

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Adély Jílkové s názvem „Strukturní a funkční analýza katepsinu B1 z krevničky *Schistosoma mansoni*“ obhajovanou na Univerzitě Karlově v Praze, Přírodovědecké fakultě, 2014.

Vypracoval: RNDr. Libor Mikeš, PhD., Katedra parazitologie PŘF UK v Praze

Předložená disertační práce má rozsah 170 stran. Je připravena v obvyklé formě svázaných publikovaných prací s doplněním obecnějšího vhledu do problematiky formou literárního úvodu, shrnujícího abstraktu, dále je doplněna diskusí a závěry zahrnujícími zhodnocení výzkumu prezentovaného v publikacích autorky. Konkrétně práce obsahuje 5 článků, z toho 4 v uznávaných mezinárodních impaktovaných časopisech – 3 publikované původní práce (IF 5,356; 4,651; 3,377) a 1 manuskript původní práce, v době odevzdání disertační práce připravený k odeslání, v současnosti již přijatý k tisku po „minor revisions“ (IF 6,794) a 1 také souhrnnou práci publikovanou v češtině (Chemické listy, IF 0,453).

Z formálního hlediska obsahuje disertační práce všechny náležitosti. Oceňuji jasně a přehledně vycílené cíle, zařazení zvláštních oddílů obsahujících seznam zkratk, přehled používaných metod a také zařazení přehledu hlavních výsledků před každou konkrétní publikací včetně jasněho vymezení podílu autorky na experimentálních výsledcích a přípravě rukopisu. To vše přispívá k přehlednosti a dobré orientaci v disertační práci, která svým objemem přesahuje obvyklý průměr. Kromě anglického abstraktu a původních článků je text psán v češtině, velmi dobře čtivým odborným jazykem, s minimem překlepů a gramatických chyb. Zmínil bych snad jen nestejně psaní koncovek u některých slov převzatých z latiny (proteasa vs. schistosomóza), chyby v psaní 3. osoby množného čísla u některých sloves (vázat – vážou, nikoliv „váží“ – 1. slovesná třída, vzor „mazat“).

Literární přehled seznamuje čtenáře v první části s problematikou výzkumu a s vlastnostmi cysteinových katepsinů obecně a připravuje tak solidní kontext pro pochopení významu vlastních výsledků autorky a kolektivu spolupracovníků. Druhá část je pak věnována biologii schistosom („krevniček“) a problematice trávení krevních proteinů těmito parazity, včetně shrnutí množství publikovaných informací o hlavní trávicí peptidáze, cathepsinu B1, jenž byl a je intenzivně studován jako potenciální cíl nové generace chemoterapeutických antihelmintik v několika renomovaných světových laboratořích. V literárním přehledu je citováno na 191 publikací, vesměs relevantních zdrojů informací primárního výzkumu. Celkově se jedná o kvalitní text. Některé nepřesnosti a neobratnosti lze nalézt v parazitologické části, lze je zřejmě částečně přičíst na vrub tomu, že autorka není biolog. Nejedná se však o chyby, které by závažně znehodnocovaly odbornou kvalitu textu. Například: str. 16, kap. 2.2.1. – nelze zobecnit, že prvním mezipřevzatým digenetickým motolic je vždy měkkýš (u čeledi Aporocotylidae to mohou být i mnohoštětinatí kroužkovci); konec téže kapitoly – rod schistosom *Trichobilharzia* u nás je jen příkladem, jinak u nás byly nalezeny i další rody, např. *Bilharziella*, *Gigantobilharzia*; str. 17, kap. 2.2.2. – není jasné, o které krevničky se mluví a pak se název kapitoly jak zní vztahuje na celou čeleď – v tom

případě nelze zobecnit, že definitivním hostitelem je jen člověk (to neplatí ani pro rod *Schistosoma* - např. u *S. japonicum* je to i dalších ca. 40 druhů savců, v rámci čeledě jsou i druhy parazitující u ptáků atd.) a nelze zobecnit, že mezihostitelem je tropický sladkovodní plž (známe druhy krevničků s mezihostitelem ze subpolárních oblastí nebo z brakické či slané vody); str. 18 – močový měchýř nemá mukózu; str. 19 - k přichycení ke stěně cévy slouží samci schistosom spíše břišní než ústní přísavka; str. 20 - použitá mapa rozšíření schistosomózy není zrovna přesná, lze vidět na příkladu Brazílie a Číny, kde je *S. mansoni* ve skutečnosti jen na několika malých územích na SV Brazílie, resp. *S. japonicum* se nevyskytuje zdaleka na celém území Číny; str. 20 - “po opakovaných zánětech se množství granulomů zvýší natolik, že orgány kalcifikují” je dost neobratné a nepřesné vyjádření – granulom je sám typem chronického zánětu, v játrech dochází k fibróze a posléze k cirhóze, kalcifikace nepostihuje orgán en bloc a týká se více močového měchýře; str. 23 – kap. 2.3.1., navzdory názvu kapitoly není v textu o degradomu ani zmínka; a některé další drobnosti, které nemá cenu zde zmiňovat.

