

**Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Daniela Sojky „Multienzyme proteolytic digestion of host blood in the gut of the tick *Ixodes ricinus*“**

Předložená práce se skládá z 38 stran úvodního textu a 4 původních prací, z nichž jedna je ve formě manuskriptu a tři byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech. Dvě z prací se zabývají trávicími peptidázami klíštěte *Ixodes ricinus*, jedna cystatiny a jedna alfa-2-makroglobulinem klíšťáka *Ornithodoros moubata*. U prvních dvou je Mgr. Sojka prvním autorem.

V úvodním textu podává autor výstižný přehled známých faktů o trávení krve u klíšťat, přičemž se neomezuje pouze na literární přehled, ale text nanejvýš vhodně doplňuje některými vlastními dosud nepublikovanými údaji a pro kompletnost rovněž stručným přehledem publikovaných výsledků s odkazy na články, jež jsou součástí disertační práce. Uvádí zde i předběžné cenné, i když zatím v podstatě negativní, výsledky s blokováním produkce enzymů pomocí interferenční double strand RNA. Úvodní část proto působí velice uceleným dojmem a je velice čtivá, až na drobné výjimky psaná velice slušnou angličtinou (drobné překlepy, nepřesnosti a nejednotnosti v psaní – např. str. 7 je „we purpose“ místo „we propose“, str. 9 „than die“ místo „then die“, dále některé nepřesně uváděné názvy organismů – str. 12 „*Amblyoma*“ místo „*Amblyomma*“, str. 15 „*Hemonchus*“ místo „*Haemonchus*“, dále na str. 12 jsou buněčné inkluze nevhodně nazývány organelami, bylo by dobré sjednotit psaní „in vitro a in vivo“ normálním písmem či italikem a jako helmintolog si neodpustím „rýpnout“, že autor mezi patogeny přenášenými klíšťaty na str. 8 neuvedl právě helminty). Na str. 26 a 27 postrádám v textu odkazy na příložené papery.

Příložené původní publikace byly otištěny v časopisech s velice slušným impakt faktorem a rovněž publikaci ve stádiu manuskriptu považuji za velice zdařilou a předpokládám, že bude bez větších problémů přijata v kvalitním časopise. Faktické komentáře a otázky si ponechávám na konec posudku.

Autor ve své práci podává poměrně ucelený pohled na možný mechanismus trávení krve u klíštěte obecného a spolehlivě dokládá, že tento mechanismus je, co se týče enzymatické výbavy, obdobný trávení krve u schistosom (*S. mansoni*) a naprosto se liší od trávení krve u hematofágního hmyzu. Byly odhaleny klíčové enzymy, které byly sekvenčně a částečně i funkčně charakterizovány, většina z nich byla „vyrobena“ i jako rekombinantní proteiny. Jedná se o originální výsledky, jejichž význam je o to větší, že se nejedná pouze o „výsek“ znalostí, např. o popis jediného enzymu, jako tomu bylo u klíštěcích peptidáz doposud.

Na závěr konkrétní dotazy a připomínky:

- 1) Proč byla prováděna exprese rekombinantních enzymů, kromě IrAE, v *E. coli* a ne v *Pichia pastoris* ? Ačkoliv se tento systém neosvědčil při získání aktivního cathepsinu L u schistosom, v případě CB se jednalo naopak o vhodnější systém, jelikož *P.p.* folduje lépe (některé) rekombinantní eukaryotní proteiny...
- 2) Na obr. 7 v úvodním textu jsou na blotu některé nespecifické reakce – postrádám stripy s kontrolními neimunizovanými séry.
- 3) Proč nebyla funkce IrAE v trans-aktivaci cathepsinu testována v homologním systému *I. ricinus*, ale s CB *S. mansoni*, ačkoliv rekombinantní CB klíštěte je už v práci prezentován ? Je to pouze tím, že IrCB byl získán až v závěru práce ?
- 4) V manuskriptu bych doporučil uvést popis, citace a původ afinitních prób (značených ligandů) již v kapitole „Materiál a metodika“.
- 5) Obrázek 1A manuskriptu – v legendě uvést, co znamenají úsečky kolem hodnot v grafu (jakou vyjadřují statistickou funkci).
- 6) Strana 10 manuskriptu: odkaz na „Fig. 3“ patří jen k bodu „i“.
- 7) Obr. 4 manuskriptu – chápu správně, že při afinitním značení se „signál“ CB a CL bez použití specifických inhibitorů překrývá ?
- 8) Obr. 9 manuskriptu – nedomnívá se autor při bližším pohledu, že na rozdíl od tvrzení uvedeného v textu, je jistý, i když slabý, signál pro CD i v jiných tkáních než ve střevě (hlavně ovárium a Malpighické trubice) ?
- 9) Je správně anglicky množné číslo „helminthes“, anebo „helminths“ ?

