

## Posudek na disertační práci Mgr. Tomáše Paulendy „Úloha proteinů ORMDL v signalizaci žírných buněk“ vypracovanou v oboru „Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie“.

Předložená disertační práce spadá do oblasti studia signalizačních mechanismů žírných buněk s cílem hlubšího porozumění jejich úlohy v udržení přirozených mechanismů imunitního systému, ale i v jejich ústřední roli v rozvoji konkrétních typů autoimunitních onemocnění. Téma práce je zaměřeno na rodinu proteinů ORMDL, malých membránových proteinů endoplasmatického retikula, mezi jejichž hlavní úlohy patří kontrola biosyntézy lipidových derivátů, zejména sfingolipidů a leukotrienů. ORMDL proteiny však hrají významné role v řadě dalších buněčných typů a v kontrole buněčných procesů. Přestože sekvenčně příbuzné proteiny lidským ORMDL se vyskytují v genomu řady organismů počínaje rostlinami přes houby, kvasinky, bezobratlé až po savce, zvýšenou pozornost si vysloužila jejich role predikovaná genomovými asociačními studiemi v rozvoji lidských autoimunitních onemocnění, zejména astmatu, ale i zánětlivých střevních onemocnění. Protože gen kódující vývojového předchůdce ORM divergoval u lidí do třech vývojově modifikovaných kopií, studium funkce každého ze členů této malé proteinové rodiny zasluhuje zvláštní pozornost. Ústředním tematem předložené práce se stalo studium molekulárních mechanismů kontrolujících funkci proteinu ORMDL3, a to zejména pro jeho významnou úlohu na rozvoji dětské formy astmatu.

Celkově lze říci, že studovaná tematika molekulárních mechanismů a funkce ORMLD proteinů je poměrně mladá a vysoce aktuální, což je dokumentováno rychlým nárůstem významných publikací zejména v posledních pěti letech. Přes tento trend je stále mnoho otázek nezodpovězených a řada závěrů naopak kontroverzních, což jen podtrhuje složitost výzkumu jednotlivých typů ORMDL proteinů a potřeby dalšího experimentálního vyjasnění.

Cílem předložené práce bylo splnit zadané výzkumné úkoly, které jsou rozděleny do pěti oblastí: 1. Určení úlohy ORMDL3 v signalizaci žírných buněk indukovaných přes FcεRI, 2. Porovnání proteinové sekvence u různých druhů k identifikaci konzervativních aminokyselin a jejich sekvenčních motivů, 3. Objasnění úlohy jednotlivých členů ORMDL rodiny v rozvoji intestinálního zánětu použitím modelu dextran sulfátem sodným indukované kolitidy u myši, 4. Nalezení dosud neznámých interakčních partnerů ORMDL3 u žírných buněk, 5. Objasnění úlohy časné signalizace žírných buněk indukovaných přes FcεRI, a to použitím různých experimentálních přístupů. Každý z těchto uvedených úkolů byl dále rozpracován do několika dílčích úkolů.

Předložená disertační práce je komponována jako soubor sedmi prací, z nichž pět je již zveřejněných a dvě ve stádiu předložení. Z těchto publikovaných pěti prací je jeden přehledový článek, kde je Mgr. Paulenda prvním autorem a který podrobně mapuje úlohu jednotlivých členů ORMDL rodiny v biosyntéze buněčných sfingolipidů, ale i jiných funkcí, zejména jejich významu při rozvoji astmatu. Autor zde provedl bioinformatické porovnání podobnosti genové sekvence na příkladě vybraných zástupců z říše rostlin, dále pak hub, kvasinek, hmyzu, ryb, myši a lidí. Výsledkem analýzy byla identifikace evolučně konzervativních sekvencí a nález fosforylačního sekvenčního motivu pro kvasinkovou kinázu Ypk1 u některých zástupců. Hodnota přehledového článku je však především ve shrnutí poznatků o funkci ORMDL proteinů, zejména v rozvoji astmatu a dalších lidských chorob, ale i v biosyntéze sfingolipidů a regulaci serinové palmitoyltransferázy. Souhrnný článek byl publikován v roce 2016 ve vysoce kvalitním časopise *Allergy* (současný IF = 6.771).

