

## Oponentský posudek disertační práce

Autor: Mgr. Hana Velová

Název práce: Adaptive evolution of Toll-like receptors in birds

Instituce: Univerzita Karlova v Praze

Obor: Studijní program zoologie (P1502), katedra zoologie

Školitel: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Oponent: prom. biol. Karel Novák, Cs.C.

Datum: 20. 8. 2020

Předložená práce na získání titulu Ph.D. vypracovaná Mgr. Hanou Velovou v rámci doktorského studia je jednoznačně v kategorii výborných prací v oblasti molekulární populační genetiky živočichů.

Samotná disertační práce se skládá z obsáhlého výtahu z publikovaných článků uchazeče, který dovoluje zorientovat se v tématu, v metodických přístupech a v hlavních výsledcích. Detaily jednotlivých etap práce jsou potom přiblíženy v přiložených šesti článcích s autorstvím uchazeče. Články byly publikovány v časopisech s přiděleným impaktním faktorem. Ve všech případech se jedná o významná periodika s průměrnou hodnotou impaktního faktoru 5,727. Ve dvou článcích je H. Velová prvním autorem, čímž jsou splněna kritéria oborové rady pro studijní program zoologie pro publikační aktivitu uchazečů o udělení doktorského titulu.

Je pozoruhodné, že prakticky každá z přiložených prací přinesla originální výsledky, které ovlivnily znalosti v celém oboru.

Zadané téma bylo v době zahájení studia vysoce aktuální. V souladu se zdůvodněním výběru uchazečem lze uvést, že i když jsou geny pro Toll-like receptory vrozeného imunitního systému u ptáků zřejmě klíčové pro adaptace k infekčním tlakům na populační úrovni, jejich diverzita a úloha nebyly v době zahájení studia významně zpracované. Přitom právě u této třídy přistupuje snadnost šíření infekcí na velké vzdálenosti a expozice variabilnímu životnímu prostředí i přes několik klimatických pásem a kontinentů. Tím se vytváří situace, která se až na výjimky u savců nevyskytuje. Proto nelze mechanicky přenášet poznatky z modelových savců na třídu ptáků. V souladu s očekáváním byla nalezena daleko vyšší diverzita této třídy imunitních receptorů než u savců a řada evolučních přestaveb, které se podařilo uchazeči úspěšně popsat a publikovat.

Za první významný poznatek lze označit přehodnocení podstaty experimentálního zánětu vyvolávaného místně roztokem lektinu fytohemaglutininu u volně žijících ptáků jako prostředku pro získávání terénních dat o imunoreaktivitě (Vinkler et al., 2014). Na základě spektra exprimovaných cytokinů byla odpověď připsána primárnímu zánětu jako důsledku TLR signalizace, nikoliv následné proliferaci a koncentraci T buněk ze systému imunity adaptivní.

Tento poznatek samozřejmě mění interpretaci dat z terénních výzkumů a vede k souvislostem odpovědi s jinými receptory a přenašeči.

Dvojice dalších publikací je věnována diverzitě TLR4, -5 a -7, zastupujících různé skupiny rozeznávaných ligandů - bakteriální lipopolysacharid, flagellin a virovou RNA. V práci autorů Vinkler et al. (2015) byla zmapována diverzita *TLR4*, -5 a -7 u domácí populace koroptví pomocí cílené NGS. Vzhledem k trvalému úbytku populace koroptví, který je připisován infekčním faktorům, zejména mykoplazmě, má práce praktický přesah. Byla kypodivu zjištěna nízká diverzita ve sledovaných *TLR* genech, což může indikovat negativní selekci či efekt nízké početnosti populace („bottleneck effect“). Tento trend může sám o sobě vést ke snížení odolnosti na populační úrovni.

Zobecněním sledování diverzity TLR4, -5 a -7 u koroptve se zdá být práce autorů Vinkler et al. (2014) o diverzitě těchto tří reprezentativních receptorů v celé skupině *Galloanserae*. Jednalo se o čistě bioinformatický přístup založený na databázových sekvencích, které jsou všeobecně přístupné pro zpracování a interpretaci. Přesto se podařilo vytěžit řadu původních poznatků, zejména díky výběru predikčních postupů. Jmenovitě se jednalo o predikci povrchového elektrostatického potenciálu receptorových molekul a modelování vazby známých ligandů. Byly identifikovány aminokyseliny se znaky pozitivní selekce, evolučně proměnlivé aminokyselinové pozice a predikovány funkčně významné pozice v extracelulárních částech receptorů. Dokonalá grafická prezentace na molekulárních modelech umožnila soustředit veškeré informace pro čtenáře v mimořádně kompaktní podobě. Bylo možné učinit závěr o rychlejší evoluci anti-bakteriálních a extracelulárně exponovaných receptorů TLR4 a -5 v porovnání s antivirovým receptorem TLR7.

V další práci (Bainová et al., 2014) byla prokázána překvapivá pseudogenizace genu pro Toll-like receptor 5 v čeledi vrabcovitých. K inaktivaci *TLR5* došlo v průběhu evoluce nejméně u 18 druhů z testovaných 47, zřejmě v důsledku paralelních událostí. Predikce na základě genové sekvence byla elegantně potvrzena dodatečnou kontrolou exprese. I když se ztráta funkce TLR5 objevuje i u savců (např. Osvaldová A. et al., *Dev. Comp. Immunol.* 47:90, 2014 pro skot), v tomto rozsahu pozorována nebyla. Protože TLR5 je klíčový receptor pro rozeznávání bičíkatých bakterií, jeho absence u souboru ptačích druhů vyvolává řadu otázek, které ještě budou muset být zodpovězeny.

