

Oponentský posudek na Disertační práci Mgr. Aleny Morávkové

Název: Ontogeneze B lymfocytů u vybraných veterinárních druhů savců

Komentář k Cílům

Jak píše autorka v kapitole 2, měla její práce, používající miniaturní prase a psa jako základní model, následující cíle:

1. vytvořit nové druhově specifické monoklonální protilátky s unikátní specifitou
2. prostudovat B lymfopoézu (včetně ontogeneze)
3. srovnat B lymfopoézu prasat s jinými druhy

Z tohoto výčtu se podařilo dosáhnout cílů 2 a 3 v tom smyslu, že autorka popsala imunofenotyp různých B subpopulací za použití kombinací monoklonálních protilátek (mAb). Bod 1 se nepodařilo splnit ve smyslu, jak autorka zřejmě očekávala, nicméně vyprodukovala nové mAb, které reagovaly buď s rekombinantním proteinem CD19 (již ne s nativním) nebo s molekulami, které jsou společné pro lymfoidní a myelomonocytární buňky (po imunizaci směsí buněk z DG90).

Celkový komentář k Disertační práci

Jednotlivé části Disertační práce budí dojem, jako by byly psány ve vzájemně rozdílné duševní kondici. Ve srozumitelně a poutavě napsaném Literárním přehledu (s minimem překlepů) staví autorka objekt svého zájmu správně do kontextu se současným stavem poznání. Materiál a metody jsou exaktně napsány, zde ani jinde v práci jsem ale nenašel údaje o počtech použitých zvířat, které jsem postrádal ve Výsledcích. Kapitulu Výsledky vidím jako jasně nejslabší část Disertační práce a konkrétně ji rozebírám níže. Diskuse je opět psána srozumitelně a částečně vysvětluje nejasnosti kolem postupu zmíněném ve Výsledcích. Přílohy obsahují práci autorů Morávková a spol (Folia Biol. – IF 0,51) a 2 práce se spoluautorstvím (Vet. Immunol. Immunopathol. – IF 1,8, Mol. Immunol – IF 3,2). Práce s prvním autorstvím je o problematice, o níž se Disertační práce vůbec nezmiňuje (inokulace sarkómové linie K2 do potkana).

Výsledky

CD19

Nejdříve autorka popisuje sekvenování CD19 a určení mezidruhové homologie. Na základě sekvence určena míra konzervovanosti CD19, nejbližší prasečímu je lidský protein (72% homologie). Větší variabilita je v extracelulární části molekuly. Jak uvádí Mgr. Morávková, tuto část provedl J. Sun z laboratoře prof. Butlera. V dalších podkapitolách (5.1.2.2. až 5.1.2.4.) popisuje autorka snahu o vyvinutí specifických protilátek proti prasečí CD19. V textu nevidím zmínku, že by autorka zkusila anti-lidské protilátky (vzhledem k homologii

lidské a prasečí CD19), kterých je velké množství. Toto zkoušení ale proběhlo (podle ústní informace školitele) a přineslo údajně negativní výsledek. Rekombinantní polypeptidy (fragment extracelulární domény) autorka exprimovala v bakterii. Po imunizaci myši vytvořila hybridómy, výsledných 11 mAb testovala na Westernu rekombinantního polypeptidu. Čtyři měly nejvyšší reaktivitu a byly nejstabilnější, žádná z nich ale nereagovala s lyzátem B buněčné linie (Western) ani cytometricky. V dalším sledu experimentů použila autorka mononukleární buňky (DG90) jako zdroj imunizace a z výsledných mAb většina pozitivně reaguje s MNC, ale nikdy údajně není omezena na populaci; opět byly 4 hybridómy vybrány a produkce byla nestabilní a vyhasla.

Igα (CD79a) a SWC3

MAB proti lidské CD79a autorka prioritně použila na prasečí B lymfocyty s pozitivním výsledkem. Na základě kombinace s protilátkami proti CD2 a μ udává autorka 5 subpopulací, přičemž tyto molekuly staví do kontextu s dřívějšími pracemi školitele specialisty. CD2 asi předchází povrchovou expresí μ , což ale nebylo prokazováno přímo. Expresi CD2 a SWC3 vztahují k jednotlivým stádiím podle přestaveb imunoreceptorových genů. Přímě ale testování přestaveb není zmíněno.

Fetální orgány

Jednotlivé subpopulace byly sledovány během fetálního vývoje, přičemž ale není uvedeno shrnutí, jak a zda se jednotlivé nálezy lišily.

Psi

Podobnými experimenty sledovány B lymfoidní a hematopoetické prekurzory u psů. CD34^{pos} bb jsou v souladu s dostupnými daty hojnější v KD u mladých zvířat. Byl nalezen vztah mezi expresí CD34 a SWC3^{low}.

Výsledky – celkový komentář

Jako zásadní vidím skutečnost, že kapitola Výsledky téměř nikdy (výjimkou je práce Faldyny a kol. v příloze) nezmiňuje, kolik bylo použito zvířat. Navíc není často uveden bezprostřední závěr provedeného pozorování (který by mohl být širěji rozveden v Diskusi). Tím není jasný tok myšlenek, který vedl k jednotlivým experimentům.

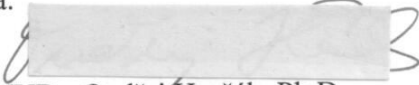
Otázky

1. Testovali jste reaktivitu lidských mAb proti CD19 u prasat? Pokud byly negativní, jaké klony se podařilo vyzkoušet?
2. Poté, co 4 vybrané hybridómy neprodukovaly kvalitní mAb proti CD19, proč jste nevyzkoušeli zbylých 7?
3. V textu se zmiňujete, že u žádné protilátky nebyla reaktivita omezena jen na jednotlivou populaci, ale v Obr 5 demonstujete mAb 1D12, která se zdá, že tuto podmínku splňuje.

4. V experimentech popisujících ontogenezi několikrát zmiňujete, jaké geny Ig by měly být na daném stádiu přestavěny. Testovali jste svou hypotézu na DNA úrovni?
5. V Diskusi popisujete, že nemožnost vytvořit B-specifické mAb může být dána tím, že myši byly imunizovány směsí buněk z DG90, kdy je již velké množství myeloidních buněk. Vaše experimenty s CD2 a SWC3, případně dalšími mAb implikují, že je možné získat relativně čisté B lymfoidní prasečí buňky. Byla by to cesta k získání specifických mAb?
6. V Úvodu se zmiňujete o dvou faktorech, které ukazují prase jako důležitý experimentální nástroj: hospodářská/veterinární důležitost a biologická blízkost člověku (i když jen v některých aspektech). Na co konkrétně přitom potřebujeme B-specifické protilátky?

Doporučení

Klady Disertační práce i výhrady vůči ní zmiňuji výše. Požadavek 1 práce v časopise s nenulovým IF (1. autorství) je splněn, přičemž problematika v něm obsažená se netýká tématu Disertační práce. Z Disertační práce vyplývá, že autorka ovládla několik metod a je schopna vytvořit kvalitní literární přehled. Formální kritéria Disertační práce včetně publikační aktivity jsou tedy s výhradami splněna.


doc. MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D.
Klinika dětské hematologie a onkologie
2. lékařská fakulta UK
email: Ondrej.Hrusak@lfmotol.cuni.cz