V další části výzkumu zaměřené na objasnění vlivu netoxických hladin etanolu na signalizační funkci žírných buněk indukovaných přes FcεRI, publikované v časopise *PLOS-One*, přispěl Mgr. Paulenda v roli spoluautora

článku k hledání optimálních hladin etanolu a statistickému vyhodnocení dat spojených s mobilizací vápníku u antigenem stimulovaných žírných buněk. Výsledky studie přinesly závěr, že koncentrace etanolu v hladině nízké jen 0.2% může inhibovat aktivaci žírných buněk, a proto je tento fakt nutno brát v úvahu při práci s membránovými mikrodoménovými komplexy. Studie ukázala, že zvýšené hladiny cholesterolu chrání před inhibičním působením etanolu a že CSK je negativním regulátorem mobilizace vápníku.

Předkladatel disertační práce se také významou měrou podílel na výsledcích studie, která našla nové interakční partnery ORMDL3, a to členů syntetické dráhy leukotrienů. V této části práce se zaměřil na konstrukci expresních vektorů k produkci ORMDL proteinů fúzaných s glutathion-S-transferázou v bakteriích, ale i na konstrukci expresních vektorů pro *in vitro* translaci a produkci radioaktivně značených proteinů. Příprava fúzních proteinů s GST pak umožnila provést vyvazovací experiment, který vedl k průkazu přímé interakce ORMDL3 s 5-lipoxygenázou a 5-lipoxygenázu aktivujícím proteinem pomocí hmotnostní spektrometrie. Studie dále ukázala, že zvýšené hladiny 5-lipoxygenázy navozují utlumení produkce ceramidů. Tyto výsledky jsou shrnuty v práci, která byla předložena ke zveřejnění a kde je Mgr. Paulenda spoluautorem.

V roce 2018 vyšly dvě práce v časopise *Frontiers in Immunology*, ve kterých je předkladatel disertační práce spoluautorem. V obou případech jeho přínos spočíval v provedení a vyhodnocení dat experimentu testujícího mobilizaci vápníku, v jednom z nich i v provedení imunoblotačního experimentu na průkaz exprese a fosforylace proteinů.

K práci potvrzující negativní regulační úlohu ORMDL3 proteinu v expresi prozánětlivých mediátorů a chemotaktické odpovědi žírných buněk aktivovaných prostřednictvím vysoce afinitního receptoru pro imunoglobulin E přispěl doktorand konstrukcí vektorů k produkci fluorescenčně značených ORMDL proteinů a přípravou vektorů pro lentivirovou infekci cílových buněk, a provedl a vyhodnotil tento experiment, který spočíval v posouzení úlohy ORMDL3 proteinu v případě jeho zvýšené nebo utlumené exprese. Výsledky studie byly zveřejněny v prestižním časopise *Cellular and Molecular Life Sciences*, kde je předkladatel disertační práce spoluautorem.

Za velmi zásadní přínos autora disertační práce pak považují studii, jejíž cílem bylo posoudit vliv členů ORMDL rodiny na rozvoj střevního zánětu. K tomuto účelu byl zvolen experimentální model dextran sulfátem sodným (DSS) indukované kolitidy u myši. Autoři jako první ukazují přímý vliv ORMDL proteinů na průběh intestinálního zánětu a tento poznatek je zásadní i z hlediska jeho možného využití v léčbě zánětlivých onemocnění střev. Tato práce prezentuje řadu nových poznatků vztahujících se k *de novo* biosyntéze sfingolipidů a také zásadní poznání, že hladina informační RNA pro ORMDL3 protein je utlumována v průběhu navozeného zánětu, zatímco v případě proteinů ORMDL1 a ORMDL2 zůstává hladina transkripce neměnná. Hladiny všech ORMDL proteinů jsou však ve střevní tkáni zvýšeny v průběhu DSS indukovaného zánětu. Když se buňky aktivují DSS *in vitro*, jsou hladiny informační RNA zvýšeny u všech tří ORMDL proteinů. Zvýšená exprese kteréhokoliv z ORMDL proteinů v buňkách linie Caco2 navodí porovnatelné utlumení mucinových genů *Muc2* a *Muc5AC* u neovlivněných, ale i DSS ovlivněných buňkách. Bylo také zjištěno, že DSS podporuje degranulaci žírných buněk. V této práci předložené ke zveřejnění je Mgr. Paulenda prvním autorem.

