

Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Šárka Pospíšilová

Název: Vliv klíštěcího serpinu IRS-2 na dendritické buňky aktivované TLR4 ligandem

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslava Lieskovská, PhD.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Magisterská diplomová práce Bc. Šárky Pospíšilové se zabývá charakterizací účinků nedávno popsaného klíštěcího serpinu IRS-2 na dendritické buňky. Práce svým tematickým i metodickým zaměřením vychází z dlouholetých tradic Laboratoře imunologie parazitóz vedené Prof. RNDr. Janem Kopeckým, CSc.

Diplomová práce má 48 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi a závěr. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a odpovídající nárokům na magisterské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Cíle práce jsou stručné, jasně definované a konkrétní.

Úvod čítá 13 stran textu. V první podkapitole se autorka zaměřuje na systematické zařazení klíšťat v rámci arthropod a popis životního cyklu klíšťat. Následuje výčet nejdůležitějších vlastností klíštěcích slin, včetně souhrnu aktuálně známých proteinů napomáhajících klíštěti při sání na hostiteli a při obraně proti jeho imunitnímu systému. Za zdařilou považuji pasáž týkající se popisu signálních drah aktivovaných Toll-like receptory. Autorce se podařilo zpracovat toto komplikované téma do přehledné a čtivé formy. K této části bych měl pouze několik drobných připomínek:

1. Strana 2. Makrofágy produkují oxid dusnatý, nikoliv dusičný.
2. Strana 12. V Americe se vyskytuje *Borrelia burgdorferi*, nikoliv *Borrelie burgdorferi*.
3. Strana 13. Odkaz Lieskovská (2011) jsem nenalezl v seznamu literatury.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsána na 6 stranách, je přehledně členěná, jednotlivé metody jsou vysvětleny srozumitelným způsobem. K této kapitole nemám žádné připomínky, pouze na straně 18 není u nylonové membrány uveden obchodní název a výrobce (GeneTiCa je dodavatel). U jednotlivých metod také není nutné uvádět, kdo je prováděl (např. str. 16 „Borelie počítala a kultivovala Bc. Veronika Slavíková“). Toto se případně řeší v poděkování.

Výsledky předložené magisterské práce jsou shrnuty na 19 stranách, včetně 20 obrázků a 18 grafů.

Autorka nejprve testovala vliv IRS-2 na produkci cytokinů dendritickými buňkami po stimulaci LPS. U žádného ze tří sledovaných cytokinů (TNF- α , IL-12, IL-10) nebyl prokázán signifikantní vliv IRS-2 na jejich produkci. U grafu 2 není uvedeno, jaká byla koncentrace IL-12 v přítomnosti samotného IRS-2 (prosím o doplnění v ústní prezentaci).

V dalším kroku byl sledován vliv IRS-2 na expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 na povrchu stimulovaných dendritických buněk. Autorka uvádí, že po 48 hodinové inkubaci s IRS-2 došlo ke snížení exprese CD80 o 50% a CD86 dokonce o 70%. Nicméně z grafů 5 a 6 „dokazujících“ tento pokles není toto zjištění zcela zřejmé, pokles se nezdá být tak výrazný. Poprosil bych autorku, zda by mohla tento rozpor vysvětlit v ústní prezentaci. Navíc zřejmě došlo k prohození grafů 5 a 6, nesouhlasí totiž popis v hlavičce grafů a legenda ke grafům.

Autorka dále sledovala vliv IRS-2 na signální dráhy aktivované Toll-like receptory. Nebyl prokázán vliv samotného IRS-2 na změnu aktivity MAP kináz (p38, Erk1/2) ani NF- κ B. Stejně tak nebyl zaznamenán významný rozdíl v aktivaci testovaných MAP kináz, NF- κ B a kinázy Akt vlivem IRS-2 u dendritických

buněk stimulovaných LPS. Rovněž nebyl prokázán významný vliv IRS-2 na fosforylaci proteinů STAT1, STAT3 a STAT6 v JAK-STAT signální dráze po stimulaci dendritických buněk borreliemi.

Připomínky:

1. Ve většině výše uvedených experimentů autorka zkoumá změny exprese, resp. aktivace proteinů u buněk s přidáním IRS-2, nebo bez IRS-2. Dle mého názoru by bylo vhodnější porovnávat vliv testovaného IRS-2 s jiným kontrolním proteinem připraveným ve stejném expresním systému jako IRS-2, aby se vyloučil vliv nežádoucích bakteriálních příměsí v rekombinačním proteinu, které mohou výsledek ovlivnit.
2. Na obrázcích western blotů (Obrázek 6-12) není zcela jasné, který časový profil odpovídá testovanému IRS-2 a který je kontrolní (prosím o vysvětlení v ústní prezentaci). Legendy k obrázkům by měly vysvětlovat to co vidíme na obrázku, nikoliv postup, jakým bylo výsledku dosaženo.

