

Oponentský posudok na magisterskú prácu Bc. Markéty Wachtlovej

Názov práce: Kotvení agonistů PRRs na nádorové buňky s cílem navození protinádorové imunitní reakce na úrovni vrozené imunity.

Školitel: RNDr. Jan Ženka, CSc.

Diplomová práce Markéty Wachtlovej je súčasťou projektu, ktorý sa zaoberá liečením nádorov pomocou cielenej aktivácie buniek vrodenej imunity. Diplomanka mala dva jasne definované ciele. Prvým cieľom bolo vytvoriť bunky melanomovej línie B16- F10, ktoré by exprimovali na bunčkovom povrchu avidín, ktorý by následne zprostredkoval vazbu biotinylovaného ligandu. Druhým cieľom bolo optimalizovať metódu detekcie BAM a DOPE (biocompatible anchor for cell membrane-látok kotviacich do membrány) po naviazaní na bunky.

Práca je klasicky členená.

V literárnom úvode sa dočítame o histórii liečenia nádorových ochorení, stručnej klasifikácii nádorov, typických znakoch nádorových buniek. Niekoľko strán je venovaných imunoterapii nádorov. Diplomantka sa ďalej zaoberala možnosťou ukotvenia PAMPs na nádorové bunky, stručne popísala možnosť využitia vírusových vektorov na prenos génov a uviedla prehľad najčastejšie používaných vektorov v génovej terapii. Posledných 6 strán sa venovala popisu vazbe avidin-biotin. Táto časť práce je prehľadne spracovaná, po štylistickej ani obsahovom stránke nemám výhrady. Niekedy som však pozorovala nepomer medzi počtom citácií a dĺžkou textu. Napr. v kapitole imunoterapia nádorov, ktorej sú venované 2 strany boli iba dve citácie. Celkový počet citácií je však úctyhodný, celkom 79.

Materiál a metodika je obsiahnutá na 8 stranách. Metódy sú stručne a zrozumiteľne popísané. Pripomienky:

1. Postrádam informáciu o plazmidoch, ktoré boli použité k transfekcii. Chýba jak mapa plazmidov, tak ich zdroj. Práca by mala obsahovať taktiež schému vírusového konštruktú a odkiaľ pochádza protokol na trasfekciu a následne transdukciu vírusových častíc.
2. Na str. 24 uvádzate, že plazmid (vírusový konštrukt odvodенý od lentiviru) kóduje GFP. Na str.27 píšete, že tento virový vektor neniesol gén pre GFP, ale obsahoval expresnú kazetu pre puromycínovú rezistenciu. Predpokladám, že druhá varianta je správna.

Výsledky sú zhrnuté na 9 stranách, 12 obrázkoch a 2 tabuľkách. Diplomantka s cieľom exprimovať avidín na povrchu B16 F10 buniek použila dva rozne virové konštruktú, oba kodujúce fúzny proteín avidín + transmembránový proteín butyrophilin. Expresiu avidínu v buňkách sa nepodarilo dokázať, resp. docieľiť. Myslím, že takto náročná úloha vyžaduje hodne šťastia a viac času.

K tejto časti mám niekoľko pripomienok.

1. Str.31 zber média s virovými časticami miesto virovým vektorom.
2. Počítali ste titer viru, ale nikde som nenašla, aký titer bol použitý pri infekcii B16-F10 buniek.
3. V kapitole Materiál a metodika na str. 26 uvádzate schému, podľa ktorej by ste mali mať 8 vzoriek pri teste kontroly vazby biotinu na avidín. Vo výsledkoch vidíme najviac 4 vzorky. Vysvetlite.

Diskusia je obsiahnutá na 3 stranách. Autorka diskutuje o roznych možnostiach ukotvenia fagocytárných ligandov a vyjadruje sa k teoretickým dovodom, prečo nebol avidín detekovaný. K tejto kapitole mám iba jednu pripomienku.

1. Vzorce látok BAM a DOPE patria do kapitoly Materiál a metodika.

Otázky:

1. Zaujímalo by ma, prečo sa pri transdukcii pridáva polybrene k vírusovej suspenzii?
2. Na obrázku č. 9 prezentujete histogram, ktorý zobrazuje percentuálne zastúpenie GFP pozitívnych buniek. Uvádzate, že na základe toho ste vypočítali titer. Mohli by ste objasniť, ako ste došli k výsledku 7×10^5 IFU/ml? Ako vyzerali histogramy pri použití 5 a 50 μ l vírusovej suspenzie, ktoré uvádzate v metódach? Došli ste k podobnému výsledku?
3. Metóda vkladania génov pomocou vírusových vektorov patrí k tým najúčinnejším. Nameraná GFP expresia bola však pomerne nízka (iba 0,2% pozitívnych buniek). Ako si to vysvetľujete?
4. Vo vašich experimentoch nebolo jasne preukázané, či sa avidin neexprimuje vôbec, alebo či sa exprimuje vo vnútri bunky, alebo ako monomer (a preto nie je rozpoznávaný biotínom, ako uvádzate v diskusii). Akou inou metódou by ste mohli overiť expresiu avidinu okrem imunofluorescencie? Ake iné spôsoby vloženia génov do buniek ešte poznáte?
5. Bola dvojdňová selekcia v prípade použitia lentivírusového konštruktu postačujúca?
6. Akým spôsobom sa viaže BSA, hemoglobín alebo PE na BAM/DOPE? Nie sú BAM/DOPE pre bunky toxické?