Souhrnně lze říci, že autor disertační práce dosáhl velice kvalitních a zcela nových výsledků, kterými přispěl k rozšíření znalostí v oblasti signálních mechanismů žírných buněk a funkce proteinů ORMDL rodiny. Důkazem jsou výsledky prací publikovaných v časopisech s vysokým impakt faktorem. Z hlediska obsahové stránky je předložená disertační práce zpracována kvalitně s citací podstatných objevů v dané oblasti, aktualizovaných k datu zpracování práce. Úvod disertační práce je zpracován do rozsahu 22 textových stran a je doplněn 8

obrázky a schematy. Tato část je členěna do 3 sekcí, a to nejprve do popisu rodiny ORMDL proteinů, pak části zaměřené na popis funkce členů ORMDL rodiny a na závěrečnou pasáž úvodu věnující se funkci a mechanismům žírných buněk. Tady bych uvítal jiné uspořádání úvodu, kde by bylo vhodné začít popisem obecných funkcí žírných buněk s vysvětlením mechanismu aktivace vedoucí k degranulaci a uvolnění mediátorů jak je např. prezentováno v popisu obrázku 5 s následným popisem mechanismů vápníkové mobilizace, jak je prezentováno v obrázku 6, a vysvětlením mechanismu leukotrienové biosyntézy, jak je uvedeno v obrázku 7. Popis rodiny ORMDL proteinů by měl být představen až v následné pasáži, neboť popis jejich funkce se přímo odkazuje na uvedené biosyntetické a aktivační dráhy.

K formální stránce předložené práce mám výhrady. Zdá se, že tato část práce nebyla dotažena do preciznosti, a to je škoda, protože kvalitní výsledky a obsahově komplexní práce je narušena při čtení textu překlepy, nevhodnou či chybějící interpunkcí, absencí mezer či chybějícími slovy. Pro text legend u obrázků 1, 2, 4 a 8 je použit jiný font než u obrázků 3, 5, 6, a 7, kde autor ponechal stejný font jakým je psána disertační práce. Sladění fontu a odstranění textových chyb by připsaly k souladu s kvalitními publikačními výstupy.

Vyzdvihl bych ale metodický rozsah předložené práce, kdy autor k dosažení výsledků musel zvládnout téměř dvě desítky popsaných technik a metodických postupů, které jsou podrobně popsány v jednotlivých zveřejněných vědeckých článcích.

K autorovi disertační práce mám následující dotazy a komentáře:

1. Protože gen kódující obdobu ORMDL proteinů je hojně rozšířen v živočišné říši, je jeho absence v genomu *C. elegans* zářezující, tím spíše, že u jiných členů *Nematodes* je tento gen zastoupen. Je nějaká představa, jaké proteiny by mohly převzít regulační roli ORMDL ekvivalentů u tohoto červa?
2. Jak vysvětlujete příčinu pozorované zvýšené hladiny ORMDL proteinů ve střevní tkáni myši v průběhu DDS indukované kolitidy, ale také v *in vitro* DSS ovlivněných buňkách oproti pozorovanému útlumu hladiny mRNA pro ORMDL3 a neměnné hladiny ORMDL1 a ORMDL2?
3. Co soudíte o nedávno publikovaných výsledcích, které dokumentují, že nedochází ke zvýšení hladiny mRNA pro ORMDL3 při alergenem indukovaném astmatu a že ORMDL3 defektní myši normálně vyvíjejí astmatické symptomy po stimulaci prachovými roztoči (Debeuf *et al.*, 2019)?
4. Mohly by se proteiny ORMDL účastnit vedle zánětlivých onemocnění střev i rozvoje kolorektálního karcinomu? Jsou v tomto ohledu známy nějaké souvislosti?

Závěrem konstatuji, že předložená doktorská disertační práce Mgr. Tomáše Paulendy je mimořádně kvalitní a přesahuje běžné požadavky na doktorskou disertaci. O tom svědčí i fakt, že výsledky téměř celé disertační práce byly již publikovány ve vysoce kvalitních časopisech. Posuzovanou práci pokládám za vynikající doklad autorových profesionálních kvalit, doporučuji ji k obhajobě a navrhuji udělit Mgr. Tomáši Paulendovi vědeckou hodnost Ph.D.

Ve Vestci, 7. ledna 2020.

RNDr. Petr Malý, CSc.