



BIOLOGY CENTRE ASCR

Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ22 0710 0000 0000 0552 7231 | SWIFT CODE – CNBACZPP | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | fax: +420 385 310 388 | www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek na bakalářskou práci Bc. Terezy Křečkové „Pilotní analýza kalcium-dependentních proteinkináz prvoka *Babesia divergens*“

Ve své bakalářské práci Tereza Křečková charakterizovala kalcium-dependentní proteinkinázy, jejichž vlastnosti a role u babesií nejsou dosud objasněny. Bakalářská je zjevně součástí většího projektu a její výsledky určitě přinesly důležitá data pro navazující výzkum. Také si troufnu tvrdit, že výsledky budou platnou součástí budoucí na toto téma zaměřené publikace. Dílčích cílů měla studentka několik (rešerše na dané téma, osekvenovat predikované sekvence CDPK z genomové DNA a z cDNA, predikovat proteinové domény, rekonstruovat fylogenetické vztahy a navrhnout analýzu exprese CDPK pomocí qPCR) a hned na úvod musím konstatovat, že se se zadaným úkolem vypořádala velmi dobře. Poslední cíl byl původně více ambiciózní (provést experiment a zjistit exprese daných genů během parazitémie), nicméně i tak si myslím, že předložená bakalářská práce je co do zpracování a dosažených výsledků (a jejich interpretaci) velmi kvalitní. Musím pochválit především moc hezky zpracovanou literární rešerši. Je psána opravdu velmi přehledně, srozumitelně, a i po formální stránce je vše v pořádku. Jediný formální nedostatek v celé bakalářské práci jsem snad jen našel úplně na první straně, resp. titulní straně, kde chybí jméno bakalářské studentky, to je naštěstí na druhé straně pod čestným prohlášením, takže autorku práce lze vystopovat. V úvodu bych úplně nesouhlasil s tvrzením, že obrázek 3 ukazuje značnou blízkost mezi CDPK u Apicomplexa a *A. thaliana*. I kdyby byly tyto skupiny velmi vzdálené, takovýto kladogram by bez informace o délkách větví ukázal pravděpodobně stejnou topologii. Nicméně obrázek je převzat z publikované práce, která vyšla v kvalitním časopise, jen jsem přemýšlel, zda-li tvrdili autoři to samé, co vy na základě této analýzy. V práci se několikrát objevil anglický výraz „egress“, který by šel možná nahradit vhodným českým ekvivalentem (např. egress z erytrocytu – opuštění erytrocytu?). Metodika je na bakalářku adekvátní, svědčí o tom, že si studentka osvojila některé základní metody molekulárně biologické laboratoře. V metodice se odkazujete na tabulku III, ve které jak píšete je seznam primerů a jejich vlastností. V tabulce je uvedená T_m (55°C) shodná pro všechny primery, předpokládám, že ale nebude odpovídat predikované T_m teplotě všech jednotlivých primerů, ale teplotě kterou jste použila během PCR. V kapitole výsledků 4.2 se píše „Kódující sekvence (cDNA) tří BdCDPKs byly úspěšně zaklonovány do plasmidu pGEM®-T Easy Vector (Promega) (viz Obrázek 6), a po částech úspěšně osekvenovány“ s odkazem na tabulku III, která obsahuje seznam sekv. primerů – v tabulce se o úspěšném sekvenování ale nic nedovíme. Kapitola 4.4 obsahuje velmi podrobný popis fylogenetických vztahů jednotlivých CDPKs, který je opravdu úctyhodný, protože není úplně jednoduché vše takto pečlivě popsat. Nicméně pro lepší orientaci ve stromu mohly být hlavní skupiny, např. CDPK9 nebo CDPK6, graficky označeny ve stromu. Přes několik výše uvedených nedostatků považuji práci za velmi kvalitní, pečlivě sepsanou s hezkými výsledky. K práci mám několik otázek, které prosím u obhajob zodpovědět:

- 1) U *Babesia divergens* byly predikovány čtyři CDPKs. U určitě mnohem více probádaného parazita *Plasmodium falciparum* (pokud jsem dobře počítal) je známo sedm těchto proteinkináz (*T. gondii* dokonce osm), které mají různé funkce. Myslíte si, že je možné ještě objevit v genomu babesií



nějakou dosud neznámou CDPK? A když ano, jakou funkci by mohla mít (třeba na základě poznatků a podobností s *P. falciparum*)?

- 2) V textu je uvedeno: „Avšak stále není jasné, jak vznikají Ca^{2+} , které se již od začátku liší podle stimulu, který signalizují“ – To je zajímavé tvrzení, ale není mi jasné (nejsem odborník na biochemii), jak se mohou od sebe lišit Ca^{2+} , resp. Ca^{2+} podle stimulu. Můžete mi to prosím nějak stručně vysvětlit?
- 3) Metodika je poměrně obsáhlá a svědčí o skvělém zapojení studenta do laboratorních technik. Zajímalo by mě, jestli jste se také podílela na kultivaci a udržování kultur *B. divergens*?
- 4) Překvapila mě poměrně velká délka PCR produktů, které jste klonovala – povedlo se vám opravdu do pGEM vektoru naligovat a do buněk transformovat i produkt o délce 3883bp?
- 5) Nemám nic proti platformě IQ-TREE pro konstrukci fylogenetických stromů (občas ji používám), jen mě zajímá, proč jste sekvence alignovala v programu Geneious, poté jste strom dělala v IQ-TREE a zpět jste strom vizualizovala v Geneious, když Geneious umí stejně dobře vytvořit ML strom a bylo by to určitě jednodušší řešení (dataset není zas tak veliký, aby to Geneious nezvládl v rozumné době).
- 6) Zajímala by mě fylogeneze babesíí a theilerií – jsou tyto rody monofyletické a byl v literatuře popsán nějaký trend, který by ovlivňoval evoluce těchto parazitů (např. geografie, hostitel...)?

Bakalářskou práci Terezy Křečkové považuji za výbornou a doporučuji ji vřele k obhajobě. Hodnotím známkou výborně.

V Českých Budějovicích, 20. 5. 2022

RNDr. Ivan Fiala PhD.

Biology Centre of ASCR, Institute of Parasitology

Branišovská 31, České Budějovice, 37005

Czech Republic