



RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Parazitologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice

---

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Adély Harcubové

### „Vakcinační potenciál cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*“

V práci autorka řeší problematiku inhibitoru cysteinových proteáz jako potenciálního kandidáta na vakcínu proti klíšťatům, případně patogenům jimi přenášených.

Jako cíl si autorka určila produkci rekombinantního cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus* v bakulovirovém expresním systému a testování jeho vakcinačního potenciálu.

Autorka řeší účinnost vakcinace rekombinantním proteinem v základním imunizačním experimentu tj. sání klíšťat na imunizovaných myších, dále vliv sání klíšťat na obsah protilátek a vliv imunizace na rozpoznatelnost dalších proteinů ve slinách klíštěte.

Práce je přehledná a srozumitelná. Má 39 stran a tradiční členění. Je vyvážená a svým rozsahem odpovídá nárokům na magisterskou práci. Autorka splnila vytyčené cíle práce a výsledky úspěšně sepsala a diskutuje s množstvím literárních zdrojů.

K práci celkově nemám vážné výhrady, je čtivá a srozumitelná, až na výjimky bez gramatických či stylistických chyb a překlepů. Graficky je úhledná s přehlednými tabulkami a obrázky. Autorka by jen měla sjednotit styl citací pokud jsou dva autoři (př. Singh & Girschick; Agyei et Runham; Brguljan, Cimerman)

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky:

Úvod:

Jak jsem zmínila je úvod čtivý, kapitoly na sebe logicky navazují a mám jen tuto připomínku: V přehledu vakcín mi chybí zmínka o ferritinu a jeho úspěšném použití srovnatelném s Bm86.

Materiál a metody:

U systému *flashBAC* není uveden výrobce ( str.12), u primerů bych uvítala vyznačení restričních míst a gen-specifických úseků (str.13), u cystatinu jako očkovací látky není uvedeno množství použité k vakcinaci, je uveden pouze objem (str.15), není zmíněna role ovalbuminu v imunizačních pokusech a to ani v dalších kapitolách (str.15).

Výsledky:

Jak byl protein po gelové filtraci koncentrován?(str.18), kolik proteinu bylo získáno? (autorka zmiňuje jen koncentraci, str. 19).

Diskuze:

Autorka srovnává efekt imunizace cystatinem 3 z *I. ricinus* se sialostatinem z *I. scapularis*, rozdíly jsou průkazné ve všech experimentech, které autorka provedla. Na sání klíšťat na imunizovaném hostiteli má podle autorky vliv právě rozdílný hostitel, malé množství protilátek po sání vysvětluje produkci cystatinu 3 ve slinných žlázách až v posledním dnu sání, stejně tak i vliv na rozpoznatelnost dalších proteinů ve slinách klíštěte.

Proto nemohu souhlasit s posledním odstavcem z této práce, kdy autorka navrhuje další experimenty s jinými hostiteli. Podle mého by byly tyto experimenty naprosto zbytečné. Tento cystatin je třetím cystatinem z *I. ricinus*, není homologem sialostatinů z *I. scapularis* a jsem přesvědčena, že jeho role je obecně směřována do střeva klíštěte. Výsledky tohoto pokusu byly tedy předvídatelné a autorka vlastně potvrdila předpoklady z práce Perner, 2008, že tento cystatin 3 patří do jiné funkční skupiny než sialostatinů 1 a 2 z *I. scapularis* a cystatinů 1 a 2 z *I. ricinus* zmiňované Pernerem.

Na autorku mám několik doplňujících dotazů:

Proč autorka vybrala zrovna tento kmen myší?

Jaký vliv na hostitele má imunizace ovalbuminem?

Jak si autorka vysvětluje prodloužení sání při nejvyšším titru protilátek? Nemůže být výsledek ostatních experimentů ovlivněn malým titrem protilátek? Jaký byl titr protilátek proti ovalbuminu?

Co je známo o expresi sialostatinů L vzhledem k cystatinu 3 z *I. ricinus* ve slinných žlázách?

Je možné, že by měl cystatin 3 vliv na přenos patogenů klíštětem *I. ricinus*?

Závěrem:

Autorka zvládla expresi proteinu v bakulovirovém expresním systému, získaný protein využila pro studium jeho vakcinačního potenciálu. Zjištění, že tento protein není vhodným kandidátem pro vakcinaci je v podstatě pozitivním výsledkem. Potvrzuje předpoklad vycházející z expresního profilu cystatinu 3, že jeho úloha bude lokalizována zejména ve střevě *I. ricinus*. Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na magisterskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení titulu Magistr.

