

Oponentský posudek diplomové práce Karolíny Šubrtové:

Využití technologie cDNA vakcín pro imunizaci vybranými proteiny klíčtčích slin

Diplomová práce je zaměřená na konstrukci DNA vakcín a jejich následné použití pro intradermální imunizaci myši proti proteinům klíčtčích slin. Byla přitom vyhodnocena účinnost vyvolání tvorby protilátek proti těmto proteinům pomocí imunoblotingu a testu ELISA.

V *Literárním přehledu* (16 stran) je zejména popsána obrana hostitele před klíčtčem a patogeny, které může přenášet, a naopak mechanismy, kterými klíčtč může tuto obranu překonat. Dále je věnována pozornost protiklíšt'ové vakcíně a metodice DNA vakcinace. Kapitola je zakončena využitím DNA vakcín pro imunizaci expresní knihovnou. Překvapivě není v této kapitole podrobněji zmíněna publikace RNDr. J. Chmelaře, na kterou diplomová práce navazuje.

V další kapitole jsou přehledně uvedeny cíle práce.

Kapitola *Materiál a metody* (11 stran) popisuje všechny použité metody. Jedná se zejména o klonování genů amplifikovaných pomocí PCR, izolaci plazmidů a stanovení jejich kontaminace lipopolysacharidy, imunizaci myši a získání sér a přípravu rekombinantních proteinů a jejich využití pro stanovení protilátek imunoblotingem a metodou ELISA.

Ve *Výsledcích* (17 stran) jsou popsána a dokumentována data z provedených pokusů. Podařilo se připravit DNA vakcíny pro 4 vybrané geny a po optimalizaci imunizačního protokolu prokázat jejich schopnost vyvolat tvorbu protilátek.

V *Diskusi* (7 stran) autorka zdůvodnila volbu cytomegalovirového promotoru pro expresi imunizačních genů a intradermální podávání DNA vakcín myším, popsala účinek lipopolysacharidů při imunizaci, uvedla údaje o proteinech vybraných k imunizaci, zdůvodnila optimalizaci postupu imunizace a zamyslela se nad získanými výsledky. Na závěrečných shrnujících grafech pak zdařile poukázala na zkříženou reaktivitu některých sér (obdobným způsobem však taky mohla porovnat intenzitu reakce sér mezi použitými kmeny myši).

Diplomová práce dále obsahuje přehled citované literatury a je doplněna abstraktem (českým a anglickým) a souhrnem.

K diplomové práci mám zejména následující připomínky a doplňující dotazy:

Formální náležitosti

- Práce neobsahuje seznam zkratk, jak to bývá u diplomových prací obvyklé, ale zkratky jsou zaváděny přímo v textu, přičemž nejdříve je uvedena zkratka, v závorce pak její význam. Zkratka „BOFES“ není zavedena, zkratka „SAT“ je vysvětlena dvakrát.
- V práci je celkem malý počet překlepů, ale čtivost a srozumitelnost textu je někdy snížena nevhodným používáním (či nepoužíváním) čárek ve větách.
- Některá anglická slova (např. *high-throughput*, *full-length*) jsou vložena bez překladu do textu, aniž by byla alespoň odlišena kurzívou nebo dána do uvozovek.
- Kapitola 2.2.1.1 je v textu označena 2.2.2.1.
- V bibliografii jsou autoři začínající „Ch“ uvedeni mezi písmeny „I“ a „J“.

Literární přehled

- Aplikace DNA do organismu by neměla být zaměňována s DNA vakcinací. Je třeba také rozlišovat imunizaci genem a proteinem.
- Genetickou imunizaci bych neporovnával se subjednotkovými polysacharidovými vakcínami, ale spíš s podjednotkovými proteinovými vakcínami.

- Antigen prezentovaný molekulami MHC II. třídy nevede přímo k indukci protilátkové odpovědi. Pouze tak aktivuje pomocné lymfocyty T, které přispívají ke stimulaci lymfocytů B, na jejichž Ig receptor se navázal antigen.
- Je cementový protein na povrchu střevních buněk, takže tam s ním mohou reagovat protilátky?
- Jakým mechanismem dochází k zabíjení střevních buněk klišťete po navázání protilátek?
- Co je to „trans-block“ vakcinace?

