

Oponentský posudek na bakalářskou práci **Šárky Borsodi** „Vývoj fluorescenční reportérové linie *Babesia divergens*“

V předložené bakalářské práci se **Šárka Borsodi** zabývala studiem patogenu hovězího dobytka *Babesia divergens*, kterého má Laboratoř imunologie vektorů Parazitologického ústavu BC AVČR k dispozici v *in vitro* kultuře. Konkrétně šlo o zavedení a optimalizaci metody vyhodnocování parazitémie *B. divergens*, ověřením citlivosti daného patogenu na blasticidin, určením efektivní inhibiční koncentrace této selekční drogy, vytipováním a osekvenováním 5' a 3' UTR vhodných pro přípravu navrženého GFP plazmidu, jehož strategie konstrukce byla na závěr ověřena *in silico* klonováním. Studentka všechny zadané cíle splnila a na dosažené výsledky bude navazovat ve své diplomové práci.

Práci považuji za velice zdařilou jak po formální stránce, tak po obsahové. Práce je napsaná jasně s dobrou češtinou s určitým množstvím překlepů a nepřesností, např. v česky psané práci bych doporučila užívání českých termínů „a kol.“ místo „et al.“, „klindamycin a chinin“ místo „clindamycin a quinín“, „trypanosomy“ místo „Trypanosomy“; na stránce 34 dle mého názoru chybí část textu specifikující počet predikovaných promotorů u 5' UTR HSP 70 *B. divergens*; v seznamu literatury chybí téměř v každém názvu článku u latinských jmen druhů kurzíva. Úvod zahrnující první cíl práce, jímž byla řešena na téma „Strategie genetického inženýrství u parazitů rodu *Babesia*“ a rovněž metodika práce jsou přehledné. Výsledky jsou srozumitelně shrnuty. Diskuse je pečlivě vypracována, shrnuje a porovnává dosažené výsledky s publikovanými daty. Celou práci vhodně doplňují kvalitní obrázky a tabulky.

K práci mám následující otázky a připomínky:

- 1) V úvodu na str. 1 a potom opakovaně na str. 5 tvrdíte, že babesioza je jednou z nejčastějších parazitických chorob přenášených krevní transfuzí. Zajímalo by mně, který druh babesie je nejčastěji přenášený touto formou a jestli v tomto aspektu existují rozdíly dané rozšířením druhů babesií?
- 2) V úvodu na str. 2 se zmiňujete, že "fylogeneze této čeledi (zřejmě Babesiidae i když v textu chybí bližší specifikace) je založena hlavně na morfologii a nověji i molekulární analýze. Může autorka blíže vysvětlit toto tvrzení? Byla opravdu myšlena fylogeneze nebo spíše taxonomie?
- 3) V úvodu mě zaujalo tvrzení, že babesie stejně jako všechna Apikomplexa nemají geny umožňující využít RNA interferenci ke kontrole translace genů. Jsou nějaké druhy z této skupiny, u jejichž genů se alespoň částečně RNA interference povedla?
- 4) Mohla by kombinace antibiotik přítomných v kultivačním médiu ovlivňovat účinnost rezistence buněk založené na ampicilinu nebo se dá takový efekt úplně vyloučit?
- 5) Tvrzení, že jste k určitému účelu používala již ověřené primery (str. 18 a 29) by bylo vhodné doplnit o nějakou referenci v literatuře, pokud je dostupná.

6) Je metoda průtokové cytometrie využitelná pro určení parazitémie *B. divergens* i v celkové krvi nebo jenom pro *in vitro* kulturu parazita výhradně obsahující erytrocyty? Předpokládám, že metoda byla v práci použita pro detekci trofozoitů a merozoitů v infikovaných erytrocytech – dají se pomocí této metody odlišit různá vývojová stadia parazita během jeho životního cyklu a jak si představujete, že by vypadala taková data na výstupu z průtokové cytometrie?

7) Jak jste se zmínila, u *B. bovis* a *B. bigemina* se dnes rutinně využívá zavedených stabilních transfekčních systémů (Suarez & McElwain, 2010). Jsou tyto systémy podobné tomu, který v práci navrhuje vy pro *B. divergens*, případně čím se liší?

8) Dokázala byste identifikovat důvod(y), proč fixované buňky nebyly obarvené SYBR safe a pomocí propidium jodidu byly obarveny jenom částečně ve srovnání s mnohem účinnějším ethidium homodimerem?

9) I když je pokračování tématu předmětem vaší diplomové práce, zajímalo by mě, jestli již máte nějaké předběžné laboratorní výsledky ohledně postupného sestavování navrženého GFP plazmidu pomocí Gibson assembly reakcí?

Práci považuji za zdařilou a vřele doporučuji k obhajobě. Hodnotím ji zatím známkou výborně, ale závěrečné hodnocení sdělím až po obhajobě.

V Českých Budějovicích, 3. 1. 2022

RNDr. Pavla Sojková, Ph.D.