Diskuzi jsou věnovány celkem 3 strany textu. Autorka porovnává svoje výsledky s literárními údaji i s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře. K této kapitole nemám žádné připomínky.

Odkazy v **Seznamu literatury** by měly mít jednotný formát.

K diplomové práci bych měl ještě několik obecných připomínek:

1. V práci se mísí různé styly vyprávění. Hojně se vyskytuje "ich forma", která se v odborném textu nepoužívá. Práce by měla mít jednotnou formu (doporučuje se používat přičestí minulé trpné).
2. V textu se to rovněž hemží celou řadou hovorových výrazů a poněkud kostrbatých větných spojení (str. 1. (klíště) čeká přichycené třemi zadními páry nohou a s nataženými předními nohama, kterými se zachytí na srsti nebo oděvu.), které poněkud snižují kvalitu odborného textu.

Závěrečné hodnocení:

Autorka se během svého magisterského studia seznámila s celou řadou metod molekulární biologie a imunologie, v tomto směru práce splnila svůj účel. Magisterská práce nepřináší mnoho pozitivních výsledků, což je bohužel někdy úděl pilotních studií. Je sympatické, že autorka tuto skutečnost přiznává na rovinu a nesnaží se tuto skutečnost skrývat. Hlavními nedostatky práce jsou formální úroveň textu a nízká informační hodnota některých obrázků. Předloženou magisterskou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm 2.

Otázky oponenta:

1. K uvolnění dendritických buněk ze sleziny autorka použila inkubaci s Liberazou DL a DNázou I. Zajímalo by mě, z jakého důvodu se zde používá DNáza I a zda nemůže jejím vlivem docházet k poškození genomu izolovaných buněk?
2. Na straně 23 autorka uvádí, že v experimentech používala 3 μ M, nebo 6 μ M IRS-2. Z dalšího textu ale není zřejmé, jaká koncentrace byla v jednotlivých dílčích pokusech použita. Prosím o vysvětlení, případně zda byly pozorovány rozdíly v expresi kostimulačních molekul při použití různých koncentrací IRS-2.
3. Opakované pokusy sledující expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 přinesly značně rozdílné výsledky (50% x 30% u CD80, resp. 70% x 12% u CD86). Jak si autorka tyto rozdíly vysvětluje?
4. U obrázků 5, 6, 8, 10 a 11 chybí housekeeping gen. Zajímalo by mě, jakým způsobem autorka provedla relativní kvantifikaci změn aktivity příslušných proteinů?

Českých Budějovicích 15.5.2012



Radek Šíma

Posudek na diplomovou práci

Bc. Šárka Pospíšilová 2012: Vliv klíštěcího serpinu IRS-2 na dendritické buňky aktivované TLR4 ligandem. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 49 stran.

Tato diplomová práce je zaměřena na roli serpinu 2 ze slin klíštěte *Ixodes ricinus* (IRS-2). Vlastnosti tohoto proteinu podrobně popsali Chmelař a kol. 2011. Autorka této diplomové práce na uvedený článek navazuje a protein IRS-2 testuje hlavně s ohledem na jeho možnou roli na funkce dendritických buněk. Téma je to velmi aktuální a i přes vesměs negativní výsledky získala autorka cenné údaje, na které lze navázat dalšími pokusy a některé části této diplomové práce tak dotáhnout do podoby článku v impaktovaném časopise.

Úvod/Literární přehled na 13 stranách shrnuje základní poznatky o klíštěti *Ixodes ricinus*, dendritických buňkách, signálních drahách a vlivu klíštěcích slin na dendritické buňky. Literární přehled odpovídá zvolenému tématu diplomové práce a je napsaný poměrně čtivě, i přes drobné stylistické chyby dané doslovným překladem anglického textu včetně anglického slovosledu. Závažnějším problémem je, že kapitoly jsou většinou založené na pouhých 3-5 citacích a v některých odstavcích chybí jakákoliv citace. V některých částech textu si pak autorka ulehčila práci tím, že pouze přeložila vybrané věty jednoho review (např. kapitola 1.1.1 Sliny klíšťat, Francischetti et al. 2009).

- *Kapitola 1.1 Klíště obecné: V úvodu píšete, že klíšťata „se liší tím, že mají speciální ústní ústrojí, takzvaný hypostom“. Z kontextu vyplývá, že se takto odlišují od ostatních roztočů. V čem je tedy ústní ústrojí ostatních roztočů jiné?*
- *Kapitola 1.1.1 Sliny klíšťat: Podle jakého kritéria jste vybírala významné rodiny proteinů? Proč v tomto výčtu nezmiňujete třeba antigen 5-related proteiny, ixostatiny, tyropiny aj.?*
- *Kapitola 1.2 Dendritické buňky: Na straně 5 v předposledním odstavci zmiňujete prezentaci antigenu na MHC. O jakou třídu MHC molekul se jedná?*
- *Kapitola 1.3.1 Toll-like receptory: Jaké TLR hrají úlohu v rozpoznávání parazitů?*
- *Kapitola 1.3.2 až 1.3.4: Je daný typ TLR receptoru asociovaný vždy s jednou signální drahou? Pokud je jeden typ TLR receptoru asociován se všemi uvedenými signálními drahami, co pak rozhoduje, která z nich se aktivuje?*

Cíle práce jsou jasně definované ve třech bodech a víceméně odpovídají struktuře kapitole výsledky.

