



Doc. RNDr. František Weyda, CSc.  
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav  
Braníšovská 31  
370 05 České Budějovice  
Telefon: přímá linka 387 775 261, ústředna 387 771 111  
Fax: 385 310 354  
E-mail: weyda@entu.cas.cz

## **Oponetský posudek na dizertační práci Mgr. Marie Vancové: Structural and functional characteristics of spirochetes, causative agents of Lyme disease and salivary glands of the tick *Ixodes ricinus***

Předložená disertační práce má členění, které se stává obvyklým na Biologické fakultě JU. Skládá se z úvodu, dvou původních experimentálních publikací (jedna publikovaná, druhá v době psaní práce přijatá do tisku) a další práce, které tvoří základ disertační práce, dále kapitol úvodní a shrnující dosažené výsledky. Velmi vhodný je seznam použitých zkratků umístěný v závěru práce, kde je také seznam literatury. Název práce je vytvořen tak, aby pokryl danou problematiku. Práce je podána v anglickém jazyce.

V úvodu oponentního posudku bych rád konstatoval, že M. Vancová předložila vědecky vyspělou práci, podtrženou již publikovanými nebo do tisku přijatými částmi práce (a to v kvalitních odborných časopisech).

Práce je založena na ultrastrukturních výzkumech. Na konvenční elektronovou mikroskopii, kterou autorka začíná, navazují odvozené techniky imunolokalizací (především při nízkých teplotách) a techniky další. Velmi oceňuji skutečnost, že do práce byly zařazeny i výsledky úplně nové metody (obr.3 strana 11) založené na novém přístrojovém vybavení laboratoře, kde M. Vancová pracuje (nízkoteplotní skanovací elektronový mikroskop Jeol JSM 7401F s kryonástavcem Alto2005 fy.Gatan). Podotýkám, že přístroj je dosud ve zkušebním období.

V úvodu autorka shrnuje současný stav znalostí a dává tak rámeček řešené problematice. Celý úvod je vystavěn úsporným jazykem, přitom fundovaně a celkem vyčerpávajícím způsobem. Je zde pokryta základní moderní literatura.

Publikace tvořící základ disertace jsou v současné době publikovány nebo jsou přijaty do tisku v renomovaných časopisech. To samo o sobě hovoří o jejich kvalitě, která je ostatně očividná- například profesionálně dokonalé obrázky naprosto perfektně doplňující text. Práce, v nichž je diplomantka prvním autorem, přinášejí zásadní vědecké výsledky. Jsou přínosem danému oboru. Nepovažuji tedy za nutné nějak polemizovat v této oblasti. Práce evidentně dokazují, že diplomantka zvládla celou řadu náročných strukturálních, molekulárně biologických i biochemických metodik.

Ve shrnující kapitole jsou výsledky sumarizovány. Reference pak zahrnují relevantní publikace diskutované v předložené disertaci. Znovu bych chtěl zdůraznit skutečnost, že autorka doplnila práci perfektní obrazovou dokumentací.

K předkládané disertaci nemám žádné zásadní námitky. Následuje jen komentář a několik zcela formálních připomínek, které mne napadly v průběhu čtení práce:

- na str 46 se mluví o prezenci hemocytů na povrchu slinných žláz a dává se to do závažné souvislosti s možností jejich úlohy v přenosu LB spirochet- odkazuje se přitom na obr.4.



Zrovna ale na tomto obrázku hemocyty na povrchu žláz nejsou. Nepochybuji ovšem, že autorka má tuto skutečnost dokumentovanu.

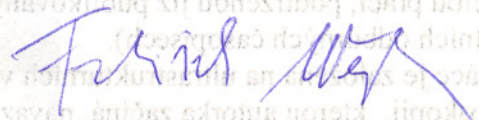


- autor Briton na str.46 je v seznamu literatury na str.51 veden jako Brinton
- autor Alberdi na str.11 se správně jmenuje Alberti
- na str.56 jsou přehozeny citace Roth a Ribeiro (abecední pořádek)

Z této části oponentního posudku jasně vyplývá, že k práci nemám zásadní připomínky a ty předložené jsou jen okrajového významu.

**Závěrem** je tedy nutno konstatovat, že předložená disertační práce dokazuje schopnost autorky samostatně bádát a přitom zvládnout i ty nejmodernější metody především elektronové mikroskopie, ale i další. Práci doporučuji jednoznačně k přijetí jako jeden z podkladů pro udělení doktorského titulu.

