POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI Mgr. Daniely Knížkové

Molecular mechanisms of inflamation

Předložená velice kvalitní dizertační práce je sepsána ve zkrácené formě na velice aktuální biomedicínské téma a to s použitím celého spektra relevantních metodik. Autorka se formátu práce zhostila velice dobře - jednak práci sepsala velice dobrou angličtinou s minimem formálních nepřesností, zároveň vhodně balancovala v literárním přehledu mezi nezbytnými obecnostmi a nutností detailně vysvětlit příslušné molekulární mechanismy. Úvodní část je velice kvalitně zpracovaná a čtivým způsobem představuje recentní publikované informace tematizované signalizací klíčovými informačními systémy imunitního systému – prostřednictví cytokinů z rodiny IL-17/rodiny IL-17R a TNF/TNF-R. Chtěl bych ocenit sevřenost textu, to že neodbíhá mimo téma práce a to, že „mezi řádky" dokazuje netriviální fakt - že autorka studované problematice evidentně detailně rozumí. Použité literární zdroje jsou reprezentativním a v řadě ohledů vyčerpávajícím přehledem relevantní literatury.

Téma regulace zánětu je v centru imunologického výzkumu, jedná se o jedno ze zásadních témat, které ač tematizováno velkým množstvím laboratoří, stále skrývá zásadní dosud neobjevené fenomény a zapojené molekuly. Autorka se zabývá charakteristikou molekulárních mechanismů dvou zmíněných základních signalizačních imunitních systémů propojujících fungování imunocytů s jednotlivými tělními soustavami. Cíle zvolené ve školitelské laboratoři byly velice ambiciózní – identifikovat a charakterizovat nové členy signalizačních kaskád a přiřadit jim možnou funkci ve fyziologických i patofyziologických funkcích při regulaci zánětlivých odpovědí. Podstatné je, že všechny tyto práce jsou založeny na systémových přístupech, které se snaží postihnout celkovou komplexitu studovaných systémů – mj. unikátní kombinací hmotnostní spektrometrie (se snaho identifikovat pokud možno všechny molekuly zapojené do příslušné signalizace v kombinaci charakterizovat jejich role bez rezignace na jejich komplexní interaktom). O tom, že se tento cíl podařilo naplnit svědčí mimořádné publikace, na nichž je dizertační práce založena. První z nich (sdílené první autorství v časopise **EMBO Journal**) charakterizující zpětnovazebné mechanismy založené na kombinaci ubikvitinylací a fosforylací molekul zapojených do signalozómu IL-17 receptorového komplexu – zcela zásadní zjištění i pro možné biomedicínské aplikace při možné regulaci zánětu u pacientů. Druhá práce publikovaná v jednom z nejlepších imunologických časopisů (**Nature Immunology**, první autorství) charakterizuje novou konstitutivně asociovanou komponentu signalozómu IL-17 receptoru, CMTM4, která se podílí na jeho stabilitě, glykosylaci lokalizaci na plazmatickou membránu. Tato práce je skvělým příkladem propojení buněčné biologie a imunologie, využívající mj. i myší model s deficitem pro CMTM4. Ten prokázal specifický imunodeficit a mj. rezistenci k experimentální psoriáze, což ukázalo na možný nový terapeutický cíl při léčbě autoimunitních onemocnění. Další práce (D.K. druhá autorka, recenzní řízení v **Nature Communications**) studuje fenomén mechanismů TNF signalizace při indukci programované buněčné smrti cílových buněk – konkrétně charakterizuje zapojení adaptorů TANK a AZ12 asociovaných s kinázou TBK1.

