

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Elišky Kalinové:

Imunitní geny v tukovém tělese klíštěte *Ixodes ricinus*

Tématem předložené diplomové práce o 66 stranách je imunitní systém klíšťat. Studentka identifikovala nejvíce exprimované imunitní geny v komplexu vzdušnice/tukové těleso klíštěte *I. ricinus* a dále zkoumala změny v expresi těchto genů v reakci na infekci klíšťat grampozitivní bakterií *Micrococcus luteus*, gramnegativní bakterií *Escherichia coli* a kvasinkou *Candida albicans*. Rovněž studentka za použití RNA interference zjišťovala roli signální dráhy Toll ve fagocytóze mikrobů hemocyty.

Diplomová práce je členěná do kapitol Úvod, Literární přehled, Cíl práce, Materiál a metody, Výsledky a diskuze, Závěr, Seznam použitých zkratk a Literatura. Nestandardní na členění práce je umístění seznamu použitých zkratk před Úvod a dále spojení výsledků a diskuze do jedné kapitoly.

Text práce obsahuje spíše menší množství překlepů a pravopisných chyb. Místy lze nicméně narazit na nepřesná či kostrbatá slovní spojení. Toto, spolu s občasným použitím příliš dlouhých souvětí, komplikuje správné pochopení textu. Dále mám ke způsobu, jakým je práce napsaná, tyto výtky:

- V textu se hojně vyskytují anglické termíny, které lze snadno přeložit do češtiny. Jedná se o česky psanou práci, a tudíž bych se vystříhala použití výrazů jako jsou fat body signals, lectins, template-primer mix, nuclease-free H₂O, primer size či goat anti-rabbit.
- Latinské názvy psané kurzívou (např. *Drosophila* či *Borrelia*) by se neměly skloňovat.
- Při prvním zmínění živočišného druhu v textu by mělo být použito nezkrácené rodové jméno.
- Studentka by si měla dát pozor na správné psaní názvů genů a proteinů. U celých názvů genů a jmen či zkratk proteinů se kurzíva nepoužívá. Kurzívou by ale měly být psané symboly genů.
- V textu práce jsou citovány vědecké články či knihy, z nichž studentka čerpala informace. Tyto odkazy na zdroj jsou však často umístěny spíše na začátku než na konci celé přejaté pasáže, což je dost matoucí. Čtenář má totiž pak dojem, že některá tvrzení v práci citacemi podložena nejsou.
- Dost mi vadilo, že v literárním přehledu je nadužívána citace Sonenshine et al. 2014a. Tato citace odkazuje na knihu. U některých tvrzení by ale bylo jistě vhodnější místo knihy citovat originální vědeckou práci. Navíc je vždy lepší citovat konkrétní kapitolu knihy, z níž byly čerpány informace, a její autory spíše než celou knihu.
- V textu práce lze narazit na zkratky, u nichž není uveden jejich význam a ani nejsou zahrnuty v seznamu v použitých zkratk. Jedná se například o zkratky GILT, rpm, DTT, TNF α či AMK. Co se týče vlastního seznamu použitých zkratk, v česky psané práci mi přijde jako dobrý nápad uvést význam zkratky v češtině a do závorky dále napsat příslušný anglický termín. Takto by tomu ovšem mělo být u všech zkratk. Bohužel v seznamu je u některých zkratk uveden pouze anglický název a u jiných je zase uveden pouze název český.

Literární přehled dobře doplňuje experimentální část práce. Studentka se napřed správně věnuje obecným záležitostem, jako jsou morfologie a životní cyklus klíšťat či patogeny přenášené klíšťaty. Posléze se teoretická část práce zaměřuje na témata přímo související s imunitním systémem klíšťat, tedy na tukové těleso klíšťat, tři základní signální dráhy, fagocytózu a peptidy/proteiny zapojené v humorální imunitě. Součástí literárního přehledu jsou dva obrázky, na něž však chybí odkazy v textu. Popis obrázku 2 mi nepřijde dostačující, protože neinformuje o všem, co lze na obrázku vidět.

Předložená práce neměla pouze jeden cíl, ale více cílů, a tudíž by se kapitola **Cíl práce** měla jmenovat spíš Cíle práce. Bylo by přehlednější, kdyby místo dlouhého souvětí byly cíle práce uvedeny v několika stručných bodech.

Z kapitoly **Materiál a metody** vyplývá, že studentka si musela osvojit širokou škálu dovedností, jako jsou analýza transkriptomických dat, pitva a injekce klíšťat, kultivace bakterií a kvasinek, konvenční PCR, RT-qPCR, RNA interference, *in vitro* fagocytární eseje a práce s fluorescenčním mikroskopem. Metodika je vesměs popsána tak, aby bylo možné pokusy zopakovat. Výjimkou je popis provádění fagocytárních esejí, kde některé informace chybí. Není zde například vůbec zmíněno, že byla použita primární protilátka proti *C. albicans*. Dále v sekci Materiál a metody postrádám odstavec věnovaný statistice. V tomto odstavci by mohlo být napsané, v jakém programu byly vytvořené grafy, jak jsou data v jednotlivých grafech prezentována a jaké statistické testy byly použity k analýze dat.

