

Oponentský posudek bakalářské práce

Autor BP: **Miriama Pekl'anská**

Oponent BP: Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.

Název BP: **Identification of the tick NF- κ B immune pathway read-out genes in *Ixodes ricinus***

Volba tématu a formální náležitosti:

Bakalářská práce byla vypracována pod vedením RNDr. Ondřeje Hajduška, Ph.D.

Tématem práce byla identifikace cílových genů NF- κ B dráhy u *Ixodes ricinus*. Autorka předložila práci, která po formální stránce splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci. Práce je psaná v anglickém jazyce, obsahuje dostatečně rozsáhlou literární rešerši popisující rozdělení klíšťat, jejich životní cyklus, význam z hlediska přenosu patogenů a především imunitní systém klíšťat se zaměřením na dráhu Toll.

Autorka zvládla základní molekulární metody, jako jsou izolace RNA z tkání, příprava cDNA, qPCR. Dále si také osvojila práci s genomovými daty (VectorBase) a řadou softwarů například pro navrhování primerů (Primer3), pro konstrukci fylogenetických stromů (BioEdit, Mega 4), analýzu qPCR výsledků (GraphPad Prism 6), atd.

Připomínky:

1. V literární rešerši bych autorce doporučila zaměřit se více na imunitní systém klíštěte, například na popis defensinů již identifikovaných u *Ixodes scapularis* i u *Ixodes ricinus* (Tonk et al. 2014, Rudenko et al. 2007, Hynes et al. 2005, atd.). Tyto práce v textu úplně chybí.
2. V kapitole 4.2. Genome analysis bych doporučila udělat podkapitolu, která by se zabývala fylogenetickou analýzou. Sestavení fylogenetického stromu identifikovaných defensinů jistě mělo autorku naučit pracovat se sekvencemi a příslušnými softwary. Nemyslím ale, že by bylo relevantní k posouzení funkce defensinů. Spíše bych uvítala popis a znázornění typické domény pro defensiny, podle které mohou být vybraní kandidáti určeni jako „správné“ defensiny.
3. Pro konstrukci fylogenetické analýzy byly podle metod použité aminokyselinové sekvence, ale v příloze jsou uvedeny nukleotidové sekvence.

4. Při popisování obecného mechanismu RNA interference by bylo vhodné citovat původní práci popisující tento jev (citace svého školitele je ale chvályhodná :)).
5. Často je v sekci Materiál a metody uváděno množství v mikrolitrech bez uvedené koncentrace. Také jednotky „nl“ uvedené v kapitole 3.2. by měly být vysvětleny.
6. Autorka používá termín „immune genes“ ... v literatuře jsem se setkala spíše s názvy „immune related genes“. Používají se oba termíny?
7. Autorce bych doporučila popisovat výsledky v textu, ne pouze pod obrázkem. Týká se to například obr. 5 či 6.
8. Celkově mně chybí vždy zhodnocení výsledků, autorka se pouze odkazuje na obrázky či grafy, ale v textu toho moc není.
9. V obrázku 8 Cac 1-9 + Rel1 by byla lepší negativní kontrola, bohužel je tam patrný band o stejné velikosti jako očekávané produkty.
10. U obrázku 1 je neúplná citace práce, ze které byl obrázek převzat.

Dotazy:

1. Mohla by autorka objasnit, podle jakých kritérií vyhledávala v genomu *I. scapularis* defensiny? Co sloužilo jako „templát“?
2. Jaký vztah k sobě mají již popsané defensiny (např. DefMT2-7 popsané v pracích Tonk et al. 2014, Rudenko et al. 2007, atd.) a defensiny identifikované autorkou? Nehledáte něco, co již bylo popsáno?
3. Mohla by autorka popsat tabulku I? Jak se liší kolonka BS (vazebná místa) a příslušné vazebné domény pro Dorsal 1 a 2?
4. Autorka používá stejné PCR podmínky pro amplifikaci fragmentů z cDNA i z genomové DNA, kdy se předpokládané amplikony značně lišily velikostí (103 pb. pro cDNA templát versus 2766 pb. pro gDNA templát). V řadě případů dostala při testování navržených primerů negativní výsledky. Není možné, že upravením podmínek PCR by bylo dosaženo jiných výsledků?
5. Chtěla bych se autorky zeptat, zda nejsou dostupné transkripty *I. ricinus* či *I. scapularis*, ze kterých by se dalo určit, zda příslušné defensiny jsou či nejsou exprimovány?
6. Očekáváte nějakou bazální expresi defensinů i za normálních podmínek (bez stimulace imunitního systému)?

7. V obrázku 9B, ve druhém sloupečku byla skutečně detekována hladina Rel1?
Knock down samotné cac2 jste neověřovali?
8. Chystáte se studovat dráhu Rel2 a očekáváte její vliv na expresi defensinů?

Hodnocení práce:

Předložená práce splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci jak množstvím experimentální činnosti, tak rozsahem a kvalitou rešeršního úvodu. Před obhajobou navrhuji práci hodnotit jako velmi dobrou.

V Českých Budějovicích, 15. 5. 2018



Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.