V Českých Budějovicích dne 20. března 2006



Doc. RNDr. František Weyda, CSc.



## Posudek oponenta na doktorskou disertační práci Mgr. Marie Vancové

Mgr. Marie Vancová vypracovala doktorskou disertační práci nazvanou „Structural and functional characteristics of spirochetes, causative agents of Lyme disease and salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*“. Zabývá se v ní především lokalizací cukerných epitopů ve slinných žlázách zmíněného klíštěte a u spirochety *Borrelia burgdorferi*.

Disertační spis má 58 stran. Skládá se ze tří publikací/rukopisů a doprovodného textu. Ve dvanáctistránkovém úvodu je podán především přehled současného stavu poznání o cukrech a lektinech borrelií i klíšťat. Následuje kapitola nazvaná Results (35 stran), ve které jsou zařazeny tři práce. Prvou z nich je publikace ve *Folia Microbiologica*, která se zabývá studiem glykokonjugátů *Borrelia burgdorferi*. Druhou rukopis článku přijatého v časopise *The Journal of Parasitology*, který popisuje detailní lokalizaci cukerných epitopů ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*. Třetí text o ultrastrukturních aspektech interakce borrelie – klíště je zřejmě rukopisem v přípravě. Disertační práce je zakončena shrnutím nejdůležitějších zjištění prvních dvou publikací do 7 bodů a slušným seznamem literatury (7 stran).

Velmi pozitivním rysem je, že disertační práce je sepsána velmi dobrou a srozumitelnou angličtinou. Dále lze pochválit kvalitní přehled současného stavu poznání. Na druhé straně je škoda, že se autorka nepokusila v úvodu více vysvětlit členění předložené práce a precizně formulovat dílčí cíle, nebo alespoň formulovat otázky či hypotézy, na než má její práce odpovědět. Myslím, že by to čtenáři usnadnilo orientaci v textu a více „stmelilo“ dohromady tři výsledkové části práce.

K úvodu mám několik doplňujících otázek: *Jsou k B. b. vnímavé i jiné rody klíšťat než rod Ixodes? Dají se rozlišit různé druhy borrelií podle ultrastruktury, například podle počtu bičíků? Jak geny pro různé Osp umístěny na plasmidech a co ovlivňuje jejich expresi?*

Autorka mě přesvědčila, že kvalitně zvládla především různé mikroskopické techniky. Velmi oceňuji i kvantitativní přístup ke zpracování výsledků vazby značených lektinů na ultratenké řezy. Jsem rád, že na PaU a Centru elektronové mikroskopie vyrostla další osoba, která tak dobře zvládá různé metody fluorescenční i elektronové mikroskopie. Rád bych se s autorkou podělil o její zkušenosti při detekci cukerných epitopů na řezech a mám proto drobné technické dotazy k použitým metodikám: *Je nutná 1M koncentrace cukrů použitých k inhibici lektinů na řezech? Nakolik spolehlivou metodou je b-eliminace na polosilných a ultratenkých řezech? Jaká je výhoda pryskyřice Polybed 812 oproti pryskyřici LR White?*

K výsledkové části mám následující připomínky. Rukopis in press: Domnívám se, že druhý odstavec abstraktu má být prvním odstavcem kapitoly „Introduction“. U blotu s lektiny nejsou zobrazeny kontroly (a nelze tak usoudit nakolik je vazba specifická) a pruhy na některých stripech lze jen obtížně porovnávat (původ z různých blotů?).

Rukopis v přípravě: *Rád bych se zeptal pro jaký časopis je tento text zamýšlen. Cíl práce by bylo zřejmě vhodné přesunout z výsledků do závěru úvodu. U infekce morčat by bylo vhodné upřesnit místo inokulace borélií a místo sání klíšťat. Na základě fotografií z fluorescenčního mikroskopu by si netroufal říci něco určitého, dokumentace z elektronového mikroskopu je průkaznější, pouze bych uvítal vysvětlení, co je na obr. 4. Dále bych prosil vysvětlit poznámku o intracelulární lokalizaci borélií. Jak lze rozhodnout zda se jedná o borélii pokud není zachována ultrastruktura?*

**Shrnutí:** Mgr. Marie Vancová předložila k obhajobě práci, která podle mého názoru splňuje všechny náležitosti doktorské disertační práce. Přispěla k poznání glykokonjugátů borrelií i klíšťat a k pochopení interakce mezi těmito organismy. Získala výsledky publikovatelné v mezinárodních časopisech a prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Doporučuji proto, aby Mgr. Marii Vancové byl po úspěšné obhajobě disertační práce a splnění všech dalších předepsaných náležitostí udělen akademický titul **doktor (Ph.D.)**.

