

Posudek na diplomovou práci Lukáše Vejsady „Diverzita MHC alel a parazitace v populacích drobných hlodavců“

Cílem práce Lukáše Vejsady bylo zhodnotit parazitaci a MHC diverzitu populací drobných savců, norníka rudého, hraboše polního a mokřadního. Lukáš se nakonec soustředil na ektoparazity a diverzitu alel lokusu MHC DRBII a porovnal míru infestace s diverzitou MHC alel.

Dovolte mi, abych práci posoudil z pozice imunologa. Je pravdou, že MHC antigeny jsou vysoce polymorfní a jejich odhadovaná diverzita (zahrnující třídy I a II) je znázorněna číslem 10^{19} , přičemž v práci studované DRB geny se u člověka vyskytují v nejméně 480 alelických formách. MHC antigeny hrají základní roli v prezentaci antigenu T lymfocytům i když ve srovnání s T receptorem je jejich specifita pro prezentované peptidy výrazně nižší. V imunologických učebnicích se uvádí, že nízká diverzita MHC antigenů u zvířat žijících v malých skupinách (gepardi) může být příčinou jejich zvýšené náchylnosti k chorobám. Imunologická odpověď na konkrétního patogena (parazita) však nezávisí pouze na MHC haplotypu, ale je ovlivňována řadou dalších parametrů jako je věk, pohlaví a zdravotní stav zvířete, ale i tolerance k antigenům patogena díky zkřížené reaktivitě s vlastními antigeny hostitele. Na druhé straně je třeba si uvědomit, že prakticky všichni paraziti jsou schopni se účinně bránit imunitnímu dozoru.

Paraziti sehráli nepochybně významnou úlohu ve vývoji genofondu hostitelů a konkrétně i v udržení vysokého polymorfismu MHC antigenů. Avšak bude zřejmě obtížné posoudit vliv konkrétních parazitů na tento polymorfismus. Lukáš si vybral pro své studie ektoparazity, i když získal i informace o zamoření studovaných hlodavců kokciemi. Zatím co u kokcií je úloha adaptivní imunity zcela jasná a vzhledem k intracelulárnímu parazitizmu kokcií hrají nejvýznamnější úlohu T lymfocyty závislé na MHC prezentaci antigenů parazita, u ektoparazitů už tato otázka tak jasná není. U krátkých sajících ektoparazitů je uplatnění T buněčné imunity diskutabilní, u dlouho sajících klíšťat (Ixodidae) se T buněčná imunita nepochybně uplatňuje (bazofilní kožní hypersenzitivita – forma DTH). O imunitě proti ektoparazitům z čeledi Laelapidae se neví prakticky nic, u sametek jsem našel práci Wright et al. (1988), která dokazuje, že po opakovaném sání sametek *Eutrombicula cinnabaris* se vyvíjela kožní reakce s projevy DTH a Arthusovy reakce. Schopnost vyvinout tuto reakci byla na naivní jedince přenosná lymfocyty opakovaně exponovaného dárce. Tyto pokusy však byly prováděny na laboratorních myších, které nejsou přirozenými hostiteli těchto ektoparazitů. U klíšťat je známo, že odpověď hostitele na opakované sání se výrazně liší v závislosti na tom, zda se jedná o přirozeného nebo arteficiálního hostitele. Zatím co u nepřirozených hostitelů (králík) se na antigeny klíštěčích slin vytváří silná imunitní reakce, která je schopna klíště zabít, u přirozených hostitelů (myšice) se prakticky žádná kožní reakce nekoná. Je to zřejmě výsledek koevoluce ektoparazita a hostitele. Tím jsem chtěl pouze naznačit důležitost výběru parazita pro studium vlivu diverzity MHC alel na parazitaci hostitelů a naopak.

Lukáš Vejsada se ve své diplomové práci zaměřil hlavně na ektoparazity hrabošovitých. Sám přiznává, že problémem byl odchyt hlodavců do sklapovacích pastí a ne do živolovek, což mohlo vést k tomu, že část ektoparazitů tělo hostitele po smrti opustila. Překvapivé jsou rozdíly ve výskytu roztočů u „zahraničních“ hlodavců (Polsko, Bulharsko) ve srovnání s tuzemskými. Jak by to autor vysvětlil?

Lukáš Vejsada analyzoval MHC diverzitu u tří hrabošovitých hlodavců a zjistil, že sledovaný lokus DRBII se vyskytoval v průměrném počtu 4,9 – 5,6 alel. Maximální nalezený počet alel byl 9. Při

ověřování selekčního tlaku prokázal pouze vliv negativní purifikující selekce. Prokázal závislost mezi počtem alel a počtem přítomných ektoparazitů. Sám ale přiznává v diskusi, existuje řada metodických proměnných, které mohou ovlivnit výsledky.

Dá se tedy konstatovat, že student vyčtené úkoly splnil, i když musel zadání práce poněkud modifikovat.

K práci mám několik faktických připomínek a dotazů:

Str. 1: v imunitním systému obratlovců je mnohem důležitější T buněčný nebo B buněčný receptor než MHC antigeny.

Str. 5: Pouze T lymfocytům, které jsou schopné rozpoznat své vlastní MHC peptidové komplexy je dovoleno vstoupit do cirkulace a to z důvodu nebezpečí autoimunitního onemocnění. Věta je nepravdivá.

