

Posudek doktorské Ph.D. disertace:

**Mgr. Iva Šplíchalová**

**The utility of Toll-like receptor 2 in defining the progenitors of definitive embryonic hematopoiesis.**

**Prague, 2020**

Posuzovaná disertace je obvykle uspořádána a formálně dobře zpracovaná. Je založena na experimentálním výzkumu myší embryonální krvinek, jehož výsledky byly publikovány ve čtyřech publikacích. U dvou těchto publikací je autorka disertace prvním autorem a u dvou je spoluautorem. Z prohlášení školitele, RNDr. Diminika Filippa, CSc., vyplývá, že se autorka disertace aktivně podílela na vzniku všech čtyř publikací. Disertační práce je v angličtině. Je velmi přehledná, informace předkládá stručným, ale zcela dostatečným a výstižným způsobem. Má drobné nedostatky, které spočívají v následujícím.

- ABSTRACT str. 8: Před CXCR4 chybí slovo „receptor“.
- ABSTRAKT (česky): Stylistická a gramatická úroveň nedosahuje úrovně jeho anglické verze.
- Str. 38 a 39: Text obsahuje četné gramatické chyby, což je ve značném kontrastu oproti jinému anglickému textu, který je velmi dobrý.
- K publikaci: Balounová J, Šplíchalová I et al., NCOMMS 2019, není přiložena „Additional information“ na kterou je na str. 41-50 odkazováno.

Těžiště dizertace je ve výzkumu exprese a funkční důležitosti receptoru Toll-2 v hematopoeze. Expresse Toll-2 autorka dizertace, spolu s Janou Balounovou a spoluautory, prokázala jako časný znak buněk, ze kterých se vznikne populace erytro-myeloidních progenitorů (EMP) ve žlutkovém vřetku. EMP jsou přechodným zdrojem myeloidních krevních buněk pro embryo, v období před a v časovém překryvu se vznikem pluripotentních myeloidní-lymfoidních kmenových buněk krvinek tkání. Jedná se o významný nále, který autorka disertace dále rozpracovává v experimentech, které umožnily eliminaci buněk EMP působením difterického toxinu. Tyto experimenty prokázaly nezbytnost druhé vlny embryonální hematopoezy pro přežití embrya. Podkladem tohoto výzkumu je vývoj originální linie geneticky upravených myší. Význam nálezu exprese receptoru Toll-2 na prekursorech buněk EMP a vlastních progenitorech EMP nesnižuje skutečnost, že nejsou známy ligandy tohoto receptoru v embryu a není tak objasněn jeho funkce. To platí i pro jiné znaky buněk EMP, např. receptory FcRγ (znak CD16/32). Autorka dizertace se dále podílela na studii, která testovala význam receptoru CXCR4 pro rozvoj definitivní krvinek podporované kmenovými buňkami. Čtvrtá publikace, k jejímuž vzniku autorka dizertace přispěla, studuje úlohu Toll-like receptorů v thymu při produkci regulační lymfocytů Treg. Aktivní, samostatný a významný podíl autorky dizertace na těchto výzkumech dokazuje jak prvo-autorství autorky na dvou významných publikacích, tak i prohlášení jejího školitele.

K výzkumu, který je podstatou posuzované dizertace a k jejímu obsahu mám následující otázky:

- Str. 55: jsou progenitory první vlny skutečně „monopotent“ odděleně pro erytroidní, megakaryocytární a makrofágové diferencované buňky? Nebo jsou některé bipotentní nebo multipotentní?
- Str. 58 a str 83: Figure 1 vs. Supplementary Figure 1:

Figure 1: 87,4 % c-kit<sup>+</sup> buněk jsou EMP progenitory

Supplementary Figure 1: jen 2,36 % c-kit<sup>+</sup> buněk jsou EMP progenitory

- Str. 83 (Supplementary Figure 1): 97,64 % c-kit<sup>+</sup> buněk je negativních pro znaky CD41 a CD16/32; co jsou tyto buňky?
- Str. 63: výsledky jsou z E10.5 oproti výsledkům na Supplementary Figure 1 na str. 83, které jsou ze dne E9.5, avšak je opět velká diskrepance v zastoupení buněk s fenotypem EMP v c-kit<sup>+</sup> buňkách (62.3 % oproti 2,36 % v Supplementary Figure 1).
- Genetickou manipulací byla připravena myš line, jejíž buňky s aktivním genem pro receptor Toll-2 bylo možné eliminovat podáním difterického toxinu. Krátkodobost účinku podaného toxinu a jeho podání v době před vznikem kmenových krvetvorných buněk poškodila především populaci buněk EMP, což bylo výzkumným cílem. Nebylo by však vhodnější cílit toxické poškození na buňky exprimující receptory FcR $\gamma$  (znak CD16/32), tj. znaku, který je selektivnější pro progenitory EMP z hlediska jejich odlišnosti od kmenových buněk než receptor Toll-2?

Závěrem konstatuji, že posuzovaná disertační práce splňuje všechny vyžadované náležitosti a dokladuje skutečnost, že její autorka se během postgraduálního doktorského studia seznámila s podstatou experimentální výzkumné práce v bio-medicínských oborech a získala tím způsobilost pro samostatnou vědeckou práci. Disertační práci doporučuji k obhajobě a v případě její úspěšné obhajoby k udělení vědeckého titulu Ph.D. za jménem autorce dizertace.

V Praze dne 3. září 2020

Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.