

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Kristýna Peterkové: Localization and quantification of mRNA coding digestive peptidases of *Fascioloides magna*.

Vedoucí práce: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Daniel Sojka, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Práce Bc. Kristýny Peterkové je na aktuální téma a navazuje na práci v laboratoři prof. Horáka a jejího školitele RNDr. Martina Kašného. Práce je velmi pěkně psaná a svědčí o porozumění autorky tématu a její ochotě použít solidní záběr metod molekulární parazitologie. Správně je nastaven přístup k dané problematice - studium nově identifikovaných proteáz: po identifikaci všech isoenzymů FmCL, FmCB, a FmCD následuje první krok k jejich funkční a biochemické charakterizaci - expresní qPCR profilování v životních stádiích dospělci, miracidie, vejce. Expres v jednotlivých orgánech dospělce - střevě, vitellariu, testes, vaječnicích a děloze je pak sledována pomocí RNA *in situ* hybridizace. Práce je završená neúspěšným pokusem o rekombinantní expresi FmCB v kvasinkách *P. pastoris*.

Po obsahové stránce je práce poměrně rozsáhlá a přehledná a splňuje předpoklady udělení Mgr. titulu na PřF UK. Velmi kladně hodnotím to, že tato magisterská práce je psaná v anglickém jazyce, na rozdíl např. od recentně oponovaných doktorských prací 1. LF UK na podobné téma, a to navíc opravdu velmi kvalitním stylem. Jako již tradičně u diplomek z laboratoře prof. Horáka, velmi dobře je zpracovaná kapitola 1. úvod, kde na stránkách 1-12 je velmi hezky popsána problematika fascioloidních motolic a studovaných proteáz. Velmi přehledná a užitečná jsou tabulky (nevím však proč značené jako figures?) uvádějící přehled identifikovaných fascioloidních enzymů Cath L (figure 6) a Cath B (Figure 7) na straně 13-14. Kapitola metod je rozsáhlá a detailní a dobře doplňuje stručnou kapitolou vlastních výsledků. Kladem práce je kvalitní podrobná diskuse. K diplomové práci mám několik poznámek a dotazů:

1/ Téma diplomové práce se evidentně překrývá minimálně s magisterskou prací Mgr. Romany Šaškové, obhájené v roce 2015, kdy FmCL1 exprese byla sledována ve dvou vývojových stádiích *F. magna* pomocí qPCR a studie lokalizace exprese FmCL1 byla prováděna pomocí *in situ* hybridizace RNA. Může autorka stručně zhodnotit v čem je její současná práce na FmCL pomocí obdobných metod rozdílná?

2/ qPCR kvantifikace str. 43, obr. 14, 15. Jedná se skutečně o dva nezávislé experimenty, jak je uvedeno v textu, nebo o jiné vyjádření výsledků téhož experimentu? Vzhledem k tomu, že se jedná o relativní kvantifikaci (normalizaci na housekeeping gen) a ne o absolutní kvantifikaci (vyjádření absolutního počtu mRNA kopií) bych se rád nechal ujistit, jak byla data normalizována, tak aby bylo možné porovnávat relativní kvantifikace mezi různými PCR produkty na stejném DNA templátu v obr. 14? V legendách ani v metodice jsem navíc nenašel dostatečné vysvětlení, proč chybí chybové úsečky u PCR kvantifikace cDNA templátů z vajec.

3/ Nezazlívám autorce to, že se jí nepodařilo exprimovat FmCB v rámci její jinak pěkné diplomové práce. Osobně bych ale uvítal snahu o paralelní expresi FmCB v bakteriálním systému a to alespoň v nerozpustné formě za účelem získání specifických protilátek imunizací, které pak lze použít pro screening exprese v eukaryotických systémech namísto pro tyto účely ne-úplně vhodné anti-HIS(tag) protilátky. To ostatně potvrzuje ne zrovna přesvědčivý immunodotblot screening (zde nazývaný "yeastern blot") kolonií *P. pastoris* (figure 34). Zaráží mně v metodice na str. 38, že lýze otisku kvasinkových kolonií je založená jen na 10% SDS - to je podle mého subjektivního dojmu na kvasinky s chitinovou buněčnou stěnou málo. Trochu archaické a nadbytečné pro diplomovou práci mi přijde uvádět PCR screening pozitivních kolonií *E. coli* jako součást výsledků - to snad patří raději jen do protokolů. Na druhou stranu obrázek 32. by měl ukazovat dle metodiky PCR screening 24 kvasinkových kolonií, ale vidíme jen pozitivní kontrolu a dvě prázdné jamky? Z diskuze v části 5.3 je patrné, že autorka si dobře uvědomuje, jak lze optimalizovat expresi v kvasinkových systémech. Moje vlastní zkušenost s kvasinkovou rekombinantní expresí je velmi různorodá. Souhlasím, že Signal P 5.0 predikovaný signální peptid (nedekovatelný starším algoritmem Signal P4.0) může být příčinou zrovna tak jako použití alpha-mating faktor signálu pro sekreci do média. Osobně jsem toho názoru, že za nejasnosti a nízké výtěžky při expresi původně lysozomálních enzymů sekrecí do média stojí dosud ne úplně objasněné role post-translačních signálů pro distribuci těchto enzymů v endo-sekrečním

systemu eukaryotických buněk (např. lidský pepsin a cathepsin D jsou strukturně prakticky stejné molekuly, liší se v podstatě jen v post-translačních modifikacích, a přesto jeden je lysozomální a druhý vněbuněčný). Dobrým systémem pro expresi původně endolysozomálních proteáz se proto jeví organismy s evolučně nazávislými sekretorickými mechanismy - např. jeden druh parazitického kinetoplastida, který byl použit pro expresi lidského legumainu - věděla by autorka, jaký systém mám na mysli? Další možností je použít delší nebo alternativní tag (kotvu, značku): Mohla by autorka vyjmenovat jiné tagy/značky, které by šlo a bylo vhodné použít pro purifikaci rek. proteinu z kvasinkových médií jiné než 6xHis tag?

4/ Cathepsin D (pepsin family) je velmi specifickou endoproteázou, která se v evoluci mnohokrát vyvinula k specifickým úlohám zejména u parazitů. Kromě role v trávení hostitelské krve se v posledních letech parazitární cathepsin D-like enzymy opět dostávají do popředí zájmu jako molekulární cíle pro boj s parazity: např. cílená inhibice některých malariálních plasmepsinů funguje i u artemisinin resistantních kmenů *P. falciparum*. Věděla by autorka popsat minimálně dvě další (ne trávicí) esenciální funkce cathepsinu D např. u některého zástupce Apicomplexa: Plasmodium, Toxoplasma? Ptám se v souvislosti s navrhovanou rolí FmCD jako enzymu trávicího šnečí proteiny v miracidiiích, kde je podle autorky dominantní proteázou. Mohla by ta role spočívat i v něčem jiném? Evidentně FmCD má i roli během embryogeneze - mohla by to být pomalá degradace žloutkových rezerv- společně s FmCB i FmCL?

Závěrem: domnívám, že předložená práce je kvalitní a splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, včetně zpracování literární rešerše a osvojení relevantního spektra metod. Proto ji **doporučuji k obhajobě a hodnotím jako chvalitebnou až výbornou v závislosti na prezentaci při obhajobě.**

V Českých Budějovicích dne 10.5. 2019 vypracoval

RNDr. Daniel Sojka, PhD.

