

Oponentský posudek doktorské dizertační práce

Autor: Mgr. Lucie Jedličková

Název: Bioaktivní molekuly zapojené do zpracování krve u hematofágních monogeneí čeledi Diplozoidae

Vedoucí práce: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D. CSc., Ústav organické chemie a biochemie, AVČR, Praha

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D., Parazitologický ústav BC AV ČR, České Budějovice

Na úvod si dovoluji konstatovat, že psaní a obhajování disertací PřF UK v místním (českém) jazyce považuji minimálně za nestandardní, na mojí domovské instituci za absolutně nepředstavitelné – důvodem je především zcela jistě fakt, že se tím zamezuje možnosti přizvat alespoň jednoho zahraničního oponenta a získat tak objektivní mezinárodní srovnání. I přes tuto pro mě zcela zásadní výtku následuje tedy logicky moje hodnocení v češtině.

Předkládaná dizertační práce Mgr. Lucie Jedličkové se zabývá biochemickou a molekulární charakteristikou enzymů a inhibitorů podílejících se na trávení hostitelské krve u *Eudiplozoon nipponicum* – krevsajících ektoparazitů kaprovitých ryb z čeledi Diplozoidae. Jak autorka v úvodu práce sama uvádí, celá skupina parazitů označovaná jako Monogenea je z hlediska parazitologie sice studována na úrovni zejména morfologie a ekologie, nicméně z molekulárního a biochemického hlediska se jedná o opomíjenou skupinu parazitů, proto vítám snahu autorky přispět, na základě předpokládané analogie molekulárních mechanismů trávení u dobře prostudovaných modelů - schistosom, fasciol a klíštěte obecného. Hodnocená dizertační práce má 123 stran textu včetně 3 vložených publikací v mezinárodních vědeckých časopisech, jejichž je Mgr. Lucie Jedličková autorkou. Přesto nebo možná spíše právě proto, že je psaná v češtině, velmi kladně hodnotím jazykovou úroveň, která je vynikající, s minimálním množstvím pravopisných chyb a překlepů. Práce je členěna na abstrakt v českém i anglickém jazyce, krátký úvod, literární přehled, cíle práce, výsledky, za nimiž následuje společná kapitola diskuze a závěru a seznam použité literatury.

Po krátkém jednostránkovém úvodu následuje rozsáhlý **literární přehled**, který na 27 stranách podrobně popisuje problematiku. Text je dobře strukturovaný (vzhledem k neobvykle rozsáhlým cílům práce), přehledný a čtivý. K této části nemám žádné připomínky.

Cíle práce – jsou sice v jakémsi konceptu, ale jsou velmi ambiciózní. Zejména tedy snaha zároveň studovat proteolytické enzymy a inhibitory, a to jak v homogenátech parazitů, tak v jejich exkrementech/sekrecích (ES) produktech je dle mého příliš široké téma pro jednu PhD práci a spíše jsou to cíle pro středně velkou vědeckou skupinu v rámci pětiletého projektu.

Výsledky práce jsou podány na celkem 60 stranách a v podstatě tato část zahrnuje tři publikace v impaktovaných časopisech, jejichž je Mgr. Jedličková první autorkou. Součástí je i stručné shrnutí v každé publikaci v českém jazyce a vyjádření skutečného podílu autorky na každé z nich. První publikace nazvaná „**Major acid endopeptidases of the blood-feeding monogenean *Eudiplozoon nipponicum* (Heteronchoinea: Diplozoidae)**“, publikovaná v časopise Parasitology v roce 2016, je primární studií k získání ucelené informace o povaze proteolytických enzymů *E. nipponicum*. Elegantní kombinací několika relativně jednoduchých molekulárních a biochemických metod autoři potvrdili, že dominantní aktivitu v homogenátech i ES vzorcích tvoří cysteinové peptidázy, a to zejména cathepsiny L převažující nad aktivitou cathepsinů B ve vzorcích. Tento parazit tak evidentně používá několik izoenzymů cathepsinu L s různou funkcí podobně jako u Fasciol a s podobnou hypotézou nyní pracujeme v rámci našich projektů i u klíštěte obecného. Druhá publikace nazvaná „**Cysteine peptidases of *Eudiplozoon nipponicum*: a broad repertoire of structurally assorted cathepsins L in contrast to the scarcity of cathepsins B in an invasive species of hematophagous monogenean of common carp**“, která vyšla v Parasites and Vectors v roce 2018, je pak zaměřená na bioinformatickou analýzu transkriptomových dat z *E. nipponicum* s cílem identifikace všech

