

RNDr. Veronika Urbanová, Ph.D.
Biologické centrum AVČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
České Budějovice

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Hany Chytráčekové
Název: Vliv klíčtčích cystatinů na TLR - indukovanou maturaci myeloidních dendritických buněk

Předložená práce je sepsaná na 48 stranách s minimem překlepů. Zabývá se vlivem klíčtčích cystatinů na maturaci dendritických buněk a produkci cytokinů po stimulaci různými TLR ligandy. Po formální stránce je diplomová práce v pořádku.

V úvodní části práce autorka stručně charakterizuje klíšťata a vliv molekul přítomných v klíšťech slinách na imunitní odpověď hostitele během sání klíšťete. Dále je popisován imunitní systém hostitele s důrazem na Toll-like receptory, avšak chybí stručnější popsání molekul CD80, CD86, MHC II a TNF α . Lépe bych charakterizovala TLR ligandy (LPS, LTA, IQ, POLY I:C), které jsou používány v experimentech diplomové práce a nikde nejsou detailněji popsány a není vysvětleno, proč byly použity.

Poznámky a otázky:

- 1) Kapitola 1.1 a 1.1.2, strana 1: V textu chybí citace (rozdělení klíšťat, sání klíšťat).
- 2) V kapitole 1.1.2.1, strana 2: Autorka zde popisuje fikoliny (Ixoderiny) a tvrdí, že mají doménu podobnou komplementové složce C3. Je tomu opravdu tak? O jakou doménu se jedná?
- 3) Kapitola 1.2.2, strana 4: V druhém odstavci chybí citace.

Kapitola materiál a metody popisuje získání a přípravu buněk pro experimenty, jejich stimulaci různými ligandy a měření exprese a produkce vybraných molekul.

Poznámky a otázky:

- 1) Kapitola 3.7, strana 17: Tabulka I uvádí nastavení parametrů cytometru, přičemž není nikde popsáno, co udávají či znamenají číselné údaje v tabulce.
- 2) Strana 18, 19, 20: V pokusu č. 1, 2 a 5 autorka popisuje, že magnetická separace po přečištění od CD11c negativní populace nebyla použita. V pokusu č. 3, 4 byly buňky přečištěny od CD11c negativní populace magnetickou separací. Jaký byl důvod v některých pokusech buňky přečistit od CD11c negativní populace a v jiných ne?

Výsledky: Autorka zde pomocí grafů ukazuje inhibiční efekt cystatinů na TLR ligandy indukovanou maturaci myeloidních buněk. Výsledky jsou zpracovány v přehledných grafech, avšak místy se vyskytují nejednoznačné informace, viz. následující otázky.

Poznámky a otázky:

- 1) Kapitola 4.1, strana 21 a 22: Na obrázku 5 a 6 je ukázána exprese MHC II komplexu po stimulaci různými TLR ligandy. V čem se liší stimulace pomocí LPS na obrázku 5 a 6? Exprese MHC II po stimulaci LPS má na každém obrázku jiné hodnoty.
- 2) V kapitole 4.1 autorka píše: U POLY I:C (10 μ g/ml) a IQ (10 μ g/ml) nedocházelo k aktivaci maturace myeloidních dendritických buněk, zřejmě kvůli příliš vysoké koncentraci ligandu, která působila na buňky toxicky. Přesto tyto koncentrace ligandu měly za následek signifikantní zvýšení TNF- α (obr. 7 a 8). Je tedy možné, že POLY I:C (10 μ g/ml) a IQ (10 μ g/ml) působí na buňku toxicky a přesto u ní indukují produkci TNF α ? Proč na obrázku 7 a 8 mají kontrolní buňky jinou expresi TNF α (bylo vždy v daném experimentu stejné množství buněk)?