Autor bezpochyby prokázal schopnost samostatné vědecké práce, stejně jako schopnost sepsat velice kvalitní odborný text. Disertační práce splňuje dle mého názoru všechny formální požadavky a po obhajobě ji doporučuji k přijetí jako součást řízení k udělení vědeckého titulu „Ph.D.“

V Praze dne 20. června 2007

RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.



# Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic

---

Jan Konvalinka PhD  
Proteases of Human Pathogens  
Flemingovo n. 2  
166 10 Praha 6  
Czech Republic

Telephone +420 220183 218  
fax +420 220 183 578  
e-mail konval@uochb.cas.cz

22.6. 2007

## **Oponentský posudek disertační práce Daniela Sojky “Multienzyme proteolytic digestion of host blood in the gut of the tick *Ixodes ricinus*”**

Mgr. Sojka předkládá disertační práci, vypracovanou na oddělení molekulární biologie a biochemie Jihočeské university a na Parasitologickém ústavu Jihočeského biologického centra AV ČR. Práce má 32 stran plus čtyři přílohy a je pojata jako shrnutí problematiky a dosažených výsledků s příloženými pracemi, které buď vyšly v odborných časopisech nebo v jednom případě byla práce zaslána. Kolega Sojka je prvním autorem dvou z těchto prací, a jeho podíl na dalších dvou je ze shrnutí celkem jasný.

Autor v těchto pracích charakterizuje proteolytické enzymy ze střevní stěny klíštěte. Používá dvou přístupů: jednak biochemického, nebo možná trochu módně řečeno chemicky-biologického, tj. charakterisace proteolytických aktivit extraktu střevní stěny specifickými substráty a inhibitory, jednak molekulárně biologického: identifikací cDNA kódujících ortology dobře charakterisovaných proteolytických enzymů ze *Schistosoma mansoni*, kterou autor (zřejmě správně) vybral jako použitelný model.

Za nejdůležitější práci z celého souboru považuji publikaci v *Int. J. Parasitol.* **37**, 713-724, 2007, popisující klonování a rekombinantní expresi legumainu z klíštěte. Jedná se o velmi zajímavý enzym, nedávno prozkoumaný u *S. mansoni*, který zřejmě hraje v proteolytické kaskádě převážně regulační úlohu tím, že aktivuje další cysteinové a serinové proteasy.

Disertant v předkládané práci prokazuje, že si velmi dobře osvojil značnou škálu experimentálních technik, od klonování cDNA, RT-PCR, práce s rekombinantní DNA, exprese a purifikace rekombinantních proteinů až po imunohistochemii a enzymovou

kinetiku a inhibiční studie. Současně potvrzuje schopnost racionálně experimenty analysovat a střizlivě zhodnotit jejich výsledky.

Rád bych také vyzdvihl, že se laboratoři disertanta podařilo získat ke spolupráci naprostou špičku oboru ze světa. Zejména seznam autorů práce č. 2 se čte jako *Who is who* v biochemii parazitů a přílehlých oborů: na kvalitě a jejím metodickém záběru práce je to ostatně znát.

V práci jsem našel jen velmi málo věcných nebo formálních nedostatků. Snad jen angličtina občas trošku „drhne“, zejména slovosled některých pasáží v Úvodu ztěžuje srozumitelnost. Práci také chybí seznam zkratk, který by ne-parazitologovi určitě pomohl.

