

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Vlasty Čtrnácté
„Molecular and biochemical features of three enzymes that may serve as new drug targets in
Cryptosporidium parvum“

(Oborová rada fyziologie a patofyziologie člověka doktorského studia v biomedicině)

Práce i theze (autoreferát) byl předložen v angličtině a odpovídají klasickému členění požadovanému oborovou radou. Po 15 vstupních stranách disertační práce, obsahujících také abstrakt, poděkování spolupracovníkům (domácím i zahraničním) a školitelům (doc. MUDr. Marie Staňková, CSc. a RNDr. MUDr. František Stejskal, Ph.D., oba z UK v Praze – 1. LF), následuje seznam zkratek a seznam kapitol disertace s uvedením příslušných stránek textu i příloh. Vlastní disertace je přehledně sepsána na 67 stranách s teoretickým úvodem, definováním cílů disertace a výčtem použitých metod s odkazem do příložených tří prací in extenso publikovaných v letech 2003-2007, které jsou předmětem disertace. Práce byly publikovány v mezinárodních mikrobiologických časopisech (úhrn impakt faktorů 5,4), u dvou z nich je autorka na prvním místě. Výsledky a diskuse jsou rozděleny do příslušných tří oddílů, protože metodicky a obsahově spolu přímo nesouvisí a jsou spojeny vlastně pouze zaměřením na stejný zkoumaný organismus. Také závěry odpovídají svými třemi oddíly připojeným publikovaným pracím. Pak následuje výčet citované literatury (až do roku 2008) a reprinty prací, které tvoří podklad disertace. Nakonec autorka připojila svoje curriculum vitae s uvedením výzkumných grantů, jejichž byla hlavní řešitelkou nebo spoluřešitelkou (1 + 5) a seznam svých publikovaných experimentálních prací (celkem 7, včetně výše uvedených), vesměs v impaktovaných časopisech. O pečlivosti autorky svědčí také to, že na závěr disertace připojila i Errata, obsahující dodatečné citace literatury (5). Abstrakta publikovaná ve sbornících z domácích i mezinárodních sjezdů v letech 2002-2007 (celkem 17) uvádí autorka v autoreferátu (Summary of Ph.D. Thesis), který odpovídá požadovanému členění, má 27 stran a vedle anglického textu obsahuje také jednostránkový abstrakt v češtině na začátku autoreferátu a výčet publikací na konci, specifikovaný na ty, které tvoří podklad disertace, a publikace ostatní. Formální úroveň práce i autoreferátu je na vynikající úrovni, text je téměř bezchybný a angličtina dokonalá.

Zkoumaným objektem disertační práce je jednobuněčný, anaerobní, obligatorní a vnitrobuněčný parazit (anaerobní protist) *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) s dosud nedořešeným přesným taxonomickým zařazením a velmi chudou enzymovou výbavou, který si opatřuje energii za anaerobních podmínek pouze z glykolýzy. Zajímavá je však přítomnost reliktních mitochondrií u tohoto eukaryonta. Nepochybné je jeho zařazení do kmene *Apicomplexa*. Může infikovat hospodářská zvířata i člověka. *C. parvum* se vyskytuje typicky v Evropě, *C. hominis* převažuje na jiných kontinentech. Člověk se však může infikovat také od zvířat kryptosporidii specializovanými pro různé živočišné druhy. U zdravých jedinců vyvolá parazit někdy akutní průjem, avšak u jedinců s oslabenou imunitou, např. u nemocných infikovaných HIV (syndrom získané imunodeficiency – AIDS), je častou příčinou úmrtí z profuzních průjmů, dehydratace a sekundární infekce. Vzhledem k chudé metabolické výbavě tohoto obligatorního parazita existuje jen velmi omezený rozsah možností efektivního zásahu cytostatiky, anthelmintiky, antibiotiky, chemoterapeutiky a desinfekčními prostředky, takže dosud neexistuje účinná, cílená, specifická terapie a prevence, a proto je **volba tématu** a snaha blíže objasnit metabolické zvláštnosti tohoto parazita vysoce aktuální. *C. parvum* se může reprodukovat asexuálně i sexuálně uvnitř enterocytu hostitelské buňky téhož jedince. Infekce je zahájena internalizací sporozoitů, uvolněných v lumen tenkého střeva z požitých zralých sporulujících tlustostěnných oocyst, do enterocytů. Tento proces je zahájen interakcí sporozoitů s kartáčovým lemem enterocytů. Vedle infekce z požití vody, potravy atd. existuje i cyklus autoinfekce, kdy tenkostěnné oocysty uvolňují sporozoity