- 3) Na obrázku 9 je zobrazen vliv cystatinů na expresi CD80 u CD11c pozitivních buněk po stimulaci LPS. V grafu je zobrazeno, že všechny klíštěcí cystatiny signifikantně snižují expresi CD80. Je tomu opravdu tak? Rozdíly mezi expresí CD80 po stimulaci LPS a LPS+cystatin mi přijdou poměrně malé.
- 4) Na obrázku 16 je ukázána exprese CD80 po stimulaci LTA jako statisticky signifikantní, přičemž statistická významnost byla vztahována k buňkám stimulovaným LTA (jak je psáno v textu pod grafem)! Nejedná se přeci o porovnání exprese CD80 u LTA stimulovaných buněk vůči kontrolním buňkám. Je tedy vliv cystatinů na expresi CD80 po stimulaci LTA opravdu signifikantní?
- 5) Obrázek 17 ukazuje expresi CD86 po stimulaci LTA. Autorka v textu nad obrázkem píše, že experiment byl proveden 2x. Z textu vyplývá, že poprvé byl experiment proveden s nepřečištěnými buňkami a exprese CD86 byla po stimulaci LTA zvýšena jen mírně a cystatiny expresi snížily nesignifikantně. Opakování pokusu přineslo zcela jiné výsledky (zvýšená exprese po stimulaci LTA a signifikantní snížení exprese po inkubaci s cystatiny. Jak autorka může vědět, který z výsledků je správný? Proč nebyl experiment ještě zopakován nebo data zprůměrována (je-li to v tomto případě možné)?
- 6) V kapitole 4.4 chybí graf znázorňující vliv cystatinů na expresi CD80 po stimulaci imiquimodem (v kapitole materiál a metody je napsáno, že exprese CD80 byla měřena). Autorka nakonec toto měření neprováděla?
- 7) Kapitola 4.5: Proč po stimulaci POLY I:C nebyl měřen vliv cystatinů na expresi CD80, MHC II a produkci TNF α jako je tomu u předchozích experimentů?
- 8) Z textu není zcela zřejmé, kolikrát byly jednotlivé experimenty opakovány. U některých pokusů autorka píše, že výsledek byl potvrzen opakováním, jinde toto prohlášení chybí. Byly tedy veškeré experimenty opakovány alespoň dvakrát?

Diskuze je celkem přehledně sepsána, pouze některé pasáže (popis MHC II a sialostatinu L) bych očekávala v úvodu práce.

Přes uvedené připomínky a otázky se domnívám, že autorka zvládla použité metody, splnila vytyčené cíle práce a dosažené výsledky ukazují inhibiční efekt klíštěcích cystatinů na TLR ligandy indukovanou maturaci myeloidních buněk. Jsem přesvědčena, že magisterská diplomová práce Hany Chytráčkové splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 21.5.2014

Veronika Urbanová

Jindřich Chmelař, Dresden, 19.5.2014

Oponentský posudek na magisterskou práci Hany Chytráčkové Vliv klíštěcích cystatinů na TLR-indukovanou maturaci myeloidních dendritických buněk

Předkládaná práce odpovídá svým obsahem, rozsahem a formou nárokům a požadavkům, které jsou na magisterskou práci kladeny. Tučně zvýrazněné jsou otázky, na které bych rád znal odpověď.

Na 48 stranách autorka popisuje projekt, v němž sledovala pomocí imunologických technik vliv klíštěcích cystatinů na maturaci dendritických buněk. V úvodu je stručně popsána skupina Ixodidae, z níž pochází studované proteiny. Dále je popsán imunomodulační vliv klíštěcích slin a jsou popsány některé popsané imunomodulátory z klíštěcích slin. Tato část je dle mého možná až příliš stručná a zasloužila by více rozvést. Podrobněji už autorka pojednává o cystatinech, dendritických buňkách a rozpoznávání patogenů. V úvodu bych autorce doporučil, aby v některých částech šla více do detailu a něco naopak rozváděla méně tak, aby hlavní část úvodu byla přímo spojená se studovaným tématem. Například popis dendritických buněk by měl být víc spojen s jejich rolí v protiklíštěcí imunitě, apod.

