

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Jaroslava Lieskovská, CSc.
Habilitační práce	Vliv klíštěcích slin na signalizaci v patogenem aktivovaných dendritických buňkách
Oponent	Mgr. Jan Weber, CSc.
Pracoviště oponenta, instituce	Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR

Předkládaná habilitační práce představuje dlouholetý výzkum uchazečky na atraktivním tématu odhalení mechanismu vlivu slin klíštěte na buněčnou signalizaci dendritických buněk během přenosu patogenů rodu *Borelie* a viru klíštěvé encefalitidy. Práce zahrnuje celkem sedm prací (6 původních a 1 přehledový článek), úvod, shrnutí každé práce a kapitoly, která diskutuje význam a budoucnost výzkumu klíštěcích slin. Habilitační práce je rozdělena do dvou na sebe navazujících částí. V první části se uchazečka zabývala především obecně imunomodulací dendritických buněk klíštěcími slinami a ve druhé části zkoumala přímo vliv určitých složek klíštěcích slin, hlavně cystatinů a serpinů na signalizaci dendritických buněk. Výzkum uchazečky poskytl řadu nových poznatků, mj. zjištění, že klíštěcí sliny inhibují TLR2 signalizaci a interferonovou signalizaci, aktivují Akt dráhu a tím podporují replikaci TBEV. Dále bylo zjištěno, že klíštěcí sialostatiny interferují s IFN a TLR2, TLR7, a TLR9 signalizací a klíštěcí serpin IRS-2 inhibuje produkci IL-6 a tím ovlivňuje vývoj Th17 lymfocytů, což finálně ovlivňuje adaptivní imunitní reakci během boreliové infekce. Příložené články byly publikovány v relevantních, hlavně specializovaných žurnálech jako je *Parasite Immunology*, *Parasite&Vectors* a *Infection&Immunity*. Habilitační práce je napsána čtivou a přehlednou formou s minimem překlepů. Obsahuje seznam zkratk a 153 referencí.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

Otázka 1. Zmiňujete se, že v slinách je více než 500 různých proteinů a peptidů. Dochází u infikovaných klíšťat k nabohacení určitých proteinů např. cystatinů či serpinů? Je rozdíl, jestli klíště přenáší jednoho či mnoho patogenů?

Otázka 2. Je nějaká výrazná imunitní odpověď na patogeny v klíšťatech? Má tato odpověď nějaký efekt na přenos na dalšího hostitele?

Otázka 3. Infikuje TBEV u člověka všechny typy dendritických buněk? Jedná se o produktivní infekci? Existuje nějaký model lidských dendritických buněk, na kterém by šly ověřovat výsledky z myších dendritických buněk?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Jaroslavy Lieskovské, CSc. „Vliv klíštěcích slin na signalizaci v patogenem aktivovaných dendritických buňkách“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Praze dne 29.3.2022

...



! podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Jaroslava Lieskovská, CSc.
Habilitační práce	Vliv klíštěcích slin na signalizaci v patogenem aktivovaných dendritických buňkách
Oponent	RNDr. Jiří Hejnar, CSc.
Pracoviště oponenta, instituce	Ústav molekulární genetiky AVČR

S potěšením a zájmem jsem prostudoval habilitační spis Mgr. Jaroslavy Lieskovské, CSc. která se uchází o docenturu na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Vědecké směřování a jednotlivé výzkumné projekty Dr. Lieskovské jsem registroval jen příležitostně a vzhled do její problematiky získávám teprve v posledních letech, kdy se naše laboratoř na Ústavu molekulární genetiky v Praze začala dostávat do oblasti přirozené protivirové imunity. Nyní se mi dostal do rukou přehledný souhrn nejdůležitějších výsledků, který rekapituluje a dává do souvislostí výsledky habilitantky zveřejněné v letech 2012 až 2015.

Habilitační spis tvoří kompaktní soubor šesti původních sdělení a jednoho přehledového článku, které byly publikovány v časopisech specializovaných na parazitologii, virologii, a imunologii. Kromě anotací jednotlivých sdělení a přiložených článků obsahuje habilitační spis podrobný úvod do problematiky a shrnující diskusi. Bibliografie je přiměřeně obsáhlá a dobře pokrývá popisovanou oblast. Celkově je habilitační spis koncizní a nabízí rychlou orientaci v úzkém oboru slinami asistované transmise (SAT) patogenů přenášených členovci.

