

Mgr. Ondřej Štěpánek, Ph.D.  
Vedoucí Laboratoře adaptivní imunity  
Ústav molekulární genetiky, v.v.i  
Akademie Věd ČR  
Václavská 1083  
14220, Praha  
ondrej.stepanek@img.cas.cz

### Oponentský posudek diplomové práce Bc. Ivy Pacákové

#### **Origin and regulation of intraepithelial CD4<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> T-cells induced by Segmented filamentous bacteria**

Předložená diplomová práce se zabývá původem a indukcí nekonvenční populace CD4<sup>+</sup> CD8α<sup>+</sup> T-lymfocytů, konkrétně rolí dvou střevních bakteriálních druhů a molekulárních mechanismů v jejich indukci. Uchazečka práci vypracovala ve stále relativně mladé, avšak již dobře etablované, laboratoři školitele Dr. Jana Dobeše. Navazuje bezprostředně na předchozí výzkum v této skupině, který byl publikován ve špičkovém časopise *Journal of Experimental Medicine*.

V první části svého výzkumu uchazečka srovnávala bezmikrobní myši, myši monokolonizované Segmented filamentous bacteria (SFB) nebo *Lactobacillus reuteri* a myši kolonizované oběma bakteriálními druhy zejména z hlediska počtu a fenotypu střevních intraepiteliálních lymfocytů (IEL), zejména CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů. Uchazečka získala zajímavé výsledky, z nichž některé byly potvrzením publikovaných data a některé zcela nové. Efekt dvojité kolonizace měl spíše malý vliv oproti monokolonizaci SFB, s výjimkou zvýšené frekvence GZMB<sup>+</sup> LAMP1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IEL a lehce snížené frekvence IEL produkujících IFNG nebo IL17A CD4<sup>+</sup> IEL a zvýšené frekvence regulačních T-lymfocytů. V další části práce uchazečka zavádí monoklonální model SFB antigenně specifických T-lymfocytů pro jejich sledování v průběhu kolonizace/vývoje myši. Na pilotním pokusu s nízkým počtem zvířat ukazuje data, která naznačují, že transferované SFB-specifické Th1 buňky se více akumulují jako IEL a vykazují silnější cytotoxický IEL fenotyp než Th17 buňky. Práce ukazuje výsledky dalších experimentů zaměřené na zdroj IFNG ve střevním epitelu a roli AhR receptoru ve formování množství a fenotypu IEL.

V první řadě bych chtěl vyzdvihnout, že se jedná o velmi aktuální a zásadní imunologické téma, které je zároveň technicky a intelektuálně extrémně náročné. Množství experimentální práce, kterou uchazečka odvedla, je obdivuhodné a dle mého názoru dalece překračuje typické diplomové práce v tomto programu. Lze pochopit, že uchazečka chtěla všechny tyto své výsledky do práce zahrnout, čímž se ovšem sama postavila před náročný úkol. Čím více výsledků práce obsahuje, tím více dat a obrazové dokumentace je třeba připravit, popsat a diskutovat. Přestože někdy méně znamená více, tak zcela rozhodnutí uchazečky chápu. **Tímto pohledem musím práci hodnotit celkově jako vysoce nadprůměrnou a níže uvedené nedokonalosti nepovažuji za velmi problematické.**

Diplomová práce je standardně členěna na literární úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi a závěr. Oceňuji, že cíle práce jsou jasně definované a následně jejich splnění je diskutováno

v závěru. Práce je psána krásnou srozumitelnou vědeckou angličtinou, kde jednotlivé věty mají jasné stručné sdělení bez nadbytečných odboček a výplňkových frází. Zejména literární úvod mi bylo potěšením číst, u výsledků a diskuze již čtivost a srozumitelnost mírně kolísá. Abych si odbyl své oponentské povinnosti - autorka se nevyvarovala některých formálních a typografických chyb (pár vybraných uvádím na konci posudku). Nicméně množství těchto chyb je akceptovatelné a nevybočuje z běžné praxe u takto rozsáhlého textu psaného a podrobně kontrolovaného jedním autorem. Práce obsahuje mnoho obrazové dokumentace – celkem 34 původních obrázků, které ilustrují literární úvod, ukazují schéma experimentů a „gatovací“ strategii a samozřejmě prezentují získaná data.

Metody jsou popsány odpovídajícím způsobem. Výsledky jsou prezentovány srozumitelnou formou s několika níže uvedenými nedokonalostmi. Diskuze je zdařilá, přišlo mi jen, že u takto dynamického pole by asi šlo diskutovat/citovat více recentních publikací.