U použitého materiálu je zvykem uvádět i výrobce, případně katalogové číslo, jelikož stejný výrobek od dvou různých producentů může výrazně ovlivnit výsledek. V kapitole 3.3 stojí věta „Pomocí pipety s modrou špičkou byla dřeň rozsuspendována,...“. **Rád bych se autorky zeptal, proč nepoužila špičku obyčejnou, průhlednou.** V kapitole 3.6 autorka uvádí, že protilátky byly ředěny 1:100. Bohužel tato informace nestačí, je třeba uvádět koncentraci buď konečnou nebo před zředěním. U popisu metody průtokové cytometrie bych uvítal podrobnější popis, jak byly jednotlivé populace identifikovány a ohraničeny, tj. **jaká byla „gating“ strategie.** Tato informace je celkem zásadní, stejně jako uvedení kombinací protilátek, které byly použity a proč. **Kolik nejvíce protilátek bylo použito dohromady a proč?** Mám otázku ohledně kultivace dendritických buněk. Bylo použito GM-CSF k jejich derivaci. Tento růstový faktor se ale používá rovněž k derivaci M1 makrofágů, které rovněž exprimují CD11c. Byla populace DC nějak odlišena od makrofágů, třeba použitím nějakého specifického markeru při FACS analýze? **Pokud ne, jaký marker by měl být použit, případně jak by se při kultivaci dalo tyto dvě populace myeloidních buněk oddělit?**

Z části „výsledky“ jsem asi nejvíce rozpačitý. Je sice vidět, že dat k prezentaci má autorka dostatek, ale způsob, jakým jsou data prezentována, není nejlepší. Předně, každý odstavec zní v podstatě stejně: „Obrázek ten a ten zobrazuje to a to. Z grafu vyplývá to a to.“ První věta se více méně vždy opakuje ještě u popisu obrázku. Takto je za sebou poskládáno 28 samostatných obrázků. Dle mého názoru by čitelnosti a srozumitelnosti výsledků prospělo, kdyby související obrázky, např. z FACS analýzy, byly dány do jednoho panelu a obrázek by tak byl např. 7A, B, C. Tím by autorka dosáhla toho, že by mohla výsledky popsat v jednom odstavci spolu se souvislostmi a práce by byla přehlednější a soudržnější.

Dále mi přijde škoda, že se v práci objevuje pouze jeden typ grafů. Chybí mi informace o tom, jak FACS analýza vypadala, tj. jakým způsobem byla primární data zpracována do prezentovaných grafů. Tolik k formě, teď k samotným výsledkům.

Nejdřív bych byl rád, pokud by autorka vysvětlila, v čem se liší mechanismus stimulace použitými ligandy, to jsem v práci bohužel nenašel. Je patrné, že stimulace TLR vede k různě silným reakcím a vliv cystatinů je také rozdílný v závislosti na použitém ligandu. Například stimulace pomocí LPS a LTA

vede ke zvýšení exprese kostimulačních molekul a cystatiny tuto expresi snižují, zatímco zvýšená exprese indukovaná pomocí IQ není cystatiny nijak významně ovlivněna. Stejně tak vliv cystatinů na produkci IL-10 je odlišný, v závislosti na použitém ligandu. **Čím tedy tyto rozdíly mohou být způsobené?** Všiml jsem si že intenzita fluorescence se významně liší mezi pokusy u stejných analyzovaných molekul, např. obr. 9 a 16, kde jednou je kontrola na 1000MFI zatímco u druhého obrázku na 12000MFI. **Čím je toto způsobeno?**

Diskuze: V druhém odstavci je použit termín „downregulace“. Přestože nejsem žádný jazykový purista, použití tohoto anglicismu, který je jednoduše nahraditelný českým ekvivalentem, mi přijde zbytečné. Popis funkce sialostatinů a jiných cystatinů se netýká výsledků a dendritických buněk, měl by být tedy uveden v úvodu. V diskuzi se mají diskutovat výsledky a otázky, které výsledky navozují, například jaký mechanismus je za snížením exprese kostimulačních molekul, jaký je vztah mezi prozánětlivou aktivací a maturací atd.

Celkově mi přijde, že diplomová práce Hany Chytráčkové obsahuje dostatek dat, i když některé výsledky by si zasloužily bližší prozkoumání a rozvedení. Nicméně forma prezentování těchto dat mi přijde málo přehledná a nedrží moc pospolu. V úvodu a diskuzi se píše hodně o dendritických buňkách a cystatinech, ale bohužel z většiny samostatně, tedy ne o cystatinech a jejich vlivu (pozorovaném nebo potenciálním) na dendritické buňky.

Mé výhrady ať autorka bere především jako doporučení pro další případnou vědeckou práci, ne jako samoučelnou kritiku.

Práci doporučuji k obhajobě se známkou 2.

Jindřich Chmelař

