

## Oponentský posudek diplomové práce Bc. Jany Páleníkové: **Interakce buněk přirozené imunity se spirochétami lymeské boreliózy a jejich ovlivnění molekulami klíštěcích slin**

V předkládané diplomové práci studentka navazuje na předchozí výzkum kolektivu laboratoře imunologie parazitóz týkající se vlivu slin klíštěte *Ixodes ricinus* na mechanismy přirozené imunity. Jana Páleníková řeší ve své diplomové práci složitou problematiku vzájemných interakcí buněk přirozené imunity, a to makrofágů a dendritických buněk, se spirochétami Lymeské boreliózy a ovlivnění těchto interakcí působením klíštěcích slin. Jelikož měla studentka k dispozici dva slibné rekombinantní proteiny z klíštěcích slin, zařadila je do svých pokusů a získala s nimi velmi zajímavé výsledky. Zabývala se ovlivněním produkce cytokinů IL-6, IL-10, IL-12 a TNF- $\alpha$  těmito proteiny, přičemž na základě získaných výsledků zařadila také pokus s ovlivněním produkce IL-6 na úrovni mRNA. Sledovala i vliv obou těchto proteinů na fagocytózu na modelu fluorescenčních pHrodo kuliček. Kuličky pHrodo jsou novým typem fluorescenčně značených partikulí, které jsou pro svou pH senzitivitu s úspěchem využívány jako modelové částice pro studium fagocytózy. Jelikož ale borelie jsou přednostně fagocytovány tzv. coiling fagocytózou, která využívá odlišných buněčných receptorů a jiných signálních drah než klasická fagocytóza, zařadila studentka i pokusy s fagocytózou značených borelií. Velký kus práce odvedla ale už při samotné optimalizaci měření fagocytózy v průtokovém cytometru, která, především v případě borelií značených CFSE, byla značně obtížná.

Práce má obvyklé členění, po obsahu následuje literární přehled napsaný na 22 stranách, cíle práce (1 strana), materiál a metody (8 stran), výsledky (13 stran), diskuze (7 stran) a závěr (1 strana). Vše doplňuje seznam zkratk a přehled použité literatury, který obsahuje 184 původních citací.

Úvodní část je přehledně rozčleněna do kapitol zabývajících se boreliemi (jejich morfologií, taxonomií a uspořádáním genomu), klíšťaty (hlavně taxonomií a životním cyklem klíšťat), buňkami přirozené imunity (se zaměřením na dendritické buňky a makrofágy) a jejich vzájemnými interakcemi, poslední kapitola je věnována serpinům, skupině proteinů ze slinných žláz klíšťat.

Materiál a metody jsou popsány věcně a přehledně, jediné, co mi v této části chybí, je podrobnější zmínka o použitých rekombinantních proteinech, především jakým způsobem a v jakém expresním systému byly vyrobeny.

Výsledky jsou dobře popsány a doplněny vždy příslušným grafem. Grafy jsou přehledné, dobře graficky zpracované a nemám jim co vytknout. Studentka ve svých pokusech nejenom potvrdila, že sliny *I. ricinus* snižují fagocytární schopnost makrofágů, ale také popsala výrazný efekt jednoho z rekombinantních proteinů – IRS-2 – na fagocytózu. Ocenit musím ale znovu optimalizaci měření fagocytózy s využitím průtokového cytometru. Využití pHrodo kuliček je velmi elegantní řešení, na kterém je možno optimalizaci provést, důležité je ale podle mě též potvrdit výsledky přímo na zkoumaném patogenu, což se studentce přes složité metodické peripetie podařilo. Odlišné výsledky získané u fagocytózy pHrodo kuliček a CFSE borelií v případě ovlivnění IRS-2 připisuje studentka tomu, že IRS-2 má pravděpodobně vliv na schopnost makrofágů degradovat pohlcený antigen, nikoliv na samotnou fagocytózu. Tento protein zároveň v pokusech inhiboval produkci IL-6 a IL-10 dendritickými buňkami. Protein SPI vedl ke snížení produkce pouze IL-10 těmito buňkami.

V diskuzi jsou výsledky kriticky zhodnoceny a porovnány jak s výsledky získanými v laboratoři imunologie parazitóz, tak i s výsledky jiných pracovišť zabývajících se prací s proteiny ze slinných žláz klíštět. Závěry jsou v bodech shrnuty v poslední části diplomové práce.

