

**Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Petra Franty  
„Experimentální vakcinace králíků rekombinantními trávicími peptidázami  
klíštěte *Ixodes ricinus*“**

Petr Franta předložil diplomovou práci řešící problematiku designu a testování možné vakcíny proti klíšťatům. Protiklíštěcí imunita a identifikace antigenů vhodných pro přípravu takové vakcíny patří celosvětově mezi aktuální a hojně diskutované oblasti výzkumu.

Po formální stránce má předkládaná práce o rozsahu 38 stran všechny náležitosti diplomové práce. Literární přehled o dané problematice je vcelku čtivý a s minimem gramatických chyb, avšak působí poněkud povrchně. Některé pasáže, např. týkající se skrytých a exponovaných antigenů klíštěte, by si rozhodně zasloužily více pozornosti. Snaha text opticky prodloužit pomocí velkých mezer mezi odstavci pak působí spíše kontraproduktivně. Úsporný styl je místy na úkor srozumitelnosti a přesnosti, i když to autor myslel dobře. Jeden příklad za všechny: v kap. 1.2.3. stojí, že „Vakcinace homogenáty klíšťat, slinnými žlázami či jejich extrakty a klíštěcími orgány indukují imunitní odpověď při sání klíštěte.“ Domnívám se, že indukce imunitní odpovědi je smyslem vakcinace bez ohledu na sání klíštěte, a také že vakcinace klíštěcími orgány vcelku, tj. ne homogenáty, se neprovádí. Metodika je zpracována pečlivě a dostatečně podrobně. Výsledková část má logickou stavbu, určité rezervy má snad jen vzhled tabulek. Diskuze dosažených výsledků je krátká, ale věcná. Práci uzavírá seznam použitých pramenů čítající 65 původních citací a 2 odkazy na webové stránky.


Na autora mám následující dotazy a faktické připomínky:

- 1) Proč bylo během imunizací používáno pouze nekompletní Freundovo adjuvans (obvykle se v první dávce podává kompletní FA)?
- 2) Kap. 4.3.: Proč bylo zvoleno pH renaturačního PBS pufru 8,5?
- 3) Chválím záměr autora dát hodnocení imunizací nějaký systém, nicméně statistické zpracování výsledků je poněkud nesrozumitelné. Ke kterému ze sledovaných parametrů (hmotnost, velikost snůšky, úmrtnost) se vztahuje výsledek t-testu? Prosim Petra o doplnění a vysvětlení statistiky.
- 4) V grafech znázorňujících délku sání (obr. 8, 9 a 10) bych pro větší přehlednost doporučovala uvádět ještě průměrnou délku sání za celou skupinu.
- 5) Proč byla kontrolní (neimunizovaná) skupina tvořena vždy pouze jedním zvířetem? Dle mého názoru by měla být kontrolní skupina přibližně stejně velká jako imunizovaná. Také bych doporučovala kontrolní zvířata imunizovat nějakým irelevantním proteinem (např. BSA), nebo alespoň aplikovat adjuvans. Nelze totiž vyloučit, že samotné podání adjuvancia a následná stimulace imunitní odpovědi může mít vliv na sající klíšťata bez ohledu na antigenní složení vakcíny.
- 6) Jak dlouho po čtvrté imunizační dávce byla na králíky nasazena klíšťata?
- 7) Str. 27: „U králíků imunizovaných IrCL nebyla pozorována zvýšená hladina protilátek proti katepsinu L.“ Přitom titer zmíněných sér byl 6400, což svědčí o přítomnosti specifických protilátek. Jak byla tato formulace myšlena?

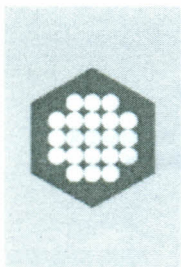
- 8) Kladně hodnotím fakt, že autor nezamlčel neúspěšné použití králíčího plemene nevhodného pro experimentální nasávání klíšťat; další studenti tak nemusí opakovat stejné chyby.

Přes uvedené připomínky a výtky považuji předloženou magisterskou práci Petra Franty za vyhovující a odpovídající současným požadavkům Přírodovědecké fakulty JU a **doporučuji** ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 12. ledna 2012



RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.