V Českých Budějovicích 17. 5. 2012

  
Lenka Grunclová



Univerzita Karlova V Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra parazitologie

Viničná 7, 128 44 Praha 2, Česká republika  
Tel: 221951816; Fax: 224919704; E-mail: [kasa@post.cz](mailto:kasa@post.cz)  
<http://www.natur.cuni.cz/parasitology>

## Oponentský posudek na diplomovou práci

**Autor:** Bc. Adéla Harcubová

**Název:** Vakcinační potenciál cystatinu klíštěte *Ixodes ricinus*

**Základní parametry práce:** 39 str. (řádkování 1,5), 66 citací

Předložená práce je zaměřena na zhodnocení vakcinačního potenciálu klíštěcího cystatinu (*Ixodes ricinus*, GenBank cystatin a.n. AJ547803.1). Vytýčených cílů (1. Produkce rekombinantního cystatinu z klíštěte *I. ricinus* v bakulovirovém expresním systému a 2. Testování vakcinačního potenciálu připraveného cystatinu pomocí imunizačních pokusů v modelovém systému: laboratorní myš - klíště *I. ricinus*) mělo být dosaženo s využitím pokročilých molekulárních (např. transformace buněk, purifikace rekombinantních proteinů), separačních (např. afinitní a gelová chromatografie) a imunologických technik (např. imunizace modelových zvířat, izolace sér, ELISA). Autorka ve své práci navazuje na výsledky výzkumného týmu kolem Prof. RNDr. Jana Kopeckého (hl. školitel) a RNDr. Jiřího Saláta, Ph.D (školitel specialista); rekombinantní bakulovirus použitý k produkci cystatinu *I. ricinus* (CIR) byl tímto týmem v minulosti připraven a podobná metodika použita v práci Salát a kol. 2010 (Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*).

**Úvod:** Na 10 stranách autorka, odpovídajícím způsobem definuje modelový organismus *I. ricinus*, shrnuje problematiku imunitní odpovědi hostitele na sání klíštěte a specifikuje hlavní funkční složky slinných žláz klíštěte (např. imunomodulační molekuly). Vlastním proteinovým molekulám klíšťat – cystatinům, které autorka experimentálně zpracovávala je v úvodu věnována pouze cca jedna strana textu (str. 9-10). Dle mého názoru, chybí jasné definice referovaných molekul (např. anotační čísla z databázi) či zásadní informace o primární, sekundární a terciální struktuře cystatinů (např. molekulové hmotnosti, 3D model typové molekuly s popisy nebo fylogenetické vztahy mezi zástupci této podskupiny inhibitorů). Tyto nedostatky se týkají také přímo zkoumaného cystatinu, jehož nukleotidová a aminokyselinová sekvence byla anotována již v roce 2003 (Jacot S.Y., Etudes des genes exprimes au cours du repas sanguin dans l'intestin de la tique *Ixodes ricinus*, Thesis, 2003) a jež byl dále charakterizován v roce 2008 (Perner J., Charakterizace cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*, bakalářská práce, 2008). Úvodu předloženého textu je informace o zkoumaném cystatinu omezena pouze na 5 řádků. Autorka sice v následující části (Materiál a metody) uvádí nukleotidovou sekvenci cystatinového genu, ale aminokyselinová sekvence prezentována není, což u práce zabývající se expresí rekombinačních proteinů považují za nedostatek. Myslím, že úvodní kapitole by výrazně prospělo obohacení obrazovými a schematickými prvky (např. právě 3D model molekuly typového cystatinu).

#### **Otázky:**

- *V souvislosti s úvodní kapitolou by mne zajímalo, zda byly některé z cystatinových molekul v minulosti identifikovány ve slinách klišťate *I. ricinus* (či příbuzných druhů) pomocí hmotnostně spektrometrických metod např. LC MS/MS či MALDI TOF-TOF?*

**Cíle práce:** Jsou dva, stručně a jasně definované.

#### **Otázky:**

- *Mohla by autorka komentovat použití termínu „bakulovirový expresní systém“ (viz cíl 1.). Existuje vhodnější terminologie (např. exprese v hmyzích buňkách)?*

- *Domnívám se, že by bylo smysluplné, kdyby před započítím plnění cíle 2 byl ověřován předpoklad potenciální imunogenicity zkoumaného cystatinu (tj. např. zda séra myši, na nichž sála klišťata vůbec interagují s touto molekulou).*