Jako podklad pro diskusi bych disertantovi rád položil následující otázky:

1/ na str. 23 se trochu omluvně zmiňuje o tom, že je nucen pro jasnost používat pro označení orthologů cathepsinů zavádějící a dnes už málo funkční nomenklaturu. Úplně s jeho nespokojeností souhlasím. Jakou jinou nomenklaturu by pro tento typ enzymů navrhoval?

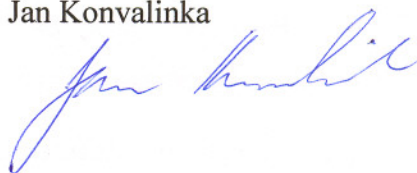
2/autor v závěru spekuluje o proteasových inhibitorech jako o možném terapeutiku proti klíštěti nebo klíštětem přenosným chorobám. Přitom však sám ukazuje, že proteolytický aparát klíštěte je značně redundantní. Jaký by tedy zvolil cíl terapeutického zákroku?

4/ Byly ve střevní stěně klíštěte nalezeny také metalopeptidasy?

5/ Do jakého časopisu (a s jakým výsledkem) zaslal autor práci č. 1?

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce je vynikající i podle mezinárodních měřítek, svrchovaně naplňuje požadavky příslušných zákonných ustanovení a plně ji proto doporučuji k obhajobě.

Jan Konvalinka



Review of the PhD. thesis "Multienzyme proteolytic digestion of host blood in the gut of the tick *Ixodes ricinus*" by MSc Daniel Sojka, University of South Bohemia, Faculty of Biology Sciences, Department of Molecular Biology and Biochemistry

(Reviewed by Sirlei Daffre, University of São Paulo, Biomedical Science Institute, Parasitology Department)

The PhD. thesis from MSc Daniel Sojka is based mainly on the biochemical and molecular characterization of five enzymes which belong to the gut protease network from the hard tick *Ixodes ricinus*. Interestingly, he shows that the digestion of host blood proteins in ticks is mediated by a protease network analogous to the intestinal network of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Certainly the results obtained in this thesis can be used in the near future for the control of *Ixodes ricinus*, which is an important vector of human and animal diseases in Europe as well as in the control of other ticks. The data about the digestive network from *Ixodes ricinus* are already partially published in the International Journal for Parasitology (**paper 2**) which has a good impact factor (3.346). In this paper, the authors characterize one of the gut proteases, the tick legumain (IrAE), which might be involved in the trans-activation of the tick cathepsin B, as well as in the digestion of the host hemoglobin. The identification of the other four proteases (IrCB, IrCL, IrCC, and IrCD) is shown in **paper 1**, which is already prepared for publication. Certainly it will be published in a good Journal, since these data are innovative, being a significant contribution to the limited knowledge on the biochemistry of blood digestion in ticks. Unquestionably Daniel Sojka had a fundamental participation in the elaboration of these two papers, since he is the first author of both. Besides his work in *Ixodes scapularis*, Daniel had an unique opportunity to work on other tick species, *Ornithodoros moubata*, which has a life cycle different from *I. ricinus*, implying in cyclic activities of feeding and oviposition. Two papers have been published already using *O. moubata*'s data based on protease inhibitors. One of them (**paper 3**, impact factor 2.752) is about two secreted cystatins which efficiently inhibit papain-like peptidases, including cathepsin B and C from *O. moubata*, suggesting that they are probably involved in the protease network regulation in the gut of this soft tick. **Paper 4** (impact factor 2.733) relates biochemistry and molecular data about  $\alpha_2$ -macroglobulin expressed in the hemocytes and salivary gland from *O. moubata*. This protease inhibitor may be involved in the immune response of ticks as well as in the modulation of the host immune response during tick blood-feeding. In these two last papers, Daniel appears as co-author, allowing him to explore other physiological aspects of ticks, including control of the digestion and the immune system. Moreover, as previously emphasized, he was able to work with two different tick species, which certainly gave him interesting ideas about the physiology, biochemistry and molecular biology of blood digestion, tick control and pathogen-transmission. Finally, I would like to point out that Daniel had the opportunity to work with several technical approaches which undoubtedly gave him the skills for the enzymatic, cellular, biochemical, and molecular studies, besides others.

