

Praha, 14.8. 2020

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Hany Velové: Adaptive evolution of Toll-like receptors in birds.

Disertační práce magistry Hany Velové, vypracovaná na Přírodovědecké fakultě UK pod vedením RNDr. Michala Vinklera, sestává z 48 stran textu, seznamu literatury, a příloh. Přiloženo je šest publikací, ve dvou z nich je Hana Velová první (a zároveň i korespondenční) autorkou. Zvláště publikace v časopise *Molecular Biology and Evolution* z roku 2018 je velmi rozsáhlá a v oboru již dosti citovaná.

Hlavní text je po úvodu a metodikách rozčleněn do několika kapitol přibližně odpovídajících tématům přiložených publikací. Nejrozsáhlejší je část popisující genetickou variabilitu toll-like receptorů (TLR) u mnoha ptačích druhů. Druhovým rozsahem a detailností popisu lze práci považovat za prioritní. V práci jsou popsány evoluční události jako například duplikace některých genů z TLR1 rodiny (a jejich časové zařazení), duplikace TLR5 u některých ptačích druhů, pseudogenizace TLR7. Díky dostupnosti sekvencí z mnoha druhů mohla autorka provést podrobnou analýzu selekčních tlaků působících na tyto geny. Jádrem práce je analýza pozitivně selektovaných míst v TLR proteinech a pokus o jejich funkční kategorizaci predikcí fyzikálně chemických charakteristik a pozice těchto míst v 3D struktuře. Do této části práce spadají i publikace popisující evoluci některých TLR u nadřádu Galloanserae, TLR4 a TLR5 u pěvců a TLR4/5/7 u české populace koroptve polní (*Perdix perdix*). V závěrečné části je popsána velmi zajímavá molekulární charakterizace fytohemaglutininového indukčního testu používaného jako rychlý indikátor imunokompetence v terénních podmínkách.

Hlavní text i přiložené publikace jsou napsány velmi kvalitně a podrobně. Text obsahuje vícero gramatických chyb v angličtině a pomohlo by mu zřejmě ještě jedno závěrečné přečtení. Mám několik vesměs minoritních připomínek, které není třeba zodpovídat během obhajoby:

- Bylo by užitečné přidat schéma chromozomální lokalizace jednotlivých ptačích TLR, eventuálně i syntenie s jinými obratlovci (lokalizace jsou pouze uvedené jako „supplemental data“ jednoho z článků v tabulce)
- Více důrazu bych kladl na podrobnější popis evoluce TLR u obratlovců, s důrazem na originální citace (například chybí citace Poltorak et al., *Science* 1998, PMID 9851930, popisující slavné první poziční klonování TLR4 jako LPS receptoru).

- Doporučil bych podrobněji rozvést možnou variabilitu ligandů detekovaných TLR receptory, tzv. PAMP (pathogen associated molecular patterns). Ty jsou zřejmě klíčem k pochopení variability TLR proteinů, a jejich variabilita je velmi odlišná od klasických antigenů. Autorka uvádí několik příkladů z literatury ale z důvodu důležitosti tématu bych ocenil větší šíři, pokud je to možné. S tím souvisí i koncept DAMP ligandů (damage-associated molecular patterns), který autorka uvádí ale vůbec nevysvětluje.

Přímé dotazy k autorce mám následující:

1. **Duplikace TLR7:** U více ptačích druhů je v práci Velová et al. 2018 popsána duplikace TLR7. Tato duplikace je interpretována jako evolučně recentní a nastávající opakovaně a nezávisle v každém druhu. Jako důkaz je uváděn fylogenetický strom sekvencí kde oba duplikované paralogy vždy leží vedle sebe pro každý druh. Zároveň je uvedeno že analýza sekvencí neukázala přítomnost genové konverze, která by mohla tuto podobnost dodatečně způsobit. Jedná se ale o mnoho nezávislých duplikačních událostí ve více druzích. V práci Raven et al. 2017, kterou autorka také cituje, je velké množství nezávislých duplikací v ptačím TLR7 označeno jako „extremely unlikely“. Podle Raven et al. je možné že duplikace nastaly pro příbuzné druhy jen jednou, ancestrálně, a různé genetické procesy homogenizovaly sekvenci uvnitř každého druhu. V práci postrádám diskutování tohoto scénáře. Například, s jakou pravděpodobností lze vyloučit genovou konverzi u TLR7 sekvencí, které jsou zřejmě téměř totožné? Dále, dala by se některá varianta (ancestrální vs. opakované duplikace) vyloučit podrobnou sekvenční analýzou celého duplikovaného genomového lokusu?
2. **Absence TLR8:** Tento TLR je popisován jako chybějící u všech ptačích druhů. V kuřecím genomu je však částečná sekvence TLR8 přítomna vedle TLR7 (Philbin 2005, citováno autorkou v dizertační práci). Je možné, že k pseudogenizaci TLR8 nedošlo u společného ptačího předka, ale pouze u některých skupin ptáků. Byly sekvence ortologní ke kuřecímu TLR8 analyzovány pro větší množství ptačích druhů, tak jako to bylo provedeno pro jiné TLR? Jsou nějaké indicie ukazující na kompletní či téměř kompletní TLR8 ortolog u některého druhu?
3. **Analýza pozitivní selekce ptačích TLR:** Byly provedeny analýzy pozitivní selekce zaměřené na určení jednotlivých aminokyselinových residuí pod signifikantní selekcí u studovaných ptačích druhů. Tento typ analýz lze ale také použít na detekci selekce přítomné jen v určité podskupině druhů, na některé z větví fylogenetického stromu („branch-type“ analýzy). Byl proveden tento typ analýzy a je pravděpodobné že by některé TLR byly pod výraznou selekcí například pouze v určitém ptačím řádu?

- 4. Pozitivně selektovaná (PS) místa mimo TLR ECD (ectodomain).** Většina PS míst byla lokalizována v ECD, kde je předpokladem evoluční konflikt s patogenními ligandy. Některá místa jsou ale mimo ECD. Autorka v diskuzi správně uvádí že metody určení PS míst produkují mnoho falešně pozitivních dat. Další možnosti je ale situace, kdy protivirový protein (zde TLR) je zacílený specifickým virovým produktem a dále degradován nebo je změněna jeho lokalizace. Klasickým příkladem je dvojice APOBEC a virový protein Vif z HIV-1. Cílová místa, která mohou ležet kdekoliv na daném hostitelském proteinu, jsou potom také pod pozitivní selekcí jako klasická místa vazby ligandu. Byly u TLR dráhy (eventuálně přímo u TLR receptorů) popsány případy cílené degradace způsobené proteiny virů či jiných patogenů?

Závěr:

Rozsah i formální stránku hodnotím i přes výše zmíněné připomínky jako výborné. Dosažené vědecké poznatky jsou významné a publikované v dobrých mezinárodních časopisech. Mohu potvrdit že předložená práce prokazuje způsobilost Hany Velové k požadavkům kladeným na vypracování doktorské disertační práce. Proto doporučuji aby práce byla přijata jako základ pro řízení o udělení vědecké hodnosti PhD.

MUDr. Daniel Elleder, Ph.D.
Ústav molekulární genetiky AVČR
Václavská 1083
14220 Praha
e-mail: elleder@img.cas.cz
tel.: 296443145