

Oponentský posudek bakalářské práce Anny Juranové na téma: Stanovení expresních profilů prokineticinů v různých stádiích klíštěte obecného

Bakalářská práce Anny Juranové se zabývá charakterizací klíštěcích prokineticinů, zejména pak profily jejich exprese v různých stádiích a tkáních. Navazuje tak na dlouholetou tradici výzkumu klíšťat na Katedře Medicínské Biologie.

Práce je přehledně členěna na 9 kapitol. Po krátkém úvodu a shrnutí cílů práce následuje Literární rešerše, která na osmi stranách popisuje klíštěte obecné a jeho parazitální interakci s hostitelem. Dále se rešerše věnuje prokineticinům u obratlovců a bezobratlých a jejich vlivu na fyziologické procesy v organismu. Rešerše je napsána srozumitelně a dané téma pokrývá do dostatečné hloubky. Přesto je v textu několik něšťastných formulací. Na str. 5 je použit termín „Imunitní únik klíštěte“, který není zcela srozumitelný; nebo v sekci o prokineticinech se opakuje informace o vlivu na ileum morčete hned 4x.

Další kapitolou jsou Materiál a Metody, ve které autorka uvádí informace o experimentálních zvířatech a zacházení s nimi. Dále popisuje metody izolace tkání klíšťat, izolace RNA z těchto tkání, přepis do cDNA a detaily RT-PCR. Tato sekce je prezentována se všemi detaily potřebnými pro případné opakování experimentů a považuji ji za zdařilou.

V kapitole Výsledky jsou prezentována data z přípravy cDNA, určení účinnosti primerů a samotné měření exprese prokineticinových genů ve vzorcích. Data na obrázcích 3 a 4, kde jsou prezentovány Ct hodnoty jsou v textu vyhodnocena chybně. Nižší Ct hodnoty jsou zde prezentovány jako nižší exprese, což neplatí. Dále v textu k obr. 5 a 7 už je popisek správně. Stanovení účinnosti primerů bylo úspěšné pro 2 z 10 testovaných dvojic primerů, což není mnoho. Autorka diskutuje možné příčiny dále v textu. Na obrázku 7 je zvláštní, že nebyla zaznamenána hodnota Ct pro 10 000x ředění. Odhadem by byla kolem 33. cyklu, což není tak pozdě. Navíc ostatní ředění vykazují konzistentní hodnoty. Příčinou mohla být kromě vysokého ředění i pipetovací chyba. Na obrázku 9D není jasné, jestli pro vzorek D3 byla naměřená hodnota nula nebo jestli pro tento vzorek chybí data. Kromě výše zmíněných komentářů je výsledková část zpracovaná dobře. Velké odchylky a tím pádem nízkou relevanci výsledků by šlo vyřešit opakováním měření nebo zvýšením množství vzorků v jednotlivých replikátech. Chápu ale, že celý proces je časově náročný a zřejmě na něj v průběhu Covidové pandemie a lockdownů nebyl čas.

Diskuze se zabývá zejména možnými důvody nízké účinnosti primerů a navrhuje jejich řešení. Dále pak popisuje možné účinky prokineticinů v interakci mezi klíštětem a hostitelem, které by mohly být tématem dalšího výzkumu. V diskuzi nesouhlasím s tvrzením, že: „Příkladem by mohla být kontaminace vzorků DNA, která je podle mého názoru nepravděpodobná, i když NTC vyšla pozitivní.“ Dle mého názoru je v případě pozitivní NTC kontaminace pravděpodobná, zejména když vyšla podobně jako by měl vyjít nejvíc nařazený vzorek.

Po diskuzi následují Shrnutí, Seznam zkratk a Seznam literatury, ke kterým nemám kritické připomínky.

K bakalářské práci mám následující otázky, které prosím odpovězte v průběhu prezentace, pokud se to hodí, nebo na konci:

1. K sajícím samicím klíštěte *I. ricinus* byli přidáni samci. Jaký to mělo důvod, když samci krev nesají? Jak by sání samic klíšťat probíhalo bez samců?
2. Expres prokineticinů byla naměřena ve střevě klíšťat. Jakou tam mohou plnit roli?
3. Jednotlivé replikáty RT-PCR byly zřejmě hodně variabilní a proto jsou v měřeních vysoké odchylky. Byly tyto odchylky zaznamenány i u housekeeping genů nebo pouze u prokineticinů?
4. Jak by šlo ověřit, jestli byl naměřený signál specifický nebo se jednalo o tvorbu dimeru primerů?

Přes určité výtky, které k práci mám, se domnívám, práce splňuje podmínky na ni kladené a že se v průběhu autorka seznámila s metodami molekulární biologie, které může uplatnit při budoucím studiu nebo zaměstnání. Bakalářskou práci Anny Juranové doporučuji k obhajobě s výsledným hodnocením závislým na ústní prezentaci práce autorkou.

V Hamiltonu, Montana, USA, 17. května 2022

Jan Kotál, PhD.