Taken the Thesis format into consideration, I would like to point out that the introduction is concise but contains fundamental information to allow the readers to understand several aspects of invertebrate digestion. The complementary data reported in Results and Discussion (Item 3) let the readers have an excellent idea about the main points of the first two papers. The content of the third paper could be better explored in the Results and Discussion Section, since there is a straight connection between

protease inhibitors and proteases from the tick gut. Even the fourth paper could be more thoroughly discussed in Item 3, linking protease inhibitor with tick control.

After that, I have a couple of more general questions and also specific ones from each part of the Thesis:

1. Considering the different feeding strategies used by argasidae and ixodidae ticks, could you give positive and negative aspects of each one for pathogen transmission?
2. Bearing in mind the cycle life of pathogens transmitted by *Ixodes ricinus*, e.g. *Borrelia burgdorferi*, and encephalitis virus, could you speculate on how you could use the network of digestive proteases to control their transmission?
3. If the hemoglobin crystals have a function in the preservation of nutrient reserves, would you expect to have more of those crystals in soft ticks during a specific time of their life cycle? Could you observe this phenomenon comparing your data from *O. moubata* and *I. ricinus*?
4. Can you discuss the statement of Delcroix *et al.* (2006) about how the transition from cysteine/aspartic intestinal digestive proteases to serine proteases appears to have occurred in arthropods or mollusks?

#### Papers I and II

1. For most of digestive proteases studied, you have found just one single cDNA type. Did you expect that considering the methodology of the cDNA construction and also other functional aspects of these proteases?
2. Can you separate completely the lumen content from the gut epithelia during the preparation of the tick gut tissue extracts?
3. You have had a broad tissue expression of the IrCL gene (Paper I, fig 9). How can you explain that considering the specificity of this enzyme? Speculate for other protease genes.
4. Could you speculate about the role of IrCB on the processing of other enzymes? Or would it be more important for hemoglobin digestion?
5. Pedro de Oliveira and collaborators (Lara *et al.* 2005, Graça-Souza *et al.* 2006) believe that selective uptake of hemoglobin by digestive cells has evolved as a part of an adaptation against heme toxicity. Can you discuss about that?
6. I am not so convinced that IrAe is more phylogenetically related to vertebrate Aes than invertebrates Aes (Paper II, Fig 2). And you? How would be the phylogenetic tree using only mature enzymes?

#### Paper III.

1. What are residual bodies in the digestive cells from *O. moubata*? Are they present in *I. ricinus* digestive cells? Make a comparison between the gut of *O. moubata* and *I. ricinus*.

2. You have speculated that the reduction of cystatins mRNA levels after blood-sucking is for keeping the gut enzymes activities. Do you still believe that? Or could it be due other reasons?

3. You have used ferritin as housekeeping gene in several experiments. Considering the function of ferritin, do you believe that it is present at equal levels in different tissues? Why?

Paper IV.

1. Would be interesting to check if  $\alpha$ -macroglobulin binds to pathogens transmitted by ticks?

Suggestions/Corrections:

1. Determination of cleavage site for pro-IrAE or any other enzyme: You could do the C-terminal sequencing by combination of carboxypeptidase digestion and mass spectrometry using the mature enzyme.

2. Results/Discussion, page 29. The experiment of RNAi silencing in the paper of Aljamali et al. was done in the salivary gland and not in gut.

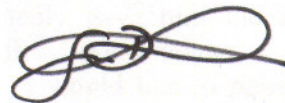
Final remarks:

I would like to thank Dr Petr Kopacek and Prof. Libor Grubhoffer for inviting me as opponent of this thesis. I have had a great opportunity to learn new things and think more about tick digestion. I also thank you for sharing your unpublished results. The approach for silencing protease genes, by RNAi, is certainly fruitful for the discovery of the role of gut enzymes. Congratulations for this wonderful work !!!

I do consider that the work developed by Daniel during his PhD project has an excellent scientific merit and the thesis was carefully written.

Therefore, I recommend accepting the thesis of MSc Daniel Sojka for his PhD. defense.

São Paulo, June 26<sup>th</sup>, 2007



Prof. Dr Sirlei Daffre