



Oponent: ing. Jan Kopečný, Dr.Sc.

OPONENTSKÝ POSUDEK

Na téze k doktorské disertační práci

Recognition of Microbial Molecular Patterns in Earthworms

Mgr. Františka Škanty

Evoluce imunitního systému se odvíjí od přirozené imunity, která chrání nižší organismy před možnými patogeny, ale současně umožňuje rozlišit vlastní struktury od cizích. Pro studium přirozené imunity jsou nejvhodnější nižší bezobratlé organismy, které ještě nemají rozvinutou imunitu adaptivní, která tudíž nemůže působení přirozené imunity nepřekrývat. Tímto způsobem je možné detailně popsat signální dráhy reakcí této imunity a využít je pro terapii imunologických onemocnění nebo pro preklinickou selekci léčiv. Význam má i popis možností biologické kontroly nad škůdci, tak i možnosti zdokonalovat chovy komerčně využívaných bezobratlých. Nejčastěji se jako model používají octomilka, bourec morušový, šváb americký, zavíječ voskový, potemník moučný, martináč a ruměnice pospolná.

Vzhledem k veliké rozmanitosti taxonů bezobratlých jsou velké rozdíly v tělních bariérách, imunitních reakcích, využití kyslíkových metabolitů i zastoupení a aktivitách antibakteriálních proteinů. Důležité jsou i rozpoznávací možnosti založené na rozlišení vzorů (PRR). V rámci jejich specifity jsou detekovány patogeny (PAMP) i jiné mikroby (MAMPs), a mohou sloužit i jako opsoniny pro fagocytózu, nebo aktivovat serinové proteasy. Zajímavé jsou z těchto hledisek maloštětinatí červi. Ti mají septovaný trup v coelomech, do kterých částečně prostupují střevní mikroby. Z imunologického hlediska proto představují zajímavý objekt intenzivnějšího studia.

Výsledky předložené disertace práce jsou založeny na kompilaci výsledků 8 publikovaných článků. Ve dvou pracích je předkladatel prvním autorem.

Vypracovaná literární rešerše je složena z 5 následujících částí: Ekologii žížal, interakce s mikroorganismy, buněčné a humorální obranné mechanismy a buněčná regulace železa v těle žížal.

Cíle práce jsou konkrétně stanoveny a to na vliv prostředí na 5 detailně definovaných oblastí, které pokrývají přiložené publikace.

Výsledky byly získány na základě širokého spektra biochemických, imunologických, histologických, mikrobiologických i molekulárně genetických metod, které dokazují široké metodické zkušenosti předkladatele.

Experimentální část disertace zahrnuje získané výsledky doktoranda, které jsou strukturovány podle vyšších publikací, na kterých se autor podílel. Vyzdvihl bych tyto nové výsledky:

Pro celou disertaci bylo podstatné zavedení jednoduchého a jednoznačného určení *E. andrei* a *E. fetida* a to na základě sekvencí mitochondriální cytochrom c oxidasy a vyvinutí specifických PCR primerů. Bez něj by nebylo možné spolehlivé vyhodnocení následných pokusů. To se týká např. úrovně exprese coelomového cytolytického faktoru, lysozymu, proteinas i produkce fetidinu

a lyseninů jedinci obou druhů po změně živného substrátu. Zajímavé je, že počet kopií jednotlivých genů u obou druhů se výrazně liší.

Významný byl i popis odezvy PRR receptorů na detekci G+, G- bakterie a kvasinek u jedinců *E. andrei*, které vedlo k nárůstu produkce coelomového cytolytického faktoru a lysozymu ve střevu. Současně byly zvýšeny aktivity některých hydrolytických enzymů (proteinas, laminarasy a glukosaminidasy). Nebyly indukovány aktivity endochitinas, chitobiosidas a cellobiosidas, což vedle glukosaminidas reprezentuje hlavní enzymy podílející se na hydrolýze stěny kvasinek.

Spuštění imunitní odpovědi na přídavek G+, G- bakterie a kvasinek v kultuře *E. andrei* bylo sledováno pomocí reversní transkripce a pomocí *in situ* hybridizace. To umožnilo popsat dynamiku pasáže testovaných mikroorganismů a produkce a tkáňovou lokalizaci CCF, lysozymu, fetidinů/lyseninů v coelomocytech a střevě.