uvnitř gastrointestinálního traktu téhož hostitele. Molekulárně genetická analýza tohoto parazita vedla k rozluštění jeho jaderného genomu v r. 2004 (Abrahamsen et al.)

Název práce implikuje, že pojednává o **třech enzymech** u *C. parvum*, které by mohly být kandidáty specifického zásahu pro nová léčiva. V abstraktech na str. 1 a 2 thezí (autoreferátu) se dokonce mluví o třech nepostradatelných (essential) enzymech. Tyto formulace jsou poněkud zavádějící, protože u dvou z kandidátních enzymů, tj. pyruvát:NADP⁺-oxidoreduktasy (PNO) a Fe-hydrogenasy, resp. produktu odpovídajícího expresi tzv. *NARF-like* genu, autorka enzymovou aktivitu ve sporozoitech nedokázala, a nejasná je i funkce těchto nalezených genů, takže lze stěží mluvit o jejich nepostradatelnosti. Může jít o evoluční relikty.

Produkt **PNO genu** se zdál vhodným kandidátem pro sledování možného specifického farmakologického ovlivnění, protože uvedený gen představuje raritní fúzi dvou domén, N-terminální pyruvát:ferredoxinoxidoreduktasové domény PFO (exprimující Fe-S protein) a C-terminální NADPH-cytochrom P450 reduktasové domény CPR (exprimující flavodoprotein). Tato raritní fúze byla dosud nalezena pouze u fakultativně anaerobního fotosyntezujícího protista *Euglena gracilis* (*E. gracilis*) a dále právě také u anaerobního protista *C. parvum*. U *E. gracilis* má exprimovaný enzym funkci dekarboxylace pyruvátu na acetyl-CoA za anaerobních podmínek a je lokalizován v mitochondriích stejně jako pyruvátdehydrogenasa EC 1.2.4.1 (PDH), kterou známe jako klasický enzym aerobní (oxidační) dekarboxylace aerobních eukaryontů včetně člověka. Vzhledem k přítomnosti reliktních mitochondrií u anaeroba *C. parvum* si však autorka právem položila otázku subcelulární lokalizace exprimovaného proteinu.

Volba ***NARF-like* genu** byla vyvolána zřejmě předpokladem možné fylogenetické příbuznosti s geny pro [Fe]-hydrogenasy charakteristické pro hydrogenosomy, typické organely některých anaerobních protistů. Do skupiny anaerobních organismů *C. parvum* také patří.

Třetím enzymem byla zvolena **S-adenosylhomocysteinhydrolasa** EC 3.3.1.1 (SAHH), což je ubikviterní enzym metabolismu siřných aminokyselin, zejména methioninu, který štěpí hydrolyticky S-adenosyl-L-homocystein na L-homocystein a adenosin. U tohoto enzymu by každý terapeutický zásah ovšem znamenal i možný zásah do metabolismu hostitele, nelze však vyloučit strukturní odlišnosti od enzymu lidského. Proto autorka připravila se spolupracovníky rekombinantní enzym *C. parvum* klonováním odpovídajícího genu v *E. coli* a testovala na něm inhibiční účinek alifatických adenosinových strukturních analogů, které jí poskytl prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. V experimentech dosud nepublikovaných, které zařadila na konec práce, testovala také uvedené analogy jako inhibitory růstu *C. parvum* in vitro na lidských kultivovaných buňkách HCT-8 infikovaných parazitem.

