

Posudek školitele diplomové práce Rebečky Göblové: Význam exosomů a ektosomů pro virulenci *Trichomonas vaginalis*

Extracelulární váčky jsou zásadním komunikačním prostředkem nejen mezi buňkami tkání v rámci jednoho mnohobuněčného organismu, ale stále více se ukazuje jejich význam v komunikaci mezi parazitem a hostitelem. Zadáání této diplomové práce vycházelo ze současných studií, které charakterizovaly tvorbu extracelulárních váčků (exosomů a ektosomů) a jejich proteinové složení u lidského parazita urogenitálního traktu *Trichomonas vaginalis*. O jejich významu pro virulenci tohoto parazita však máme dosud minimální znalosti. Původní myšlenkou bylo vybrat dva kmeny *T. vaginalis* o různé virulenci a porovnat proteomy exosomů. Prvním úkolem proto bylo vytipovat vhodné kmeny, bez jejich obvyklých endosymbiontů tj. bez dsRNA virů a mykoplasem, které virulenci mohou ovlivňovat. V době kdy Rebecka začala pracovat na své diplomové práci jsme získali nový kmen (tj. izolát) z moči pacientky, která neměla žádné klinické příznaky trichomoniázy a domnívali jsme se, že by potenciálně mohl patřit mezi méně virulentní. Rebecka však ukázala pomocí testu virulence na laboratorních myších, že se chová jako kmen středně až vysoce virulentní. Dále jsme zvažovali, do jaké míry jsou jednotlivé buňky trichomonád tohoto kmene stejné co se týče virulence a proto Rebecka odvodila několik klonů tohoto kmene a opět otestovala jejich virulenci. Kupodivu většina klonů byla pro myši nevirulentní, jeden klon však byl vysoce virulentní. Tento výsledek považuji za velmi zásadní, protože dosud o heterogenitě trichomonád v rámci jednotlivých kmenů (izolátů) neexistují žádné studie. Poté co Rebecka získala takto definované klony, začala pracovat na izolaci exosomů. Nutno podotknout, že jsme v naší laboratoři dosud s extracelulárními váčkami nepracovali a Rebecka se musela nejprve potýkat se získáním vhodných markerů, protože zavedené komerční protilátky proti savčím markerům u *T. vaginalis* nefungují. Odvodila proto tři transgenní linie *T. vaginalis*, které exprimovaly vytipované proteiny s hemaglutinovou značkou jako potenciální markery a jejich buněčnou lokalizaci sledovala imunofluorescenční mikroskopií a na buněčných frakcích. Jako nejlepší se ukázal tetraspanin-1 (TSP1). Poté provedla několik předběžných experimentů pro izolaci exosomů, avšak další experimentální činnost, která měla být realizována na jaře tohoto roku realizována nebyla vzhledem k příchodu pandemie Covid-19. Dr. Petr Rada, který byl konzultantem Rebecky a paralelně pracoval na izolaci a protetické analýze exosomů *T. vaginalis* proto poskytl Rebecke dva datasety proteomických analýz exosomů, aby si mohla alespoň vyzkoušet jak získaná proteomická data hodnotit.

Rebeka začala své magisterské studium v roce 2017/18 a přestože jsem ji od začátku upozorňoval, že je třeba na diplomové práci velmi intenzivně pracovat, během prvního roku docházela Rebeka do laboratoře mnohem méně, než bylo potřeba a experimentální práce šla velmi pomalu dopředu. Po domluvě na začátku druhého ročníku se její aktivita zlepšila, nicméně na konci druhého roku nebyly její výsledky dostatečné na sepsání diplomové práce a proto jsme se dohodli na prodloužení studia nejprve do ledna a poté na konec akademického roku 2019/2020. Vývoj této diplomové práce byl tedy relativně složitý, avšak je třeba zvážit, že zadané téma byla možná až příliš ambiciózní a dosažené výsledky jsou zajímavé a budou odrazovým můstkem pro další studium exosomů trichomonád. Je třeba také ocenit, že diplomová práce je sepsána v angličtině. Celkově se domnívám, že předložená práce je na solidní úrovni a doporučuji ji k obhajobě.

V Řevnicích 19. 8. 2020


prof. Jan Tachezy, Ph.D.