



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. Jiřího Březiny

CX3CR1⁺ migratory dendritic cells in the mechanism of central tolerance

Předložená diplomová práce se zabývá jedním z klíčových témat „Centrálního dogmatu imunologie“ – buněčnými a molekulárními mechanismy centrální tolerance. Přestože se jedná o problematiku zcela mainstreamovou, učebnicovou a vysoce kompetitivní – je překvapivé, jak málo jsme si jistí i ve zcela základních premisách a jak pokrok technologií (zvláště single cell přístupů) mění náš pohled na základ pro pochopení fungování imunologických mechanismů. Výše zmíněný technologický pokrok umožňuje mnohem jemnější a preciznější definici zapojených buněčných populací a přináší nové hypotézy testovatelné pomocí sofistikovaných zvířecích modelů, kdy experimentátor i čtenář erudovaně předložených dat získává pocit, že takto promyšlené a sestavené experimenty musejí konečně přinášet nezpochybnitelná objektivní data...

Při čtení práce je tedy jednoznačné, že téma práce bylo zvoleno velice vhodně, nutilo Jiřího pečlivě formulovat hypotézy, ty ještě pečlivěji testovat a úplně nejpečlivěji interpretovat získaná data. Penzum práce, které Jiří Březina odvedl je impresivní, stejně jako jeho orientace v problému (což prokázal mimořádně kvalitním literárním úvodem aspirujícího na publikovatelný přehledový článek a diskusi). Z pohledu garanta oboru se jedná o optimální situaci, kdy na kvalitním pracovišti vedeném zkušeným školitelem a dalšími spolupracovníky student realizuje projekt navazující myšlenkově na dlouhodobou experimentální kontinuitu, a kde si sám s velkou samostatností vyzkouší 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! Pokud je takový projekt v samém srdci oboru, tím lépe!

Práce je psána výbornou angličtinou, celkem cca 68 stranách, je členěna standardně a obsahuje požadované části. Po formální stránce je zpracována velice kvalitně, je třeba vynaložit mnoho práce identifikovat minuciózní formální nedostatky. Je tedy evidentní, že si s ní autor dal hodně práce nejen po stránce obsahové, ale i formální. Jak literární rešerše, tak část výsledková i diskuse jsou promyšleně formulovány. Práce obsahuje impresivních 200 vhodně vybraných citací, opět citační standard předložené práce je vysoký, včetně identifikace přehledových článků. Kromě výše zmíněného, práce obsahuje celou řadu obrázků. Ty jsou v teoretické části vytvořeny samotným autorem, v části experimentální se jedná o tabule v podstatě publikační kvality, které mají vysoký grafický standard.

Literární přehled je velice zdařilý, kriticky se zabývá rolí thymu v imunitní odpovědi, tematizuje molekulární mechanismy a velice pečlivě a podrobně si všímá všech zatím popsaných buněčných populací. Text je myslím nejkvalitnější tam, kde se věnuje tématu do těch největších podrobností – např. kooperativnímu mezibuněčnému přenosu antigenů. Jak jsem již zmínil, tato část práce by po menších úpravách mohla být vhodným základem pro přehledový článek na téma buněčné heterogenity brzlíku s důrazem na funkční specializaci APC.

Kapitola materiál a metody sevřeně a dostatečně popisuje využití reagentie, myší modely i metodické postupy.

Výsledková část předložená na 11 stranách je opět mimořádně kvalitní, v podstatě se jedná o rozšířený a průběžně komentovaný publikační formát. Diskuse jednoznačně prokazuje autorovu orientaci v problematice, schopnost korelace získaných dat s recentní literaturou, včetně vytvoření pracovního modelu zapojení CX3CR1+ mDC buněk do mechanismů centrální tolerance. Předložená diplomová práce zcela jistě splnila svůj účel proniknout do metodického za intelektuálního zázemí moderní imunologie, a to s přidanou hodnotou skutečného objevu dosud nepoznaného buněčného mechanismu s možnými důležitými funkčními důsledky!

