



POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI Mgr. Matouše Vobořila

AIRE-EXPRESSING CELLS IN IMMUNE TOLERANCE IN HEALTH AND DISEASE

Na aktuálně předloženou dizertační práci Matouše Vobořila jsem se skutečně těšil. Jedním z důvodem bylo to, že jako „dvorní oponent“ kvalifikačních prací studentů Dominika Filipa jsem byl zvědav, kam experimentální a interpretační úsilí laboratoře pokročilo. Hlavním důvodem byla samozřejmě osoba uchazeče o doktorský titul, kterého zažíváme jako mimořádný a mnohostranný talent, jehož rozvoj bylo radost pozorovat a snad mu i v některých aspektech napomoci. Mimo téma tohoto posudku (který by se měl primárně zabývat hodnocením doktorské práce) se jedná mj. o Matoušův pedagogický talent (již jako magisterský student a ještě podstatněji jako doktorand se zapojil do výuky na Přírodovědecké fakultě ve specializovaném pokročilém kursu *Advances in Immunology*) a v neposlední řadě altruismus a výborné organizační schopnosti (M.V. byl po řadu let hlavním organizátorem a dobrou duší každoročních doktorských konferencí programu *Imunologie ve Svatém Jáně pod Skalou*).

Samostatnou kapitolou Matoušovy vědecké výchovy je samozřejmě jeho doktorské studium na Pff UK, kde plně projevil své nadání. Pod vedením mimořádného školitele, dr. Dominika Filipa dostal vhodnou kombinaci svobody a odborného vedení. Podstatné bylo téma, které se nachází v hlavním proudu biomedicínského výzkumu, kompetuje s těmi nejvýznamnějšími světovými laboratořemi, je intelektuálně mimořádně náročné a velice rychle se vyvíjí. Co mi během pravidelných Matoušových představení pokroků experimentální práce během doktorských konferencí dobře utkvělo v paměti - byly jeho diskuse s významnými světovými vědci, které pravidelně na konferenci zveme, kde byl schopen obhájit své názory a interpretace dat - a to perfektní angličtinou. V těchto okamžicích jsem zažil to podstatné v životě pedagoga - pocit, že zde žák přerostl své učitele!

Předložená dizertační práce je sepsána ve zkrácené formě na velice aktuální biomedicínské téma a to s použitím celého spektra moderních relevantních metodik. Během posledních let se po metodické stránce (a samozřejmě i intelektuální) dostala školící laboratoř mezi světové lídry v rozkrývání mimořádně komplexních fenoménů regulace imunitních dějů (s důrazem na fenomén periferní a centrální tolerance; neklasických rolí TLR), rutinně využívající sofistikované myši geneticky modifikované modely, pokročilé zobrazovací techniky, vysoce kvalitní cytometrické přístupy, OMICS technologie a v neposlední řadě netriviální analytické a statistické přístupy. Jak je zřejmé z definic podílu na jednotlivých publikacích, Matouš Vobořil se ve školitelské laboratoři zapojil do celé šíře zde prováděných metodik (biochemie, molekulární biologie, cytometrie, single-cell transkriptomické analýzy, bioinformatika...), vysoce přesahující to, na co jsme u doktorských studentů (a vlastně i u vědců v dalších etapách kariéry zvyklí).

Matouš Vobořil se formátu práce zhostil velice dobře. Jednak práci sepsal velice dobrou angličtinou s minimem formálních nepřesností, vhodně balancoval v literárním přehledu mezi nezbytnými obecnostmi a nutností detailně vysvětlit příslušné molekulární mechanismy. Úvodní část velice kvalitně zpracovaným a čtivým způsobem na cca 38 stranách představuje recentní publikované informace tematizované centrální tolerancí s důrazem na zastoupení jednotlivých buněčných populací. Použité literární zdroje jsou reprezentativní a v řadě ohledů vyčerpávajícím přehledem relevantní literatury. Takto ucelený a skvěle prodiskutovaný přehled

“buněčnosti fenoménu centrální a periferní tolerance” jsem nikde v literatuře nezaznamenal, dokáží si jej tedy dobře představit jako samostatné review.