isoenzymů cathepsinů L. Celkem bylo identifikováno 10 různých cathepsinů L, dvě verze s předpokládanou rolí v zažívání byly vybrány pro rekombinantní expresi v kvasinkách *P. pastoris* a charakterizaci (rEnCL1 a rEnCL3) spolu jedinou isoformou cathepsinu B (rEnCB), která má roli spíše v embryogenezi než v trávení. V práci jsou tyto enzymy dále selektivně lokalizovány na polotenkách (5µm) mikroskopických řezech pomocí RNA *in situ* hybridizace a imunohistochemie za použití specifických protilátek. Třetí, podle mne nejkvalitnější předložená publikace, je nazvaná „**A novel Kunitz protein with proposed dual function from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) impairs haemostasis and action of complement *in vitro***“. Tato publikace vyšla v International Journal for Parasitology v tomto roce a je zaměřená na inhibitory Kunitzova typu, které byly nalezeny v transkriptomu dospělého *E. nipponicum*. Pro rekombinantní expresi a charakterizaci byl vybrán EnKT1, kvůli své vysoké homologii s textilininem-1, antihemorhagickým faktorem z pakobry východní (*Pseudonaja textilis*). Kromě antikoagulačních aktivit potvrzených tromboelastografií, tento Kunitz inhibitor je navíc schopný blokovat i rybí komplementovou kaskádu vedoucí k lýze buněk. Je třeba zdůraznit, že se jedná o první parazitární Kunitz protein, u kterého byla schopnost blokovat komplement prokázána. Vzhledem k expresi EnKT1 v gastrodermis, má tento inhibitor zřejmě úlohu v antikoagulaci a protekci střevní stěny parazita při sání na kapřích žábrech, což je poznatek, který může mít důležitý význam i u jiných krev-sajících ektoparazitů, např. mnou studovaných klíšťat.

Kapitola **Závěr a diskuze** je stručným shrnutím významu třech publikovaných prací a jejich zasazením do širšího kontextu dlouhodobého výzkumu. Diskuzi oceňuji jako velmi zdařilou, svědčící o autorčině povědomí a schopnosti zasazení poznatků do širšího kontextu, schopností objektivně zhodnotit dosažené výsledky a s dostatkem odvahy k přiměřené. Stručné shrnutí výsledků práce jen podtrhuje celkově velmi pozitivní dojem z předložené disertační práce.

Závěrečné hodnocení

Práce je na zajímavé téma, je určitě kvalitním zpracováním i obsahem a dle mého subjektivního pohledu splňuje všechny formální i věcné požadavky pro udělení doktorského/PhD titulu na PřF UK.

Moje otázky a výtky k práci jsou následující:

1. „Věcná“ na úvod: Obrázek č. 5 je opravdu nevalné kvality. Navíc citování serveru Wikipedie jako elektronického zdroje informací v PhD práci asi není úplně šťastnou volbou. Na různé mechanismy proteolýzy a různé typy proteolytických enzymů přitom existuje zavedená citace, která je k nalezení i ve většině autorkou citovaných prací a objevuje se (ve starší verzi) i v seznamu použité literatury této disertace - věděla by autorka o jakou citaci se jedná?