Materiál a metody

- U řady chemikálií a přístrojů nebyl uveden výrobce či dodavatel.
- Pro popis podmínek ligace je důležité množství použité DNA, které nelze určit z objemu, pokud není uvedena koncentrace.
- Elektroforéza SDS-PAGE mohla být popsána podrobněji (koncentrace bisacrylamidu, ostríci gel, aparatura).
- Popis klonování genů do plazmidu pcDNA4/TO/myc-His považují za nedostatečný. Proč nebyly k transfekci buněk CHO použity plazmidy odvozené od plazmidu VR2001?
- Jak bylo prováděno „manuální navrzení primerů“ a určení signálních peptidů?
- Jak bylo odebíráno myší sérum?
- K čemu slouží pilocarpin a jaký byl výtěžek při odběru slin?
- Čím se liší použité kmeny myší?
- Jak byly buňky CHO uvolňovány z podkladu, v jakém množství byly nasazovány na lahvičky? Proč byly tyto adherentní buňky transfekovány v suspenzi? Jaká byla účinnost transfekce?
- Byly výsledné konstrukty ověřovány také restrikcí štěpením?
- Jak (kde) vznikl pelet při přípravě proteinu c14 centrifugací přes kolonu Amicon?
- Kolik bylo paralelních jamek u testu ELISA? Jaký byl asi podíl rekombinantních proteinů v lyzátech?

Výsledky

- Ve *Výsledcích* je chybně uvedeno, na kterém uchu byl očekáván zánět po aplikaci slin (v *Diskuzi* je to uvedeno správně).
- Výsledek imunoblotu u 1. imunizačního pokusu je popsán dvakrát (na str. 34 a str. 35). Ani v jednom případě však není ukázán výsledek na obrázku.
- Obvykle je počet hvězdiček u statistické významnosti používán opačně, než jak je to definováno v této práci.
- Vzhledem ke zkřížené reaktivitě sér mohla být ukázána homologie proteinů IRS.
- Bylo u připravených vakcín ověřováno (alespoň u vacGFP), že dochází k produkci imunizačních proteinů?
- Jakým způsobem byla zjištěna zvýšená reaktivita kontrolních sér VR?
- Proč nebyly uvedeny obrázky pro imunobloting s IRS-4 a IRS-8 analogické obr. 8 a 9?
- Jsou v plazmidu pcDNA4/TO/myc-His naklonovány geny společně se signální sekvencí TPA? Je jisté, že produkované proteiny byly sekretovány?

Diskuze

- Jak byly vybrány geny pro přípravu DNA vakcín? V publikaci dr. Chmelaře jsem geny s označením IRS nenašel. Při hledání v MEDLINu jsem zjistil, že tato zkratka je používána pro *insulin receptor substrate*.
- Langerhansovy buňky jsou přítomny v epidermis. Vzhledem ke způsobu imunizace se domnívám, že injikovaná DNA se dostávala hlavně do dermálních dendritických buněk.

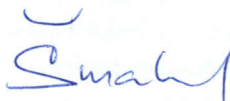
Otázky do diskuse:

1. Jakým způsobem lze u DNA imunizace posílit protilátkovou odpověď?
2. K jakému účelu budou moci být využity protilátky připravené v této práci?

ZÁVĚR:

V předložené diplomové práci prokázala Karolína Šubrtová schopnost samostatné vědecké práce a získala řadu zajímavých poznatků. Získané výsledky dokázala zpracovat a vyhodnotit. Uvedené připomínky však svědčí o tom, že některé části práce mohly být napsány pečlivěji či přesněji. Doporučuji proto diplomovou práci klasifikovat **velmi dobře**.

Praha, 22.5.2009



RNDr. Michal Šmahel, PhD.
Ústav hematologie a krevní transfuze Praha
Oddělení experimentální virologie

Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Karolíny Šubrtové „Využití technologie cDNA vakcín pro imunizaci vybranými proteiny klíštěcích slin“

(vypracoval Dr. Petr Kopáček, Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice).