**K práci mám následující připomínky a otázky, na které by měla uchazečka reagovat u obhajoby:**

1. Podle popisku a metod u pokusu ve Figure 6 byly použity pro kvantifikaci „universal bacterial S16 primers“. V případě monokolonizovaných myší by tedy specifické a univerzální primery měly dávat totožné výsledky (řekněme po očištění rozdílné účinnosti primerů). Jak je tedy možné, že tato relativní kvantifikace dává rozdílné výsledky u různých monokolonizovaných myší a že se mění v čase? Dále, jak je možné, že *L. reuteri* bylo detekována v monokolonizovaných myších SFB? Překvapilo mne, že toto pozorování není diskutováno. Pokud došlo ke kontaminaci SFB monokolonizovaných myší bakterií *L. reuteri* (byť množství této bakterie bylo výrazně nižší než u dvojité kolonizovaných myší), tak to možná významně mění interpretaci naměřených dat. Mohla by uchazečka podrobně popsat, v jakých hygienických podmínkách byly myši chovány v průběhu experimentu? Jak bylo zajištěno/testováno, že nedošlo ke kontaminaci prostředím?

2. Jak bylo počítáno Z-score u analýzy výsledků prezentovaných ve Figure 9? Nejprve mi bylo podezřelé, že hierarchie jednotlivých myší (datových bodů) se mění při zobrazení netransformovaných dat a při Z-score, což bylo částečně vysvětleno až v diskuzi tím, že Z-score byla nejspíše počítána z jednotlivých batchů (kolik jich bylo a kolik myší obsahovaly?). Podrobnější vysvětlení bych očekával ve Figure legends a/nebo metodách. Pro větší transparentnost by bylo dobré ukázat všechna naměřená data s rozlišením, což by umožnilo verifikovat interpretaci dat. Je možné počítat statistickou signifikanci z takto transformovaných dat, když při statistickém srovnání netransformovaných dat výsledky signifikantní nejsou? Nejedná se o tzv. p-hacking? Jak jinak by šlo statisticky hodnotit data s vysokou batch-to-batch variabilitou? Data ve Figure 9B-C je vypadají, že nemají normální rozdělení (zejm. u dvojité kolonizovaných myší), což je v rozporu s předpoklady pro statistický test ANOVA. Jak jinak lze tato data statisticky hodnotit?

3. Popisky k obrázkům jsou místy příliš stručné a zpravidla chybí informace o tom, jaké myši byly analyzovány. Přestože tato informace je většinou uvedena v textu, bylo by přehlednější ji mít i zde. Konkrétně experiment ukázaný ve Figure 33 je matoucí, protože se jedná o inhibici AhR, jehož ligand produkuje *L. reuteri*, ale z textu a Figure 31 vyplývá, že myši byly kolonizovány pouze SFB. To mi nedávalo smysl, než jsem z diskuze (Str. 68-69) zjistil, že patrně tyto myši nebyly germ-free, ale SPF a

tedy nejspíše měly neznámou úroveň „přirozené“ kolonizace bakterií *L. reuteri*. Autorka v diskuzi správně dochází k závěru, že experimenty v takovém setupu lze obtížně interpretovat (zejména, jednali se o pokus adresující: „Mechanisms of IELs activation after colonization by *Lactobacillus reuteri*“). Chápu, že uchazečka tento technicky náročný pokus chtěla zahrnout, ale uvítal bych, kdyby motivace a interpretace byly zjevné již ve výsledkové části. Jaký by měl být design experimentu, který by nejlépe odhalil roli AhR v tom, jak *L. reuteri* ovlivňuje počet a genotyp IELs?

4. Uchazečka interpretuje svá data tak, že Th1 buňky jsou prekurzory cytotoxických IELs (Figure 30). Ovšem předchozí data ukázala, že dvojitě kolonizované myši mají v lamina propria méně IFNG produkujících buněk, ale více cytotoxických IEL než myši monokolonizované SFB (Figure 9 a 11). Mohla by autorka tento zdánlivý rozpor (anti-korelace IFNG produkujících buněk a cytotoxických IEL) vysvětlit? Mohla by uchazečka představit a zdůvodnit svůj pohled na celou cestu, kterou urazí naivní CD4<sup>+</sup> T-lymfocyt než se stane IEL včetně přechodných stadií (lokalizace, fenotyp)?

5. Uchazečka používá pouze výraz SFB. Jedná se o jeden definovaný druh nebo směsnou kulturu? Má tento druh (druhy) vědecké jméno?

#### Příklady formálních a typografických chyb

1. V seznamu literatury jsou některé citace uvedeny neúplně nebo chybně. Článek od Jolicoeur et al. má chybu v názvu a chybně uvedený časopis, článek od Wells et Osborne má nekompletní název a neuvedené periodikum apod.
2. Jméno ústřední bakterie „*L. reuteri*“ je někdy psané kurzívou a někdy ne, často chybně psáno bez mezery mezi zkratkou rodového jména a druhovým jménem.
3. Ve Figure 1 je pravděpodobně chybně uvedeno „CD8ββ+“ místo „CD8αβ+“.
4. „abundance did not decreased“ (Str. 34)
5. Na Figure 7 (gatovací strategie) není odkazováno v textu.

**Celkově hodnotím práci jako excelentní, významně převyšující běžné standardy, jednoznačně ji doporučuji k obhajobě s nejlepším možným ohodnocením.**

V Praze dne 10.5.2024

Mgr. Ondřej Štěpánek, PhD