



INSTITUTE OF MICROBIOLOGY
Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.

Director

Referee's comments to PhD thesis of Mgr. Lenka Grunclová "Immune-related molecules in the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*"

Submitted PhD thesis of Lenka Grunclová, PhD student of the Faculty of Biological Sciences in České Budějovice, was elaborated in the Institute of Parasitology of the Biology Centre of the Academy of Sciences, v.v.i. under the supervision of Dr. Petr Kopáček. The Laboratory of Vector Immunology focuses on molecules and cellular actions involved in immune system of tick and pathogen transmission and the lab has outstanding results.

The PhD thesis of Lenka Grunclová is based on two original first-author papers published in well-recognized international journals – *Developmental and Comparative Immunology* (IF 3.4) and *Biological Chemistry* (IF 2.7). The thesis as such comprises introduction, brief description of the published as well as non-published results, and summary. A sufficient, up-to-date list of referred papers is included.

The well-written Introduction provides an overview on the basic anatomy and physiology of hard and soft ticks. Most important part of the Introduction deals with the defense mechanisms of tick with particular emphasis on the innate immunity in the gut, which is the major topic of the thesis. The first paper characterizes tick gut lysozyme that belongs to the group of c-type lysozymes and that is strongly up-regulated after feeding suggesting both defense and digestive functions. Second part of the thesis describes the screening of the gut-specific cDNA library to follow the differential gene expression affected by blood feeding. The third part is based on published results showing the differential expression pattern and inhibitory specificity of the secreted cystatins. Finally, results on thyropin and serine protease inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata* are included and can be submitted for publication soon.

I am not going to discuss the details of published papers because the manuscripts underwent a rigorous per-review process. Indeed, I would like to ask few questions that should be considered as "catalyzers" of the discussion.

- Digestive process in soft ticks starts with hemolysis. Are there any data on the mechanism of hemolysis – is it due to differences in the osmotic pressure or are there any hemolytic factors?

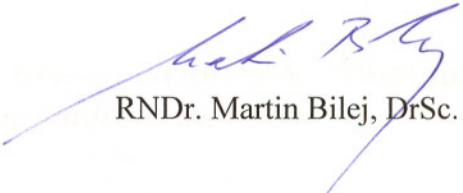
Second group of questions concerns lysozyme.

- Peptidoglycan is present both in Gram-positive and Gram-negative bacteria however its structure differs. Do you know if tick gut lysozyme discriminates between Lys and DAP type of peptidoglycan?

- Lysozyme activity strongly depends on ion strength. Did you follow the effect of ion strength on the activity? Is there any other enzyme activity of lysozyme described as it is for example chitinase activity in leeches for i-type lysozyme?
- Do you plan to follow the effect of microbial challenge on lysozyme up-regulation (e.g. bacteria administered together with blood meal)?

In conclusion, I appreciated to read the thesis of Mgr. Lenka Grunclová and I can fully recommend it for the fulfillment of the academic degree PhD.

Prague, June 20, 2007


RNDr. Martin Bilej, DrSc.



Doc. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.
Biologické centrum AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Telefon: přímá linka 387 775 271, ústředna 387 771 111
Fax: 385 310 354
E-mail: kodrik@entu.cas.cz

Oponentský posudek na disertační práci Lenky Grunclové:

Immune-related molecules in the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*

Předložená disertační práce se skládá z několika úvodních kapitol a vlastní výsledkové části, která představuje 5 více méně samostatných, na sebe navazujících prací, z nichž 2 byly publikovány v kvalitních vědeckých časopisech (Developmental and Comparative Immunology, Biological Chemistry). Všechny práce se týkají látek, které mají vztah k imunitním procesům v pokusném organismu *Ornithodoros moubata* a jsou charakterizovány jako takové nebo na genové úrovni. Práce je psána anglicky, je srozumitelná a po formální stránce dostatečně obsáhlá. Po obsahové stránce představuje rozsáhlý soubor dat, který rozšiřuje znalosti o klíštěcí imunitě – o jejich vysoké kvalitě svědčí to, že část dat byla publikována ve výše zmíněných časopisech.

