



# BIOLOGY CENTRE ASCR

## Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ22 0710 0000 0000 0552 7231 | SWIFT CODE – CNBACZPP | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | fax: +420 385 310 388 | www.paru.cas.cz | e-mail: par@paru.cas.cz

Jan Perner, Ph.D.

Laboratory of Molecular Biology of Ticks  
Institute of Parasitology, Biology Centre CAS  
Czech Academy of Sciences

### Předmět: Posudek PhD. práce

Předkládaná dizertační práce (autorka: Mgr. Zuzana Matoušková) se zabývá strukturně funkčním popisem klíčících proteinových inhibitorů řady proteolytických enzymů. Experimentální část této práce byla prováděna v laboratoři Dr. Michaela Mareše (ÚOCHB AVČR), tedy v přední laboratoři světového měřítka na tuto sub-disciplínu. Práce je založena na inhibitech několika typů [Omc2 (cystatin), IRS-2 (serpin) a IrThy (tyropin)], tedy i s několika molekulárními cíli, a nabízí tak poměrně široké spektrum mechanismů účinku. Nutno neopomenout, že práce nabízí i poměrně rozsáhlé časové okénko dokumentující vývoj poznání. Z dnešního úhlu pohledu se tak mohou jevit některé části publikovaných prací jako obsoletní, ale v té době představovaly opravdu „state-of-the-art“, tedy jakési vrcholy řemesla. Nicméně práce přináší značné množství originálních poznatků o molekulárních znalostech klíčících proteinů a navrhovaném mechanismu účinku interakce klíčičte s hostitelem u studovaných klíčících proteinových inhibitorů proteáz. Práce zahrnuje širokou škálu metod biochemie, molekulární biologie a biofyziky, s deklarovaným popisem, které části byly provedeny autorkou, a které byly spoluautorsky řešené.

Dizertační práce má standardní textové orámování, se smysluplným úvodem a stručným, leč logickým a funkčním závěrem. Jádro této práce tvoří čtyři publikace, ve kterých je kandidátka dvakrát spoluautorkou širšího kolektivu autorů a dvakrát je první autorkou vědecké práce výzkumného kolektivu publikovaného jednou v dobrém a jednou ve velmi dobrém mezinárodním časopise. Zatímco práce v Acta Crystallographica přidává jen jemně k strukturně funkčnímu poznání a je v podstatě plně technickou strukturní prací, práce v IJMS už maximálně naplňuje cíle a teze této DP. Tato práce tedy reprezentuje vstupenku autorky k PhD titulu. Proto mi dovolu, po první obecné otázce, se zastavit u této práce a soustředit se v otázkové části tohoto hodnocení na objevy prezentované v tomto článku.

1. DP je založená na přístupu charakterizace jedné molekuly, se všemi svými výhodami a nevýhodami. Výhodou jistě může být odhalení biotechnologického/biomedicínského potenciálu, nevýhoda může být, že ne nutně *in vitro* data budou platná v kontextu *in vivo*.

Otázka 1a: Jak by se měli/mohli dále rozpracovat některé z vámi studovaných proteinových proteázových inhibitorů tak, aby se molekuly mohly kvalifikovat na vyšší „technology-readiness level (TRL)“? Jaké jsou limity, jak je odstranit a kde vidíte potenciál pro zvýšení atraktivity pro aplikaci těchto molekul? (a nutně nemyslím, resp. vylučme prosím pro tuto



diskuzi, že mohou být protektivním antigenem pro vakcinační použití). Dá se strukturně predikovat vylepšení těchto proteinů nebo jejich částí za použití cílených nebo náhodných mutagenezí?

Otázka 1b: Jak jsem již naznačil, některé práce jsou starší. Mohla byste je, prosím, zasadit do současného stavu poznání, zejm. snadné dostupnosti -omics dat? Jsou všechny vaše studované inhibitory objeveny ve slinných proteomech? Mají nějakou zajímavou kinetiku exprese ve spojitosti s klíštěcím sáním (transkriptomická data)? Jsou homologní inhibitory v transkriptomech/genomech i volně žijících Acari v podobném nebo méně expandovaném zastoupení? Z některých prací se zdá (DOI: 10.1093/molbev/msj082, 10.1186/1471-2164-13-307), že „genová dávka“ pro proteázové inhibitory není nikterak expandovaná u klíšťat oproti volně žijícím bezobratlím (moucha, *Tetranychus*).

2. Práce charakterizující klíštěcí thyropin, publikovaná v IJMS deklaruje vysoký standard strukturně-funkční proteinové biochemie, kde Mgr. Z. Matoušková jasně demonstruje hloubku i šířku jejího vědeckého záběru, a to navíc na ne úplně triviálním molekulovém modelu (thyropin, jak autorka sama dokumentuje, může být sám substrátem i inhibítorem).

