



Jana Balounová Ph.D.
Head of Immunology Unit
Phenotyping Module
Czech Centre for Phenogenomics
Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.
Průmyslová 595
CZ252 50 Vestec
Czech Republic
e-mail: jana.balounova@img.cas.cz | Phone: +420 325 873 219

V Praze 5. září 2022

Oponentský posudek disertační práce: *Fenotypová a funkční charakterizace leukocytů pacientů s dysregulací imunitního systému*

Disertační práce Mgr. Martiny Fejtkové shrnuje výsledky tří studií zaměřených na funkční charakterizaci nově popsanych genových mutací v genech TLR8, HCK a IFNAR1, způsobujících vrozené poruchy imunity. Mgr. Martina Fejtková je prvním autorem publikace v časopisu *American Journal of Hematology* a spoluautorkou prací zveřejněných v *Journal of Allergy and Clinical Immunology* a *Clinical Infectious Diseases*.

V úvodu práce autorka velmi přehledně rekapituluje dosavadní poznatky o vrozených poruchách imunity, metody jejich vyšetřování a možnosti terapie.

V jednotlivých kapitolách výsledků práce dále detailněji shrnuje dosavadní informace o funkci genů postižených nově identifikovanými mutacemi, experimentální design studií a výsledky práce.

Tři projekty o které se práce opírá jsou zaměřeny na nově objevené mutace v genech kódujících:

1. Toll like receptor 8 (TLR8), která vede k autoimunitní hemolytické anémii a autoinflamatorním projevům v důsledku dysregulace TLR8 a TLR7 odpovědi především myeloidních buněk. Mutace v blízkosti prvního vazebného místa TLR8 vede k jeho snížené expresi a zvýšené reaktivitě na agonisty TLR8. Mutovaný TLR8 rozeznává i ligandy TLR7 a zároveň je snížena jeho schopnost inhibovat TLR7 signalizaci. Ačkoliv myší TLR8 může rozeznávat i jiné ligandy než lidský, práce na mutovaném lidském TLR8 ukazuje na určité podobnosti s myším kmenem deficitním pro TLR8 (*Demaria et al. 2010*). Onemocnění způsobené mutací v genu TLR8 bylo navrženo pro zařazení mezi vrozené poruchy imunity s autoinflamatorními projevy zároveň byla i navržena doposud účinná léčba inhibitorem signalizace TLR7, hydroxychloroquinem.

2. Hematopoetickou kinázu (HCK), která vede k absenci inhibičního tyrosinu a následné konstitutivní aktivaci kinázy způsobující chronické zánětlivé onemocnění kůže a plic. Mutace HCK vede ke zvýšené chemotaktické, migrační a zánětlivé funkci myeloidních buněk. I toto nově charakterizované onemocnění bylo navrženo pro zařazení mezi vrozené poruchy imunity a byla navržena cílená protizánětlivá léčba, která částečně potlačila autoimunitní postižení v plicích a kůži, nedokázala ovšem onemocnění zcela zastavit.

3. Podjednotku 1 receptoru pro IFN α (IFNAR1) vedoucí k úplnému deficitu této podjednotky a tedy i jakékoliv signalizace interferonů typu I. Následkem této insuficience došlo u pacienta k bouřlivé imunitní reakci po imunizaci živou vakcínou MMR či reaktivaci EBV. Podobné LoF mutace IFNAR1 byly popsány i u dalších dětských pacientů, u kterých způsobila vakcinace živou vakcínou obdobné obtíže nebo prodělali různé virové infekce (*Hernandez et al. 2019, Bastard et al. 2021*) nebo podleli infekci SARS-Cov-2 (*Abolhassani et al. 2022*).



Otázky oponenta:

1. Práce se detailněji nezabývá metodikou identifikace jednotlivých mutací. Můžete stručně popsat jak byly tyto tři studované mutace nalezeny? Předpokládám, že v genomu pacientů byly nalezeny i další mutace, které na vznik onemocnění nemají vliv, jak byly tyto mutace vyloučeny?
2. Můžete porovnat onemocnění způsobené GoF mutací TLR7 s onemocněním vyvolaným Vámi popsanou mutací v TLR8?
3. Jaké jsou výhledy obou dvojčat? Předpokládáte, že pro kontrolu onemocnění u dvojčete A bude dostatečná léčba hydroxychloroquinem nebo i u něj bude časem zvažována transplantace krvetvorných buněk?
4. Mutace v TLR8 se nachází v blízkosti dimerizačního motivu (shrnutí v *Ohto et al. 2014*), může mít vliv na jeho schopnost dimerizovat? Je možné, že mutace dimerizaci usnadňuje?
5. Je možné, že by v monocitech mohlo dojít k tvorbě heterodimerů TLR7/TLR8 a například mutovaná forma TLR8 by je tvořila častěji?
6. V případě onemocnění vyvolaného mutací v HCK byla indikována transplantace kostní dřeně příliš pozdě. Povedou poznatky o těchto nových mutacích k indikaci transplantace krvetvorných buněk u dalších pacientů v časnějším stádiu onemocnění?
7. V cytokinových esejích (*Kanderova et al. 2021*, Figure 5 I, J) ukazujete, že myeloidní linie THP-1, exprimující wt či mutovanou HCK, sekretuje více prozánětlivých cytokinů pokud je kultivována v přítomnosti endoteliálních linií. Proč tomu tak je?
8. Pomohla by pacientovi s mutací v genu IFNAR1 transplantace kostní dřeně?

Výsledky získané v průběhu doktorského studia Mgr. Martynej Fejtkové byly nedávno publikovány ve třech prestižních časopisech, což svědčí o nejen o mimořádné kvalitě práce, adekvátně volených postupech a použitých metodách, ale i o aktuálnosti tématu.

Disertační práce je sepsána velmi srozumitelně a je přehledně členěna. Práce cituje 154 odborných publikací, doporučila bych snad jen uvádět u citací přehledových článků tuto informaci buď přímo v textu, nebo alespoň v seznamu literatury. Domnívám se, že pro kapitulu "Toll like receptory" by bylo vhodné uvést nějaké primární zdroje, nebo přehledové články z laboratoří, které objevily jejich funkci v imunitním systému (Medzhitov, Hoffman, Beutler, Akira, ...).

Cíle práce, kterými je funkčně charakterizovat nově nalezené mutace u pacientů s vrozenými poruchami imunity, považuji za splněné. Onemocnění způsobené mutacemi v genech TLR8 a HCK byla navržena pro zařazení mezi vrozené poruchy imunity. Výsledky práce vedly nebo povedou k navržení nových diagnostických a léčebných postupů. Autorka prokázala schopnost provádět experimentální práci a její výsledky srozumitelně komunikovat a publikovat.

Dle mého názoru je předložená disertační práce výjimečně kvalitní a studentka jednoznačně splňuje kritéria pro udělení doktorského titulu v imunologii.

Mgr. Jana Balounová, Ph.D.