První část habilitačního spisu specifikuje a kvantifikuje fenomén SAT na úrovni signálních drah vycházejících od aktivovaných Toll-like receptorů (TLR) a interferonu v modelovém systému myších dendritických buněk infikovaných spirochetami *Borrelia afzelii*. Byly pozorovány inhibice interferonové, TLR2 a PKA signalizace a naopak aktivace antiinflamatorního působení IL-10. Ve stejném systému pak byl popsán antiapoptotický vliv aktivované kinázy PI3 a Akt, který pozitivně ovlivňuje titr TBEV v dendritických buňkách. Ve druhé části habilitačního spisu jsou poté rozebrány dílčí vlivy vybraných komponent klíštěcích slin. Cystatiny (sialostatin L a L2) oslabují interferonovou a TLR-7,9 signalizaci zatímco serpin IRS-2 inhibuje signální dráhu IL-6/STAT3 a snižuje tak imunitní reakci zprostředkovanou lymfocyty Th17.

Z poměrně krátké diskuze jsem ocenil zejména ty části, které zvažují komplikované možnosti koevoluce hostitelů, patogenů a jejich vektorů. Je zřejmé, že spirocheti a TBEV jsou adaptivně selektovány na faktory, kterými parazitující vektor navozuje toleranci hostitele. U TBEV zatím není zcela jasné, jak transmise přispívají mnohdy protichůdně působící mechanismy (migrace nebo recruitment monocytů, makrofágů, dendritických buněk aj.) s vlivem na replikaci nebo diseminaci viru. Inspirativní je rovněž srovnání sáčích strategií klíšťat a komárů (pool feeders vs capillary feeders) a implikace pro

přizpůsobení virů přenášených komáry. V závěru diskuze jsou shrnuty výhledy možných aplikací pro vakcinaci, prevenci a terapii onemocnění přenášených krevsajícím hmyzem.

K obsahové stránce habilitačního spisu nemám žádné vážnější připomínky (kromě nepatrných nepřesností v obecné části nevidím jedinou slabinu, kterou bych měl kriticky uvádět) a celkově mohu konstatovat, že se jedná o práci překračující obvykle kladené nároky. Představený soubor prací rovněž splňuje publikační kritéria pro získání docentury a během posledních let získal zřetelehodný citační ohlas. Je škoda, že nezachycuje recentní výzkum habilitantky, kde bych očekával posun směrem ke koordinační roli ve výzkumném týmu (byť většina prací představená v habilitačním spisu byla Mgr. Lieskovskou korespondována), což by doložilo její vývoj směrem k vědecké samostatnosti a vedení vlastních výzkumných projektů.

V souhrnu mohu vřele doporučit Mgr. Jaroslavu Lieskovskou k obhajobě habilitační práce, proslovení habilitační přednášky a udělení docentury na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.


Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

K diskusi habilitačního spisu mám několik obecných a doplňujících dotazů. i. Metodicky je soubor předložených prací založen na *ex vivo* aktivaci dendritických buněk derivovaných z myší sleziny. Zajímalo by mě, nakolik se obdobný výzkum posouvá k *in vivo* studiím na myších modelech geneticky modifikovaných v příslušných signálních drahách a zda se tímto způsobem daří reprodukovat závěry získané přístupem *ex vivo*. ii. Jsou data o účincích faktorů ze slin přenosná mezi jednotlivými druhy klíšťat? Lze např. předpokládat, že ortologní faktory z *Ixodes ricinus* budou fungovat stejně jako sialostatiny L a L2 popsané z *I. scapularis*? Jinými slovy, mohou být kýžené vakcíny blokuující přenos patogenů univerzální pro různé vektory? iii. Nakolik je pro výslednou infekci hostitele podstatná role senzorů RIG-1 a MDA-5? Jsou vzájemně zastupitelné? Existují studie na myších modelech postrádajících tyto faktory z rodiny RLR?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Jaroslavy Lieskovské, CSc. „Vliv klíštěcích slin na signalizaci v patogenem aktivovaných dendritických buňkách“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Praze dne 8.3. 2022



podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Jaroslava Lieskovská, CSc.
Habilitační práce	Vliv klíštěcích slin na signalizaci v patogenem aktivovaných dendritických buňkách
Oponent	Doc.RNDr. Jitka Forstová CSc
Pracoviště oponenta, instituce	Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta ...

Habilitační práce Dr. Jaroslavy Lieskovské, vypracována na Přírodovědecké fakultě Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích, shrnuje výsledky 7 studií publikovaných v letech 2012-2018. Sedm publikací zahrnutých v práci (6 původních prací a jedno review publikované v časopisech s IF pohybujícím se od 2 do 3,9) představují jednotný celek, zaměřený, jak napovídá název, na modulaci imunitního systému hostitele slinami klíštěat přenášejících buď bakterie *Borrelia burgdorferi*, (v Evropě rozšířený druh *B. afzelii*), nebo Virus klíštěvé encefalitidy (TBEV). Experimenty byly prováděny in vitro, na myších dendritických buňkách izolovaných z kostní dřeně nebo sleziny. Další hlavní metody používané v experimentech jsou western blot analýzy, ELISA testy nebo FACS analýzy pro detekce aktivovaných komponent signálních drah, změn v produkci cytokinů, či pro detekci interferonem indukovaných proteinů

V předložené práci je stručný literární přehled, výstižně shrnující poznatky jednak o klíštěatech a patogenech jimi přenášených, jednak o dendritických buňkách a receptorech rozpoznávajících patogeny i o signalizačních drahách jimi indukovaných. Přehled dále obsahuje informace o vlivu klíštěcích slin na signalisační dráhy vedoucí k produkci interferonu a dalších cytokinů.

