

## POSUDEK HABILITAČNÍ PRÁCE

Autor: RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

Název práce: **“*Studium aspartátových proteas patogenních kvasinek a retrovirů*”**

Obor: Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Habilitační práce RNDr. Olgy Heidingsfeld, CSc. se týká velmi aktuálního a důležitého tématu z hlediska lidského zdraví jakým studium funkce a struktury aspartátových proteas produkovaných retroviry a patogenními kvasinkami bezesporu je. Jako příklad studia retrovirových proteas bych vyzvedla přípravu proteasy HTLV pomocí chemické syntézy a její následnou aktivaci. Převážná většina prací zahrnutých v této habilitační práci je však věnována studiu aspartátových proteas rodu *Candida*. Vedle exprese intracelulárních vakuolárních proteas Arp1 a Cpy1 z *C. albicans* byla studována exprese, funkce a struktura sekretovaných aspartátových proteas (Sap), které představují velkou skupinu virulenních faktorů kvasinek rodu *Candida*. Sap proteiny jsou produkovány v různých množstvích v závislosti na růstových podmínkách produkujících buněk a mají mnoho funkcí. Kromě zajištění dostupné výživy pro produkující buňky z extracelulárního prostoru, usnadňují přichycení patogenních druhů k buňkám tkání hostitele a mohou také inaktivovat složky komplementu i antifungální peptidy produkované hostitelem. Rod *Candida* zahrnuje jak druhy nepatogenní, tak bohužel i ty, které jsou schopné morfogenetické přeměny z neškodného komensálního mikroorganismu v urputného patogena znepríjemňujícího, a velmi často i ohrožujícího život, zvláště u imunokompromitovaných jedinců. Studium sekretovaných proteas je tak vysoce aktuální i v dnešní době, kdy se počet imunokompromitovaných osob zvyšuje, mimo jiné i častějším způsobem léčby mnoha onemocnění transplantacemi orgánů. I když se výzkumem Sap proteas zabývají vědci v mnoha laboratořích po celém světě po více než 30 let, určitě ještě další roky budou potřeba pro objasnění všech rolí a funkcí, které tyto proteiny mají při infekci člověka retroviry i patogenními druhy kvasinek.

Dr. Heidingsfeld koncipovala svou habilitační práci jako soubor 29 prací publikovaných v letech 1991-2015, které rozdělila do 5 tematických bloků. Práce v celkovém rozsahu 314 stran je uvedena krátkým shrnujícím úvodem k celé práci, po kterém následují podrobnější komentáře k jednotlivým blokům publikací. V nich autorka uvádí svůj podíl na tvorbě jednotlivých publikací, který se pohybuje od 10 % u experimentálních prací do 100 % v případě přehledných článků. Čtenář v těchto komentářích rychle získá přehled o nejdůležitějších

poznacích v oblasti, které se daný blok publikací týká. V každém komentáři je také obsažena pasáž ukazující na vztah řešené problematiky k lidskému zdraví. Po specializovaných komentářích následuje závěrečný souhrn výsledků, ve kterém autorka mimo jiné zdůrazňuje výsledky, které považuje za nejhodnotnější z hlediska současného výzkumu v dané oblasti. Za celkovým souhrnem následuje seznam citací použitých v komentářích. Vlastní rukopis v rozsahu přes 50 stránek je psán přehledně a logicky, vhodným jazykem a obecně je velmi dobře srozumitelný. Z formálního hlediska se v práci vyskytuje minimum pravopisných chyb a překlepů, které nijak nezhoršují kvalitu rukopisu a nesnižují jeho srozumitelnost a pochopitelnost pro čtenáře.

