Department of Pediatrics
Charles University, 1st Faculty of Medicine

Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic
Tel./ Fax: + 420 224 910 478

Oponentský posudek

Kofaktory obsahující železo u anaerobního parazita *Giardia intestinalis*

Disertační práce
Doktorský studijní program *„Parazitologie“*

Mgr. Jan Pyrih
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Školitel: Prof. RNDr. Jan Tachezy, PhD
Katedra parazitologie PřF UK v Praze

Školitel konzultant: Doc. RNDr. Ivan Hrdý, PhD
Katedra parazitologie PřF UK v Praze

Téma disertační práce

Disertační práce Mgr. Jana Pyriha zasahuje do velmi dynamické oblasti parazitologie, zaměřuje se na široce pojaté studium anaerobního parazita *Giadia intestinalis (také Giardia lamblia),* který způsobuje rozšířené infekční onemocnění u člověka. Je velmi málo známo jak jsou u anaerobně žijících protistů formovány FeS klastry a jak je využíván hem. Dizertant se proto zaměřil na železo obsahují kofaktory u *Giardia intestinalis*. Tento pozoruhodný parazit prošel dramatickou reduktivní evolucí, která vedla ke vzniku jednoho z nejmenších eukaryotických genomů a nejvíce redukované formy mitochondrie – mitosomu. Řešení předkládané problematiky vyžadovalo velkou píli, systematičnost a vytrvalost doktoranda, kvalitní zázemí laboratoře a návaznost na pečlivá pozorování školitele, členů laboratoře a katedry parazitologie PřF UK v Praze.

Zpracování práce

Po stránce obsahové i formální má předložená disertační práce Mgr. Jana Pyriha vynikající úroveň. Práce je přehledná a velmi dobře dokumentovaná. Celkový rozsah předkládané práce je 129 stran, 63 stran představuje vlastní text doktorské disertace, dalších 66 stran jsou přílohy tří publikovaných prací a jedné práce v rukopise , které tvoří vlastní jádro disertace. Disertace je psána, mohu-li posoudit, dobrou angličtinou, literární odkazy čítají 194 položek. Přehledné obrázky velmi vhodně doplňují vlastní text předložené práce.

Autor si vytyčil čtyři poměrně komplexní cíle práce (Charakterizovat cytochromy b_5 a jejich schopnost vázat hem *in vitro* a v buňce *G. intestinalis*; Testovat přítomnost hemu v buňce *G. intestinalis*; Charakterizovat Tah18-like oxidoreduktázy u *G. intestinalis*; Zkoumat složení ISC a CIA dráhy a buněčnou lokalizaci jejich komponent). Všechny čtyři cíle práce se podařilo dizertantovi plně realizovat.

Použité metodiky jsou detailně popsány v jednotlivých publikacích. Obecně lze shrnout, že metody zahrnovaly detekci hemu, enzymové kinetiky, nízkoteplotní analýzy spekter, SDS page a western blot analýzy buněčných frakcí, imunofluorescenční lokalizaci proteinů v *G. intestinalis*, produkci rekombinantních proteinů v bakteriích.

Bylo dosaženo vynikajících výsledků, podtrhnu jen některé z nich. Analýzou primární struktury a fylogenetickými studiemi byl charakterizován nový typ cytochromů b_5 u G. intestinalis a dalších eukaryot – skupina II. Tato je charakterizována nepřítomností C-terminálové transmembránové domény a změnami v místě vazby hemu. Předpokládalo se, že anaerobní prvoci jsou schopni žít zcela bez hemu. Dizertant prokázal, že *G. intestinalis* je schopna importovat hem z extracelularního prostředí a tento hem zabudovávat do cytoplasmatického gCYTb_5-IV. Systematická analýza proteomu mitosou G. intestinalis pomocí diferenciální gradientové ultracentrifugace a recentně pomocí *in vivo* biotinylace vedla k nálezu proteinů s neznámomou homologií, nález je předmětem následných studií.

Předložená disertace je založena na třech publikovaných sděleních v důležitých časopisech oboru s IF a jednom sdělení ve formě rukopisu, ve dvou sděleních je dizertant prvním autorem. Celkový IF časopisů, ve kterých byla tato tři sdělení publikována, je 10,831. Každé prezentované sdělení je osobitým přínosem s významnou reflexí do oboru parazitologie. Aktuálnost řešené problematiky podtrhuje rovněž skutečnost, že problematika byla řešena v rámci několika grantových projektů. Dvě ze tří publikovaných sdělení mají již 39 citačních odkazů (WoS), je jisté, že publikace ze srpna 2015 bude sledovat minimálně stejný citační trend.

Komentář:

Protože tato PhD studie vyústila do tří publikací, které byly otištěny v mezinárodních časopisech, kde byly podrobeny důkladné recensi, uzavírám proto, že nemám žádné výhrady k textu předložené disertace. Předkládám následující otázky:

a) U nově definované skupiny II cytochromů b_5 není první histidinový motiv obklopen kyselými zbytky a druhé místo je součástí H-X-WV(N/S) motivu, je možné předvídat funkční konsekvence ve srovnání např. se skupinami I a III?

b) V osekvenovaných genomech *G. intestinalis* jste neprokázali přítomnost genu pro ferredoxin reduktázu, která je zpravidla součástí ISC dráhy. Vámi identifikovaný GiOR-1 protein je diflavin oxidoreductáza, která nebyla schopna redukovat rekombinantní GiFdx. Jaké máte další plány ve studiu tohoto pozoruhodného proteinu?

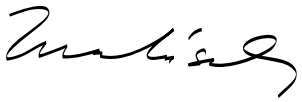
c) Na základě komplexního studia *G. intestinalis* dizertant postuluje, že ztráta některých mitochonriálních genů a drah během mitosomální evoluce je souběžně spojena se vznikem nových specifických proteinů. Toto je z obecně biologického hlediska nesmírně nosné. Jaké jsou další plány a přístupy ve studiu této problematiky.

d) Používá se ještě ve vašem oboru alespoň alternativně označení *Giardia lamblia,* zavedené v roce 1915 na počest Alfreda Giarda a českého lékaře Viléma Dušana Lambla?

Závěr:

Disertační práce Mgr. Jana Pyriha přináší originální poznatky v českém i evropském kontextu, je významným přínosem oboru.

V předložené disertační práci Mgr. Jan Pyrih prokázal předpoklad k samostatné tvořivé vědecké práci. Doporučuji oborové radě doktorského studijního programu „Parazitologie“ práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.



Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc, FCMA
Klinika dětského a dorostového lékařství
1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

V Praze dne 1. prosince 2015