

# Oponentský posudek disertační práce

**Název disertace:** Vývoj B buněk u prasat a úloha  $\gamma$   $\delta$  T lymfocytů při imunizaci naivního imunitního systému

**Autor:** Mgr. Kateřina Štěpánová

**Školitel:** RNDr. Marek Šinkora, Ph.D.

**Školící pracoviště:** Laboratoř fyziologie, imunity a ontogeneze gnotobiontů, MBÚ AV ČR, v.v.i. Nový Hrádek

**Oponent:** prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.

**Rozsah práce:** 113 stran

**Počet obrázků a grafů:** 3

**Počet tabulek:** 13

**Počet použitých citací:** 176

**Počet příloh vlastních prací:** 5

Disertační práce Mgr. Kateřiny Štěpánové je zaměřena na studium dvou typů imunokompetentních buněk, B buněk a  $\gamma$   $\delta$  T lymfocytů, s využitím pro toto pracoviště tradičního modelu bezmikrobních selat. V rámci disertace bylo vymezeno pět dílčích okruhů otázek, které byly řešením disertace z velké části zodpovězeny. K technickému provedení experimentů byly využity adekvátní laboratorní techniky aplikované na gnotobiotický model. Jednalo se o separace buněčných subpopulací, průtokovou cytometrii, kultivační techniky, konfokální mikroskopii, semikvantitativní PCR a některé state-of-art laboratorní postupy.

Pravděpodobně klíčovým úkolem bylo přispět k poznání vývoje B buněk u prasete, kdy dosud neexistuje jednotný názor na lymfogenezi B buněk. Spornou je především úloha ileálních Peyerových plátů, které jsou považovány na jedné straně za primární lymfatický orgán nezbytný pro normální vývoj B buněk analogicky k Fabriciově burse, na straně druhé za místo sekundární pozitivní selekce a proliferace B buněk. Výsledky prezentované v příložené publikaci #1 přinášejí podstatné informace hovořící ve prospěch druhé téze; podstatným argumentem je fakt, že k vývoji B buněk v ileálních Peyerových plátech je třeba kolonizace střeva. Lymfogeneze B buněk ve fetální fázi ontogeneze prasat v kostní dřeni, fetálních játrech a žloutkovém vaku, spolu s informací o pořadí přeskupení  $\lambda$  a  $\kappa$  lehkých řetězců během fetálního a neonatálního vývoje selat je doloženo v příložené publikaci #2. Tento dílčí cíl se tedy dá uzavřít tvrzením, že ileální Peyerovy pláty nejsou nutné pro systémovou tvorbu a udržování hladiny B buněk v organismu, jsou však klíčovým místem pro indukci časných imunitních reakcí vyvolaných mikroorganismy kolonizujícími střevo. Pravděpodobně to platí i pro časné reakce na potravní antigeny, jak prokázal již dříve jeden z autorů (MŠ) uvedených publikací.

Významný pokrok v poznání vývoje a heterogenity B buněk přináší příložená publikace #3. Metodou průkazu CD21 na B buňkách několika různými anti-CD21 protilátkami autoři prokazují, že zralé B buňky exprimují CD21 ve dvou různých formách označených jako CD21<sup>a</sup> a CD21<sup>b</sup>. Provedená ontogenetická fenotypová a funkční studie pak

dokládá, že subpopulace nesoucí různé formy CD21 jsou funkčně odlišnými podskupinami periferních B buněk prasete.

Druhému buněčnému typu, tj.  $\gamma$   $\delta$  T lymfocytům, jsou věnovány poslední dvě příložené publikace. V publikaci #4 podrobnou analýzou orgánové distribuce subpopulací  $\gamma$   $\delta$  T lymfocytů lišících se v expresi CD2 a CD8 znaků, tj. subpopulací CD2<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> a CD2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> v kombinaci s expresí znaku CD25 a dalších pěti znaků u bezmikrobních selat, konvenčních selat a konvenčních dospělých prasat došla autorka k závěru, že jednotlivé CD2/CD8 subpopulace  $\gamma$   $\delta$  T lymfocytů u prasat mohou představovat funkčně odlišné buňky. Tento závěr je pak rozšířen, na základě výsledků uvedených v publikaci #5, o názor, že CD2<sup>+</sup> a CD2<sup>-</sup>  $\gamma$   $\delta$  T lymfocyty jsou specifickými liniemi. Tento závěr je podložen nepřímými důkazy založenými jednak na schopnosti exprese CD2/CD8 znaků, odlišné proliferační aktivitě na polyklonální mitogeny a cytokiny, na schopnosti exprese např. MHC-II, jednak na faktu, že CD2<sup>-</sup>  $\gamma$   $\delta$  T buňky chybí druhům označovaným jako „ $\gamma$   $\delta$ -low-species“.

Celkově lze konstatovat, že předložená práce obsahuje řadu původních poznatků, které umožňují podrobnější členění dvou typů imunokompetentních buněk prasete a tím i přesnější pochopení jejich funkce. I když práce přináší ve většině případů nepřímé důkazy, které bude nutné doplnit dalšími studiemi, lze je považovat v dané oblasti poznání za novum. Právě převaha těchto nepřímých důkazů vede oponenta k otázce, zda je možné v prasečím modelu získat přímé důkazy o funkci jednotlivých buněčných subpopulací? Dále má oponent několik poznámek či námětů pro vědeckou rozpravu a od autorky by rád slyšel její názor.

(1) B buňky přestupují v lymfoidních orgánech z jednoho funkčního buněčného okrsku do jiného a následně opouštějí tyto orgány, přecházejí do cirkulace a následně kolonizují jednotlivé orgány. Jak je u prasete tento proces řízen, jaká je úloha chemokinů a/nebo sfingosin-1-fosfátu?

(2) Pro B buňky nesoucí CD21<sup>b</sup> byly v kombinaci se znakem CD2 vymezeny čtyři subpopulace, které, zdá se, tvoří vývojovou řadu protilátky produkujících buněk. O buňkách nesoucích CD21<sup>a</sup> se hovoří pouze jako o odlišné funkční subpopulaci. Jsou nějaké nové poznatky či názor na jejich funkci?

Závěrem dovoluji mně jako oponentovi, abych vyjádřil své hluboké přesvědčení o tom, že předložená práce Mgr. Kateřiny Štěpánové je kvalitní jak po stránce obsahové, tak formální (přehlížím fakt, že v mém výtisku disertační práce chybí u čtvrté publikace strana 729 a překlepy a chybějící písmena v textu autoreferátu). Metodické postupy aplikované na gnotobiotický model prasete jsou zcela vhodně voleny. Po technické stránce jsou na úrovni současných možností oboru. Autorka prokázala, že je zručná experimentátorka schopná publikovat vlastní experimentální data. **Ze všech výše uvedených důvodů proto doporučuji disertační práci Mgr. Kateřiny Štěpánové k obhajobě a pokládám ji za velice solidní základ pro udělení titulu Ph.D.**

V Nechanicích, 15. února 2013

Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.