

Oponentský posudek na bakalářskou práci Anny Palounkové

„Úloha osy PD-1/PD-L1 při infekci *Borrelia burgdorferi* u myši“

Předkládaná bakalářská práce sestává z rešeršní a vlastní experimentální části. Téma bakalářské práce spadá mezi problematiku indukce imunitní tolerance boreliemi, potažmo klíštěcími slinami, kterou se na katedře medicínské biologie dlouhodobě zabývá tým doktorky Lieskovské. Autorka si klade za cíl v rešeršní části zpracovat problematiku role kontrolních bodů v imunitní odpovědi a ve vlastní experimentální práci pak vliv osy PD-1/PD-L1 na buňky imunologické synapse aktivované boreliemi. Autorka se během své práce seznámila s prací v laboratoři a osvojila si základní metody z imunologie.

Práce v rozsahu 41 stran má obvyklou strukturu skládající se z kapitol: Úvod (9 stran), Cíle práce (1 strana), Materiál a metody (8 stran), Výsledky (10 stran), Diskuse (4 strany), Shrnutí (1 strana), Seznam literatury a Seznam použitých zkratk. Použitá literatura čítá 54 citací, přičemž pozitivně hodnotím použití pouze vědeckých zdrojů.

-Kapitola úvod

Rešeršní část práce je bohužel stylisticky velmi slabá, což značně stěžuje její srozumitelnost. Chybí mi návaznost jednotlivých kapitol, ze kterých by bylo zřejmé, proč autorka zvolila zrovna tyto informace a jak spolu vzájemně souvisejí. Rovněž velmi iritující je doslovný překlad některých pasáží z angličtiny, který zapříčiňuje špatnou větnou skladbu a nesmyslné slovní obraty.

Jako příklad bych uvedla doslovně přenesenou formulaci „deficit hlavových nervů“ (str 2) volila bych spíše vhodnější překlad postižení hlavových nervů. Stejně tak „*borrelia* tissue burden“ je spíše množstvím borelií ve tkáni než tkáňovou zátěží (str 4) jak uvádí autorka.

Řada informací však špatným překladem získává úplně jiný charakter, např. TLR jako takové nemají prozánětlivý účinek (...“mohou prozánětlivé účinky TLR’s“... strana 3). Protein CspA a další zmiňované proteiny jsou exprimované na povrchu borelií, což opět překlad zcela mnění (...“CspA je převládající protein vázající FH/FHL-1 B. burgdorferi a je produkován během sání klíšťat krátce po přenosu na hostitele, ale není produkován u klíšťat, která nesála.... strany 4 a 5).

Kapitola 1.4.3. pojednávající o klíštěcích slinách je trochu nelogicky vmezeřena mezi mechanismy kterými se borelie jako takové vyhýbají imunitní reakci hostitele. Volila bych samostatné umístění této kapitoly. Zároveň, jelikož ve vlastní experimentální práci nebyly sliny klíšťat použity, uvítala bych u této kapitoly úvod, kde by autorka vysvětlila, proč o nich hovoří a jaký mají vztah k infikování hostitele boreliemi. Spojitost mezi klíštěcími slinami a boreliemi je zmíněna pouze v úvodu kapitoly 1.2. Klinika Lymeské boreliózy. Autorka zde uvádí, že borelie migrují do slinných žláz klíštěte a spolu se slinami se přenáší do dermis hostitele. Jelikož se nacházíme v Českých Budějovicích a kromě univerzity tu máme také Akademii věd a řadu excelentních vědců zabývajících se přenosem borelií, myslím, že by v tomto kontextu měla být zmíněna práce doktora Radka Šímy a jeho kolegů, kteří ve svých experimentech toto dlouholeté dogma vyvrátili.

Kapitoly 1.5.1. a 1.5.2. bych vyměnila, aby se čtenář nejdříve dozvěděl o ose PD-1/ PD-L1 a pak teprve dostal detailní popis jejího působení. Řada informací je navíc v těchto kapitolách duplicitních.

Vzhledem k celkové koncepci práce bych rovněž zaměnila pořadí kapitol 1.5.3. a 1.5.4. o úloze imunitních bodů u rakoviny a infekcí. Tyto kapitoly by si také zasloužily sjednocení názvů.

- Kapitola Materiál a metody

U experimentálních prací je obvyklé, že se píše v trpném rodě. Kapitoly 3.1. a 3.2. popisující použité myši a borelie jsou psány správně v tomto trpném rodě, zřejmě proto že jsou léty "standardizovány" téměř u všech studentů KME. V dalších kapitolách se autorka uchýlila k méně vhodnému použití 1. osoby, což na čtenáře působí rušivě. Toto bych doporučila mít na mysli v budoucnu při psaní diplomové práce.

