



Faculty of Science
CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

JAN ČERNÝ

Professor of Cell Biology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE

Department of Cell Biology

Viničná 7, 128 40 Praha 2

Czech Republic

Phone: (++420) 2 4106 1795

E-mail: jan.cerny@natur.cuni.cz

POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE Bc. ŠIMONA BORNÝ

Analysis of the resistance of B cell antigen receptor signaling to the inhibition of Src-family kinases.

Předložená diplomová práce se zabývá imunoreceptorovou signalizací v T- a B-lymfocytech s důrazem na jejich rozdíly v inhibici kináz rodiny Src. Jedná se o velice náročné téma, neboť studovaná problematika je v mnoha aspektech dlouhodobě studována mnoha laboratořemi do velkých detailů a to na různých modelech, s využitím primárních i od leukemií či lymfomů odvozených buněčných liniích a to vše na různých knock-out a knock-in modelech různého genetického pozadí. Relevantní literatura tedy obsahuje velké množství kontroverzních dat a diskrepancí, některé z nich se přímo vybízejí k reevaluaci a srovnávacím experimentům.

Jednou z takových záhad dotýkající se samotné molekulární podstaty imunoreceptorové signalizace je téma zvolené Šimonem Bornou pro svou diplomovou práci. Ač by měla být dle převládajícího paradigmatu TCR a BCR signalizace obdobná, při použití specifických inhibitorů Src kináz se ukazují fundamentální rozdíly poukazující na to, že nám stále něco podstatného uniká. Šimon Borna si tedy se svým školitelem kladou důležité otázky, které snaží řešit metodicky moderními adekvátními přístupy, modelově objevně, bohužel vzhledem k složitosti signalizačních drah s ne zcela jednoznačným výsledkem. To ale není překvapivé, studovaný fenomén je natolik komplexní a mnohvrstevnatý, že jeho jednoznačné rozlousknutí by bylo překvapivé. Při čtení práce bylo tedy zřejmé, že téma práce bylo zvoleno vhodně, nutilo studenta pečlivě formulovat hypotézy, ty ještě pečlivěji testovat a úplně nejpečlivěji interpretovat získaná data. Penzum práce, které Šimon Borna odvedl je impresivní, stejně jako jeho orientace v problému, kde si sám vyzkoušel reálný výzkumný projekt, kdy je třeba v labyrintech možností často vstupovat do slepých uliček, opakovaně vstupovat do nových, a hlavně se nenechat odradit neúspěchy. To, co bylo možné snadno objevit, již dávno objeveno bylo!

Práce je psána solidní angličtinou, celkem na 60 stranách, je členěna standardně a obsahuje požadované části. Po formální stránce je zpracována velice kvalitně obsahuje málo překlepů či formulačních lapsů. Je evidentní, že si s ní autor dal hodně práce nejen po stránce formální, ale i obsahové. Jak literární rešerše, tak část výsledková i diskuse jsou promyšleně formulovány. Jak jsem již zmínil, zvolené téma je intelektuálně

náročné, ambiciózní a v literatuře v řadě aspektů kontroverzní. Mohu ale konstatovat, že se s těmito překážkami (které mohou ale být pro někoho ideální motivací) autor vypořádal velice dobře.

K práci bych měl několik otázek a komentářů:

- 1. V experimentální části práce je tematizována vybraná podmnožina kináz Src rodiny exprimovaná v imunocytech, osobně mi v literární přehledu chyběla část týkající se redundanci těchto enzymů v imunitním systému, např. tabulka zachycující expresi jednotlivých členů v jednotlivých buněčných typech, vyčerpávajícím způsobem minimálně na příkladu T- a B- lymfocytů v jednotlivých fázích svého vývoje. Rád bych o něco podobného poprosil při obhajobě.*
- 2. Dále je v práci tematizován inhibitor PP2. I v tomto případě jsem v práci postrádal jeho zevrubnější definici, zařazení do kontextu ostatních kinázových inhibitorů, důvod, proč jste si ho sami vybrali pro své experimenty, i když jej z kontextu dobře tuším. Ostatně s PP2 se pojí jeden z mála formálních nedostatků – a to na straně 27 utajená reference (na téma vysokého IC50 PP2 pro Blk) – označená jako (ref) – zrovna tato by mne velice zajímala, neboť tématu specifčnosti a IC50 PP2 pro jednotlivé členy Src rodiny by myslím opět mohlo být v práci věnováno více prostoru. Prosím o tuto informaci při obhajobě.*
- 3. Dále by mne zajímalo, zda existuje nějaký rozdíl v supramolekulárním uspořádání (oligomerizace, asociace s RAFTy...) mezi TCR a BCR – zvláště ve vztahu k signalizaci.*
- 4. Dále by mne zajímal rozdíl v signalizaci mediované přirozenou interakcí mezi BCR a antigenem/TCR s MHC ve srovnání s tou, která je logicky z praktických účelů pro redukcionistický experiment spouštěna pomocí protilátky.*
- 5. Na straně 15 mne zaujalo konstatování, že BCR je v endozómech oddělen od antigenu a recyklován zpátky na povrch, někdy je však degradován. Co rozhoduje o tom, zda dochází k recyklaci nebo degradaci receptoru? Jsou peptidy derivované z variabilních částí BCR prezentovány? Pokud ano, mohou být rozpoznávány jako cizorodé pomocnými T-lymfocyty a tak je nutit k „falešné“ aktivaci nesprávných buněk? Nemůže se např. zde skrývat fundamentální rozdíl mezi nastavením signalizace v T- a B- lymfocytech, kdy v případě B-lymfocytů se v jedné buňce nalézá jak receptor, tak antigenní presentace s ním interagujících antigenů – obojí nezbytné pro terminální diferenciaci buňky a efektivní produkci rozpustných protilátek?*
- 6. Dále by mne zajímalo, proč si myslíte, že hlavním rozdílem mezi signálními drahami zprostředkovávajícími signál od BCR vs. TCR je schopnost BCR rekrutovat signalozóm obsahující PLC γ .*

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce je zajímavým příspěvkem k tématu signalizace prostřednictvím T- a B-buněčného receptoru, ukazující nové alternativy a vylučující řadu možností, jak vysvětlit jejich rozdílný signalizační pattern. Práce je sepsána kvalitní angličtinou, s minimem formálních provinění, intelektuálně na výši a co je důležité zopakovat, pomocí náročných netriviálních metodik moderní imunologie zahrnující kombinaci molekulárně biologických přístupů, pokročilé buněčné biologie i kombinaci optimálních modelů pro testování konkrétní hypotézy. Tuto práci jednoznačně doporučuji k obhajobě s výborným hodnocením. Autorovi přeji hodně štěstí a úspěchů v dobře započaté vědecké kariéře, kdy si hned na začátek „osahal“ reálný vědecký problém, který je toho typu, že se nedá rozlousknout hned první ranou...

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.