Výsledky jsou přehledně prezentovány prostřednictvím devíti obrázků a dvou tabulek. Celkově se mi design experimentů i zvolený způsob prezentace výsledků líbí. Většina výsledků je diskutována a porovnávána s řadou relevantních studií. Přesto mám i k této části práce několik připomínek.

- V práci vůbec nejsou zmíněny výsledky pokusu, v němž se studentka prostřednictvím RNA interference pokoušela umlčet gen pro transkripční faktor Relish.
- V tabulce IX by vedle průměrné hodnoty TPM měla být uvedena i směrodatná odchylka, aby bylo možné míru exprese jednotlivých genů spolehlivě srovnávat.
- Co se týče dat graficky znázorněných na obrázcích 5–9, nikde není napsáno, jaká metoda byla použita k vypočtení hodnot relativní exprese jednotlivých genů.
- V popiscích obrázků 5–9 není uvedeno, zda čísla na ose y představují procenta či nikoli a zda bílé či modré sloupčky v grafech znázorňují průměr či třeba medián. Dále by pro výpočet statisticky signifikantních rozdílů mezi skupinou injikovanou PBS a dalšími čtyřmi skupinami neměl být použit *t*-test. *T*-test se totiž užívá pouze ke srovnání dvou skupin.
- Nikde v práci není uvedeno, jak hodně se díky RNA interferenci snížila exprese genu pro Cactus 1. Tato informace by v textu určitě neměla chybět.
- V popisku obrázku 11 není uvedeno, zda barevné sloupce v grafech znázorňují průměr nebo třeba medián a zda chybové úsečky představují směrodatnou odchylku (SD) či střední chybu průměru (SEM).

Hlavní přínosy práce jsou shrnuty v několika bodech v kapitole **Závěr**. Lze konstatovat, že vytyčené cíle práce se podařilo splnit.

Seznam literatury čítá přes 100 prací. Použité literární zdroje jsou sepsány v jednotném stylu a všechny odkazy uváděné průběžně v textu práce skutečně mají odpovídající citaci v seznamu použité literatury.

Na studentku mám následující otázky, které doufám, že mi zodpoví během obhajoby:

- 1) Proč je pojem vzdušnice/tukové těleso v textu práce psán kurzívou?
- 2) Na str. 15 tvrdíte, že u klíšťat buněčná imunita zahrnuje hemocyty a humorální imunita zahrnuje primitivní komplement, AMP a imunitní signalizační dráhy. Jsou ale imunitní signální dráhy skutečně komponentou pouze humorální imunity?
- 3) Proč protokol qPCR (str. 30, tabulka VI) zahrnoval 50 cyklů? Dle mé zkušenosti jsou produkty, co se začnou objevovat po 40. cyklu, nespecifické.
- 4) Pokud byla T_m navržených primerů cca 60 °C (str. 30), je skutečně ideální jako teplotu nasedání primerů zvolit též 60 °C (tabulka VI)?

- 5) Kolik z 20 navržených párů primerů (tabulka VIII) Vám fungovalo hned napoprvé a kolik párů primerů jste musela znovu navrhovat?
- 6) Gen pro TIL-doménový protein se zdá být nejhojněji exprimovaným genem v komplexu vzdušnice/tukové těleso (tabulka IX). Pokud tento protein nemá roli v imunitní reakci klíštěte vůči mikrobům, jaká by mohla být jeho jiná funkce v klíštěti?
- 7) Jakou roli má protein označovaný zkratkou GILT v imunitních procesech?
- 8) Dle obrázku 6e (str. 42) se exprese genu pro protein GILT zvyšovala v čase. Nejméně byl gen exprimovaný v časovém intervalu 6 hod a nejvyšší exprese nastala v časovém intervalu 48 hod. Jak si postupné zvyšování exprese tohoto genu vysvětlujete?
- 9) Jaké jsou podobnosti a rozdíly mezi signální dráhou Toll u bezobratlých a TLR signalizací u savců?

Na závěr lze konstatovat, že předložená diplomová práce přináší nové poznatky ohledně reakce imunitního systému klíštěte vůči mikrobům. To, že práce rozšiřuje současný stav poznání, potvrzuje i fakt, že data získaná studentkou jsou součástí připravované publikace. Navzdory mým četným připomínkám se domnívám, že práce splňuje požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci, a **doporučuji ji proto k obhajobě**. O známce rozhodnu dle průběhu obhajoby.

V Českých Budějovicích dne 16. 5. 2023

.....
Mgr. Adéla Chlastáková, Ph.D.