V Praze dne 9. března 2006

  
Prof. Petr Volf



# POSUDOK

na dizertačnú prácu

**Mgr. Marie Vancovej:**

## **STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF SPIROCHETES, CAUSATIVE AGENTS OF LYME DISEASE**

Posudzovaná práca rieši aktuálnu problematiku výskumu kliešťami prenášaných patogénov, z hľadiska charakterizácie a lokalizácie uhľohydrátov na povrchu patogéna, *Borrelia burgdorferi* s.s., ale aj objasnením ultraštruktúry buniek slinných žliaz vektora, kliešťa *I. ricinus* a interakciami medzi boréliami a kliešťom. Pre pochopnie prenosu patogénov z cicajúceho kliešťa na hostiteľa a zavedenie účinných preventívnych opatrení je nevyhnutné získať čo najviac poznatkov o aktívnych látkach v patogénovi a vektorovi, ktoré sa na týchto procesoch môžu podieľať. Preto si myslím, že zvolená téma je vysoko aktuálna.

Práca je napísaná v angličtine na veľmi dobrej úrovni, prehľadne a zrozumiteľne. Po technickej stránke si autorka zvolila formu súhrnu manuskriptov so stručným literárnym prehľadom, ktorý je obsiahnutý na 12 stranách. Takýmto spôsobom autorka podáva ucelený, jasný obraz o danej problematike. Malou výhradou je chýbanie kapitoly „Ciele práce“. Aj keď sú ciele práce popísané v každom manuskripte, krátky súhrn cieľov dizertačnej práce, tak ako sú prezentované v autoreferáte by však nebol na škodu.

Výsledková časť pozostáva z troch samostatných častí. Prvá publikácia je venovaná štúdiu glykokonjugátov borélií, ich lokalizácii ako aj charakterizácii ich olichosacharidových zlúčenín. Pre presnú lokalizáciu a identifikáciu sacharidov na povrchovej membráne a membránových vezikuloch borelií boli použité viaceré metodické prístupy prípravy, značenia a spracovania preparátov, ktoré boli vizualizované transmisiou elektrónovou mikroskopiou. Na povrchu vonkajšej membrány boli však okrem glykokonjugátov *B. burgdorferi* s.s. naviazané aj glykozylované zlúčeniny z BSK-H média, v ktorom boli spirochéty kultivované. Preto by som sa chcela opýtať, či je možné použiť aj iné prístupy štúdiu štruktúry borélií bez potreby kultivácie, napríklad priamo v nakazených kliešťoch, respektíve v koži hostiteľa? Taktiež by ma zaujímalo, či autorka v budúcnosti neplánuje študovať ultraštruktúru iných zástupcov komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato?

Druhá časť výsledkov je venovaná ultraštruktúre slinných žliaz nenacicaných ako aj čiastočne nacicaných samíc *I. ricinus*, identifikácii a lokalizácii sacharidov prostredníctvom ich schopností viazať špecifické lektíny. Zaujímavý je nález prítomnosti kyseliny sialovej

z čiastočne nacicanych samíc, ktorej prítomnosť nebola doteraz v kliešťoch zachytená. Na autorku mám preto otázku: *Aká môže byť podľa vás funkcia kyseliny sialovej? Myslíte si, že kyselina sialová by mohla chrániť cicajúce kliešte pred účinkom komplementu hostiteľa, tak ako je to u niektorých prokaryotov?*

Tretia časť dizertačnej práce sa zaoberá ultraštruktúrou a interakciami medzi *B. burgdorferi* s.s. a bunkami slinných žliaz kliešťá. Získané poznatky o lokalizácii borélií na povrchu slinných žliaz, a nie vo vnútri acínov sú veľmi hodnotné a zaslúžili by si ďalšie štúdium. *Plánujete sa v budúcnosti uberať aj týmto smerom?*

Záverom konštatujem, že Mgr. Marie Vancová predložila prácu vysokých odborných kvalít, a preto doporučujem, aby po úspešnej obhajobe a za predpokladu splnenia všetkých ďalších náležitostí jej bol v súlade s platnými predpismi udelený vedecko-akademický titul PhD.

V Bratislave, 15. marca 2006



MVDr. Markéta Derdáková, PhD.