Měla jsem možnost oponovat již pěknou bakalářskou práci Jany Páleníkové a ráda konstatuji, že mě studentka nezklamala a také její diplomové práce si drží vysoký standard formálního zpracování. Chyb je v práci málo a ty, které se objevují, jsou většinou pouze překlepy nebo drobné chyby z nepozornosti. Jako příklady uvedu pouze 2 úsměvné chyby, a to první ze str. 52, kde IRS-2 snižoval jistě produkci IL-10, a ne sebe sama, jak je uvedeno, a druhou v seznamu literatury, kde je v názvu publikace Slámové a kolektivu uvedeno místo „immune interactions“, tedy imunitní interakce, „murine interactions“, tedy myší interakce.

K práci mám tyto otázky a připomínky:

**Str. 2:** u testování kandidátních vakcín proti antigenům borelií bych přivítala citace, které by umožnily dohledat jednotlivé práce

**Str. 4:** v tabulce píšete, že *Borrelia californiensis* je přenášena klíšťaty *Ixodes scapularis*, *I. pacificus* a *I. ricinus*, ale uvádíte, že se vyskytuje jen v USA, naopak *B. kurtenbachii* je zde uveden jako přenašeč i *I. scapularis*, ale přitom výskyt pouze v Evropě. Můžete to vysvětlit?

**Str. 6, 17:** u obrázků v česky psané práci bych přivítala české popisky

**Str. 25:** jak jsem již zmínila výše, zde by bylo vhodné zařadit podrobnější popis získání a přečištění obou proteinů, jelikož tyto postupy mohou mít vliv na výsledky imunologických pokusů. Můžete to doplnit?

Str. 24, 26: borelie byly v pokusech přidávány k buňkám do média s antibiotiky. Nemohl fakt, že spirochéty nebyly živé, částečně ovlivnit výsledky pokusů, například u fagocytózy?

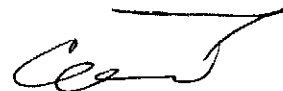
Str. 33: u proteinu SPI se zdá, jako by efekt na snížení produkce IL-6 byl pozorovatelný pouze u katepsin G knockout myší. Jak si to vysvětlujete? Může to znamenat, že zde by byl efekt proteinu SPI na tvorbu IL-6 závislý na stejném funkčním místě jako inhibiční aktivita proti katepsinu G a kontaktem SPI s katepsinem G byl poškozen?

Str. 47: zde diskutujete, proč ve vašich pokusech nebyla měřitelná produkce IL-12. Vysvětlujete to tím, že použitý ELISA kit detekuje heterodimer, k jehož tvorbě by bylo potřeba kostimulačního signálu, který ale chyběl. Co je tímto signálem a proč nebylo možné ho v pokusu dosáhnout? Případně proč nebyl použit jiný detekční kit?

Str. 50: v případě proteinu IRS-2 byly získány nekonzistentní výsledky při sledování ovlivnění fagocytózy pHrodo kuliček a CFSE značených borelií. Tento fakt vysvětlujete tím, že IRS-2 pravděpodobně neovlivňuje samotnou internalizaci částic, ale spíše má vliv na zpracování antigenu ve fagozomu tím, že nedochází v jeho přítomnosti ke snižování pH. Tato teorie mi přijde velmi zajímavá a jeví se i pravděpodobná, neměla jste ale možnost ji nějak ověřit? Například v případě fagocytózy pHrodo kuliček ověřit množství fagocytovaných částic pomocí fluorescenční mikroskopie? Nebo není možné pomocí nějakého činidla zjistit pH ve fagozomech/lysozomech?

Práce Jany Páleníkové obsahuje velké množství původních výsledků, které mohou být základem kvalitní publikace. Zároveň dosažené výsledky naznačují, že by si toto téma zasloužilo ještě další výzkum, aby byly zodpovězeny otázky, které vznikly při psaní této diplomové práce. A proto doufám, že se studentka studiu vlivu rekombinantních klíštěcích proteinů na buňky přirozené imunity bude věnovat ve svém případném doktorském studiu. Práce podle mého názoru splňuje ve všech ohledech nároky kladené na diplomovou práci Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a **doporučuji** ji proto k obhajobě.

V Plzni 16. 1. 2013



RNDr. Kateřina Černá, Ph. D.