Ve zbylé, avšak většinové části práce, jsou pak představeny jednotlivé publikace v plném rozsahu, které jsou řazeny do tematických bloků, tedy ne chronologicky. Čtenář tak snadno získá dobrý přehled o získaných výsledcích autorky, jejich návaznosti a propojení. Kvalita výsledků práce předkladatelky a jejích spolupracovníků i vhodnost použitých metodik je z uvedených publikací zřejmá. Práce jsou publikovány v recenzovaných vědeckých časopisech, včetně těch s vyšším impaktním faktorem, a jako oponent k nim nemám žádné připomínky. Jak jsem již zmínila, téma předložené habilitační práce je aktuální, i když na něm autorka pracuje téměř čtvrtstoletí a první práce byla publikována již v roce 1991. Lze tak soudit také z citovanosti prací, kdy i práce staršího data jsou citované v současnosti. Nejcitovanější prací je pak práce z roku 2001 zabývající se studiem inhibitorů sekretovaných aspartátových proteas u čtyř druhů rodu *Candida* s 80 citacemi. Dobrý ohlas ve vědecké komunitě získala také práce popisující novou metodu testování izolátů rodu *Candida* na přítomnost sekretovaných proteas z roku 2003 s 30 citacemi. Na důležitost tematiky ukazují také vysoké ohlasy prací využívajících ke studiu proteas i jiné modelové organismy – např. *Arabidopsis* (rok publikace 2002, 79 citací) nebo opičí virus Mason-Pfizer (rok publikace 1998, 28 citací).

Z publikací zahrnutých v habilitační práci vyplývá, že během své vědecké kariéry Dr. Heidingsfeld pracovala s několika modelovými organismy, jako jsou retroviry, rostliny, bakterie i různé druhy kvasinek. Tato různorodost modelových organismů vyžadovala, aby autorka zvládla metody práce specifické pro jednotlivé hostitele zahrnující např. kultivace producentů kmenů. Autorka dále ovládla velké množství obecných technik od molekulárně genetických, včetně klonování genů a konstrukce expresních vektorů, po biochemické, zahrnující purifikaci různých proteas včetně jejich aktivace a testování enzymatické aktivity. Velmi důležitou součástí experimentálního přístupu autorky se také staly metody umožňující

strukturní charakterizaci studovaných molekul (krystalografie) a určení chemického složení obsahu vakuol živé buňky pomocí Ramanovy mikrospektroskopie.

Vedle vlastní experimentální práce Dr. Heidingsfeld prokázala také schopnost navrhovat a koordinovat celé studie, řídit studenty a spolupracovníky a připravovat výsledky k publikaci. Prokázala tak schopnost komplexní vědecké práce včetně sepisování souhrnných článků a předávání zkušeností mladší generaci mentorováním studentů v různých stupních vzdělání od bakalářského a magisterského stupně po doktorské studium.

Jelikož považuji předloženou habilitační práci za velmi kvalitní a autorka prokázala i vědecko-pedagogické schopnosti, vřele doporučuji tuto práci k obhajobě. Po úspěšné obhajobě a splnění všech ostatních náležitostí doporučuji udělit Dr. Heidingsfeld titul „docent“ v oboru Biochemie.

Pro diskusi při obhajobě habilitační práce mám následující dotazy:

1. Jaký heterologní systém autorka považuje za nejvhodnější pro produkci a purifikaci proteas a jiných hydrolas rodu *Candida* vzhledem k příslušnosti rodu do tzv. CTG klastru?
2. V jedné z prací zahrnutých v habilitační práci byla vyvinuta metoda diagnostiky kvasinkových klinických izolátů na základě sekrece proteas. Je tato metoda využívána v praxi?
3. Podobně jako je tomu u bakterií, vznikají také u patogenních kvasinek rodu *Candida* rezistence na používaná antimykotika. Jaké jsou přístupy k řešení tohoto významného problému, jak se týkají autorkou studovaných sekretovaných proteas a jaký je jejich potenciál v léčbě kandidóz?
4. Sekretované aspartátové proteasy jsou jedním z hlavních virulenčních faktorů v patogenezi kvasinek rodu *Candida*, nejsou však faktorem jediným. Může autorka komentovat úlohu dalších faktorů (např. fosfolipas) ovlivňujících infektivitu těchto kvasinek?

V Praze dne 11. 3. 2019

RNDr. Ivana Malcová, CSc.

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Praha