Formálním důkazem (a podkladem pro možnost sepsání práce ve zkrácené formě) skvělé vědecké práce realizované během doktorského studia je seznam publikací:

2020 **M. Vobořil**, T. Brabec, J. Dobeš, I. Šplíchalová, J. Březina, A. Čepková, M. Dobešová, A. Aidarova, J. Kubovčíak, O. Tsyklauri, O. Štěpánek, V. Beneš, R. Sedláček, L. Klein, M. Kolář, and D. Filipp, Toll-like receptor signaling in thymic epithelium controls monocyte-derived dendritic cell recruitment and Treg generation. *Nat Commun.* (2020); doi: 10.1038/s41467-020-16081-3 (IF 11,8)

2019 Yamano, T, J. Dobeš, **M. Vobořil**, M. Steinert, T. Brabec, N. Ziętara, M. Dobešová, C. Ohnmacht, M. Laan, P. Peterson, V. Benes, R. Sedláček, R. Hanayama, M. Kolář, L. Klein, and D. Filipp, Aire-expressing ILC3-like cells in the lymph node display potent APC features. *J Exp Med.* (2019); doi: 10.1084/jem.20181430 (IF 10,35)

2018 D. Filipp, T. Brabec, **M. Vobořil**, J. Dobeš, Enteric α -defensins on the verge of intestinal immune tolerance and inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* (2018); doi: 10.1016/j.semcdb.2018.01.007, Review (IF 5,46)

2018 J. Dobeš, F. Edenhofer, **M. Vobořil**, T. Brabec, M. Dobešová, A. Čepková, L. Klein, K. Rajewsky, D. Filipp, A novel conditional Aire allele enables cell-specific ablation of the immune tolerance regulator Aire. *Eur J Immunol.* (2018); doi: 10.1002/eji.201747267. (IF 4,695)

2015 J. Dobeš, A. Neuwirth, M. Dobešová, **M. Vobořil**, J. Balounová, O. Ballek, J. Lebl, A. Meloni, K. Krohn, N. Kluger, A. Ranki, D. Filipp, Gastrointestinal Autoimmunity Associated With Loss of Central Tolerance to Enteric α -Defensins. *Gastroenterology.* (2015); doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.009. (IF 19,233)

Souhrnný IF těchto prací je cca 50, přičemž další, na nichž se M.V. experimentálně podílel, jsou zaslané do prestižních časopisů, blízko submitu, popř. ve významné fázi rozpracovanosti. Výše uvedené publikace, na nichž se intelektuálně i peněm odvedené „mokré“ práce Matouš Vobořil významně podílel, svědčí nejen o jeho pracovitosti a nadání ale i o dalším podstatném rysu jeho osobnosti – a to dotahovat projekty do zdárného konce, patřičně analyzovat a interpretovat data – a nebát se – spolu se svým mentorem posílat výsledky své vědecké činnosti do těch nejprestižnějších světových žurnálů!

Matouš Vobořil je tedy autorem/spoluautorem čtyř experimentálních vědeckých publikací a jednoho review ve vysoce kvalitních biomedicínských časopisech, vyzdvihnout je třeba zvláště jeho prvoautorskou práci publikovanou v prestižním časopise *Nature Communications* (IF), které se budu dále ve svých dotazech věnovat, je totiž evidentní, že tato práce je jeho pravým „doktorandským dítětem“ Matouš. Tato publikace je mimořádná tím, že přináší zcela nové poznatky v mainstreamové, vysoce kompetitivní oblasti imunologického (a dokonce obecněji biomedicínského) výzkumu, které mají navíc obecnější přesahy do té nejobecnější učebnicové imunologické teorie.

Co bych chtěl mimořádně ocenit je to, že je zde předložen zcela originální funkční mechanismus propojující TLR signalizaci v mTECs regulující vznik Tregs prostřednictvím produkce příslušných cytokinů a následného chemotaktického přilákání CD14⁺moDC do medul brzlíku. Předložená práce otevírá mnoho dalších otázek, což je pro kvalitní publikace typické a pomyslně otevírá celou zcela novou oblast imunologického výzkumu.

