

Oponentský posudek

Diplomová práce: Martina Bajzíkova, Charakterizace biologických a funkčních vlastností nového typu lidských CD27- paměťových B lymfocytů.

Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací biologických a funkčních vlastností nového typu lidských B lymfocytů, které mají fenotyp $IgM^+CD19^+CD21^{lo}CD38^{lo}$, nenesou na svém povrchu molekulu CD27, liší se v expresi molekuly CD24 a jsou detekovány převážně u pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí (CVID) a revmatoidní artritidou (RA). Tato obsáhlá studie zahrnuje kromě rozboru exprese B buněčných znaků detekovaných pomocí průtokové cytometrie též molekulární analýzu zkoumající charakteristiky zmiňovaných B buněčných populací na úrovni jedné buňky. Studována byla především distribuce IgM a IgG transkriptů, analýza VDJ přeskupení pro těžké řetězce u těchto transkriptů a exprese transkriptů pro molekuly RAG. Výsledky práce naznačují, že zmiňované populace B buněk by mohly reprezentovat výkonnostní stádia B lymfocytů s tím, že $CD24^-$ subpopulace je více diferenciována než $CD24^+$ subpopulace. Předností této diplomové práce je především skutečnost, že autorka provedla detailní analýzu získaných sekvencí a získala maximální možný soubor informací o studovaných B buněčných subpopulacích.

Po obsahové a formální stránce je práce kvalitně provedena. Strukturalizace textu je srozumitelná, logická a snadno se v ní orientuje. Abstrakt a úvod vymezují záměry a cíle práce, přiměřeně shrnují uskutečněné experimenty a nabízí vysvětlení nálezů. Literární přehled je rozsáhlý, což se u diplomových prací toleruje, nicméně je logicky řazen, neopakuje se a postupuje smysluplně od základů k specifické problematice. To prokazuje, že autorka se dobře orientuje v problematice B buněk a chápe základní mechanismy této části imunologie. Metodická část je dostatečně podrobná, experimentální procedury jsou popsány důsledně a srozumitelně a umožňují snadnou reprodukovatelnost práce. Výsledky práce jsou obsáhlé a jsou správně řazeny do logických celků. Problematický ve výsledkové části je popis veškerých výsledků prezentovaných v tabulkách a grafech opakovaně v textu. To vede k opakování a způsobuje, že čtenář se v textu snadno ztrácí. Celé práci by prospělo, kdyby se textová část zahustila a orientovala se pouze na popis významných nálezů a rozdílů. Grafické souhrny a tabulky jsou přehledné a mají adekvátní popisky. Sporný je pouze obrázek 7, který je méně čitelný. Diskuse je řazena v logickém uspořádání k získaným výsledkům a poskytuje interpretaci získaných dat. Veškeré výsledky jsou konfrontovány a diskutovány s již publikovanými nálezy. Je škoda, že v diskuzi chybí kritické zhodnocení limitací této diplomové práce. Na druhou stranu diskuse nabízí provokativní hypotézy, které však bude těžké ověřit, protože funkční testy zkoumaných subpopulací B lymfocytů nejsou u lidí snadno proveditelné. Nechybí ani závěry a seznam použitých zdrojů, se kterými bylo pracováno a z kterých bylo čerpáno.

Hlavním příspěvkem předložené práce je odhalení a molekulární popis nového typu lidských B lymfocytů, které sice vykazují na svém povrchu naivní fenotyp ($CD27^-$), avšak molekulární analýza jejich transkriptů naznačila, že by mohly reprezentovat výkonnostní stádia B lymfocytů. Tento náleží je zcela unikátní a vůbec první svého druhu. Tím tuto práci lze hodnotit a považovat za přínosnou a smysluplnou.