Významný je popis struktury, exprese a specifity i fylogenetického zařazení střevního TLR u *E. andrei*. Svou strukturou je EaTLR nejvíce podobný TLR prvoústých a druhoústých a je aktivován kulturou (G+) *B. subtilis*. Detailní popis receptoru přispěl k nejvyšší citovanosti uvedené publikace. Podobně byly letos přesně určeny vlastnosti homologu LBP/BPI (Lipopolysaccharide-Binding Protein/Bacterial Permeability Increasing protein) „Pattern Recognition“ receptoru, který se aktivuje bakteriálními lipopolysacharidy a byl u kroužkovců popsán vůbec poprvé. Exprimuje se především v coelomocytech a seminálních vajíčkách.

Proteiny vázající železo jsou klíčové v homeostázi železa a podílejí se na vrozených akutních imunitních reakcích bezobratlých. U *E. andrei* byla sestavena sekvence genu pro ferritin včetně lokalizace sekvence „Iron-Responsive Elementu“ (IRE). Ferridin byl následně fylogeneticky zařazen a izolován. Bylo prokázáno, že jeho exprese je indukována v coelomocytech jak G+ bakteriemi, tak pomaleji v G- bakteriemi. Rovněž byla prokázána i jeho akonitasová aktivita. Později byl popsán i cytosolický „Iron Regulatory Protein“, který se váže na IRE a může tak vytvářet kompletní IRE/IRP systém udržující buněčnou homeostázu železa.

Žížaly jsou dlouhodobě používány jako indikátor znečištění prostředí. Autor sledoval reakci těchto zvířat na přítomnost vysokých dávek dibenzo-p-dioxinu a dibenzofuranu. Zajímavým poznatkem jsou téměř 3x zvýšené počty bakterií a to jak anaerobních, tak především aerobních v kontaminovaných půdách. Na tento fakt reagovaly žížaly zvýšenou produkcí CCF. Předpokládá se, že uvedené polutanty způsobují především oxidační stres a významně zvýšily hladinu calreticulinu a HSP70. CAT a SOD nebyly výrazně zvýšeny. Půdní mikrobiom byl bohužel analyzován na základě složení mastných kyselin fosfolipidů, což umožňuje rozlišení aerobů a anaerobů, ale nikoliv funkčních skupin bakterií. Práce dokumentuje i histologické poškození střeva testovaných máloštětinatců.

Připomínky

- | | |
|---------|---|
| Str. 2 | Zkratky jsou většinou v abecedním pořadí, jen část je připsaná na konci. Výsledek není proto úplně přehledný. |
| Str. 51 | Seznam literatury obsahuje okolo 230 citací pečlivě zpracovaných ale seřazených podle české abecedy. |

Dotazy:

1. Bylo provedeno nebo probíhá vedle mitochondriálního i sekvenování genomu *Eisenia fetida* nebo *andrei*?
2. Jsou známy ligandy G+ bakterií, které by mohly aktivovat popsany EaTLR receptor?
3. Do budoucna by bylo vhodné detailnější zmapování mikrobiot obou druhů žížal. Plánujete sekvenování mikrobiot žížal? Dřívější práce většinou odkazovaly na malý selekční tlak trávicího traktu na složení střevního mikrobiomu. Recentní publikace ukazují na možnou selekci „komenzální“ mikroflóry u druhů *E. andrei*,

- E. foetida* a *Perionyx exkavatus* (Aira a kol., 2015; Singh a kol., 2015).
4. Čím se lišila kontaminovaná půda od kontrolní v ekotoxikologické studii? Byly při měření přidávány polutanty, nebo byla použita přímo půda od ENVISAN-GEM a.s.?

Závěrečné hodnocení:

V předložené práci předkladatel prokázal schopnost pracovat s odbornou literaturou, dokládá experimentální erudici, schopnost získané výsledky dobře vyhodnotit a především je výborně uplatnit. Veškeré publikace autora jsou, jak již bylo uvedeno na vysoké úrovni odborné, ale byly i publikované ve velmi dobrých časopisech. Z celkového počtu 10 publikací jich bylo 8 v časopisech z prvního kvartilu a jen dva ve třetím. Celkem jejich celkový impakt je 31,343. Práce již byly 46x citovány a autor má Hi 4, což jsou na doktoranda vynikající výsledky. Na základě toho mohu konstatovat, že autor disertace výrazně přispěl k poznání vrozené imunity bezobratlých. Jeho práci hodnotím jako výbornou, a splňující všechny požadované náležitosti na téze pro doktorskou disertační práci.

Ing. Jan Kopečný, DrSc.,

V Praze, 8. září 2016