



V Olomouci 25. srpna 2013

Věc: Posudek na disertační práci Mouhammeda AbuAttieha, M.D.

**Elements of Immune Fitness
(Prvky imunitní způsobilosti)**

Předložená disertační práce představuje ucelenou formu sdělení strukturovaného standardním způsobem. Věnuje se velmi zajímavé problematice souvislosti mezi sníženou variabilitou BCR a TCR receptorů u experimentálních myších linií a kvalitou imunitní odpovědi buněk specifické imunity a dále vlivu thymektomie u experimentálních zvířat na antigenní specifitu buněčné a zejména humorální imunitní odpovědi.

Autor používá standardní uspořádání disertační práce, kterou postavil z převážné části na dvou publikacích v časopisech s IF, jejichž je prvním autorem. Práci tematicky rozdělil do dvou celků. V prvním celku se věnuje souvislosti mezi omezenou diverzitou BCR a TCR a kvalitou imunitní protekce sledovanou pomocí reakce odhojení štěpu, reakce oddálené přecitlivělosti a obrany proti oportunní infekci *Pneumocystis murina* na modelu dvou myších linií a) JH^{-/-} linie s delecí JH segmentů vedoucí k absenci B lymfocytů a restrikci diverzity TCR pod 1 % konvenčních hodnot a b) QM myší linie s oligoklonální populací B lymfocytů zapříčiněnou náhradou germinálních JH segmentů přeskupeným VDJ segmentem kódujícím protilátku proti 4-hydroxy-3-nitrofenylacetátu (NP) a restrikcí diverzity V oblastí TCR pod 7 % konvenčních hodnot. V druhém celku se věnuje zejména souvislosti mezi thymektomií provedenou 5. týden života experimentálních C57BL/6 myší a diferenciací B lymfocytů směrem k protilátce sekretujícím buňkám a paměťovým buňkám a mechanismem tvorby jimi tvořených afinitně maturovaných imunoglobulinových molekul.

Po stručném úvodu následuje přehled použitých metod, dále pak výsledky včetně 19 obrázků a 8 tabulek a jejich diskuse.

V metodické části je uvedeno poměrně rozsáhlé spektrum velmi zajímavých imunologických a molekulárně biologických metod umožňujících charakterizovat kvalitu i antigenní specifitu navozených imunitních odpovědí jakož i molekulární mechanismus afinitní maturace BCR.

Ve výsledkové a diskusní části je prezentována a okomentována sada výsledků. Mezi nejvýznamnější patří pozorování, že značně omezená diverzita TCR u T lymfocytárního poolu (pod 1% konvenčních hodnot), nezpomaluje proces odhojování H-Y nekompatibilního štěpu, nesnižuje rozvoj reakce oddálené přecitlivělosti a jen částečně omezuje odolnost proti modelové oportunní infekci *P. murina*, typicky se vyskytující u myší s deficiencí T lymfocytů. Tyto výsledky podtrhují úžasnou plasticitu imunitního systému. Významný závěr druhého celku je pozorování, že thymektomie v období ustanovení T lymfocytárního poolu (5 týdnů života myši) vede k značnému



omezení systémové koncentrace T lymfocytů se známkami recentního přeskupení genu pro TCR, což je zajímavé zejména z pohledu významu extrathymického vyžívání T lymfocytů. Thymektomie v tomto období není spojena s poklesem reakce oddálené přecitlivělosti a naopak je spojena s intenzivnější reakcí oddálené přecitlivělosti oproti kontrolám. Druhá část však především klade důraz na charakterizaci procesu afinitní maturace B lymfocytů a jejich diferenciaci. Experimenty prokázaly, že imunizace athymických myší nepolymerovaným NP konjugovaným s ovalbuminem, tedy T dependentním antigenem, vede k tvorbě specifických IgM a IgG1 protilátek podobně jako u kontrolních myší a rovněž pool buněk sekretujících NP specifické protilátky v kostní dřeni není redukován, ale naopak je mírně četnější oproti kontrolám a to až 6 měsíců po imunizaci. Nicméně athymické myši vykazují značnou variabilitu v procesu somatické hypermutace v regionech určujících komplementaritu oproti uniformně se chovajícím kontrolám, což zřejmě vede k poklesu afinity produkovaných protilátek. Abnormality v procesu afinitní maturace byly pozorovány i u skupiny myší, u nichž byla provedena stejná operace jako u athymických myší, ale bez fáze odstranění thymu a tyto abnormality byly dokonce významnější než u athymických myší. Funkční thymus se tak zdá být nezastupitelný pro správný průběh procesu afinitní maturace B lymfocytů. Tato pozorování jsou významná zejména pro návrh vakcinačních postupů u některých skupin imunokompromitovaných jedinců.

Kvalitu výsledků a jejich diskusi není třeba hlouběji komentovat a nezbyvá než s nimi plně souhlasit, neboť byly podrobeny oponentnímu řízení odpovídajícímu oběma vysoce impaktovaným časopisům v nich byly uveřejněny.

Další studie jsou nutné pro posouzení možných imunologických a klinických důsledků pozorovaného jevu zejména v souvislosti s imunitní odpovědí pacientů po transplantaci a v imunosupresi jak sám autor zmínil.

Celkově musím ocenit autorovu schopnost obsáhnout rozsáhlé spektrum metod a analytických postupů použitých pro dosažení a interpretaci experimentálních dat. Rovněž diskuse na závěr jednotlivých částí potvrzují autorům literární přehled a orientaci v problematice. Mouhammed AbuAttieh M.D. je prvním autorem dvou publikací souvisejících s tematikou dizertační práce zveřejněných v časopisech s vysokým IF, dále dvou prací v časopisech uvedených v databázi Scopus, devíti abstrakt z konferencí, a dále pěti ústních sdělení a tří posterů.

Prosím, aby jako součást obhajoby disertační práce byly odpovězeny tyto otázky:

1. Could you hypothesize mechanistically, how the thymectomy process could affects affinity maturation of B cell as a response to immunization with T-dependent antigens.
2. Could you mention known extrathymic sites of T cell maturation and their potential impact on your results?
3. Abbreviations such as UCUCA (page 30), NP (page 17) are not explained at the first occurrence in the text. The author should pay attention to such a rather formal imperfections which could disturb the reader.



Závěrem lze konstatovat, že předložené dílo splňuje všechna kritéria kladená na disertační práci v biomedicínských oborech. Autor prokázal nejen schopnost samostatné vědecké činnosti, ale i schopnost získané výsledky objektivně posoudit a vyvodit odpovídající závěry. Úroveň zpracování i prezentace získaných dat svědčí o velmi dobrých teoretických i praktických znalostech doktoranda. Na základě uvedených skutečností konstatuji, že se jedná o zdařilé vědecké sdělení, a doporučuji proto disertační práci Mouhammeda AbuAttieha M.D. k obhajobě s tím, aby mu byl v případě jejího úspěšného průběhu udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
Ústav imunologie LF UP Olomouc