Následují publikace rozdělené na dvě části, první část (3 původní články a review) se zabývá vlivem slin na vybrané signální dráhy, produkci interferonu nebo replikaci patogenu (*Borrelia* nebo TBEV, druhá část (3 původní články) se zabývá účinky proteinů izolovaných ze slin (sialostatiny L a L2 a serpin IRS-2). Každou publikaci uvádí autorka krátkým shrnujícím textem.

V závěru práce je, kromě shrnutí, užitečná kapitola s titulkem „Význam, úskalí a perspektivy výzkumu klíštěcích slin“.

Práce přináší řadu poznatků o modulaci odpovědi vrozené imunity klíštěcími slinami a jejich některými komponentami v dendritických buňkách aktivovaných patogenem. Je pečlivě a kultivovaně sepsána. Text je doprovázen užitečnými obrázky a schémata.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

1. Dráha vedoucí od fosfatidyl inositol 3 kinázy/ serine/threonine kinázy (Akt) reguluje řadu buněčných procesů včetně aktivace buněčné proliferace a potlačení apoptózy ale také se uplatňuje v indukci protivirových odpovědí. Výsledkem práce Lieskova et al 2018 je zjištění, že sliny klíštěte zvyšují replikaci TBEV v myeloidních dendritických buňkách aktivací signální dráhy P13K/Akt. Ve slezinných DC bylo naopak ukázáno, že replikace viru nebyla slinami klíštěte ovlivněna.
 - i) Jak se dá vysvětlit tento rozdíl? Některé argumenty (např. možnost ovlivnění tvorbou exosomů) autorka uvádí), ale ví se již něco o možném mechanismu aktivace PI3K/Akt dráhy slinami klíštěte?

Řada virů s DNA genomem i RNA genomem (včetně některých flavivirů) potřebuje a je schopna aktivovat tuto dráhu. Na druhé straně, např. virus Zika kóduje proteiny, které snižují signalizaci z Akt (Kirsh et al 2020).

ii) Jak do P13K/Akt dráhy zasahuje sám virus klíšťové encefalitidy a pokud je to známo, jakým mechanismem? A jak se viry aktivující PI3K/ Akt dráhu vyrovnávají s pozitivní funkcí této dráhy v indukcii protivirotických odpovědí vrozené imunity?

2. Přes mnohá úsilí se zatím nepodařilo připravit nebo akceptovat vakcínu, proti onemocnění Lymskou boreliózou.

V literatuře se od doby, kdy jste publikovala práce zahrnuté v habilitačním spisu objevilo několik pokusů vývoje vakcíny, a to i na Budějovickém pracovišti, ze kterého vzešly novější práce, které ukazují překvapivě, že sliny klíštěte nemají vliv na infektivitu *Borrelia afzelii* při transmissi infikovaných nymf klíšťat *Ixodes ricinus* na myš a navrhuji zaměřit se na střevo klíštěte (Pospíšilová et al. 2019; Mahmood et al 2021)). Další se zabývala protekčními účinky kandidátní vakcíny založené na jednom proteinu vnější bakteriální membrány (BB0405; Klouwens et al 2021)

Na druhé straně, slibná kandidátní vakcína vyvinutá v Yale university na bázi mRNA vakcíny ukryté v lipidické nanočástici, exprimující koktejl 19 vybraných proteinů ze slin *Ixodes scapularis* zabránila transmissi *Borrelia burgdorferi* v morčatech.

i) Jaký je váš názor na cestu k úspěšnému vývoji vakcíny? Co je největším problémem na cestě k vakcíně proti Lymské borelióze?

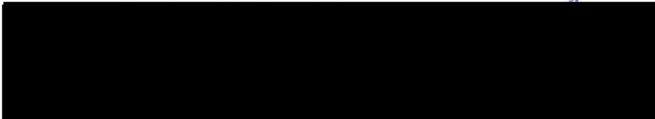
ii) Jak to dopadlo s kandidátní vakcínou VLA15 (vyvíjenou firmami Valnea a Pfizer) cílenou na povrchový protein A (OspA) borélie?

iii) Do jaké míry lze aplikovat výsledky (proteinová složení slin získaných z *Borrelia burgdorferis* sensu stricto - druhu rozšířeném v USA na druh rozšířený v Evropě- *Borrelia afzelii* ?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Jaroslavy Lieskovské, CSc. „Vliv klíštěcích slin na signalizaci v patogenně aktivovaných dendritických buňkách“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Praze, dne. dubna 2022.


podpis oponenta