

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: **Hana Jáňová**

Název práce: ***Immunomodulation of dendritic cells by adenylate cyclase toxin from Bordatella pertusis***

Jméno školitele: Mgr. **Irena Adkins**, PhD.

Jméno oponenta: Mgr. **Tomáš Brdička**, Ph.D.

Datum: 1.6.2010

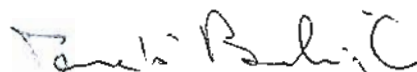
Hana Jáňová se ve své diplomové práci zabývá vlivem toxinu CyaA z bakterie *Bordatella pertusis* na schopnost dendritických buněk prezentovat antigeny T lymfocytům. *Bordatella pertusis* způsobuje onemocnění černý kašel, potenciálně smrtelnou chorobu, která i přes rozsáhlou vakcinaci stále ještě postihuje nezanedbatelnou část světové populace. Adenylát cykloasový toxin CyaA, kterým se zabývá tato diplomová práce je jedním z nejdůležitějších faktorů virulence *B. Pertussis*. Výzkumu tohoto toxinu a jeho vlivu na buňky imunitního systému již bylo věnováno značné množství publikací. Přesto však jsou některé jeho funkce jen poměrně málo prozkoumány. Jednou z těchto aktivit je jeho vliv na antigenní prezentaci dendritických buněk, o které pojednává i tato diplomová práce. V úvodu Hana Jáňová podává přehled literatury, který se v první části zabývá biologií *B. pertussis* a toxiny, které tato bakterie produkuje. Následují kapitoly o relevantních funkcích imunitního systému a literární přehled je ukončen podrobným pojednáním o interakcích CyaA s různými typy leukocytů. Přehled literatury je velmi kvalitně zpracován, svým rozsahem zcela dostačující a až na výjimky má přímý vztah k problémům řešeným ve výsledkové části. Ta se pak věnuje konkrétním experimentům, s cílem objasnit roli CyaA v antigenní prezentaci. V první části používá modelový antigen v podobě serie ovalbuminových epitopů vnesených do dendritických buněk inaktivovaným toxoidem (CyaA-OVA-CA) a přesvědčivě dokazuje že CyaA silně inhibuje schopnost těchto dendritických buněk aktivovat T lymfocyty rozeznávající vnesené ovalbuminové epitopy. Jak jsem vyrozuměl z textu práce, experimenty s podobným výsledkem byly v laboratoři prováděny i s kompletním ovalbuminem. Zřejmě proto byl ve druhé části práce používán jako modelový antigen ovalbumin. Experimenty v této části se zabývají jednotlivými procesy souvisejícími s prezentací antigenů, a mají za cíl objasnit mechanismus, jakým CyaA inhibuje schopnost dendritických buněk aktivovat T lymfocyty. Postupně se podařilo jasným a přesvědčivým způsobem vyvrátit řadu možností, jako např. vliv na apoptosu a adhesivitu dendritických buněk, vliv na endocytózu ovalbuminu a jeho zpracování proteasomem či v endosomálním kompartmentu. Práce tak sice nepřinesla definitivní vysvětlení efektů CyaA na aktivaci T lymfocytů, přesto si ale myslím, že přináší řadu nových důležitých poznatků a svým rozsahem, značnou technickou náročností a dosaženými výsledky více než splňuje to, co se od práce tohoto typu očekává. Velmi oceňuji i dobře napsanou diskusi a rozumnou interpretaci získaných dat.

Po technické stránce Hana Jáňová prokázala zvládnutí řady velmi náročných molekulárně biologických, biochemických a buněčně biologických metod a schopnost práce s vědeckou literaturou. Po formální stránce je práce kvalitně zpracována a napsána velmi dobrou angličtinou s minimem chyb.

Jako taková práce jednoznačně splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji ke kladnému přijetí.

Závěrem ještě několik dotazů do diskuse:

1. V práci používáte dva různé modelové antigeny, CyaA-OVA-CA⁺ a ovalbumin, přičemž na CyaA-OVA-CA⁺ demonstrujete schopnost CyaA inhibovat funkci dendritických buněk, zatímco ovalbumin je pak používán ke studiu mechanismu této inhibice. Jaké jsou rozdíly ve drahách vedoucích k prezentaci peptidů na MHCI a MHCII mezi ovalbuminem a CyaA-OVA-CA⁺. Byly podobné experimenty jako s ovalbuminem provedeny i s CyaA-OVA-CA⁺?
2. Podařilo se vám vyloučit řadu možných mechanismů, kterými by CyaA mohl ovlivňovat schopnost dendritických buněk prezentovat antigeny a aktivovat T lymfocyty. Je možné, že by CyaA ovlivňoval tvorbu imunologické synapse nebo polarizaci dendritické buňky při interakci s T lymfocytom (zejména v souvislosti s jeho efekty na cytoskelet)?
3. Měla jste možnost přímo porovnat dendritické buňky prezentující peptidy z ovalbuminu a CyaA-OVA-CA⁺ pokud jde o jejich schopnost aktivovat T lymfocyty? Byla by šance na využití konjugátů toxoidu s různými epitopy při vývoji nových vakcín?
4. Jakým mechanismem byla po aktivaci v buňkách B3Z indukována tvorba beta-galaktosidasy? V práci to není dostatečně jasně vysvětleno.



Tomáš Brdička

V Praze 1.6.2010