2. „Druhá věcná“ - na straně 7 věta “Protein má sekreční signální sekvenci“. Jako původem molekulární biolog, často dostávám „za vyučenou“ od parazitologů zejména v oblasti systematického (a stále se měnícího) řazení parazitárních druhů. Proto to rád jednou otočím: co přesně znamená „signální peptid“ u proteinů a jak přesně souvisí či nesouvisí se sekrecí mimo buňku?

3. Upřímně mi trochu vadí rozsáhlost, nebo možná spíše nekoncepčnost celkového přístupu, kdy v jedné PhD práci se studuje střevní degradomika, tzn. proteolytické aktivity a konkrétní enzymy účastníci se trávení krve, a zároveň se studují inhibitory s potenciální rolí v antikoagulaci hostitelské krve. Nicméně, ke štěstí autorky se nakonec podařilo exprimovat a charakterizovat Kunitz inhibitor, který se lokalizuje do gastrodermis a tudíž nejspíše s trávením souvisí. Vzhledem k tomu, že druhý oponent bude jistě jako expert na biochemii mít více konkrétních otázek k degradomice, rád se zeptám na biologickou funkci identifikovaného Kunitz inhibitoru: Je možné, že by podobně jako některé z Kunitz inhibitorů z hadích venomů, měl i tento protein duální funkci a mohl kromě inhibice serinových peptidáz blokovat i sodíko-draslíkové pumpy na povrchu nervové soustavy při neuroparalýze hostitele, popř. v daleko nižších koncentracích pomocí modulace draslíkových kanálů modifikovat imunitní odpověď rybího hostitele za předpokladu, že by se do hostitelského krevního oběhu dostával regurgitací při sání *E. nipponicum* na žábrech? (pozn.: podobné molekuly pocházející např. z hadích jedů se používají jako cílené inhibitory Kv1.1, 1.3 kanálů při léčbě autoimunních chorob a omezení vlastní imunity po transplantacích).

4. V publikaci č. 1 autorka uvádí, že nebyla detekována aktivita asparaginylové peptidázy (tzv. legumainu) pomocí Z-AAN-AMC fluorescenčního peptidolytického substrátu v analyzovaných vzorcích *E. nipponicum*. Otázka je jasná: jsou nějaké legumain-kódující sekvence přítomny v dostupných EST datech *Z E. nipponicum*? Lze opravdu vyloučit možnost absence legumainové aktivity v důsledku známé pH indukované deaktivující konformační změny tohoto enzymu při nakládání se vzorky? (pozn.: lidský, schistosomální i klišťecí prolegumain se autokatalyticky aktivují při pH nižším než 5.0, vzniklý mature legumain se pak deaktivuje při překročení pH 6.5 směrem k zásaditému spektru– souvisí to zřejmě se striktní pH regulací legumainů jako lysosomálních procesujících enzymů v průběhu endolysosomálního transportu a trávení.

5. Čistě teoreticky: v Evropě a zejména v Čechách se chlubíme produkcí kaprů, i když tato vánoční ryba je v ČR nepůvodním druhem a byla sem zavlečena ve středověku zejména díky klášternímu hospodářství. Ve skutečnosti se jedná o kosmopolitně se vyskytující, většinou konzumentů neoblíbenou, agresivní a pro ekosystémy nebezpečnou rybu. V zemích jako jsou USA (Mississippi) nebo Austrálii (povodí řek Murray a Darling až 80 procent rybí populace) se dlouhodobě (a neúspěšně) snaží tento neoblíbený invazivní druh ryby likvidovat prostředky sahajícími od elektrických zářivek po použití specifických virových infekcí. Dokázala by autorka spekulativně zvážit, zda by některý z jejich nově získaných poznatků spíše než k prevenci nákazy populace kaprů, nemohl znamenat využití specifického parazita kaprů jako biologického regulačního nástroje kapří populace v rizikových lokalitách?

V Českých Budějovicích dne 10.10. 2019 vypracoval

RNDr. Daniel Sojka, PhD.