

Oponentský posudek na bakalářskou práci Kláry Charvátové „Variabilita TLR2 receptoru u hrabošovitých hlodavců (Arvicolidae) napříč Evropou, v závislosti na parazitovanosti hostitele“

Bakalářská práce je určitou pilotní studií pro zjištění, zda-li TLR2 receptory hrabošovitých jako hostitelů vši a kokcií vykazují variabilitu závislou právě na parazitovanosti hostitelů zmíněnými cizopasníky.

V první části úvodu (kap. 2.1) se autorka zaměřila na charakteristiku hostitelů – tří druhů hrabošovitých, což chválím, protože je důležité podat přehled nejen o parazitech ale i o hostitelích. Ovšem charakteristika parazitů mohla být mnohem podrobnější. Postrádal jsem např. konkrétní příklady druhů r. *Eimeria* (+ jejich charakteristiku), které byly nalezeny u hrabošovitých a se kterými se v práci můžeme potkat. Obr. 2 postrádá popisky k jednotlivým stádiím a věřím, že i existuje sofistikovanější zdroj než je uvedený web vsi.nazory.cz. Kapitola 2.2, která je věnována imunitní obraně hostitele je napsána přehledně, stručně a jasně. Trochu nezvykle působí kapitola 2.2.2, která obsahuje tři oddíly nazvané podle autorů článků a jde vlastně o rešerši těchto několika prací. Tab. I udává seznam jednotlivých typů TOL receptorů a příslušných ligandů a původ těchto ligandů. Tabulka se týká ale pouze bakteriálních a virových ligandů a chybí jakákoli informace o TOL receptorech a parazitech (ve smyslu eukaryotický parazit), kterým se věnuje bakalářská práce. Částečně na toto zodpovídá text na straně 10 a 11.

K práci mám následující kritické poznámky a otázky:

Proč byl zvolen právě TLR2, když pro *Eimeria* spp. byla zjištěna pozitivní asociace s TLR7, TLR9 a TIR (Jackson a kol 2009) a TLR4 a MyD88 podle Zhou a kol. (2013)?

V metodice a na jiných místech v textu se lokality dělí podle států – např. vzorky z Maďarska, Bulharska, Ruska atd. I když je uvedena mapka s místy odchytů, lokality mohly být blíže specifikovány – Rusko je obrovská země a jedna lokalita při hranici s Estonskem nereprezentuje Rusko jako celek. Navíc u řady jiných lokalit se jedná o odchyt v příhraničí a lokalita z jihu Maďarska je určitě charakterem jiná než ta u hranice se Slovenskem. U metody PCR chybí koncentrace použitých nukleotidů, primerů a počet jednotek polymerázy – uvedení objemů není dostačující informace. Nikde jsem se nedočel o délce amplifikovaného úseku, respektive o délce alignmentu/datasetu, který byl použit pro analýzu – toto je velmi důležitá informace vzhledem k věrohodnosti analýzy. Chybí informace jakou metodou byl vytvořen alignment, stejně tak detaily k metodice konstrukce fylogenetických stromů, použité parametry, zvolený model pro ML atd. prakticky chybí úplně. Stejně tak jakékoli bližší údaje k analýze haplotypové sítě. Je nedostatečné udat pouze program, ve kterém byla analýza provedena.

Výsledky jsou poměrně stručně shrnuty na pouze jedné stránce a několika řádcích (+ tři stromy na obrázcích). Tabulka IV. by mohla být rozšířena o údaje z jednotlivých lokalit včetně počtu hostitelů u jednotlivých lokalit. Tyto údaje lze získat z Tab VI v příloze, nicméně je to poměrně pracná záležitost.

Část výsledků práce je založena na odchycích, které se prováděly po několik let a není problém, že tyto data studentka sama nezískávala. Nicméně by mne zajímalo, jestli se autorka účastnila se svojí školitelkou nějakých odchytů a vyzkoušela si tuto metodiku?

Není úplně nejšťastnější v jednom odstavci výsledků (odst. 2) shrnout počty odchycených hlodavců a zároveň výsledky fylogenetických analýz.

Ve výsledcích se udává, že celkem 13% vzorků hlodavců bylo molekulárními metodami určeno jako jiný druh. Přesto jeden z pěti bodů Závěrů je, že díky molekulární analýze byla zjištěna správnost určení odchycených druhů hlodavců. Jaká je tedy pravda? A není možné, že těch 13% by mohlo z určité části pramenit např. z kontaminace při zpracování vzorků molekulárními metodami?

Udáváte hodnotu podpory větvení pro všechny druhy 0,5 pro posterior probabilities v rámci BI. Tato hodnota ovšem není srovnatelná s ML nebo MP a nemůže se tedy tvrdit, že co má PP podporu vyšší než 0,5 je dobře podpořeno (defakto hodnoty pod 0,9 jsou velmi nízké podpory). V práci nejsou zmíněny vůbec výsledky z analýz dosažené programem Phym1 – domnívám se, že v něm byla provedena ML – jaké byly podpory pro tuto analýzu? A byla topologie stromů obdobná těm z BI?

Domnívám se že, kromě prezentovaných fylogenetických stromů, by bylo vhodnější uvést informaci o SNP v jednotlivých sekvencích – kolik jich bylo detekováno, kolik je synonymních a kolik nesynonymních. Pokusila jste se o toto vyhodnocení, případně plánujete ho?

Dovolil bych si nesouhlasit, že vzorky z Bulharska náleží k druhu *M. agrestis* v analýze prezentované na obr.6. Podle mne patří druhu *M. arvalis*, protože vykazují blízkou přítomnost právě k druhu *M. arvalis* z genové banky. Nemohlo dojít ke špatné determinaci hostitele?

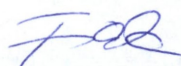
V diskuzi se píše, že vzorky byly účelově vybrány tak, aby každá lokalita obsahovala vzorky s parazity. Není to ale v rozporu s ideou celé studie, kdy se snážíte najít rozdíly v TLR2 u parazitovaných a neparazitovaných hostitelů. Domnívám se, že lokalita úplně bez parazitů by mohla ukázat kýžený rozdíl v sekvenci TLR. Prosím o reakci na můj komentář.

TLR je zodpovědný kromě parazitů za odpověď na infekci bakteriemi a viry. Jak byste byla schopna případnou variabilitu v TLR dát do souvislosti s nákazou *Eimeria* spp. a vešmi, když by to mohla být spíše reakce na jinou infekci (bakterie, viry). Zjišťovali jste přítomnost např. borelií?

V diskuzi zmiňujete pokračování výzkumu a použití více sofistikovaného programu Phase. Jste opravdu přesvědčena, že by tento program mohl ukázat variabilitu v TLR u vámi analyzovaného datasetu?

I přes vznesené připomínky doporučuji práci k obhajobě. Studentka v laboratoři bezesporu odvedla dobrou práci. Ovšem v interpretaci výsledků jsou bohužel mezery. Práci hodnotím zatím známkou velmi dobře až dobře,

V Českých Budějovicích, 21. 5. 2018



RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.