Str. 5: Správně se píše proteazom (proteasome) a ne proteozom.

Str. 6: Úloha Th buněk nespočívá pouze v aktivaci B lymfocytů a makrofágů, ale také na příklad Tc lymfocytů.

Str. 15, 2. odstavec: Díky spolupráci s Toll-like receptory se zvažuje i možnost, že by mohly MHC geny ovlivňovat tímto způsobem i vrozenou imunitu. Chybí citace: Frei R. et al. PLoS One 5: e8808, 2010.

Str. 19: *Microtus agrestis* je hraboš lesní? Myslel jsem, že mokřadní.

Str. 25, Tab. 3: Na str. 25 chybí celková data pro *Myodes glareolus* (jsou až na konci tabulky na str. 26).

Str. 31: fylogenetický strom je špatně čitelný.

Dotazy:

1. Jak vysvětlíte vyšší rezistenci k parazitárním infekcím u jedinců s vyšším počtem MHC alel?
2. Proč byl k analýze MHC diverzity vybrán právě lokus DRB II?
3. Co je „good genes hypothesis“ pro samce a mohla by se uplatnit při interakci ektoparazitů s hrabošovitými hlodavci?

Závěr: Lukáš Vejsda splnil požadavky kladené na diplomovou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 5. 1. 2018



Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.



Posudek oponenta na magisterskou práci **Bc. Lukáše Vejsady:**

Diverzita MHC alel a parazitace v populacích drobných hlodavců

Magisterská diplomová práce obsahuje 39 stran textu, který se opírá o rozsáhlý soubor 71 zdrojů citovaných údajů. Práce je doplněna přílohou s tabulkami materiálu, protokoly, získanými primárními daty a grafy. Cílem práce bylo provést analýzu parazitace a MHC diverzity v populacích drobných zemních hlodavců u norníka a dvou druhů našich hrabošů. Předložená práce se tedy zabývá velmi zajímavou problematikou na pomezí parazitologie, populační a evoluční biologie. Není pochyb o tom, že bylo nabídnuto studentovi velmi atraktivní téma, při jehož řešení může získat kromě znalostí také cenné praktické zkušenosti a dovednosti jak z terénu při odchycích, tak v laboratoři při aplikaci molekulárně-biologických metod.

V úvodu předkládané práce autor popisuje základní termíny a mechanismy získané imunity a její genetické základy. Pro čtenáře, který se s touto problematikou nesetkává denně, není text vždy úplně jasný, překlad z angličtiny je někdy neobratný, chybí předložky, objevují se chybné pádové koncovky, chybí nebo přebývají diakritická znaménka, občas chybí shoda podnětu s přísudkem, nicméně v běžném rozsahu diplomových prací. Na druhou stranu po přečtení úvodu jsem se cítil být do problematiky stručně uveden.

Metodika je vcelku dobře popsána, není zde ale zcela jasné, jak byla získána data u hrabošů, jestli se autor také podílel na odchytu a dalším zpracování.

Str. 19 – nahoře *Microtus agrestis* není hraboš lesní ale mokřadní.

Str. 21, Obr. 5 - koláčové grafy neukazují relativní četnosti druhů na lokalitách ale strukturu odchyceného materiálu.

U výsledků (kap. 4.1) není jasné, proč musel být využit program QP30 a ne jakýkoliv jiný statistický program s deskriptivní statistikou? Pokud je ve studii zaměřena pozornost na populace, pak není možné je spojovat, i když je nedostatek materiálu. Spojování populací je možné pokud řešíme otázky na úrovni druhu. Podobně v populačních studiích je nevhodné z grafu vyřazovat jakoukoliv skupinu jedinců, zvláště pak zde s nulovým výskytem parazitů. To přináší úplně jiný dojem o stavu parazitace. Na str. 26 je uvedeno, že výsledné histogramy jsou uvedeny na Obr. 5,6,7 - čísla by ale měla být posunuta o jednu a pak i další čísla obrázků v textu.

Kap. 4.2.2 – „s pravděpodobností $p=0,004$ “ vhodnější formulace by byla např., že výsledek je průkazný na hladině významnosti $p=0,004$. Hladina významnosti $p=1,0$ je zcela mimořádná.

Kap. 4.3 Korelace mezi alelami a parazity – podle počtu vzorků (kroužků v grafu 23 a 27) není zcela jasné, o jakou korelaci se vlastně jednalo – jestli mezi alelami jedince a počtem určitých parazitů na něm nebo mezi celkovým počtem alel stanovených v populaci a třeba průměrnou zátěží jedinců v této populaci. V druhém případě by pak bylo jasné, že korelace musí být slabá, neboť ji stírá dosti velký informační šum.

Str. 34, obr. 12 - zde není proložena přímka ale křivka.

V diskusi jsem našel pouze drobnou nepřesnost na str. 35 dole (spíše komickou „... více lidí s živými pastmi ...“ lépe s pastmi živočasnými). Jinak diskuse byla vcelku povedená a snažila se diskutovat všechny výsledky a aspekty předkládané studie.

Závěrem mohu konstatovat, že, přes výše uvedené námítky, poznámky a komentáře, byla odvedena odborná práce a sepsána o ní zpráva odpovídající požadavkům na diplomovou práci na PřF JU. Pokud bych měl hodnotit práci známkou, přiklonil bych se ke stupni velmi dobře.