

Věc: Oponentský posudek na bakalářskou práci

Bakalářská práce Matěje Miláčka se zabývá popisem funkční variability „Toll-like“ receptorů (TLR) 1B, 4 a 15 u drozdců r. *Mimus* a jejím srovnáním mezi populacemi galapážských druhů a kontinentálním *M. polyglottos*. Důraz je kladen na proteinovou strukturu a fyzikální vlastnosti jednotlivých alel TLR.

Standardně členěná práce má celkem 47 stran. Samotný text je však poměrně krátký, protože práce obsahuje 17 obrázků a 1 tabulku v hlavním textu a 2 obrázky a 6 tabulek v příloze. Všechny obrázky a tabulky jsou přitom uvedeny v seznamu příloh a čekal bych je tedy v příloze na konci práce. Obrázky a tabulky také nejsou číslovány tak, jak se objevují v textu (po Obr. 1 a 2 následuje Obr. 18, první tabulka zmíněná v textu je Tab. 2 následovaná Tab. 6). Popisky v Obr. 1 by měly být přeloženy do češtiny a popisky obrázků by obecně měly být detailnější, protože v dané podobě rozhodně nejsou samovyvětlující a jejich úlohu nahrazuje hlavní text. V úvodu autor představuje koevoluci mezi hostiteli a patogeny, TLR a modelový systém galapážských drozdců. Text je poměrně stručný a některé uváděné příklady by mohly být detailněji rozebrány (viz šatovníci a lejsčící na str. 2). Autor uvádí, že TLR po navázání ligandu aktivuje dendritické buňky prezentující antigeny na svém povrchu prostřednictvím MHC. Přesto jsou MHC geny komplexnější než TLR. Čím to může být? Přínosem práce jsou podle autora poznatky o genetické variabilitě v malých populacích a jejich přispění k ochranné genetice. Asi by stálo za to tuto myšlenku více rozvést. Skutečně jsou galapážští drozdci a TLR dobrým modelem pro takové studium, když, jak autor v úvodu uvádí, inbreeding nemá vliv na fitness galapážských drozdců a TLR jsou pod purifikující selekcí a jejich variabilita má na fitness vliv negativní?

Cíle práce jsou jasné. Metody jsou poměrně dobře popsány. Fragmenty tří vybraných TLR byly amplifikovány u více než 200 vzorků a sekvenovány na Illumina platformě MiSeq. Na základě DNA sekvencí byly spočítány statistiky popisující genetickou variabilitu. Autor na konci kap. 2.1 uvádí, že generování sekvenčních dat bylo provedeno jeho školitelem. Není mi zde jasné, zda šlo pouze o laboratorní práci nebo i analýzu DNA dat, o kterých pojednává velká část diskuze. První odstavec kap. 2.2 není moc metodický. U jednotlivých haplotypů byl určen jejich náboj, hydropatie, normalizovaný van der Waalsův objem a účinná energie dělení. Dále byla modelována proteinová struktura a analyzován povrchový náboj.

Ve výsledcích v kapitole 3.1 se autor věnuje popisu genetické variability odhalené v nukleotidových a proteinových sekvencích studovaných TLR genů. Výsledky jsou shrnuty v několika tabulkách a orientaci v nich by jistě usnadnila jejich grafická prezentace ve formě stromčeka nebo haplotypové sítě. Zvláště postrádám shrnutí zastoupení haplotypů v jednotlivých populacích. Vzhledem k tomu, že ostrovní populace drozdců řazené do čtyř druhů jsou izolované a tvoří unikátní evoluční jednotky, je překvapivé, že srovnání bylo prováděno mezi kontinentální populací *M. polyglottos* a zbytkem. Zvláště u heterozygoty mi to přijde velmi nešťastné, protože izolované populace prostě heterozygoty tvořit nemůžou. Může mi to autor nějak vysvětlit? Dále se autor věnuje údajům o náboji, hydropatii, objemu a účinné energii dělení analyzovaných pomocí analýzy hlavních komponent PCA. Tyto údaje samotné však v práci chybí. K PCA by mě zajímalo, proč jsou na Obr. 3 analyzovány kontinentální, galapážské a všechny populace dohromady, ale na Obr. 4 a 5 pouze kontinentální a galapážské. Analýza povrchového náboje je dokumentována tepelnou mapou, epogramem a samotnou vizualizací povrchového náboje na proteinu. V tepelné mapě je trochu nešťastně použito celé barevné spektrum, kdy pro mě trochu neintuitivně teplé barvy červená a fialová značí podobnost 100 a 0 procent. Epogram opakuje informaci obsaženou už na obrázcích tepelných map a je tedy asi zbytečný. Nebo není? Na vizualizacích povrchového náboje by měla být označena funkční místa a podstatné rozdíly. Případně by k nim mohly být přidány 3D modely TLR z Obr. 18.

Jak už bylo řečeno, v první části diskuze se autor zabývá variabilitou v sekvencích TLR, především pak nízkou heterozygotností pozorovanou v galapážských populacích u všech studovaných genů. Výsledky jsou interpretovány s přihlédnutím k možné výhodnosti heterozygotnosti v imunokompetenci drozdců. Dle získaných

dat jsou však TLR geny neutrální a nízká heterozygotnost je daná vysokou frekvencí jedné alely v malých a izolovaných populacích. V kratičké kapitole 4.3 autor dále tvrdí, že TLR geny dokládají obecný výskyt mezidruhového polymorfismu („trans species polymorphism“) u drozdců. Ten opět předpokládá působení selekce. A to v malých populacích, kde převažuje genetický drift u ptáků, kterým nevádí inbreeding a u genů, u kterých variabilita negativně ovlivňuje fitness. Pokud připustíme roli selekce, polymorfní alely jsou pořád vzácné. Vzal autor v potaz jejich možnou introgresi z jiných ostrovů? V poslední části diskuze se autor zabývá analýzou struktury TLR. Zajímavým poznatkem je výrazně odlišná struktura vzácného haplotypu 4 TLR1B. Autor uvádí, že může jít o nefunkční alelu, která ještě z populace nebyla odstraněna. Mohlo by jít o novou mutaci? Z jakého haplotypu by mohla vzniknout? Pochyby o celém přístupu však vzbuzuje pozorované strukturně variabilní místo u TLR4, u kterého v odpovídající oblasti nebyla pozorována žádná aminokyselinová variabilita. Ačkoli autor spekuluje o možné mutaci mimo sekvenovanou oblast, může jít o artefakt? Jak si autor představuje možné praktické využití strukturních a fyzikálních vlastností proteinů v ochranářské genetice, které opakovaně v práci zmiňuje? Jakým směrem se bude ubírat další výzkum? Zásadním předpokladem pro budoucí využití poznatků této práce je dle mého znalost příspěvku jednotlivých mutací k fitness nebo identifikace ligandů jednotlivých haplotypů. Je to vůbec proveditelné? Jak?

Předložená práce splňuje nároky kladené na kvalifikační práce na Přírodovědecké fakultě JU, ale celkově jsem z ní poměrně rozpačitý. Mám pocit, že přes pokročilé téma studentovi chybí základní pochopení problematiky. S jejím hodnocením si tak počkám až na obhajobu.

V Českých Budějovicích dne 17. 5. 2019



RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.