

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Lucie Ječné na téma „Enzymy a další molekulární faktory ovlivňující vývoj leishmanií ve flebotomech“

(vypracoval RNDr. Petr Kopáček, CSc., Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, v.v.i. , České Budějovice)

Předkládaná dizertační práce Mgr. Lucie Ječné má klasickou formu a je členěna na krátký obecný Úvod, Cíle práce, Literární úvod, Výsledky prezentované formou tří publikovaných článků v impaktovaných časopisech a jedním připravovaným rukopisem, Diskuzí se Souhrnem a Seznamem použité literatury.

Hned v úvodu svého hodnocení bych chtěl předeslat, že Lucie Ječná je prvním autorkou článku publikovaném J. Medical Entomology a připravovaného rukopisu a dále spoluautorkou dvou článků zveřejněných v PLOS Negl Trop. Diseases. Splňuje tak požadavky kladené Oborovou radou parazitologie PřF UK na publikační aktivitu doktorandů.

Dizertační práce je psaná česky. Ačkoli požadavky OR tuto možnost zřejmě nevyklučují, jsou česky psané dizertační práce v přírodních vědách dnes již poměrně výjimečné a samy o sobě představují určitý handicap pro uchazeče o titul PhD z několika důvodů.

1. Česky psané práce neumožňují recenzi zahraničních oponentů a tím srovnání s úrovní na jiných zahraničních univerzitách.
2. Uchazeč zbytečně zpochybňuje svůj podíl na psaní publikovaných článků.
3. Literární úvod, který by v mnoha případech mohl sloužit jako užitečné a publikovatelné review k dané problematice, je z tohoto hlediska nepoužitelný.
4. Uchazeč tím může odhalovat i určitou míru pohodlnosti a snahu dosáhnout cíle cestou nejmenšího odporu.

Z mého pohledu je mi rozhodně milejší dizertace napsaná třeba nedokonalou angličtinou, podle které lze posoudit schopnost (či neschopnost) doktoranda dále se pohybovat ve vědeckém prostředí - psát publikace, grantové aplikace, peer-review apod.

Úvodní literární přehled Lucie Ječné mohla opřít o bohatý zdroj literatury v dané problematice. Většina uvedených obrázků byla převzata z jiných přehledných článků a jejich úprava spočívala pouze v českém popisu. Některé pasáže, jako např. obecná část o cysteinových proteázách se mi zdají zbytečně rozsáhlé a málo související s problematikou řešenou v této dizertační práci. Uvedení obrázku 3 například implikuje otázku - **Co je známo o substrátové specifitě cysteinových proteáz u leishmanií?** Jiný odstavec – např. o sekretovaných kyselých fosfatázách na straně 25 zaujme tím, že je doslova napěchován literárními odkazy (napočítal jsem 15 různých citací na 13 řádků), z nichž žádný nebyl mladší než z roku 2002. Nemůžu se ubránit dojmu, že tato část byla převzata z nějakého review postaršího data.

Při čtení této části jsem se tak poněkud ztrácel v množství literárních odkazů, aniž by mi tento Literární úvod pomohl se orientovat, co je v dané problematice více nebo méně důležité. Na druhé straně jsem zjistil, že některé zásadní práce v tomto přehledu chyběly. Mezi nimi bych uvedl např. práci Rogerse a kol. z Cellular Microbiology 2008, který spolu s laboratoří Petra Volfa popsal chitinázu potřebnou k překonání peritrofické matrix flebotoma nebo recentní práci Stamperové a kol. (PLOS NTD, 2011) o infekčních parametrech flebotoma, které predikují přenos *L. major*. Celkově bych uvítal posílení molekulárního pohledu na danou problematiku např. uvedením a hlubší analýzou článku Pitalugy a kol. (Mol. Genet. Genomics 2009), který porovnává transkripty střev nasátých a leishmániemi infikovaných flebotomů (*L. longipalpis*).

K literárnímu úvodu bych si dovolil několik otázek:

1. Na straně 22 zmiňujete možnou úlohu lipofosfoglykanů v inhibici střevních proteáz. **Na jakém principu tato inhibice funguje?**
2. Na straně 26 uvádíte pojem neoglykoprotein či neoglykoenzym. **Co si pod těmito pojmy představujete a jak neoglykoproteiny vznikají?**
3. Na straně 27 zmiňujete, že ve střevech flebotomů přežijí jen leishmanie, které se zachytí. Laická otázka: **Jsou defekované leishmanie živé?**

Část výsledky budu komentovat podle jednotlivých článků:

Publikace I.

V první publikované práci Ječná et al., J. Med. Entomol. 2009 autoři ukazují pomocí mutantních linií *L. mexicana*, které neprodukují inhibitor cysteinových proteáz (ICP), že tato molekula exprimovaná zejména promastigotními stádii zřejmě není důležitá pro vývoj leishmanií ve flebotomovi. Rekombinantní ICP fungoval jako inhibitor vůči papainu, ale pochopitelně neinhiboval aktivitu střevních proteáz ve střevě flebotomů, jejichž trávicí systém je založený na serinových nikoli cysteinových proteázách.

Otázky ke článku 1:

Nedožadovali se oponenti tohoto článku průkazu cysteinových proteáz ve střevě?