Pro čtenáře by bylo přehlednější, kdyby byly jednotlivé kapitoly nazvány dle cílů, kde první kapitola by bylo schéma pokusu a pak by následovaly podkapitoly s jednotlivými kroky. Samotný obrázek se schématem pokusu je velmi podařený a myslím, že by mu slušelo být na začátku kapitoly.

U cytokinových ELISA testů, které jsou prováděny dle manuálu výrobce a nebyly nijak modifikovány, není třeba vypisovat celý postup.

Kapitola 3.9. působí jakoby byla jen tak mimochodem přidána, přitom ve výsledcích se dozvídáme, že tyto pokusy byly defakto pilotní a na jejich základě autorka prováděla další pokusy s pDC. Domnívám se, že toto by autorka mohla zmínit již zde v krátkém úvodu. Rovněž si myslím, že tyto pokusy jsou rovnocenné pokusům s pDC a splenocyty a tato kapitola by si rovněž zasloužila rozdělení do kapitol izolace – aktivace – měření.

V kapitole 3.4. pojednávající o aktivaci pDC se poprvé objevuje nepřesnost, která se jako červená nit táhne celým zbytkem práce. Autorka při svých experimentech izolovala splenocyty a ty pak dále kultivovala s plazmacytoidními dendritickými buňkami. **Proto je formulace „kokultivace pDC s T lymfocyty“, která se objevuje ve všech grafech a hojně i v textu, chybná.**

- Kapitola diskuse

U této kapitoly velmi cítit, že výsledky autorky jsou originální a nejsou téměř žádné práce, se kterými by své výsledky mohla konfrontovat. Proto bych se nebála alespoň částečně nastínit, zda jsou výsledky v souladu s předešlými daty získanými v laboratoři medicínské biologie. Rovněž existuje publikace o indukci PD-1 a PD-L1 u klíštěte *Rhipicephalus microplus* (Sajiki 2021), kterou by bylo vhodné vzhledem k nedostatku relevantní literatury uvést. Velmi oceňuji závěr diskuse navrhuující další postup.

K práci mám několik dotazů:

1. Jak jsem již zmínila, fakticky jste nepracovala s T-lymfocyty, ale se splenocyty. Jaké další imunitní buňky jsou ve slezině přítomny?
2. Jaký byl procentuální výtěžek pDC při jejich derivaci? Kontrolovali jste jejich zastoupení při každém pokusu?
3. Kolik procent všech splenocytů tvořily CD3+ buňky?

4. Čím si vysvětlujete zvýšení exprese PD-1 u CD4+ a CD8+ T lymfocytů po 2 hod inkubaci s anti PD-L1 protilátkou?

5. Jedním z cílů vaší práce je stanovení exprese PD-1/PD-L1 u myších buněk imunologické synapse in vitro. Ve výsledcích však máte pouze expresi PD-L1 neutrofilů, potažmo PD-1 u CD4+ a CD8+ T lymfocytů. Nemáte však expresi PD-1/ PD-L1 u pDC se kterými pracujete. Měřila jste expresi obou molekul na plazmacytoidních DC? Pakliže ano tak prosím o graf, pakliže ne tak prosím o vysvětlení.

6. Je známo, že dendritické buňky na svém povrchu mohou exprimovat jak PD-1 tak jeho ligand PD-L1. Myslíte si, že ve vašem experimentálním designu, spolu reagují samotné pDC právě vazbou PD-1/PD-L1?

Práce Anny Palounkové začala vznikat na jaře roku 2020, který byl poznamenán vypuknutím epidemie koronaviru a s ním spojenými restrikcemi. Bohužel, domnívám se, že toto se nepříznivě projevilo právě na kvalitě předkládané práce. Celkově na mě práce působí velmi chaoticky, jakoby sama autorka nevěděla, o čem přesně píše. Jak sama autorka píše, toto téma má potenciál, který zde nebyl plně využit. Po důkladném zvážení se však i přes všechny výše uvedené výhrady a připomínky domnívám, že předložená práce splňuje všechny odborné náležitosti vyžadované Přírodovědeckou fakultou JU a proto **doporučuji** práci k obhajobě.

Známku navrhnou na základě zodpovězení položených dotazů.

V Turnově dne 16. 5. 2022

RNDr. Jana Hradiská PhD.