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

I. lékařská fakulta

ÚSTAV IMUNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE

Studničkova 7, 128 00 Praha 2

Česká Republika

Posudek diplomové práce

*Bc. Jany Páleníkové*

**Interakce buněk přirozené imunity se spirochetami lymeské boreliózy  
a jejich ovlivnění molekulami klíštěcích slin**

Práce se zabývá studiem vztahu přenašeč – mikrob – hostitel na modelu lymeské boreliózy. Jde o téma velmi aktuální, protože lymeská borelióza je onemocněním častým a závažným, proti kterému dosud neexistuje účinné očkování. Podrobná znalost imunologických reakcí proti boreliím je základním předpokladem konstrukce účinné vakcíny. Práce byla prováděna v laboratoři, která se již léta zabývá studiem interakce klíšťat a imunitního systému hostitele a dosáhla v této oblasti řady prioritních výsledků. Diplomantka se začlenila do tohoto dlouhodobého programu laboratoře a výsledky její práce znamenají další posun v řešení problematiky na molekulární a buněčné úrovni. Imunomodulační účinek klíštěcích slin je znám. Autorka studiem imunomodulačních vlastností dvou rekombinantních proteinů klíštěcích slin výrazně přispívá k objasnění mechanismu působení klíštěcích slin při přenosu infekce.

Práce je členěna obvyklým způsobem a až na několik drobných chyb je pěkně formálně upravena. Koncepce je promyšlená a reálná a vytčených cílů bylo dosaženo. Velmi se mi líbí úvodní literární přehled, který je velmi zajímavý a výborně didakticky pojatý.

Úroveň literárního úvodu a dlouhý seznam citované literatury ukazují na dobrou orientaci autorky ve studované problematice. Použité metody jsou dobře popsány. Jde o metody vhodné moderní a náročné zahrnující práci s experimentálními zvířaty, imunochemické metody, metody molekulární biologie a průtokovou cytometrii.

V kapitole „Výsledky“ jsou popsány zjištěné účinky rekombinantních proteinů klišťecích slin IRS-2 a SPI na tvorbu cytokinů IL-6, IL-10 a TNF-alfa a na funkci makrofágů. Součástí diplomové práce je rovněž vypracování metodiky sledování fagocytózy průtokovou cytometrií. Výsledky jsou výstižně a logicky shrnuty v závěrech. Velmi přesvědčivé jsou výsledky týkající se inhibičního účinku IRS-2 na genovou expresi a produkci zánětového cytokinu IL-6 myšími dendritickými buňkami. Jde o jasný průkaz jednoho z mechanismů imunosupresivního působení klišťecích slin. Nepochybný je účinek klišťecích slin při potlačení fagocytózy u myši, účinek rekombinantních proteinů však již není tak jednoznačný a vyžaduje další studium.

Získané výsledky jsou kriticky posouzeny v diskusi. Zejména zajímavá je diskuse o možných mechanismech ovlivnění fagocytózy klišťecími slinami a jejich složkami. V diskusi je podrobně pojednáno o postupu při hledání vhodného způsobu testování fagocytózy průtokovou cytometrií. Podle mého názoru by měl být tento bod zahrnut spíše do výsledků, protože najetí vhodné metody znamenalo značné tvůrčí úsilí a bylo jedním z cílů práce.

K práci mám následující připomínky a otázky:

- Patrně ze špatné formulace věty vyplývá, že NOD2 je na povrchu makrofágů.
- Na str. 18 je uveden IL-6 jako Th1 cytokin
- Bylo by vlastenečtější použít jiný výraz než „design pokusu“.
- Byl nějaký zvláštní důvod k tomu, že v případě K.O. myši byli používáni samci, zatím co u ostatních kmenů, jak je běžné, samice?
- Při izolaci dendritických buněk byly použity magnetické kuličky. Byla izolace prováděna jen 1 x, nebo byla separace opakována? Jaký byl výtěžek buněk a jaká byla jejich čistota?
- U paragrafu 3.2.2. na str. 28 by bylo vhodnější v nadpisu mluvit o genové expresi, ne o produkci cytokinu.
- Popis obrázků, zejména u 4.1. není „samovysvětlující“. Měly by v něm být lépe charakterizovány jednotlivé sloupečky, zejména vzhledem k tomu, že popis grafů v textu je poněkud komplikovaný.
- Na str. 33 (4. ř.) je záměna SPI za IRS-2.

- Jak by bylo možné interpretovat snížení produkce IL-10 působením IRS-2 a SPI vzhledem k celkově imunosupresivnímu účinku slin?
- Ke studiu fagocytózy byla z pochopitelných důvodů použita neadherující buněčná linie makrofágů. Je otázka, do jaké míry může tato linie vypovídat o účinku na fagocytózu in vivo, protože adherence je jedna ze základních vlastností makrofágů za přirozených podmínek.

## ZÁVĚR

Předložená diplomová práce je velmi pěkně a koncepčně zpracovaná. Přináší významné původní výsledky a svědčí o teoretické i metodické erudici autorky, o její schopnosti samostatně vědecky pracovat a kriticky hodnotit a interpretovat výsledky. Doporučuji přijetí diplomové práce k obhajobě.



Prof. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc.

V Praze 20. 1. 2013