**Materiál a metody:** Jsou logicky seřazené, podrobně rozepsané na 6 stranách a obsahují také popis 3. pokusů. Za účelem zpřehlednění některých pasáží bych opět doporučoval uvedení obrazových prvků či schémat (např. částečná mapa bakulovirového systému či foto komůrek určených pro sání klišťat připevněných na hřbet myši). Chybí také popis a důvod použití právě Sf9 buněk, popis použitých primerů (vyznačení restikčních míst, určení počtu nukleotidů,  $T_m$  apod.), práce postrádá odkaz na schválený projekt pokusů a osvědčení umožňující práci se zvířaty, dále chybí detaily, jako např. na str. 14 chybí údaj o koncentraci (...“Ke 13  $\mu$ l vzorku“...), na str. 15 chybí údaj o objemu (...“20  $\mu$ g proteinu bylo smícháno“...), na str. 15 chybí údaj o objemu odebrané krve (...“14 dní po poslední imunizaci byla všem myším odebrána krev z ocasu“...) či na str. 17 chybí vysvětlení k látce pilocarpin (...“na hřbetní část klišťat byly nanášeny 2  $\mu$ l roztoku pilocarpinu“...) apod.

#### **Otázky:**

- *Proč byla pro expresi cystatinu zvolena právě exprese v hmyzích buňkách (výhody/nevýhody oproti jiným expresním systémům)?*

- *„Reverse“ primer pro cystatin obsahuje 53 nukleotidů. Mohla by autorka komentovat důvod navržení tak dlouhého oligonukleotidu a také významný rozdíl v  $T_m$  (14°C) mezi „reverse“ a „forward“ primerem?*

#### **Výsledky, diskuze a závěr**

Výsledky experimentů zpracované na 12 stranách jsou na rozdíl od předchozích kapitol vhodně doplněny fotodokumentací a tabulkami, které tvoří základ této kapitoly. Většina výsledků je s ohledem na předpoklady spíše negativních a některé působí až kontroverzně (např. str. 28, ...“ Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou vakcinovanou cystatinem naměřeny nebyly. V prvním pokusu byl zaznamenán opačný výsledek, než jaký byl očekáván. Hodnoty byly signifikantně vyšší u myši vakcinovaných ovalbuminem“...). Pečlivé statistické zhodnocení oceňuji. Diskuze (3 strany) není z mého pohledu vyčerpávající, uvítal bych obsáhlejší hypotézy k výsledkům. Závěr (7 řádků) je stručný a z formálního hlediska v pořádku.

#### **Otázky:**

- *Žádám autorku o podrobnější komentář ke sdělení právě na str. 28 (...“ Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou vakcinovanou cystatinem naměřeny nebyly. V prvním pokusu byl zaznamenán opačný výsledek, než jaký byl očekáván. Hodnoty byly signifikantně vyšší u myši vakcinovaných ovalbuminem“ ...).*

- *Žádám autorku o podrobnější komentář ke sdělení na str. 30 (...“Na rozdíl od našich výsledků, v pokusech s jiným cystatinem, sialostatinem L2, měla imunizace vliv na sání klišťat. Tato molekula blokovala sání nymf *Ixodes scapularis* a docházelo také k redukci hmotnosti*

klíšťat po nasátí. To může být vysvětleno tím, že v těchto pokusech byl používán jiný hostitel, imunizována byla morčata.“...). Je autorčino tvrzení z poslední věty dokumentováno nějakým publikovaným srovnávacím experimentem zahrnujícím dva zvířecí modely?

- Je z literatury znám důkaz imunogenicity cystatinové molekuly *I. ricinus*? Proč toto nebylo ověřováno (např. Western Blot/ELISA se slinami a séry myši na nichž sála/nesála klíšťata)?
- Je pravděpodobné, že u příbuzných klíštěcích druhů např. *I. scapularis*/*I. ricinus* může být efekt cystatinu natolik odlišný?
- Je z literatury známa lokalizace cystatinu *I. ricinus* (dotaz směřovaný k polemice zda tento cystatin může fungovat také jako skrytý antigen ve střevě klíštěte)?
- Prováděla statistické zhodnocení výsledků autorka osobně (program GraphPad Prism 5)?
- Jaký další experimentální přístup k rozpracované problematice by autorka navrhovala.

**Přehled literatury:** Seznam 66 publikací je v pořádku s jednotným formátem.

Oceňuji, že práce je prostá překlepů a dalších formálních chyb. Nepochybuji také, že se autorka seznámila s několika pokročilými molekulárními a imunologickými metodami, které bude moci využít během budoucí profesní kariéry. Přestože je práce založena převážně negativních výsledcích realizovaných experimentů, tak se domnívám, že práce splňuje základní podmínky kladené na diplomovou práci (zpracovat literární rešerši a osvojit si relevantní spektrum metod), a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako velmi dobrou (2).

Praha 26. května 2012



---

RNDr. Martin Kašný, Ph.D.