Otázka 2a: Figure 1 není úplně optimální. Panel B ukazuje, dominantní expresi *ir-thyr* zejména v nenasátých klíšťatech, ale tkáňové dělení je provedeno na polonásátých samicích, kde data ukazují na značnou expresi ve slinných žlázách. Tím se mohlo minout některé nejvíc abundantní místo exprese v nenasátých klíšťatech, případně indikující biologickou funkci. Děj rukopisu se pak tedy odehrává s očekáváním interakce klíštěcího inhibitoru a hostitelské proteázy skrze klíštěcí slinění. Aktivní a inhibiční assaye se ale provádějí většinou mírně pod neutrálním pH. Je nějaký předpoklad, že klíštěcí sání/slintání nějak moduluje pH v místě sání směrem dolů, aby se dostalo fyziologické relevance těchto dat, nebo se spíše přikláníte ke zpřísnění interpretace dat, a ku příkladu z Fig. 3A usoudit, že IrThy může být ucházejícím inhibítorem Cathepsinu K, ale nikoliv V, v podmínkách *in vivo* klíštěcího sání? Omlouvám se za neznalost, jaký se uvažuje zdroj vybraných cathepsinů, resp. jedná se o solubilní proteiny krevní plasmy (ví se koncentrace?) nebo spíše sekretované či degranulované produkty bílých krvinek (jakých)? Například my v proteomické analýze (DIA) myší plazmy vidíme celkem slušně Cathepsin S, Z, D, E, B, L. Cathepsin G a O pak jen po infekci *Trypanosoma brucei*. Je možné tedy, že klíštěcí sání atrahuje produkční buňky, nebo indikuje expresi orgánovou, pro Cathepsin V a K?

Otázka 2b: Modulace IrTyr inhibiční kapacity pomocí volných GAGs *in vitro* na vybrané proteázy je skutečně nová a zajímavá. Fig. 5 elegantně demonstruje i možný mód účinku přes elektrostatické interakce, který ale nuluje přidání 0.3M NaCl. Jestli jsem to správně pochopil, assay je provedena při 50mM NaCl. K dosažení fyziologické relevance tohoto objevu by bylo dobré znát data při 150mM NaCl. Jsou taková, nebo máte odhad, jak by vypadala?

Otázka 2c: GAGs se většinou assemblerují do složitějších struktur. Je možné/víte, jestli mají sliny klíšťat kapacitu degradovat jednotlivé komponenty extracelulární matrix?

Ještě mi dovoluňte zmínit, spíš pro poučení do budoucna, než jako seriózní výtka této práce, některé „kosmetické“ přehmaty:

- i) str. 10: Proti-klíštěcí vakcína v podstatě nikdy nepovede ke snížení populace vektora.
- ii) str. 26, italikou se píše jen rod a druh, vše „výše“ se píše standartním fontem, čili např Ixodidae a nikoliv *Ixodidae*.
- iii) Název DP mi přijde, že se odchyluje lehce od dosažených cílů. Nabral jsem dojem, z publikovaných prací, že se jedná spíše o popis klíštěcích inhibitorů s proteázami hostitele, spíš než klíštěte, jakkoli zřejmě budou hrát i roli v endogenní proteostáze.
- iv) str 32.... „sliny“ posilují infekčnost přenášených patogenů. To je poměrně z dnešního úhlu pohledu kontroverzní tvrzení. Bylo by vhodné odcitovat zdroj. Případně zvážit v kontextu: DOI: 10.1098/rsob.210244.
- v) str. 32/33(Tab1) Klíšťata nepřenáší nemoci, ale jejich původce (tedy patogeny).
- vi) str. 32 chybí zmínka o už existujících klíštěcích vakcínách (cílicích Bm86).

Předložená disertační práce představuje kvalitní a originální dílo, které významně přispívá k pochopení interakce klíštěte s hostitelem, zejména svojí opravdu velmi kvalitní prací publikovanou v IJMS. Práce položila první fundament k pokroku na využití studovaných molekul v oblasti biotechnologie/biomedicíny.

Závěrem, tato práce je strukturně i obsahově funkční a splňuje tak, co je mi známo, formální kritéria pro přidělení titulu PhD na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. V práci publikované v IJMS autorka Mgr. Zuzana Matoušková zřetelně demonstrovala kapacitu exekuce, prezentace a obhájení si výsledků během „peer-review“ procesu, své strukturně-funkční práce proteinové biochemie. Tím naplňuje i nepsaný požadavek o posunu v poznání, v tomto případě proteinové biochemie v oblasti molekulové interakce mezi parazitem a hostitelem.

Disertační práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 10.5.2024, Jan Perner PhD