Použité **metody** tvoří širokou paletu současných moderních technik mikrobiologických, molekulárně genetických, technik proteinové chemie, enzymologie a mikroskopie. Práce udivuje svojí metodickou šíří a náročností na laboratorní a technické vybavení, k čemuž jistě přispěla i účast zahraničních pracovišť na řešení předložené disertace, zejména v USA, na nichž autorka měla možnost pracovat jako stipendistka Fogarty International Center, a to zejména ve Wadsworth Center v Albany, N.Y., jehož 2 pracovníci jsou také spoluautory předložených publikací, a na Texas A&M University. Z předložené disertace není patrné, které postupy autorka využívala na domácím a které na zahraničním pracovišti, a lze si jen přát, aby získané poznatky v náročných metodách mohla využít v co nejširší míře na svých současných pracovištích na 1. LF UK a v AV ČR.

Za **nové poznatky** vyplývající z disertace možno označit zejména tyto:

- 1) PNO u *C. parvum* je cytosolový protein, nikoli mitochondriální jako u *E. gracilis*,

není lokalizován v reliktních mitochondriích, byl však lokalizován také v krystaloidním tělísku, což bylo dokázáno konfokální mikroskopickou imunolokalizací a transmisní elektronovou mikroskopií (TEM) pomocí protilátek značených koloidním zlatem.

2) Ve spolupráci s dalšími spolupracovníky vedenými Dr. Františkem Stejskalem byla určena nukleotidová sekvence klonovaného *NARF*-like genu u *C. parvum* a srovnávací fylogenetickou analýzou zjištěno, že předpokládaný exprimovaný protein má větší podobnost s *NARF*-like geny aerobních protistů a vyšších eukaryontních organismů než s [Fe]-hydrogenasami anaerobních protistů a bakterií.

3) Klonovaný a exprimovaný genový fragment SAHH *C. parvum* se liší podstatně od homologní SAHH savců i protistů v tom, že obsahuje inserci 49 aminokyselin typickou pro rostliny. Rekombinantní enzym byl purifikován a zjištěno, že jde o tetramer podobě jako u SAHH jiných organismů. Byly stanoveny jeho kinetické charakteristiky a dokázána inhibiční účinnost 3 alifatických adenosinových strukturních analogů získaných od prof. Holého, a to jak u izolovaného rekombinantního enzymu, tak *in vitro* inhibicí růstu *C. parvum* v kultuře infikovaných lidských buněk HCT-8. Jako vhodní kandidáti pro další vývoj cílené chemoterapie kryptosporidiosis se ukázaly zejména (*S*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin a (*R*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin.

K uvedenému disertaci bych si dovolil několik **poznámek**:

- 1) Značná část práce je věnována metabolismu a enzymům *C. parvum*. Práce však obsahuje jen jedno metabolické schéma přeměny S-adenosylmethioninu na str. 55 bez příslušných chemických struktur hlavních reprezentantů, neobsahuje ani jednu úplnou rovnici klíčových enzymových reakcí a ani jeden chemický vzorec, a to ani u testovaných inhibitorů. U vybraných enzymů nebyl proveden ani jeden pokus o klasifikaci podle IUB přesto, že např. název S-adenosylhomocysteinhydrolasa je dvojnásobný a může znamenat enzym EC 3.3.1.1, o který v této práci jde, ale také enzym EC 3.2.2.9, který hydrolyzou uvolňuje ze stejného substrátu nikoli adenosin, nýbrž adenin. Jde tedy o jakousi biochemii bez chemie, což klade na čtenáře velké nároky na představivost.
- 2) Ke str. 2 disertace. První, kdo upozornili na příbuznost Cryptosporidia spíše se třídou Gregarina než Coccidia byli v r. 1999 Carreno a spol. v Parasitol. Res. 85, 899-904.
- 3) Práce obsahuje některé terminologické nepřesnosti. Tetramerní struktura enzymu SAHH není proteinovou strukturou terciární, jak je nesprávně uvedeno v disertaci na str. 68 a v autoreferátu na str. 14, nýbrž strukturou kvarterní, jak je správně uvedeno v publikaci na str. 108. V seznamu zkratk na str. VIII chybí zkratka ORF (open reading frame) uváděná na str. 49 disertace. Na str. 25 dole spermin není triamin. Na str. 24 se mluví se mluví o transportu nukleových kyselin od hostitele k parazitu, autorka měla zřejmě na mysli purinové a pyrimidinové báze. Na str. 22 uprostřed je v závorce uvedena *Escherichia coli*, správně ovšem *Escherichia* a závorka patří logicky o řádku zpět za „facultatively anaerobic eubacteria“. Na str. 61 dole se mluví o poměru (ratio) hodnot C_T , avšak rovnice v závorce vyjadřuje rozdíl. Na str. 10 nahoře : Anglie je součástí Evropy. Na str. 11 autoreferátu : správně discussion, nikoli discussion (v práci správně). Na str. XIII disertace se 2x vyskytuje nesprávně pruvate místo pyruvate. Na str. 113 uprostřed: The Fund (nikoli Fond) a Innovations (nikoli Inovations). Jinak znovu zdůrazňuji, že věcných a pravopisných chyb je minimálně a angličtina je velmi pečlivá.

Autorce bych rád položil několik **otázek**:

- 1) Autorce se nepodařilo stanovit enzymovou aktivitu PNO ve sporozoitech *C. parvum*, přestože je příslušný protein u tohoto organismu exprimován. Je to způsobeno tím, že jeho malé množství ve sporozoitech je pod úrovní detekce a že by bylo možno dosáhnout lepších výsledků účinným kultivačním systémem tohoto parazita *in vitro*, jak autorka naznačuje na str. 41 disertace? Jinou možností by mohlo být, že podmínkou působení

enzymu je membránová lokalizace a že tomuto proteinu chybí vodící sekvence pro tuto lokalizaci např. v reliktních mitochondriích.


- 2) Protože enzymová výbava tohoto obligatorního parazita je velmi chudá, nebylo by vhodnější zaměřit se ve snaze o nalezení účinné terapie na proces interakce sporozoitu s membránovými glykoproteiny a glykolipidy kartáčového lemu enterocytu ?
- 3) Autorka měla během svých četných zahraničních stáží příležitost seznámit se s řadou moderních, často i ekonomicky náročných metod a technik. Které z nich by nemohla v současnosti uplatnit na domácích pracovištích a bylo by je vhodné přednostně zavést až už na 1. LF nebo v Biotechnologickém ústavu AV ČR ?
- 4) Nakonec se vnučuje od samého počátku otázka, proč autorka zvolila ke své obhajobě právě oborovou radu fyziologie a patofyziologie člověka ? Patofyziologii kryptosporidiosis jsou v práci věnovány pouze dvě stránky teoretického úvodu (str. 15 a 16). Práce vznikala na parazitologických pracovištích, školitelé jsou infekcionista a parazitolog a práce, o které se disertace opírá, byly publikovány v mikrobiologických časopisech.

Závěr:

Předložená disertace svým obsahem, zpracováním a značnou metodickou náročností zasahuje do oborů parazitologie, molekulární genetiky, biochemie a mikroskopie. Přesahuje zdaleka požadované nároky kladené na doktorské disertační práce, přináší četné nové poznatky a ukázala, že si autorka použité moderní metody a postupy osvojila a že je schopna je dále rozvíjet. Disertační práce tedy prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci, a proto navrhuji, aby jí byl po úspěšné obhajobě udělen titul

doktor (ve zkratce **Ph.D.** za jménem).

Praha, 27. srpna 2008.


Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.
Ústav lékařské biochemie UK –1.LF