V úvodních kapitolách uvádí autorka čtenáře do problematiky klíštěcí imunity. Zmiňuje se o základních údajích biologie klíšťat a stručně charakterizuje jejich imunitní soustavu včetně antimikrobiálních peptidů jako jsou fragmenty hemoglobinu, defensivy, lysozymy, inhibitory proteáz atd. a jejich interakce s patogeny. Zvláštní pozornost je věnována střevní imunitě vzhledem k tomu, že u klíšťat prakticky chybí proteolytické enzymy vylučované do střeva a proto je střevní obsah velmi vhodné prostředí pro přežívání patogenů. Na závěr úvodní části autorka shrnuje jak se klíšťata s touto skutečností vyrovnávají.

Následuje výsledková část rozdělená, jak už bylo uvedeno výše, do několika samostatných celků. Autorka zde uvádí vlastní výsledky své disertační práce, které spočívají v charakterizaci obranných látek jako je lysozym, cystatiny, thyropin nebo SHP (serin protease homolog). Některé z nich se podařilo charakterizovat i na genové úrovni včetně možného řízení jejich exprese hlavně vzhledem k příjmu potravy. Je také diskutována jejich možná funkce v imunitě pokusného druhu *O. moubata* i funkce v dalších biologických procesech. Tato část disertace je zakončena stručným shrnutím dosažených výsledků.

K této části mám následující dotazy, komentáře a náměty do diskuze:

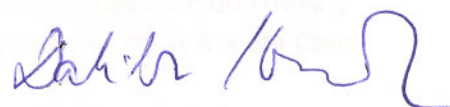
- není zcela jasné vzájemné postavení jednotlivých prací (částí) výsledkové kapitoly, hlavně pak těch, které bezprostředně předchází publikacím z časopisů. Některé jejich věty se totiž opakují a ani jejich přehled uváděný na str. 14 není zcela v souladu s realitou
- na str. 15 autorka uvádí, že u některých živočichů se lysozymy adaptovaly na trávící funkce. Může autorka uvést nějaké podrobnosti? Je to známo i u klíšťat?
- na str. 17 je použita zkratka PBM (post bloodmeal), jestli jsem pozorně četl, tak její vysvětlení je uvedeno až následně v I. publikaci. Obecně by přehlednosti textu

- přispělo shrnutí použitých zkratk - zvláště pak vzhledem k jejich častému používání
- je v nomenklatuře látek podílejících se na imunitě klíšťat (str. 656/I. práce) (nebo obecně bezobratlých) a lišících se druhově nějaký systém (např. podobný 3 resp. 5 písmennému kódu zavedenému u hmyzích neurohormonů)?
 - používají se některé lysozymy prakticky nebo jsou nějaké perspektivy jejich praktického použití?
 - je něco známo o tom proč došlo k záměně Tyr na His na pozici 52 u popsaného lysozymu z *O. moubata*? Je experimentálně dokázáno, jestli taková záměna ovlivňuje aktivitu?
 - str. 31 - citace Franta (2005) není v seznamu literatury (což jsem zjistil náhodou, jak je to s ostatními citacemi jsem nekontroloval)
 - str. 36 - řada komentářů práce III. Cystatins... se odkazuje na publikaci II (viz první bod komentář výše)
 - obrázek 3 na str. 5, obr. 4A na str. 1638 (paper II) a obr. 11A na str. 54 se mi jeví jako stejné s jiným textem. Prosím o komentář
 - str. 52 proč je první obrázek této IV. Části označen jako Fig. 8 (opět viz první bod komentáře výše)?
 - str. 61, fig 16, dráha 4 – nemůže se přese jen SHP účastnit štěpení bílkovin obsažených v potravě, když byl detekován ve střevním obsahu?