Diplomová práca Markéty Wachtlovej prezentuje pilotné experimenty v zaujímavom a odvážnom projekte, kde cieľom bolo naviazať fagocytárne ligandy na povrch nádorových buniek prostredníctvom avidínu. Diplomantka sa oboznámila s modernými metódami molekulárnej biológie, s biochemickými analýzami a s prácou s bunkovými kultúrami. Napriek zväčša negatívnym výsledkom táto práca priniesla potrebnú informáciu pre riešiteľov projektu o možnosti využitia tejto metódy a bola iste prínosom i pre samotnú autorku. Po formálnej aj obsahovej stránke hodnotím prácu kladne a doporučujem ju k obhajobe. Navrhujem klasifikovať prácu známku jedna až dva.

V Českých Budějoviach, dňa 15.1.2013

Jaroslava Lieskovská





UNIVERSITY of CALIFORNIA, SAN DIEGO
SCHOOL OF MEDICINE

Ján Strnádel, PhD.
University of California, San Diego
School of Medicine
Department of Pathology
Moore's Cancer Center
office: 858-822-5616
fax: 858-822-4566
email: jstrnadel@ucsd.edu

Posudok k diplomovej práci s názvom ***“Kotvení agonistů PRRs na nádorové buňky s cílem navození protinádorové imunitní reakce na úrovni vrozené imunity”***

Cieľom predloženej diplomovej práce bolo experimentálne overenie možnosti expresie avidínu transdukciou virálnym vektorom s následným kotvením agonistov PRRs na nádorových bunkách s cieľom navodiť protinádorovú imunitnú odpoveď na úrovni vrodenej imunity. Ďalším cieľom bolo optimalizovať systém na detekciu väzby BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane) a DOPE (N-(Succinimidyl)oxy-L- α -phosphatidylethanolamine, Dioleyl) na nádorových bunkách melanómovej línie B16-F10.

Diplomová práca je prehľadne členená, v teoretickej časti využíva množstvo citovanej českej i zahraničnej literatúry. Jednotlivé časti do seba plynulo zapadajú a autorka Markéta Wachtlová v nich vysvetľuje pojmy použité v ďalších častiach diplomovej práce. Spracovanie teoretickej časti je dostatočne informatívne a rozsiahle. Vo väčšej miere sa autorka venuje imunoterapiám.

V metodickej časti sú stručne popísané metódy, chemikálie a plasmidy, použité na prípravu virálnych vektorov. Pozitívne možno hodnotiť aj výber metódy na zavedenie avidínu na povrch nádorových buniek. Využitie virálnych vektorov je dnes veľmi aktuálne, aj keď na rozdiel od iných metód vyžaduje zvýšenú opatrnosť pri experimentálnej práci. Skúsenosť s prácou s virálnymi vektormi je v prípade mnohých zahraničných laboratórií požadovaná od aplikanta/ky na študijný pobyt. Metodická časť je vhodne členená a plynule prechádza do záveru a diskusie.

Aj keď výsledky možno nezodpovedajú v tomto prípade cieľom, ktoré si autorka stanovila, celkovo najväčším prínosom je zoznámenie sa s niektorými základnými metodikami molekulárnej biológie, prácou s fluorescenčným mikroskopom, spektrofotometrom a prietokovým cytometrom. Autorka vecne a kriticky hodnotí dosiahnuté výsledky, z ktorých možno brať do úvahy optimalizáciu metódy kvantifikácie väzby BAM a DOPE ako jeden z cieľov s pozitívnym výsledkom.

Úroveň grafického výstupu (obrázky, grafy) je dobrá, snád' len s pár výnimkami v popise grafov. Okrem toho je možno žiadúce použitie českých názvov aj v prípade citovaných tabuliek napriek faktu, že niektoré preklady (napr. "pakážovací buňky" - v origináli "packaging cells" môžu vyznievať trochu "veselo").

Voči práci nemám väčšie výhrady. V texte sa nájdu menšie nepresnosti (napr. namiesto výrazu "excitačný filter pre GFP" je lepšie použiť "emisný filter"), ďalej na str. 30 "PMD2.G - kóduje obalový proteín VSV" - správne "kóduje obalový proteín VSV-G". Prácu hodnotím veľmi kladne, so známku "výborná". Verím, že téma, ktorú si autorka vybrala ju aj naďalej motivuje, pretože by bola škoda, aby ostala len v štádiu diplomovej práce. Získané experimentálne skúsenosti a výsledky, ktoré sa dostavia môžu v spojení s testovaním *in vitro* pokusov na *in vivo* systéme viesť k publikačnému výstupu a zároveň otvoriť dvere do niektorých napr. amerických laboratórií, kde je protinádorová imunitná reakcia na úrovni vrodenej imunity intenzívne študovaná.

Ako návrhy do diskusie predkladám tieto otázky:

- 1.) Viete vysvetliť prečo niektoré vírusy preferenčne infikujú nádorové bunky?
- 2.) Aké vlastnosti musí mať ideálny systém na kotvenie agonistov PRR na nádorové bunky?
- 3.) V prípade, že by sa Vám podarilo dokázať expresiu avidínu na povrchu nádorových buniek po transdukcii virálnym vektorom, aké by boli Vaše ďalšie kroky? Ako by ste takýto systém overili na laboratórnych zvieratách v prípade melanómov a ako v prípade iných nádorov?

S pozdravom do Českých Budejovic

13-01-2013

Ing. Ján Strnádel, PhD.

UC San Diego School of Medicine, Department of Pathology

9500 Gilman Drive, San Diego, CA 92093-0695 TEL 858-822-5616 FAX (858) 858-822-4566