorní postup, např. kapitola 4.7.3 a 4.7.4

Otázky:

V tab. IV je údajně podtržené restrikční místo pro jednotlivé enzymy. **Je podtrženo skutečně celé restrikční místo?**

Hned v začátku zmiňujete, že sekvence byly nalezeny podle anotace v jeho (I ricinus) střevním transkriptomu. **Pokud vím, tak sekvence v transkriptomových projektech nejsou anotovány, nebo se mýlím?**

Jak je zajištěna tloušťka membrány při její výrobě?

Jak byla manuálně defibrinována krev?

Výsledky:

Výsledky jsou popsány srozumitelně, nicméně některé pasáže odpovídají svým obsahem spíše diskuzi (5.2, 5.6, 5.7). Popis výsledků by měl postupovat podle obrázků, aby čtenář nemusel listovat k odkazovaným obrázkům (kap. 5.2). Kap. 5.4.2 zaligovaný plazmid by mělo spíš být zaligovaný transkript. Obrázek 10 by měl prokazovat úspěšnou syntézu dsRNA. **Můžete popsat,**

co přesně vidíme a podle čeho lze usuzovat na úspěch? Toto mi v popisu výsledků chybí. V legendě obr. 10 popisujete „ssRNA z Apy“. Takto to nelze, musíte napsat ssRNA s Apal restričním místem nebo nějak podobně. U tabulky IX neodpovídá popis. Nikde v tabulce nevidím zmiňované časové intervaly. Dále nevím co znamená údaj 3/3/3. **Prosím vysvětlit.**

Z obr. 11 je patrné, že nedošlo ke snížení exprese pomocí RNAi. **Bylo dbáno na to, aby primery pro qPCR nasedaly jinam než do úseku použitého pro syntézu dsRNA?** Z popisu to není zřejmé.

Obr. 12 popisuje pravděpodobně jediný signifikantní výsledek, nicméně není nikde uvedena hladina statistické významnosti, ani hvězdička, která by významný rozdíl označovala. Rozdíl 50% je také sporný, soudě dle obrázku. Některé rozdíly na obr. 11 nicméně vypadají reálně, např. GLUT1 ve střevě, přesto nebyla průkaznost dosažena. **Jak by bylo možné dosáhnout statistické průkaznosti?** Na str. 33 a 34 je rozpůlený obrázek 14. To by tak nemělo být.

Diskuze:

Diskuze je na dvě stránky, přičemž první část by spíše patřila do úvodu (dokonce se zde některá tvrzení opakují i se stejnými referencemi) a druhá část, věnovaná diskuzi výsledků neobsahuje skoro žádné reference, s nimiž by výsledky byly srovnány. V diskuzi se vyskytuje také mnoho výše uvedených větněstavěbních jevů, což snižuje srozumitelnost, např. věta „Metabolismus bílkovin závisí na podstatné aktivitě metabolismu sacharidů...“. Na magisterskou práci není diskuze příliš kvalitní. Otázka: Píšete, že „díky intracelulárnímu trávení je velké množství krve zpracováno.“ **Myslíte, že kdyby trávení krve bylo extracelulární, že by bylo méně efektivní?**

Píšete, že: „Klíšťata z čeledi klíšťatovití (Ixodidae) včetně hematofágního zástupce *Boophilus microplus*, přijímají velké množství krve (Sonenshine, 1991).“ Tvrzení implikuje, že existují i nehematofágní zástupci čeledi Ixodidae. **Existují?**

Závěr je pak popsán celkem srozumitelně, i když není zvykem do závěru odkazovat na obrázky, navíc chybně (obr 12 a 13). Seznam použité literatury je, co do rozsahu a výběru prací, v pořádku.

Celkově práce působí dojmem, že už se s ní autorka nechtěla zabývat, přečíst si ji po sobě, zkontrolovat chyby apod. To bohužel snižuje kvalitu práce. Nepochybuji o tom, že experimenty autorka prováděla sama, nicméně u magisterské práce bych očekával větší snahu o vyřešení nefungujících metod (knock down RNAi). Popis metod by pak měl být konzistentnější se správným uváděním koncentrací a složení roztoků.

I přes mnohé výtky jsem přesvědčen, že práce si určitě zaslouží obhájení. S udělením známky počkám po obhajobě, zatím bych to viděl na horší **velmi dobrou**.

V Českých Budějovicích 10.7.2020

Jindřich Chmelař