K práci mám celou řadu zvědavých dotazů:

1. *Strana 11 – zde jsou zmíněny invariant T-cells – jaké typy buněk tím autor myslí? Jak funguje selekce $\gamma\delta$ T-lymfocytů, jestli se nepletu, v práci v podstatě nejsou zmíněny.*
2. *Strana 11 – je zde zmíněna role molekuly Foxn1 – jaký je její evoluční původ, souvisí její objevení kauzálně se vznikem brzlíku? Je možné pozorovat postupný nárůst buněčné a strukturní komplexity brzlíku během evoluce strunatců?*
3. *Strana 12 – je zmiňována heterogenita TECs zahrnující 5 populací – platí to pro lidský i myší model?*
4. *Strana 14 – je zmíněno, že mTECs u myši exprimují 19 000 genů (85% genomu), z toho 3000 je kontrolováno AIRE. Co jiné AIRE-like molekuly? Jak je tomu se sestřihem, konkrétně alternativním, který může dramaticky ovlivňovat spektrum prezentovaných antigenů pro selekce? Kromě „promiskuitní exprese“ se nabízí i „promiskuitní alternativní sestřih“...*
5. *Strana 15 – je zde zmíněno, že u NOD myši má APECED nejsilnější imunologický fenotyp – jsou zde nějaké kandidátní geny vysvětlující tak odlišný fenotyp knock-out AIRE u různých myších kmenů?*
6. *Strana 16 – kde ještě (kromě mTECs^{HI}) je exprimován TF Fezf2.*
7. *Strana 17 – jaký je fenotyp thymových B-lymfocytů, jedná se o jedinou uniformní populaci?*
8. *Strana 17 – je zmíněno, že jedna mTEC může prezentovat antigeny omezenému počtu thymocytů – jaký by mohl být odhad počtu těchto buněk za dobu života individuální mTEC. Jaký je poměr početnosti TEC a thymocytů. Obecně – jaké jsou poměry počtu jednotlivých buněčných typů lokalizovaných v brzlíku? Jak se to mění s věkem – roste poměr mezi thymocyty a TECs? Mění se s věkem T-cellpoiesis v kostní dřeni – tedy buněk, které by měly projít thymem pro udržení centrální tolerance?*
9. *Strana 18 a 21 – jaký je váš názor na negativní selekci v thymovém kortexu?*
10. *Strana 24 – existují ještě jiné „embryonic-derived tissue resident macrophages“ než mikroglie a Kupferovy buňky?*
11. *Strana 24 – jsou zde zmíněna Hassalova tělíska – mohl byste rozvést informaci o této histologické struktuře thymu?*
12. *Strana 26 – jsou zde zmíněny 3 hlavní typy thymových DCs, je něco známo o jejich dynamice během stárnutí, kdy dochází k involuci thymu, mění se nějak jejich poměr – tato otázka je obecnější povahy – co ostatní APC s možnými imunoregulačními důsledky?*
13. *Je možná nějaká role pro thymové bazofily, u nichž je prokázán mezibuněčný transfer membrán, včetně MHC II?*
14. *Strana 36 – jaké všechny buněčné typy v myši exprimují Foxn1 – pouze TECs thymu?*
15. *Strana 37 – obrázek 1 – mTECs^{HI} vykazují bimodální tdTomato signál. Jaké máte vysvětlení? Zkoušeli jste backgating high a intermediate populace?*

16. Strana 38 a 49 – zmiňujete kolokalizaci *tdTomato* s *eGFP* pravděpodobně v Golgiho aparátu. Ten je v buňkách lokalizován v blízkosti MTOC, kde je velká „tlačénice“ různých typů vezikulárních struktur, včetně recyklujících endosomů... Co vás vede k závěru, že nejpravděpodobnější je lokalizace v Golgi? Nezkoušeli jste lysotracker nebo lysosensor pro určení aktuálního pH v kolokalizační struktuře, popř. po fixaci markery jednotlivých vezikulárních struktur?
17. Strana 42 – mezi kostimulačními molekulami zmiňujete PD-L1 – je tato molekula kostimulační?
18. Strana 47- predikujete, že CD45+ MHCII- CD11c- populace jsou thymocyty. Nezkoušeli jste pro fenotypizaci těchto enigmatických buněk protilátky proti markerům vývojových stadií thymocytů?
19. Strana 51 – v modelu jsou postulovány odlišné role mDC s odlišnou expresí MHC II. Jak tato exprese může být stabilní? Mohou být LO buňky aktivovány ke zvýšení exprese MHC II např. injekcí LPS do thymu? Co by se s těmito populacemi mohlo stát např. při intrathymové bakteriální infekci?

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce je vysoce kvalitním příspěvkem k mimořádně důležitému biomedicínskému tématu. Práce je sepsána kvalitní angličtinou, formálně dokonale, intelektuálně na výši a co je důležité zopakovat, pomocí náročných netriviálních metodik moderní imunologie testování konkrétní hypotézy. Tuto práci doporučuji k obhajobě s výborným hodnocením. Autorovi přeji hodně štěstí a úspěchů v dobře započaté vědecké kariéře, kdy se hned na začátek pod vedením skvělých pomocníků dotkl klíčových mechanismů imunitní odpovědi.

v Praze 3.9.2019

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.