Karolína Šubrtová předkládá k obhajobě poměrně rozsáhlou diplomovou práci (s přílohami 69 stran), která je po formální stránce zcela v pořádku.

Velmi se mi líbil úvodní literární přehled, který je napsaný pěknou a srozumitelnou češtinou. Autorka v něm v přiměřené míře rozebírá zejména antihemostatické a imunomodulační složky klíštěcích slin a nastiňuje problematiku slinami aktivovaného přenosu (SAT efektu). Potom postupně přechází k tématu protiklíštěcích vakcín a rozebírá možnosti i omezení skrytých vs. exponovaných antigenů. Jedna kapitola je věnována problematice serpinů (inhibitorů serinových proteáz), na které je dále diplomová práce zaměřena. Úvod pak směřuje k samotné podstatě práce, kterou je ověření a optimalizace použití cDNA vakcín pro testování vakcinačního potenciálu vybraných klíštěcích molekul. V závěru úvodu autorka zmiňuje potenciál molekuly subolesinu zkoumaný týmem Jose de la Fuente. Neuvádí však nejnovější výsledky, které odhalují charakter a funkci tohoto proteinu. Proto bych se velmi přimlouval, aby Karolína během obhajoby tyto údaje doplnila a posoudila další možnosti využití subolesinu jako vhodného kandidáta pro proti-klíštěcí vakcínu.

Část Materiál a metody je sepsaná mimořádně pečlivě, bez laboratorního žargonu s minimální potřebou používání těžce přeložitelných anglicismů. Už jen z tohoto důvodu si hodlám diplomovou práci Karolíny ponechat jako dobrý příklad pro své studenty.

Vlastní výsledkovou část pojednala Karolína na můj vkus příliš extenzivně, kdy se pokoušela o optimalizaci cDNA vakcín s použitím příliš mnoha neznámých (kmeny myší, exprese antigenů v prokaryotických i eukaryotických systémech, neujasněné vakcinační schéma). Získané výsledky tedy mohou leccos napovědět, k optimalizaci protokolu cDNA vakcinace však podle mého nevedly. První výhradu mám k použití exprese v křeččích buňkách. V práci nikde není uveden důkaz, že by se tato exprese povedla, a že získaná média skutečně obsahovala odpovídající rekombinantní proteiny. Prosím o předložení tohoto důkazu při obhajobě.

Při použití bakteriálních expresních systémů byla prezentována jen kvalita antigenu u IRS1 a IRS2, ostatní IRS3 a IRS4 uvedeny nebyly, takže není možno posoudit, zda za kvantitativními rozdíly v imunitních odpovědích nemohly být zodpovědné rozdíly v kvalitě antigenů. Získané protilátky reagovaly na Western blotech poměrně slabě. Myslím, že by bylo velmi užitečné uvést srovnání s reakcí s protilátkami získanými klasickou imunizací rekombinantními proteiny. Při testování protilátek dávám také přednost Western blotingu oproti ELISA, protože je možné posoudit míru nespecifických reakcí. Kvantitativní vyhodnocení ELISA testů bylo podle mého poměrně nepřesné, neboť z některých grafů je zřejmé, že se absorbance pohybovala na samém pokraji „tmy“ ($A=2,5-3$), kdy získané hodnoty titrů mohou být velice zkreslené.

V závěrečné části diskuse pak Karolína přiměřeně a kriticky diskutuje získané výsledky, ale optimální protokol pro další testování možností cDNA vakcinací nenabízí. Proto bych velmi prosil, jestli by se mohla pokusit své výsledky shrnout do jednoduchého schématu, podle kterého by se měly dále cDNA vakcinace testovat.

Přes uvedené připomínky a otázky se domnívám, že Karolína Šubrtová udělala poměrně hodně experimentální práce a zvládla širokou škálu metod na rozhraní molekulární biologie a imunologie. Samotná diplomová práce je sepsaná velmi kvalitně a pečlivě. Proto magisterskou diplomovou práci Karolíny Šubrtové hodnotím jako výbornou a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě před příslušnou komisí.

V Českých Budějovicích, 18.5. 2009

Petr Kopáček