Specifické komentáře:

1. Práce byla koncipována jako srovnání unikátních subpopulací B lymfocytů mezi zdravými kontrolami, CVID a RA pacienti. Posuzovatel je však přesvědčen, že je nutno provést srovnání unikátních subpopulací s analýzou sortovaných naivních a především paměťových buněk (CD27⁺). Bez srovnávací analýzy je problematické označovat nově definované subpopulace B lymfocytů za paměťové stádia. Míra diversifikace VDJ přeskupení u unikátních populací může být nesrovnatelně nižší než je tomu u paměťových B buněk. Somatické hypermutace a změna Ig isotypu nejsou nutně iniciovány antigenem a mohou v určitém měřítku probíhat spontánně a bez přítomnosti germinální reakce (například Weller et al., 2001, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98: 1166; Shen et al., 2006, J. Immunol. 177: 5386).
2. Obrázek 13 ukazuje, že někteří CVID pacienti měli mnohem vyšší zastoupení unikátní CD27⁻ subpopulace než jiní, kteří připomínali kontroly nebo RA pacienti. Posuzovatel navrhuje srovnávací analýzu CD27⁻ subpopulace u CVID pacientů s nízkou frekvencí versus s vysokou frekvencí těchto buněk.
3. V práci se několikrát uvádí, že určité výsledky byly pozorovány u všech vzorků, ačkoliv tomu tak nebylo. Zřejmě jde o nevhodnou formulaci v angličtině, ale autorka by se měla takových vyjádření vyvarovat. Například str. 57, 1.odst. „Both IgM and IgG transcripts were discovered in all of analyzed B cells“ nebo str. 82, 3. odst. „RAG mRNAs were detected in all B cell subsets from all analyzed patients“ atd.
4. Autorka našla některé VDJ přeskupení neproduktivní (zejména pro V_H6 a V_H7 rodiny) ačkoliv použila pro PCR amplifikaci mRNA (str. 58). Tento rozpor není blíže specifikován ani není diskutován.
5. Počet analyzovaných genů pro určité analýzy je příliš nízký, aby bylo možno vytvořit významné závěry. To se týká počtu analyzovaných genů v řádech 20-40 sekvencí (např. obr. 14, obr. 15, tab. 10, obr. 19, obr. 20, atd.). Tato skutečnost by měla být diskutována. S tím souvisí i analýza V_H, D_H a J_H genů. Počet genů v různých V_H D_H a J_H rodinách se liší. Například V_H3 rodina obsahuje nejvíce genů, což je správně diskutováno na str. 87. To vyjadřuje i obrázek 15. Pokud je však počet analyzovaných genů příliš nízký a analýza se rozšíří na několik rodin genů, rozdíly v méně a více početných rodinách nemohou být považovány za statisticky významné.
6. V případě uvádění výsledků relativních počtů buněk (např. obr. 13) je vždy nutno zdůraznit k jakému celku se procenta vztahují. Jinými slovy, frekvence čeho představují uvedená čísla (celkový počet všech buněk, lymfocytů, B buněk, CD19⁺ B buněk atd.).
7. Dle posuzovatele není dostatečně diskutován nálezní uniformního rozložení mutací (obr. 21) a délky CDR3 oblasti (obr. 25) u RA pacientů pro obě unikátní subpopulace (CD24⁺ i CD24⁻). Zejména se jedná o diskuzi vzhledem k omezení repertoáru V_H genů a vysoké klonální příbuznosti B buněk. Tento nálezní je velmi důležitý a zajímavý.
8. Při nízkém počtu získaných transkriptů pro IgG je problematické dělat jakékoliv závěry. Zejména pak, jestliže nebyla provedena srovnávací analýza CD27⁻ a CD27⁺ B buněk. Není také diskutována možnost, že absence IgM versus IgG transkriptu může být způsobena limitací použité metody. V případě analýzy jedné buňky je běžné, že transkript se nepodaří amplifikovat. To je zřejmé i z úspěšnosti amplifikace IgM transkriptů pro 96 původně sortovaných buněk. Závěry pro buňky s přítomností jednoho a absencí druhého transkriptu proto mohou být chybné. Tato skutečnost by měla být diskutována.

Celkově hodnotím tuto diplomovou práci jako kvalitní rukopis, který vřele doporučuji k obhajobě. Ačkoliv práce má určité nedostatky, kvalita a množství získaných výsledků jasně převažují. V rámci kvality výzkumu požadovaném pro diplomovou práci jsem přesvědčen, že práce je nadstandardní. Z tohoto důvodu navrhuji udělit absolutorium a navrhuji klasifikaci výborný.



RNDr. Marek Šinkora, Ph.D.

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i.

Sektor imunologie a gnotobiologie, laboratoř 153

Doly 183, 549 22 Nový Hrádek

Tel.: 491-418-516

FAX: 491-478-264

E-mail: marek@biomed.cas.cz