

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Martina Kašného „Peptidázy motolic“ (Peptidases of trematodes)

Vypracoval RNDr. Petr Kopáček, Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice

Předložená dizertační práce je rozčleněna do dvou hlavních částí - první tvoří rozsáhlý literární přehled o problematice peptidáz motolic, druhá část je soubor čtyř publikovaných prací, z nichž u jedné je Martin Kašný prvním autorem, na ostatních třech se autorsky podílel. Práce je napsaná anglicky, podle mého soudu, na výborné jazykové a stylistické úrovni. Na první prolistování určitě zaujme příkladným formálním zpracováním a jsem rád, že si tuto dizertaci mohou ponechat nejen kvůli jejímu obsahu ale i jako vzor formální pečlivosti pro mé studenty.

Zmíněný literární přehled je včetně odkazů napsán na 100 stranách a opírá se o více než 300 citací. Je vtipně rozdělen do dvou období rozdělených rokem 1996, kdy byla založena peptidázová databáze MEROPS. Musím autora pochválit za vynikající spolupráci s touto databází a důsledné dodržování současné doporučené nomenklatury proteolytických enzymů. Velice se mi líbily i četné vysvětlivky pod čarou, které užitečně doplňovaly informace podané v hlavním textu, a přitom nenarušovaly jeho plynulost.

Martin Kašný podává výčet studovaných peptidáz rozdělených podle jejich příslušnosti do jednotlivých hlavních tříd. Rychlou orientaci usnadňuje uvedením jednotlivých enzymů v přehledných tabulkách spolu se základními údaji o jejich původu, základních molekulárních charakteristikách, poznámkách o jejich funkci a samozřejmě odkazy na příslušné literární databázové zdroje.

Dominantním tématem serinových peptidáz je cercáriová elastáza jako hlavní hydrolytický enzym umožňující průnik cercárií kůží svých hostitelů. Tato elastáza byla podrobně charakterizovaná u *Schistosoma mansoni*, a pak nalezena u *S. haematobium* a snad ještě u *Schistosomatium douthitti*. Naopak zřejmě nehraje žádnou roli v penetraci cercárií u příbuzné *S. japonicum* nebo u ptačích motolic *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati* studovanými v této laboratoři. Odtud tedy vyplývá otázka - Jaká je hlavní penetrační peptidáza cercárií ptačích motolic?, na kterou se snaží týmy Petra Horáka a Libora Mikeše odpovědět i v této dizertační práci.

Cysteinové peptidázy motolic jsou studovány zejména jako trávicí enzymy, které mají veliký potenciál pro cílený výzkum chemoterapeutik nebo účinných vakcín pro léčení a prevenci schistosomiáz. Velikou zásluhu na současné úrovni jejich poznání má guru této problematiky James (Jim) McKerrow a jeho laboratoř v San Francisku. Je skvělé, že tam současnosti velmi úspěšně působí zdejší odchovanec Jan Dvořák a věřím, že Martin Kašný by mohl být jeho důstojným následovníkem.

Literární část dizertace Martina Kašného má svou hodnotu zejména jako podrobný přehled o tom, co bylo v dané problematice uděláno, ale přece jen jsem trochu postrádal jakousi kapitolu, ze které by jasněji vyplývaly hlavní otázky a trendy v tomto výzkumu. **Zajímalo by mě proto, jestli Martin uvažuje o publikování tohoto přehledu jako review a pokud ano, v jakém rozsahu a formě.**

K této části bych měl několik doplňujících otázek:

1. Na stránce 53 zmiňujete souvislost glykosylace cysteinových peptidáz s jejich intracelulárním „traffickingem“. Mohl byste to blíže vysvětlit popřípadě doplnit o některé konkrétní výsledky?

2. Na stránce 54 zmiňujete několik odkazů o uplatnění RNA interference u schistosom. Zajímaly by mě podrobnější údaje o aplikovaných technikách RNAi a dosažených výsledcích.
3. Motolice se musejí nějak umět vypořádat s nadbytkem toxického železa/hemu ze ztráveného hemoglobinu. Co je rámcově známo o metabolismu železa a hemu u těchto parazitů?
4. Probíhá trávení krve ve střevě motolic extracelulárně v lumen nebo intracelulárně v lysosomech buněk střevního epitelu? Je vůbec tato otázka experimentálně řešitelná?
5. Je něco známo o mikroenvironmentálních podmínkách v místě průniku cercárie do hostitele (např. pH?). Je to vůbec experimentálně, např. histologicky přístupné?

K experimentální části dizertační práce mám následující komentáře a otázky.