Materiál a metodika jsou podrobně a přehledně rozepsané na 6 stranách. Autorka se během práce seznámila s metodou izolace dendritických buněk, kultivace dendritických buněk za různých podmínek, SDS-PAGE, western blotu, FACS a ELISA. U použitých chemikálií autorka uvádí výrobce/dodavatele; pro případné opakování či pokračování v pokusech by bylo vhodné dodat i katalogová čísla, jejich absence však nemá vliv na hodnocení vlastní diplomové práce. V rámci celé kapitoly se objevují drobné chyby typu „min.“ (minuty nejsou zkratka, ale jednotka, která se píše bez tečky) či absence mezery mezi číslem a jednotkou.

- *Kapitola 3.3 Aktivace dendritických buněk: Uvádíte zde různé množství buněk na jamku v případě stanovení cytokinů (150 tis. bb/jamku) a v případě stanovení exprese kostimulačních molekul (150 tis. bb/jamku). Koncentrace buněk jsou v obou případech*

stejně, jejich hustota vzhledem k ploše dna jamky se však liší – může mít toto vliv na výsledek? Lze pak výsledek z obou typů testů dávat do vzájemných souvislostí?

- *Kapitola 3.5 Přečištění IRS-2 od endotoxinu: (1) Rekombinantní IRS-2 jste dostala již „hotový“ a jenom jej přečistila nebo jste ho i exprimovala v bakteriích? Kdo připravoval IRS-2 v bakteriích? (2) Jaký byl výsledek testu funkčnosti enzymu?*
- *Kapitola 3.7 SDS-PAGE: Chybí specifikace tloušťky gelu a typu/výrobce elektroforetické aparatury.*
- *Kapitola 3.10. ELISA: Chybí specifikace ELISA kitů.*

Výsledky experimentů jsou přehledně a pečlivě zpracované v 5 kapitolách na 19 stranách a doplněny 18 přehlednými grafy, 8 obrázky a 12 histogramy. Krátké vysvětlující úvodní odstavce zvyšují srozumitelnost textu. Obrázky a grafy jsou dostatečně popsány. V některých případech jsou tytéž výsledky prezentovány ve dvou grafických formách (histogram/graf nebo obázek/graf), což ale není na škodu. Již v této kapitole autorka výsledky kriticky hodnotí, většinou s ohledem na průběh experimentu a použitou metodu.

- *Kapitola 4.1 Vliv IRS-2 na expresi cytokinů po stimulaci s LPS: (1) Proč jste jednotlivé cytokiny stanovovala jen v některých časových intervalech a ne ve všech (tj. 3, 24, 48 i 72 hodin)? (2) Jak dopadla statistická analýza, pokud jste dala výsledky jednotlivých opakování dohromady?*
- *Kapitola 4.1.2 IL-12: Čím si vysvětlujete, že produkce IL-12 byla stimulována až kombinací LPS+IFN-g a samotným LPS nikoliv?*
- *Kapitola 4.2: (1) Proč jste některé výsledky neprezentovala (např. 2. odstavec kapitoly a poslední odstavec na straně 23)? (2) Jak dopadla statistická analýza, pokud jste dala výsledky jednotlivých opakování dohromady?*

V kapitole **diskuze** porovnává autorka své výsledky s pouhými 10 pracemi. Celkově je diskuze povedená, ale na diplomovou práci velmi krátká (2,5 stránky).

- *Existuje srovnatelná práce na dendritických buňkách s proteiny/slinami jiného druhu klíštěte nebo jiného krevsajícího členovce (hmyzu)?*

Citovaná literatura obsahuje pouhých 41 citací, z toho 5 knih a jednu nepublikovanou práci. Autorka čerpala z časově širokého spektra článků od roku 1948 až po ty nejnovější s vročením 2012. Některé citace nedodržují jednotný formát, což je zřetelné hlavně u citací knih.

Závěr:

Práce je i přes drobné překlepy dobře zpracovaná, logicky uspořádaná, s kvalitní grafickou úpravou. Svým rozsahem a obsahem práce splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě. Samotnou práci pak hodnotím stupněm velmi dobře až dobře.

Praha
23. května 2012


RNDr. Iva Kolářová, Ph.D.