Byl od publikace tohoto článku zaznamenán nějaký posun ve znalosti funkce ICP u leishmanií?

Lze nalézt nějakou funkční paralelu např. s chagasinem?

Publikace II.

V článku Svárovská a kol. (PLOS NTD, 2010) byla testována schopnost přežití mutovaných linií *L. major* postrádajících lipofosfoglykan (*lpg1*⁻) nebo fosfoglykan (*lpg2*⁻) v ve střevě flebotomů. Práce ukázala, že pro přežití a další vývoj flebotomů je důležitá zejména molekula fosfoglykanu (*lpg2*) a nikoli lipofosfoglykanu (*lpg1*). Všechny WT i mutované linie byly stejně odolné vůči bovinnímu trypsinu, což poněkud oslabuje teorii, že povrchové fosfoglykany brání leishmanie proti ataku trávicích peptidáz.

Otázky:

Uvažovali jste o použití endogenního rekombinantního trypsinu z flebotoma namísto bovinního trypsinu?

Provedli jste obdobný experiment se střevním extraktem, který endogenní proteázy obsahuje?

Můžete vysvětlit princip přípravy mutovaných *lpg1*⁻ a *lpg2*⁻ linií?

Publikace III.

V článku Wilson et al. (PLOS NTD, 2011) autoři využívají nově zavedenou metodu in vitro stanovení vazby rozdílně fluorescenčně obarvených leishmanií na vypitvaná střeva flebotomů.

Tato metoda by zřejmě mohla znamenat významné vylepšení z hlediska variability a reprodukovatelnosti získaných výsledků. Autoři touto technikou studovali vazbu vývojových stádií promastigotů leishmanií (procyklické formy, nektomonády, leptomonády a metacyklické promastigoty) a porovnali sílu vazby různých druhů leishmanií na střeva specifických i permissivních flebotomů. Těmito výsledky mimo jiné ukázali, že vazba nepřírozené kombinace flebotomů Nového světa a leishmanií Starého světa např. může být silnější než vazba u přírodního páru vektor-parazit.

Otázky:

Neovlivňuje navázání fluorescenční barvičky na leishmanie schopnost jejich přirozené vazby na střevní epitel? Dá se to nějak experimentálně ověřit?

Mohla byste se pokusit interpretovat vaše výsledky v souvislosti s predikcí kompetence přenosu flebotomů podle výše zmíněného článku Stamperové a kol., 2011?

Publikace IV – připravovaný rukopis.

V této práci, kde je Lucie Ječná první autorkou, autoři porovnávají svoji in vitro metodu stanovení vazby leishmanií na střevo s experimentální infekcí. Pro toto srovnání použili kombinace WT a *lpg1*⁻ mutovaných linií *L. major* vs. permissivní vektor *P. perniciosus* a specifický *P. papatasi*. Potvrdili tak dřívější údaje, že při LPG je důležitý pro vývoj parazitů v specifickém, ale nikoli permissivním vektoru. Tento výsledek však nebyl potvrzen pro další kombinaci *L. infantum* vs. specifický vektor *P. sergenti* a permissivní *P. perniciosus*. Další vazebné stanovení bylo použito na sledování vazby *L. mexicana* defektní na produkci povrchových GPI zakotvených proteinů a *L. amazoniensis* mutantu s potlačenou expresí hlavní povrchové proteázy gp63 na střeva *Lu. longipalpis*. Výsledky ukázaly výrazné snížení vazby u GPI defektních linií a málo výrazné snížení v případě eliminace gp63.

Výsledky této připravované publikace jsou shrnuty do dvou tabulek a jednoho obrázku, takže tato práce z hlediska objemu získaných dat nepůsobí příliš impozantně. Že se jedná o velice předběžný

draft rukopisu svědčí i množství tiskových chyb (např. opakovaná chyba ve slově lipophosphoglycan. Odkaz v Úvodu na Tabulku 1, která obsahuje některá data získaná až v této práci je poněkud nezvyklý. Tato srovnávací tabulka by se spíše hodila do diskuze.

K této práci mám jen obecný dotaz.

Jste přesvědčena, že množství dat prezentovaných v tomto rukopise je dostatečné pro publikaci? Ve kterém časopise hodláte tuto práci publikovat a jak jste v mezích pokročili s přípravou rukopisu?

Závěrečná část Diskuze a Souhrnu je poměrně dobře napsaná a vyváženě a střízlivě komentuje a diskutuje získané výsledky. Z hlediska snazšího pochopení dizertace by možná bylo lepší uvést racionální zdůvodnění jednotlivých experimentů před kapitolou výsledků a ne až dodatečně v diskuzi. Přiznám se, že pro mě nebylo úplně jednoduché neztratit se v kombinacích různých druhů leishmanií a jejich permisivních a specifických vektorů. Z této disertační práce jsem si tak byl schopen odnést a zapamatovat výsledek, který si dovolím citovat doslova: „Vazba leishmanií ke střevu je sice důležitá, ale samotná nedokáže vysvětlit podstatu přenosu leishmanií v přírodě.“

Závěr: Přes uvedené připomínky **doporučuji** předloženou dizertační práce Mgr. Lucie Ječné k obhajobě před příslušnou komisí Přírodovědecké fakulty UK.

V Českých Budějovicích, 27.února 2012

Petr Kopáček