Oponentský posudek diplomové práce Bc. Jany Hlaváčové „Vývoj leishmanií podrodu *Viannia* v přenašeči“

Předkládaná práce se zabývá několika aspekty vývoje leishmanií podrodu *Viannia* ve hmyzích přenašečích. Autorka pomocí experimentálních infekcí, histologických a mikroskopických metod studovala vývoj *Leishmania braziliensis* v přenašeči druhu *Lutzomyia longipalpis*. V další části práce sledovala, jak je vývoj dvou různých druhů leishmanií v tomto přenašeči ovlivněn okolní teplotou. Ve třetí části práce pokusila ověřit důležitost přítomnosti funkční dráhy RNAi *L. braziliensis* při vývoji ve flebotomech.

Práce má po formální i obsahové stránce velmi vysokou úroveň. Autorka v přiměřeném rozsahu podává přehled literatury k tématu, a to i publikací staršího data. Oceňuji přehlednou tabulku 2 (str. 16). Důkladně a zároveň přehledně jsou zpracovány i kapitoly „Materiál a metodika“ a „Výsledky“. Z předložených dat je zřejmé, že autorka odvedla velké množství práce a zvládla techniky kultivace leishmanií, experimentálních infekcí flebotomů, jejich hodnocení (včetně statistického) a přípravy a analýzy histologických preparátů. Počet kvalitně provedených experimentálních infekcí si zaslouží obdiv i vzhledem k obtížné kultivaci použitých kmenů a náročnosti manipulace s nakaženými flebotomy v daných podmínkách. I kapitolu diskuze považuji celkově za velmi dobrou. Obzvláště v podkapitole o morfologii buněk *L. braziliensis* (5.2, str. 50) se autorce podařilo dát své výsledky do souvislosti s dosud publikovanými studiemi, ač jsou tyto práce často nepříliš detailní a trpí nekonzistentním použitím morfologického názvosloví.

Celkově pro mě čtení diplomové práce Bc. Jany Hlaváčové bylo příjemným zážitkem. Autorka nejen přináší nové poznatky o vývoji *L. braziliensis* a *L. peruviana*, ale dokáže je také hezkým a srozumitelným jazykem interpretovat. Níže uvedené připomínky mají tedy sloužit spíše jako konstruktivní kritika pro účely případné publikace těchto výsledků.

Připomínky:

Anglický abstrakt: Použité mutantní linie leishmanií jsou nazývány „knock-downs“, ačkoliv se jedná o linie s deletovaným genem, čili knock-out.

Úvod: Bylo by vhodné popsat mechanismus přichycení haptomonád k chitinové výstelce proktodea (hemidesmosomální spoje na rozšíření bičíku).

Úvod str. 25: chybná interpretace citované práce Lye et al., 2010. Autoři ve skutečnosti navrhují přítomnost RNA virů jako jeden z možných selekčních **pro** ztrátu dráhy RNAi u podrodu *Leishmania.*

Metody: u deletovaného genu pro protein argonaut je třeba uvést číslo genu (např. v databázi GenBank nebo TriTryp). Také by bylo vhodné uvést, že se jedná (jak předpokládám) o linii s deletovanými oběma alelami příslušného genu. U add-back linií by bylo vhodné uvést způsob, jakým byla exprese genu obnovena.

Výsledky infekcí L. braziliensis v různých teplotách (str. 38-40, kap. 4.3.2 a 4.3.3): Rozdíl mezi infekcemi L. braziliensis ve 20°C a 26°C nebyl signifikantní, proto jej nelze komentovat slovy: „Kvantitativní PCR potvrdila výsledky z mikroskopického pozorování. Ve 20 °C *L.*

braziliensis způsobovala vyšší nákazy a vyšší procento nakažených samic.“ Chybná interpretace výsledků.

Výsledky růstových křivek (str. 41, kap. 4.3.4 a 4.3.5): Růstové křivky tak, jak jsou předloženy, nemají moc vysokou výpovědní hodnotu. Pokus je nutné provést v triplikátech a alespoň jednou zopakovat. Bylo by dobré také sledovat delší časové období, aby bylo zachyceno stádium odumírání i v teplotě 20°C (L. peruviana) respektive 26°C (L. braziliensis).

Výsledky vývoje mutantů L. braziliensis M2903 (kap. 4.4): Výsledky jasně svědčí o neschopnosti WT kmene vyvíjet se v Lu. longipalpis. Zcela tedy souhlasím s tím, že není nutné pokusy opakovat na větším počtu samic. Při interpretaci je však pak třeba brát v úvahu nízké počty vypitvaných jedinců. Provedené statistické analýzy nedávají v tomto případě smysl.

Diskuze, kap. 5.1: Autorka nediskutuje výsledky studií citovaných v úvodu (Warburg et al., 1989, Soares et al., 2010, Wilson et al., 2010, Azevedo-Pereira et al., 2007), ačkoliv výsledky jejího pozorování zpochybňují relevanci předchozích studií (viz též dotaz níže).

Diskuze, kap. 5.4: „protein Argonaut, který je jednou z esenciálních molekul této dráhy a bez něhož by RNA interference neměla fungovat“. Jak autorka sama uvádí v úvodu (str. 25), Lye et al. (2010) funkci tohoto proteinu v dráze RNAi u *L. braziliensis* experimentálně ověřili.

Dotazy:

Na str. 35 autorka píše: „Procykličtí promastigoti nebyli detekováni“. Mohla být nepřítomnost těchto morfologických forem dána použitým inokulem (promastigotní kultura leishmanií)?

Jak si autorka by autorka interpretovala vazbu izolovaného lipofosfoglykanu (Soares et al., 2010), heparin-vázajícího proteinu (Azevedo-Pereira et al., 2007) a celých promastigotů (Wilson et al., 2010) *L. braziliensis* na mesenteron přenašeče, když *in-vivo* žádné přichycení parazitů nepozorovala?

Autorka nekomentuje pozorovaný dobrý vývoj L. braziliensis v přenašeči ve 20°C, zatímco v kultuře se buňkám dařilo podstatně lépe ve 26°C. Jaké pro tento jev navrhuje vysvětlení?

Spekulativní dotaz: Jakou roli by autorka předpokládala pro dráhu RNAi při vývoji L. braziliensis v přenašeči? Pozorovala nějaké morfologické změny KO linií v kultuře?

Jak se autorka dívá na možnost „zprovoznění“ dráhy RNAi u podrodu Leishmania (metodami genetického inženýrství) pro účely studia funkce jednotlivých genů?

Drobné připomínky:

Abstrakt: „všechny testované linie…nejsou schopny vývoje“ doporučuji nahradit formulací „ani jedna z testovaných linií není schopna vývoje“

Anglický abstrakt: „neither form was found attached“ doporučuji nahradit „none of the forms was found attached“

„all the tested lines ….did not develop“ nahradit „none of the tested lines developed“

str. 17: v esofagu a faryngu, nikoliv „farynxu“

str. 24: dsRNA (syntetizovaná v buňce či do buňky **importovaná**)

str. 30: SYBR nikoliv „SYBER“ Green

str. 58: Lye et. al. (2010) PLoS Pathogens, nikoliv PLoS Neglected Tropical Diseases

Celkové hodnocení:

Diplomovou práci Bc. Jany Hlaváčové pokládám za velmi zdařilou a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

V Bernu dne 26. srpna 2011

Anna Dostálová