



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Oponentský posudek na diplomovou práci

Název: Příprava agonistické myší monoklonální protilátky proti lidskému CD40 antigenu

Autor: Bc. Pavla Šoffrová

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Oponent: doc. Mgr. Jaroslava Lieskovská, CSc.

Předložená práce Bc. Pavly Šoffrové se zabývá přípravou myších monoklonálních protilátek proti lidskému CD40 antigenu a následní charakterizaci získaných protilátek s cílem zjistit, zda se jedná o protilátky agonistické či antagonistické.

Práce je sepsaná na 53 stranách a dle zvyklostí je členěna do několika kapitol: Úvod (1 strana), Literární přehled (16 stran), Materiál a metody (8 stran), Cíle (1 strana), Výsledky (10 stran), Diskuse (4 strany), Závěr (1 strana), Seznam zkratek (2 strany) a Seznam použité literatury (10 stran). Práce je psaná čtivou formou, stylisticky a gramaticky správně s akceptovatelným počtem překlepů. Po formální stránce nemám k práci zásadní připomínky, i když ojediněle se objevují slovné zvraty, které by bylo možné nahradit vhodnějšími ekvivalenty.

Literární přehled je zaměřen na charakteristiku CD40 receptoru, jeho ligandu CD40L/CD154, a detailně popisuje důsledky jejich interakce v jednotlivých imunitních buňkách. Autorka nastiňuje význam CD40/CD40L interakce za fyziologických a patologických podmínek a tyto informace prokládá početnými příklady doplněnými o pravděpodobný mechanismus účinku. Samostatná kapitola je věnována potenciálu agonistických protilátek v nádorové imunoterapii či použití antagonistických protilátek v léčbě autoimunitních nemocí. Celkově působí literární přehled uceleně, ovšem s ohledem na téma práce obsahuje množství nadbytečných a zbytečně podrobných informací, které je navíc pro čitatele obtížné pojmout. Této části práce by prospělo doplnění jednoduchých schémat ilustrujících význam CD40/CD40L interakce a vynechání některých kapitol. Naopak postrádám základní informace o protilátkách samotných, o struktuře, rozdělení a jejich vzniku.

V metodické části autorka uvádí použitý materiál a metody, které využívala v experimentech. Metody jsou popsány srozumitelně a v postačujícím rozsahu. Líbí se mi doplnění metod o jejich princip. Schéma přípravy monoklonálních protilátek hybridomovou technologií by bylo přínosné.

V části výsledky autorka slovně informuje o výsledcích přípravy a selekce monoklonálních protilátek a formou grafů prezentuje výsledky charakterizace získaných protilátek. Autorka fúzí splenocytů získala přes 1000 hybridomových kolonií, otestovala 658 hybridomů z nichž postupnou selekcí byly vybrány 18 hybridomových kolonií produkujících protilátky reagujících s CD40 antigenovými epitopy. Agonistická povaha získaných protilátek byla vyhodnocována na základě měření proliferace B lymfocytů (RAJI) a produkce IL-8 lidskými monocyty THP-1. Antagonistické Ab byly testovány na základě schopnosti kompetovat vazbě CD40 ligandu na CD40 receptor na buňkách THP-1, co se projevilo inhibicí produkce cytokinu IL-8. Autorka získala 1 agonistickou Ab, 2 antagonistické Ab a jednu potenciálně agonistickou Ab. Výsledky jsou jasně prezentovány v několika grafech s vyhovujícími popisky. Bylo by přínosné protilátky purifikovat a výše uvedené experimenty zopakovat s použitím protilátek o známe koncentraci, aby byl jejich agonistický nebo antagonistický účinek ověřen.

V části diskuse autorka zdařile diskutuje své výsledky a nastiňuje nutnost humanizace myších protilátek pro jejich terapeutické využití. V závěru jsou stručně a jasně shrnuty výsledky práce.

Připomínky:

1. Str. 2 a 3. Při popisování biologických procesů v buňce se používá spíš činný rod. 'Gen je kódován mRNA' není správné vyjádření. Správně má být uvedeno 'Gen kóduje mRNA'. 'Gen pro CD40 je uložený na chromozomu'. Správně má být uvedeno 'Gen pro CD40 leží na chromozomu'.
- 'CD40L je uložen v cytoplazmě'. Správně má být uvedeno 'CD40L se nachází v cytoplazmě'
2. Termín 'dyáda' je užíván spíš v sociologických vědách, v případě 'vztahu' CD40/CD40L mi připadá vhodnější termín 'interakce' nebo 'komplex'.
3. Popisky k obrázkům 8, 9, 10 a 12 chybně uvádějí název protilátky.
4. Tvrzení na straně 33 doloženo obrázkem 10 o snížení produkce cytokinu IL-8 není správné. Žádné snížení s grafu patrně není.
5. Jednotlivé grafy by bylo možné sloučit (např. Obr. 11 a 12) a vyhnout se tak dojmu o snaze zvětšit objem kapitoly.

Otázky:

1. Z jakého důvodu byly buňky THP-1 inkubovány dva dny s IFN-gamma a až poté s monoklonální protilátkou? Produkce IL-8 byla velice nízká. Jak si toto vysvětlujete?
2. Při testování proliferace B lymfocytů jste používala 1% sérum. Tato koncentrace vznikla vlastně naředěním hybridomového media. Myslíte, že obsah séra byl srovnatelný mezi jednotlivými hybridomy, pokud neměly stejnou kinetiku růstu?

3. Jaký je rozdíl mezi kompletním a nekompletním Freundovým adjuvans? Z čeho se skládá?
4. Podle jakého kritéria byla vybrána koncentrace séra pro testování proliferace B lymfocytů?
5. V kapitole 2.3.2. píšete, že po vyzrání dochází ke cross-prezentaci. Prosím o vysvětlení tohoto pojmu.
6. Jaké jsou výhody/nevýhody anti - CD40 protilátky ve srovnání s CD40 ligandem?
7. Jaké jiné metody (kromě metody ELISA) byste vybrala na otestování vazby CD40 ligandu s CD40 Ab?
8. V práci není nikde uvedeno, že agonistická CD40 protilátka byla připravena z důvodu následného potencionálního použití v MBTA nádorové imunoterapii. Jaké jsou plány se získanými protilátkami?

Závěr:

Autorčina práce vedla ke vzniku několika hybridomových klonů produkujících CD40 specifické protilátky, které můžou být (po doplnění) využity v diagnostice nebo po úpravě v terapii. Přínos práce je tedy zřejmý. Kromě toho je nutné dodat, že příprava protilátek hybridomovou technologií je časově náročná. Navzdory výše zmíněných připomínek můžu konstatovat, že předložená práce Pavly Šoffrové splňuje veškeré požadavky kladené na diplomovou práci na přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity. Práci doporučuji k obhajobě a její klasifikaci učiním podle obhajoby a odpovědí na mé otázky.

V Českých Budějovicích dne 12. 1. 2023