

Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autor: **Bc. Veronika Pavlasová**

Název: **Identification of physical and chemical factors regulating gene expression and infectivity of the Lyme disease spirochetes**

Školitel: **RNDr. Radek Šíma, Ph.D.**

Předkládaná magisterská diplomová práce se věnuje problematice změn exprese genů spirochéty *Borrelia burgdorferi* v závislosti na fázi životního cyklu tohoto patogena. Vybrané sledované geny mají vliv jak na infekci klíšťat boreliemi a setrvání borelií v klíšťecím vektoru, tak na úspěšnou kolonizaci teplokrevného hostitele. Práce se zaměřuje se především na zjištění konkrétních fyzikálních a chemických faktorů, které expresi těchto genů regulují.

Formální úprava:

Diplomová práce psaná anglicky je tvořena 39 stranami vlastního textu doplněného seznamem literárních zdrojů, který čítá 125 prací. Práce je logicky rozčleněna do úvodu, cílů práce, materiálů a metodiky, výsledků, diskuze a závěru. Formální úpravě nemám co vytknout.

Úvodní část pojatá jako literární rešerše se věnuje nejprve klíšťatům obecně, podrobněji pak popisuje životní cyklus klíšťat rodu *Ixodes*. V další podkapitole se zaměřuje na klíšťaty přenášené patogeny, zejména na zkoumanou spirochétu Lymeské boreliózy. Největší důraz je kladen na popis regulace genové exprese *Borrelia burgdorferi* v klíšťecím vektoru, při přechodu do savčího hostitele a úspěšné přežívání borelií v teplokrevném organismu. Text je napsán čtivě a je dobře doplněn citacemi literárních zdrojů. Z mého pohledu by však mohla být rešerše trochu rozsáhlejší.

Cíle jsou definovány přehledně ve třech bodech.

Kapitola Materiály a metody je zpracována podrobně a pečlivě. Autorka zvládla náročnou práci s pokusnými zvířaty, při které musela prokázat velkou šikovnost při stimulaci genové exprese borelií v klíšťatech jak injikační metodou, tak metodami arteficiálního krmení. Dále popisuje všechny molekulárně biologické metody použité k detekci borelií a ke sledování změn exprese jejich vybraných genů. Poslední podkapitola je věnována statistickým metodám použitým k analýzám dat.

Výsledková část je zpracována na 14 stranách doplněných 8 přehledně zpracovanými grafy a 1 tabulkou, v diskuzi autorka na 6 stranách kriticky hodnotí získané výsledky a porovnává je s dosud publikovanými pracemi. Veškeré výsledky jsou pak shrnuty v závěru.

V příloze je připojen seznam a složení použitých roztoků.

Práce rovněž obsahuje seznam použitých zkratk, což usnadňuje orientaci v textu.

Kritické poznámky:

Práce je po formální stránce pečlivě zpracována, je napsána velmi dobrou angličtinou a je v podstatě velmi zdařilou přípravou pro publikaci v impaktovaném časopise. Proto jediná nepřesnost, které se autorka dopustila, je používání mezer mezi číslem a znakem pro procenta, což se v anglicky psaném textu nedělá. A na str. 14 v podkapitole 3.2 zmiňuje CB43 infikované myši, co však znamená CB43 je vysvětleno až v části 3.3

Otázky na autorku:

- Str. 14: V části Materiály a metody máte v podkapitole 3.3 uvedeno, že k infekci larev klíšťat boreliemi bylo využito sání neinfekčních larev (cca 100 ks/myš) na infekčních myších. Klíšťata byla na přítomnost borelií testována po svlečení do stádia nymf. Kolik nymf bylo z každé myši testováno na přítomnost borelií?
- Str. 14: Jakým způsobem probíhala izolace DNA z klíšťat? Byly mechanicky mělněny? Byla měřena čistota a koncentrace izolátů?
- Str. 21 a další: Při sledování hladin relativní exprese boreliových genů jsou výsledky statistického porovnání vyznačeny jako statisticky významný rozdíl na hladině významnosti P. Jsou ale ještě popsány parametry H a F. Můžete mi prosím vysvětlit, co tyto zkratky a za nimi uvedené hodnoty znamenají?
- Obr. 5 str. 23: Kolik vzorků v každé skupině bylo použito pro měření relativní exprese sledovaných genů? Rozumím dobře, že pouze 2? Není tím ovlivněna negativně statistická analýza?
- Str. 25: Je velice zajímavé, že injekce nejen roztoků živin, ale i samotné vody do rektální ampule vedla ke zvýšené expresi *ospC* boreliemi. Ukazuje to na možnost, že k mobilizaci spirochét může vést i pouhé naředění obsahu střeva klíštěte. Čím si vysvětlujete, že k tomu nedošlo v případě *bbk32*?
- V diskuzi nabízíte možné vysvětlení faktu, že roztok aminokyselin použitý ke krmení klíšťat vedl ke smrti klíšťat při krmení kapilárou a k nepřisátí či dokonce odpadnutí klíšťat u arteficiálního krmení na membráně. Plánujete další pokusy, aby se ukázalo, zda hlavní roli hraje opravdu glycin?

Práce beze sporu splňuje nároky kladené na magisterskou diplomovou práci Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, proto ji doporučuji k obhajobě.

V Plzni dne 11.5. 2022

RNDr. Kateřina Černá, Ph.D.