K práci bych měl jen zvědavé dotazy obecnější povahy; které, jak jsem zmínil výše, se budou věnovat hlavně Matoušově prvoautorské publikaci:

1. *Mimořádně zajímavým thymickým fenoménem jsou „post AIRE mTECs“, které vykazují podobné vlastnosti jako plně diferencované korneocyty a jsou strukturálním základem Hassalových tělísek. V textu je zmíněno, že tyto buňky „vykazují zvýšenou expresi chemokinů asociovaných s chemoatrakcí dendritických buněk a dalších myeloidních buněk“. V textu je zmíněno, že KRT10⁺ post AIRE mTECs*

ztrácejí jádra, ztrácejí tedy možnost regulované genové exprese na úrovni transkripce. Jsou tyto buňky schopné sekretovat příslušné cytokiny a průběžně je translatovat ze zásobních mRNA? Jak dlouho jsou tyto bezjaderné útvary schopné existovat? Jak se mění jejich zastoupení a funkce během involuce thymu?

- 2. Práce jednoznačně ukazuje na vztah mezi TLR signalizací a funkčním nastavením i buněčných uspořádáním thymu. Je možné předpokládat, že u jedinců s nedostatečnou stimulací TLR signalizace v thymu může dojít k abnormální produkci Tregs a možné dysregulaci tolerance? Je možné, aby diskutované zvýšení imunopatologií v lidské populaci (včetně autoimunit) bylo kauzálně spojeno (v kontextu hygienické hypotézy) s „civilization driven“ fenomény funkčních změn přímo na úrovni thymu? Mimochodem, jaká je produkce Tregs a funkčnost a celularita jejich thymu u bezmikrobních myší?*
- 3. Objev nových mechanismů vysvětlujících vztah mezi TLR signalizací a kompetencí thymu při etablování tolerance jsou provedeny pomocí sofistikovaných myších modelů. Jaká je přenositelnost těchto poznatků na člověka, který je v řadě aspektů významně odlišný – i co se týká buněčných populací derivovaných z myeloidní linie.*
- 4. Mimořádně zajímavou imunopatologií s patofyziologickým mechanismem spojeným s tymem je myasthenia gravis. V práci je zmiňovaná zvýšená exprese TLR na TECs spojená s tímto autoimunitním onemocněním. Je možné na příkladu této imunopatologie demonstrovat potenciální mechanismy prolomení tolerance vůči acetylcholinovému receptoru?*
- 5. Během involuce thymu po narození se v podstatě u všech obratlovců dramaticky mění struktura i funkčnost brzlíku. Je možné, aby se na tom podílela TLR/Myd88-signalizace a popsané cytokinové změny?*

Před závěrečným shrnutím bych ještě chtěl konstatovat, že jako „dvorní“ oponent kvalifikačních prací Matouše Vobořila mám velkou radost z jeho profesionálního růstu, který je dobrým základem pro budoucí úspěšnou vědeckou kariéru. Dále bych chtěl ocenit Matoušovo zapojení do výuky – a to konkrétně do pokročilého magisterského kursu *Advances in Immunology*, kdy jeho přednášky a následné diskuse primární literatury byly studenty velice kladně hodnoceny. Je evidentní, že Matouš Vobořil využívá skvělého intelektuálního a metodického zázemí školitelské laboratoře, kde se pokládají otázky ptající se po molekulárních a buněčných mechanismech obecných imunologických dějů a příslušných patologií. Celkově je použitá metodická šíře a hluboký vhled do studované problematiky přesvědčivě dokumentovaná, a to jak v úvodním literárním přehledu, tak v diskusi na konci práce – což je opět jednoznačným argumentem pro udělení titulu Ph.D. za jménem.

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená dizertační práce je mimořádně kvalitní a prokazuje nejen autorovu vědeckou erudici, ale i schopnost srozumitelným způsobem formulovat složitá vědecká fakta a hypotézy. Dizertační práce „**AIRE-expressing cells in immune tolerance in health and disease**“ splňuje a překračuje i ty nejvyšší požadavky kladené na Univerzitě Karlově, Přírodovědecké fakultě na kvalifikační práci doktorského studia a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

v Hostivici 3.9.2020

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.