



**Posudek oponenta na bakalářskou diplomovou práci Anety Zemanové
„Studium dráhy pro syntézu mastných kyselin u klíštěte *Ixodes ricinus*“**

Bakalářská práce Anety Zemanové se zabývá studiem vybraných genů dráhy pro syntézu mastných kyselin a vyhodnocuje vliv umlčení těchto genů na fyziologii klíštěat. Přípravou protiklíštěcí vakcíny se – zatím víceméně neúspěšně – zabývá několik vědeckých týmů po celém světě a metabolismus mastných kyselin je jistě jedním ze zásadních procesů nejen u krevsajících členovců. Dokud vědecká veřejnost považuje možnost vakcinace proti klíšťatům za reálnou, pak všechny výzkumy tohoto druhu jsou na místě a téma předložené práce považuji za přínosné.

Po formální stránce má předložená práce tradiční členění a rozsahem čítajícím 32 stran patří mezi úspornější, což je dáno hlavně stručným literárním přehledem psaným na šesti (!) stranách a dvoustránkovou diskuzí. Předpokládám, že předložená práce je autorčiným prvním odborným textem, a tudíž se v práci opakovaně objevují některé gramatické a stylistické chyby, těžkopádné nebo naopak příliš zkratkovité formulace a překlady, např.:

- překlady v nadpisech (*Závěr*) a tabulkových údajích (Tab. 8 – 67 % metamorfovaných nymf je 28 ze 42, ne opačně);
- laboratorní žargon (*elektroforéza v agaróze, doběhnutí reakce, produkt byl zatransformován, váha klíštěat vs. hmotnost klíštěat* atd.);
- všechna jména a příjmení použita ve větě je třeba skloňovat (např. v poděkování: ...*děkuji Sazzadu Mahmoodovi*);
- řadové číslovky píšeme s tečkou (*3.-5. den sání*)

Jak jsem již zmínila, literární přehled je dosti stručný a těžiště práce tkví v metodické části; úspěšnému umlčení genu pomocí RNA interference musí předcházet stanovení expresního profilu daného genu zahrnující přípravu cDNA z různých klíštěcích vývojových stádií a orgánů, navrzení funkčních primerů a relativní kvantifikaci daných genů pomocí qPCR. Příprava dvouvláknové RNA pak vyžaduje pečlivou a systematickou práci, což i v laboratoři s kvalitním zázemím a vedením může pro začátečníka znamenat zdoluhavý proces s nejistým výsledkem. Metodika je však pěkně zpracovaná a nemám k ní podstatné připomínky. Naopak ve výsledkové části mám výhrady k prezentaci expresních profilů daných genů (kap. 5.2). Grafy (Obr. 4, 5 a 6) jsou přehlcené a nepřehledné a komentář k nim je příliš stručný (např. chybí zmínka o vzorku MT4DPS, který měl nejvyšší expresi *fabp*). V diskuzi autorka poměrně dobře a věcně okomentovala vlastní výsledky, ale celkově zde cituje pouze dvě publikace, což může vyvolat otázku, zda opravdu existuje v dané oblasti tak málo relevantních informací nebo si jen autorka nedala tu práci je vyhledat.

Na autorku mám následující dotazy a faktické připomínky:

- 1) Str. 5, kap. 2.5: Jakého živočicha se týká zjištění o devíti různých tkáňově specifických FABPs?
- 2) Str. 6, kap. 3.2: V popisu principu qPCR se věnujete hlavně vysvětlení absolutní kvantifikace s využitím standardní křivky, zatímco pro analýzu genové exprese jste – jak je obvyklé – používala metodu relativní kvantifikace s využitím referenčního genu.
- 3) Str. 9, kap. 4.4: Co znamená věta „*Relativní exprese fabp byla vyhodnocena na základě exprese.*“?
- 4) Je známo, jak dlouho po injekci dsRNA zůstává exprese genu snížena/zablokována?



- 5) Obr. 4, 5 a 6: Kde je vzorek se 100% expresí? Z kolika hodnot je vypočtena průměrná relativní exprese a jak byly určeny chybové úsečky?
- 6) Str. 19, obr. 8: Chybí negativní kontrola (dH_2O); domnívám se, že tzv. „no template control“ má být použita v každé PCR.
- 7) Str. 22, obr. 11: „Vodorovná čára mezi jednotlivými body v grafu (A) znázorňuje průměrnou váhu klíšťat v gfp kontrolní skupině a odděluje tak samice od samic.“ Domnívám se, že v této větě směřujete dva na sobě nezávislé faktory. Je mi známo, že normální hmotnost plně nasátých nymf se v grafu vždy rozpadá na dvě skupiny (samičí/samčí nymfy) s mezerou v oblasti cca 3,5-4,2 mg. Domnívám se však, že průměrná hmotnost (aritmetický průměr) kontrolních klíšťat může ležet mimo toto pásmo (např. v situaci, kdy je ve skupině výrazně více samičích nymf).
- 8) Str. 24, kap. 5.6.3: „V gfp (kontrolní skupina) se úspěšně svlékly téměř všechny nymfy...“ Z Tab. 8 ale vyplývá, že v této skupině úspěšně metamorfovalo pouze 64 % nymf, což rozhodně nepovažuji za „téměř všechny“.
- 9) Str. 25: Pokud exprese genu *fas* byla snížena o pouhých 14 %, jak vysvětlíte poměrně silný fenotyp *fas* knock-downů (hmotnost i doba sání klíšťat)?

Závěr: Aneta Zemanová dostala v rámci bakalářského projektu možnost pracovat v progresivním a dynamickém týmu a naučila se řadu moderních metod molekulární biologie, čímž získala výhodu pro další výzkum v magisterském stupni studia. Ačkoliv odborné formulace i prezentace získaných dat mají zatím jisté nedostatky, pevně věřím, že se autorce podaří se jich při nejbližší příležitosti vyvarovat. Celkově předložená práce splňuje nároky kladené na bakalářské práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity, **doporučuji** ji k obhajobě a prozatím hodnotím stupněm **velmi dobře**.

V Českých Budějovicích 10. května 2019

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.