Závěrem:

Předložená disertační práce představuje rozsáhlou a metodicky i časově náročnou studii, kterou je schopen zvládnout jen zručný experimentátor. Autorka v ní také dále dokazuje, že má přehled o literárních údajích a dovede své výsledky s těmito údaji srovnávat, kriticky je hodnotit a diskutovat. Proto doporučuji předloženou práci k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení doktorského titulu.

Č. Budějovice, 12. 6. 2007



Dalibor Kodrík

✉ IPAZ • Heinrich-Buff-Ring 26-32 • D-35392 Gießen



**Institut für Phytopathologie
und Angewandte Zoologie**

Abt. Angewandte Entomologie
GfD Prof. Dr. Andreas Vilcinskis
IFZ für Umweltsicherung
Heinrich-Buff-Ring 26-32
D-35392 Gießen

Tel.: +49 - (0)641 / 99 - 3 76 00

Fax.: +49 - (0)641 / 99 - 3 76 09

Email: Andreas.Vilcinskis@agr.uni-giessen.de

<http://www.uni-giessen.de/ipaz/>

Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Dean of the Faculty of Biological Sciences

University of South Bohemia

Review of the PhD-thesis submitted by Lenka Grunclova entitled

„Immune-related molecules in the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*“

Dear colleagues,

I studied the submitted PhD-thesis of Lenka Grunclova entitled „Immune-related molecules in the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*, and I will briefly evaluate her work.

Lenka Grunclova presented a cumulative thesis with chapters among which the reader is comprehensively informed in the introduction about ticks, their roles as vectors of diseases and tick innate immunity. The results and discussion chapter encloses two publications in international scientific journals which are highly recognized in invertebrate immunology and biochemistry, and three additional chapters summarizing further (yet not published) results, and a summary of all five parts of her thesis. The latter and the introduction are conclusively written and provide a red line to follow the logic and the connections behind the individual contributions. The entity of obtained results elucidates novel features in vector biology.

The hallmarks of the thesis are:

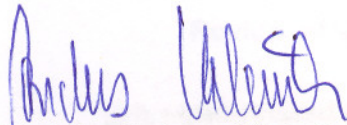
- Identification of a lysozyme homolog in ticks with putative antimicrobial and digestive functions
- Screening for genes that are differentially expressed upon blood-meal in *O. moubata*
- Identification and characterization of two tick cystatins secreted within the digestive system

Our knowledge about innate immunity and physiology of blood meal digestion in ticks is rather fragmentary when compared with the huge body of information that has been elaborated in insect vectors. Lenka Grunclova screened for immune-related genes in the soft tick model *O. moubata* among which a number was cloned and further analyzed.

For example, lysozyme was identified and determined to be up-regulated in tick digestive system upon blood-meal whereas the two discovered cystatins are down-regulated. In addition, she identified and partially characterized a cysteine peptidase inhibitor containing a thyroglobulin I domain (Om-thyropin) and a serine protease belonging to the chymotrypsin subfamily.

The entity of her results increased the number of genes known to be involved in blood-meal-digestion, and add to our understanding of its interdependencies with innate immune responses in ticks. The experimental work of Lenka Grunclova encompasses a number of sophisticated methods in biochemistry (purification and characterization of proteins), molecular biology (targeted screening for and cloning of genes, and quantification of their expression levels) and cell biology (immunofluorescence and electron microscopy) that were adequately performed and reasonably combined in sequences that result in significant contributions. The illustrations used to present her data are convincing, and have been conclusively discussed. According to my knowledge and experience her Ph.D. thesis is of particular interest for the scientific community in the field, and meets the widely accepted standards, including those of our faculty, to be awarded by the Ph.D. degree.

In conclusion, the scientific value of the thesis has scientific merit and justifies without any doubt to honour Lenka Grunclova with the RNDr.-degree. Therefore, I strongly recommend the acceptance of her Ph.D thesis and, if necessary, I would assess it with a very good mark.



Prof. Dr. Andreas Vilcinskis