Silnou stránkou předložené dizertační práce jsou metodiky a jasně experimentální modely. Jednotlivá experimentální uspořádání jsou velice promyšlená, umožňující kritickou interpretaci experimentů – a následně odpovídat na kladené otázky. Jedná se o kombinaci pokročilých biochemických přístupů, buněčné biologie, mnohobarevné cytometrické analýzy, zdůraznit bych chtěl práci s primárními buňkami a přípravu promyšlených myších geneticky modifikovaných modelů i geneticky modifikovaných buněčných linií. Kladené otázky jsou jak již bylo zmíněno v hlavním proudu imunologického výzkumu, v řadě případů jsou pak testovány hypotézy, které souvisejí s „učebnicovým" základem imunologické teorie, navíc s významným přesahem do možných aplikací při regulaci zánětlivých reakcí identifikací nových cílových molekul. Porozumění použitým

technikám je v práci přesvědčivě dokumentováno – což je dalším (spolu se schopností kriticky promýšlet literární kontexty) jednoznačným argumentem pro udělení titulu Ph.D. za jménem. Obecně je možné konstatovat, že použité metody jsou na hraně současných technických a modelových možností. Zde je evidentní, že Daniela Knížková využívá skvělého intelektuálního a metodického zázemí školitelské laboratoře, kde se díky erudici školitele pokládají otázky ptající se po molekulárních a buněčných mechanismech základních imunologických dějů.

Shrnuto a podrženo, kvalita publikovaných prací spolu s kvalitou příslušných časopisů je zcela dostatečná pro mé mimořádně kladné hodnocení předložené kvalifikační práce.

Na závěr bych měl několik veskrze zvědavých dotazů a komentářů, partikulární, i těch zaměřených na „big picture" – hlavně s ohledem na IL-17 téma:

1. *První bude asi poněkud hnidopišský. V práci jsou pečlivě rozlišovány jednotlivé členy rodiny cytokinů IL-17 příslušnými písmeny s výjimkou IL-17A, který je označován jako IL-17. Nebylo by lepší i v tomto případě použít rozlišovací písmeno? Je mi jasné, že i literatura je v tomto ohledu nejednoznačná, jaký je váš názor?*
2. *Druhý je podobného rázu. Na straně píšete, že cytokiny jsou malé proteiny, je to ve všech případech pravda? Jaký je největší cytokin?*
3. *Jaký je váš názor na možnou produkci cytokinů IL-17 rodiny neutrofily, které by mohlo být prostředí zánětlivé reakce důležité?*
4. *Na straně 13 píšete, že se ILC3 podílejí na kontrole komenzálních bakterií. Sak je tomu s kvasinkami – konkrétně v kontextu s ILC3 AIRE+ populací? Tato informace může být důležitá i v kontextu s informacemi na straně 18 – popisujícími role IL-17 in vivo.*
5. *Na straně 13 popisujete γδ T buňky jako významné producenty IL-17. Jedná se o všechny γδ T buňky, nebo specifickou subpopulaci s unikátním repertoárem TCR?*
6. *Na straně 18 se věnujete mj. kandidózám. K těm dochází mj. u pacientů s AIDS. Existují nějaké kauzality mezi IL-17 a patogenezí tohoto onemocnění?*
7. *Systém rodin IL-17/IL-17R patří mezi nejstarší mechanismy regulace imunitních reakcí/tkáňové homeostázy u mnohobuněčných organismů. Mohla byste stručně popsat jejich evoluční počátek a okomentovat možnou skutečnost, že pro porozumění funkce molekulárních mechanismů musíme brát do úvahy i komplexní evoluční kontext?*
8. *Poslední dotaz bude možná až příliš spekulativní. V práci jste použila hmotnostně-spektrometrickou analýzu s ambicí postihnout „ultimátní" komplexitu molekul zapojených do signalizace přes IL-17R. Jaký je váš názor na to, jak jsme daleko od identifikace a funkční charakterizace všech zde zapojených molekulárních hráčů a interakcí? Očekáváte objev dalších molekul s tak významným zapojením do imunitních regulací, jako jste sama popsala?*

Zcela na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená dizertační práce je velice kvalitní a prokazuje autorčinu vědeckou erudici i schopnost srozumitelným způsobem formulovat složitá vědecká fakta a hypotézy. Dizertační práce „**Molecular Mechanisms of Inflamation"** splňuje a překračuje požadavky kladené na Univerzitě Karlově, Přírodovědecké fakultě na kvalifikační práce doktorského studia a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

v Praze 5.9.2024

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.