Vzhledem k tomu, že původní články zařazené do disertační práce prošly přísným recenzním řízením v příslušných časopisech (jedná se o velmi kvalitní mezinárodně uznávaná impaktovaná periodika), je namíste soustředit se hlavně na zhodnocení podílu autorky na daných publikacích a na jejich vědecký přínos prací. Z informací uvedených autorkou v souhrnech před každou zařazenou publikací, z pořadí autorů (mj. 2x první autor) a z vyjádření školitele na str. 158 jasně vyplývá, že „Adéla Jílková se významnou měrou podílela na vzniku všech publikací uvedených v dizertační práci“. V průběhu řešení zvládla řadu biochemických, enzymologických, molekulárních, krystalografických, bioinformatických a dalších *in silico* metod, které vedly k získání prvotřídních výsledků v oblasti charakterizace katepsinu B1 *Schistosoma mansoni*.

Vědecký přínos publikací hodnotím jako vysoký. Autoři přinesli naprosto originální data o vlastnostech katepsinu B1 *S. mansoni*. Potvrdili jeho zásadní postavení v proteolytické trávící kaskádě tohoto hematofágního parazita, ukázali převládající exopeptidázovou aktivitu podílející se na funkci této peptidázy jako „molekulárního mlýnku“, objevili duální cestu aktivace zymogenu SmCB1 s alternativním zapojením asparaginylové endopeptidázy SmAE a sulfatovaných polysacharidů a možnou regulaci způsobu aktivace v závislosti na prostředí, poprvé určili experimentálně krystalové struktury zymogenu, maturovaného enzymu a meziproduktů aktivace a štěpná místa v prosequenci. Dále objevili unikátní α -helix v prosequenci enzymu obsahující motiv vázající heparin, typický, jak se zdá, pouze pro motolice živící se krví či tkání hostitele a charakterizovali některé interakce enzymu se sulfatovanými polysacharidy. Charakterizovali části prosequenční krucální pro blokování aktivního místa enzymu a na jejich základě vyvinuli několik potenciálních inhibitorů enzymu, analyzovali podrobně substrátovou a inhibiční specifitu SmCB1 pomocí syntetických i přírodních substrátů a inhibitorů. V neposlední řadě otestovali inhibiční charakteristiky řady syntetických vinylsulfonových inhibitorů, analyzovali jejich inhibiční mechanismus pro vývoj výpočetní metody skórování účinnosti inhibice a úspěšně otestovali jejich biologické účinky

na schistosomulách *S. mansoni*. Výsledky mají návaznost na mezinárodní výzkum a značně rozšiřují naše vědomosti o vztahu struktury a funkce SmCB1, který je považován za velice slibný cíl vývoje nových léčiv proti schistosomóze. Poznatky bude možno přenést i do mezinárodního výzkumu trávicích peptidáz ostatních medicínsky a veterinárně významných motolic v kontextu jejich biologie a vývoje účinných antihelminetik.

Mám několik následujících dotazů:

- 1) Na str. 5 autorka píše o další cysteinové papain-like trávicí peptidáze *S. mansoni*, katepsinu L1 (SmCL1). Tento byl však na základě podobnosti přeřazen mezi katepsiny F (MEROPS db). Můžete vysvětlit, v čem se strukturně liší katepsiny L od katepsinů F a v čem je SmCF odlišný od běžných katepsinů F?
- 2) Z hlediska možné kompartmentalizace aktivace SmCB1 uvádíte, že by mohlo docházet k aktivaci jak intracelulárně v gastrodermis, tak v lumen střeva schistosom. Předpokládáte tedy, že v buňkách by docházelo k heterologní aktivaci legumainem a ve střevě k autoaktivaci za účasti heparinu? Může být aktivace hostitelským heparinem biologicky relevantní vzhledem ke koncentraci heparinu v krvi a minimální koncentraci sulfatovaných polysacharidů potřebných k aktivaci ve vašich *in vitro* pokusech? Vyskytují se endogenní sulfatované polysacharidy i ve střevě schistosom?
- 3) U některých motolic byly s využitím reverzní transkripce nalezeny isoformy cysteinových peptidáz včetně katepsinů B, které mají Cys aktivního místa nahrazený jinou aminokyselinou, např. Gly u TrCB1 krevničky *Trichobilharzia regenti*. Tyto enzymy by neměly být aktivní. Jaký je váš názor na jejich biologickou funkci?
- 4) Ve fylogenetickém kontextu lze vysledovat, že u nižších metazoi převažují cysteinové peptidázy nad serinovými, které mají stejný mechanismus katalytického účinku. V průběhu evoluce vznikla hematofágie jako způsob obživy mnohokrát nezávisle. U parazitických prvoků, z mnohobuněčných pak u motolic, monogeneí, hlístic, roztočů se trávení (krve) účastní cysteinové peptidázy, serinové peptidázy se objevují u lophotrochozoí a ecdysozoí až u měkkýšů, kroužkoců, korýšů, hmyzu. Můžete spekulovat o možném důvodu a významu tohoto „switche“ z hlediska vlastností zmíněných skupin peptidáz?

Závěrem hodnotím předložené publikace jako velice kvalitní a přínosné z hlediska světové vědy i z hlediska profesního vývoje studentky. Adéla Jílková bezpochyby prokázala své schopnosti vědecké práce experimentální i publikační, tato disertační práce je toho důkazem. Proto ji rád doporučuji k obhajobě jako podklad pro získání vědeckého titulu PhD.