V následující práci (Králová et al., 2018) se uchazečka zaměřila na molekulární anatomii Toll-like receptoru 4 u skupiny vrabcovitých. V souboru 55 druhů byly hledány korelace mezi vypočítanou distribucí náboje na povrchu receptoru, konkrétně na povrchu oblasti vážící ligandy („ligand-binding region“, LBR) a ekologickými či fylogenetickými charakteristikami druhu. I když korelace s ekologickými ukazateli nebyla podchycena, fylogenetická souvislost byla prokázána a indikuje fylogenetická omezení pro adaptační procesy. Práce nicméně přináší řadu otázek a určitě by mohla podnítit další pokus o identifikaci faktorů korelujících se strukturou proteinu TLR4.

V poslední publikaci v dokumentované řadě (Velová et al., 2018) dochází k dalšímu zobecnění tématu. Byla provedena bioinformatická analýza dostupných genomických dat z 63 druhů zastupujících hlavní vývojové větve třídy ptáků. Byla rovněž ambiciózně studována duplikace *TLR1* v rámci obratlovců, což dovolilo určit dobu duplikaci *TLR1* před oddělením synapsidů od sauropsidů. Rovněž byla potvrzena dříve popsána pseudogenizace *TLR5* u třídy ptáků na genomické úrovni. Zcela dokumentována byla duplikace *TLR7*, která proběhla nezávisle hned v několika taxonech. Rozdíl ve funkcích kopií byl odvozen elegantní bioinformatickou metodou na základě lokalizace variabilních míst v proteinových doménách. U širokého výběru druhů byla potvrzena dřívější pozorování rychlejší evoluce u extracelulárně orientovaných TLR (třídoménových) na rozdíl od endosomálních (antivirových). Byl nalezen impozantní počet 306 pozitivně selektovaných míst, z nichž 105 se nacházelo ve funkčně relevantních oblastech TLR.

Práce vytváří východiska pro další studium evoluce *TLR* ve všech větvích třídy. Kromě pochopení evoluce je dalším výsledkem možnost nepřímo identifikovat aminokyselinové pozice, které se podílejí na koevoluci s patogeny. Zde bych rád připomenul i potenciální význam identifikace klíčových polymorfismů pro šlechtění na infekční rezistenci u hospodářských druhů.

Mgr. Velová se rovněž autorsky podílela na řadě dalších odborných publikací, které přímo nespádají do rámce doktorského studia, nicméně jsou uvedeny v celkovém přehledu odborné aktivity uchazeče.

Uchazeč v souvislosti s programem doktorského studia absolvoval pracovní pobyty na špičkových pracovištích oboru – Muzeu přírodní historie při Univerzitě v Oslo, genomické laboratoři EMBO v Heidelbergu, Roslin Institute při Edinburské univerzitě a Virginia Polytechnic Institute - a dokázal mezinárodní spolupráce realizovat a publikovat v sérii prací.

V metodách společného úvodu je uvedeno využití Bayesiánského algoritmu PHASE pro sdružování polymorfismů do haplotypů, nicméně v rámci článků již využití metody nebylo možné identifikovat. Celkově ale obdivuji velice příhodný výběr bioinformatických nástrojů a široký rozsah použitých programů. Je to bohužel v současné době rozhodující faktor pro získávání nových poznatků, který v řadě oblastí svou efektivitou zastínil základní laboratorní přístupy.

V práci lze samozřejmě nalézt drobné jazykové chyby, což vzhledem k rozsahu práce lze stěží zcela eliminovat. Větší chyby ve zpracování disertace, které by zásadním způsobem měnily vyznění, detekovat nelze.

Domnívám se, že zobecnění variability *TLR* u třídy ptáků nalezne uplatnění ve šlechtění na odolnost - jak uvádí autorka, dnes je jednoznačně potvrzený pouze poznatek z původní publikace Levequea et al. (2003) o vlivu varianty *TLR4* na výskyt salmonel u slepic. Identifikace kandidátních aminokyselin a polymorfismů v imunitních receptorech dovolí obejít či zpřesnit jinak pracné a nákladné hodnocení fenotypů v rozsáhlých populacích. Šlechtění na

infekční odolnost je v současné době považováno i za jeden z dostupných prostředků pro zvyšování welfare hospodářských zvířat.

V této souvislosti bych rád položil uchazeči upřesňující dotazy:

1. Jaká je podle názoru uchazeče možnost využití některých z funkčně významných aminokyselin či polymorfismů v ptačích *TLR* pro selekci u hospodářských druhů?

2. Jaké alternativní mechanismy by mohly nahradit úlohu *TLR5* po pseudogenizaci? Je možný experimentální či bioinformatický výzkum v tomto směru? Problém je zmíněn i v disertaci na str. 34 a 36. Trendy k pseudogenizaci *TLR5* se vyskytují i u savců, a i zde nastolují tutéž otázku. Pokud je smyslem pseudogenizace tlumení zánětlivé reakce, v jaké míře byl podobný jev pro bičíkaté bakterie u ptáků dokumentován?

Závěr:

Soubor výsledků uchazeče je ucelený a působivý a je určitě významným přínosem pro rozvoj imunogenetiky a populační genetiky ptáků. Předložená disertační práce jednoznačně prokazuje kvalifikaci uchazeče a způsobilost k tvůrčí vědecké práci ve smyslu zákona č. 111/1998 o vysokých školách. Proto doporučuji komisi pro obhajobu disertační práce, aby byl na základě obhajoby udělen uchazeči titul „doktor“ (ve zkratce Ph.D.).

V Praze – Uhřetěvesi dne 20.8.2020

.....  
prom. biol. Karel Novák, CSc.  
Oddělení genetiky a šlechtění,  
Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.  
Praha - Uhřetěves