## Oponentský posudek na diplomovou práci

Bc. Petra Franty

„Experimentální vakcinace králíků rekombinantními trávicími peptidasami klíštěte *Ixodes ricinus*“.

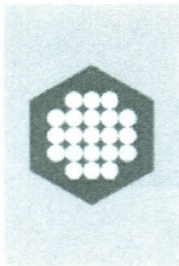
Tématem diplomové práce je vývoj protiklíštěcích vakcín a hledání vhodných vakcinačních kandidátů. Konkrétně se autor zaměřil na analýzu možného vakcinačního potenciálu hlavních trávicích peptidas klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Tyto peptidasy byly připraveny rekombinantní expresí v bakterii *Escherichia coli*, v případě IrCD byl expresní systém konstruován. Těžiště diplomové práce spočívá v její biologické části, kde autor jednak analyzuje účinnost imunizace králíků připravenými peptidasami a jednak statisticky vyhodnocuje vliv vakcinace na fyziologii dospělých klíšťat při sání na imunizovaném hostiteli.

Rozsah diplomové práce je přiměřený. Práce je formálně rozdělena obvyklým způsobem. V úvodu jsou popsány cíle práce, které byly jasně stanoveny. Literární přehled poskytuje současný a ucelený pohled na problematiku se zaměřením na regulaci klíšťat v přírodě. Podrobně se též zabývá klíštětem obecným, zejména fyziologií trávení tohoto parazita. Autor řádně cituje používané literární zdroje. Metodika je zpracována pečlivě a dostatečně detailně, jen v expresní proceduře (str. 12) není uvedeno používané antibiotikum. Z výsledků a závěrů práce jasně vyplývá, že cíle, které si autor vytkl, byly splněny. Diskuze je vyčerpávající.

Formální úroveň diplomové práce je dobrá, ojediněle se vyskytují překlapy (nejčastěji vynechání mezery mezi slovy), občas nepřeložené anglické výrazy (např. DNA ladder, His-tag) či drobné chyby (viz legendy k obrázkům 4-6). Uvedené připomínky ale nikterak nesnižují celkovou kvalitu předložené práce.

Rád bych položil několik otázek k diskuzi:

1. Jaká je homologie trávicích peptidas klíštěte *I. ricinus*, které jsou používány pro imunizace, s příbuznými savčími enzymy? Nemůže při imunizaci docházet ke křížové reakci?
2. Peptidasy jsou před imunizací renaturovány, takže je pravděpodobné, že část materiálu představuje aktivní, správně složené enzymy. Nemohou tyto aktivní peptidasy ovlivňovat fyziologii imunizovaného zvířete a vyvolat nepříznivé reakce u vakcinovaných zvířat?
3. Proč byly pro imunizace zvoleny uvedené koncentrace peptidas v imunizační směsi (50 µg případně 100 µg peptidasy/1mL imunizačního činidla)? Zamýšlíte optimalizovat koncentraci jednotlivých peptidas pro imunizaci v závislosti na titru protilátek v králíčním séru?
4. Byl u klíšťat, která sála na králících imunizovaných klíštěcími trávicími peptidasami, pozorován pokles enzymových aktivit těchto peptidas ve srovnání s klíšťaty sajícími na kontrolních králících?



**ÚOCHB AV ČR, v.v.i.**

ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE  
AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY, v.v.i.  
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, v.v.i.

5. V úvodu je zmíněno, že potenciálními skrytými antigeny pro vakcinace jsou proteiny vyskytující se v hemolymfě klíšťat. Mohou se imunoglobuliny vakcinovaného zvířete dostat při sání klíštěte přes střevo až do jeho hemolymfy?

6. Nelze dobrý protektivní efekt IrAE připsat spíše úspěšnosti vakcinace než jeho biologické roli? Oproti ostatním testovaným peptidasám se podle stanovených titrů protilátek v králičím séru IrAE jeví jako velmi dobrý antigen.

Předložená diplomová práce plně splnila zadané cíle a přinesla nové významné informace v daném oboru. Proto doporučuji diplomovou práci k obhajobě. Obhajoby se bohužel nemohu zúčastnit a v nepřítomnosti navrhuji hodnocení 1-2.

V Praze 18. ledna 2012

Mgr. Martin Horn, CSc.