V **článku 1** byly testovány experimentální podmínky k získání sekretu z penetračních žláz *T. regenti* a *T. szidati* a orientačně hledána hlavní proteolytická aktivita v těchto sekretech. Elektroforetická analýza ukázala, že „sekretom“ cercárií je proteínově poměrně bohatý a málo se lišil v závislosti na látce použité pro stimulaci sekrece. Dot blot analýza naznačila, že hlavní proteolytická aktivita je inhibovatelná EDTA. Tento výrazný efekt byl autory označen za těžko vysvětlitelný artefakt. Tomu nerozumím. **Proč nebyla dále studována a charakterizována pomocí specifických inhibitorů možná metaloproteázová aktivita v těchto sekretech?** Namísto toho se autoři snažili prokázat, že v sekretu je přítomna aktivita cysteinové proteázy typu cathepsinu B, která se mi podle uvedených dat jevila jako minoritní. Prosím o vysvětlení.

Článek 2 je hlavním dílem Martina Kašného a proto si zaslouží větší pozornost. V této se autoři zaměřili na srovnání aktivit cysteinových peptidáz v extraktech cercárií z *T. regenti* a *S. mansoni*. Prokázali, že u obou motolic je v tomto materiálu výrazná aktivita cysteinových peptidáz zejména cathepsinu B a že cercárie *T. regenti* nemá oproti *S. mansoni* serinovou elastázu. Autoři se dále pokusili pomocí gelové a ionexové chromatografie odpovídající cysteinové peptidázy izolovat. V obohacené aktivní frakci však byl cathepsin B jako minoritní proteinová složka vedle proteinu, který se nepodařilo pomocí *de novo* sekvence hmotovou spektrometrií identifikovat.

K této práci mám otázku: **Proč byl jako výchozí materiál použit cercáriový extrakt namísto cercáriového sekretu, jehož získání jste popsali v předchozí práci?**

Na mnoho dalších otázek jsem našel odpověď v práci Jana Dvořáka a spol. „Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae“ publikované letos v Biochemie. **Proto prosím, abyste vaše výsledky při obhajobě interpretoval v kontextu této nové práce.**

Článek 3. V žádném případě nechci snižovat množství práce v této publikaci obsažené. Přesto mi však připadá, že zde byl publikován velice předběžný výsledek, který pouze prokazuje, že využití degenerovaných primerů pro identifikaci genů parazita z cDNA knihovny připravené z infikované tkáně hostitele není vhodný. Pokud bych byl recenzentem této práce, tak bych rozhodně trval na využití substrakčních knihoven připravených z infikovaných a neinfikovaných tkání. **Byl nějakým způsobem určen poměr cDNA patřících šnekovi a motolici? Lze tady mluvit o kontaminaci hostitelskou cDNA, nebylo by spíš namístě mluvit o kontaminaci cDNA parazita?**

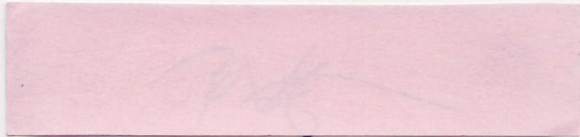
2

Článek 4, jehož je Martin Kašný spoluautorem se tematicky odlišuje od předchozích, protože se zaměřuje na identifikaci specifických antigenů pro diferenciální imunodiagnostiku jaterních motolic *Fascioloides magna* a *Fasciola hepatica* u koz. Práce prokázala, že pomocí ELISA nelze tyto infekce rozlišit. Rozdělení antigenů připravených z metacerkárií těchto motolic pomocí jedno- a dvou-rozměrné elektroforézy a jejich detekce imunoblotingem naznačila, že by se spektrum antigenů u obou druhů mohlo lišit. Podle mého názoru je velkým nedostatkem této práce fakt, že byly použity smíchaná séra z testovaných koz. Nemáme tedy žádné údaje, zda identifikované spoty a proužky je možno detekovat reprodukovatelně. Zcela upřímně jsem měl pocit, že čtu práci publikovanou před dvaceti lety. K této práci mám jedinou otázku – **Pokračuje nějakým způsobem směrem k potvrzení a identifikaci vytipovaných antigenů?**

První část dizertační práce Martina Kašného svědčí o jeho značném teoretickém rozhledu a talentu pro psaní odborné literatury. Přes určité rozpaky nad obsahovou kvalitou posledních dvou publikací jsem přesvědčen, že Martin Kašný prokázal zejména ve článku, jehož je prvním autorem, značnou experimentální erudici a potenciál pro jeho další vědecký rozvoj.

Předložená dizertační práce jistě splňuje kritéria požadované Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy na udělení titulu PhD. a proto ji doporučuji k obhajobě před příslušnou komisí.

V Českých Budějovicích, 25.února 2008



Petr Kopáček