



ÚOCHB AV
IOCB PRAGUE CR

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Kvido Stříšovský, PhD

Senior Group Leader

EMBO Young Investigator Programme alumna

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

Academy of Sciences of the Czech Republic

Flemingovo n. 2, Praha 6, 160 00, Czech Republic

t: +420 220 183 468

m: +420 734 287 095

kvido.strisovsky@uochb.cas.cz

<https://strisovsky.group.uochb.cz/en>

Posudek oponenta k disertační práci Ing. Olgy Žbodákové „The role of ADAM17 and other metalloproteases in liver pathological processes“

Tato disertační práce se zabývá úlohou metalloproteas ADAM17, ADAM10 a MMP19 v patogenezi jaterní fibrosy na myších modelech. Téma je vysoce aktuální, neboť fibrotické patologie obecně představují rostoucí zdravotní riziko ve vyspělých zemích a možnosti léčby jsou dosud velmi omezené, což souvisí mimo jiné s nedostatečným porozuměním jejich molekulární podstatě. V tomto ohledu je práce na myších modelech adekvátní, ale také vysoce náročná. Téma je hodnotné a náročné také proto, že ADAM17 a ADAM10 jsou fyziologicky a pathobiologicky velmi významné molekuly, které jsou v centru pozornosti farmaceutického průmyslu již dlouhou dobu, ovšem bez větších úspěchů. Jelikož jsou funkce ADAM metalloproteas v různých biologických kontextech redundantní nebo dokonce i antagonistické, díky expresi jejich substrátů a rozdílné regulaci, je velmi náročné rozklíčovat mechanismy jejich biologických rolí v daném kontextu.

Práce je založena na čtyřech publikacích, které vyšly v renomovaných mezinárodních recenzovaných oborových časopisech, u jedné z nichž je Ing. Žbodáková sdílená první autorka, a na jednom manu skriptu, jehož je první a hlavní autorkou. Soubor těchto publikací dává vynikající základ pro ucelenou disertační práci a umožňuje použít zkrácenou formu disertace, kde jsou výsledky jen stručně sumarizovány a k práci jsou přiloženy originální publikace obsahující všechny podrobnosti, což je poměrně přehledné. Práce je psána anglicky a je členěna standardně na Abstrakt, Úvod, Cíle práce, Výsledky, Diskusi a Shrnutí. Úvod podává hezký a logicky členěný přehled problematiky jak zmíněných proteas, tak funkce a patologie jater i experimentálních modelů jaterní fibrosy. Ostatní části disertace jsou napsány velmi přehledně a jasně. Práce je uzavřena obsáhlým přehledem literatury. Úroveň angličtiny je poměrně dobrá a dostačující k jednoznačnému pochopení sdělení, s občasnými gramatickými chybami a překlepy, které bývá možné odstranit spell-checkerem nebo pozorným čtením. Např. na s. 15 je prodoměna ADAM proteas matoucím způsobem uvedena jako na C-koncová, přitom je na N-konci proteinu, dále jsou občasné chyby ve shodě tvaru slovesa a jména ke 3. osobě jednotného a množného čísla a související použití neurčitěho členu (ADAMs are expressed as a zymogens.., , Function of a cystein rich and EGF-like domains...), či občasné 'čechismy' ve slovosledu jako např. „In following section are mentioned the most important results...“ na s. 33., atd.

Celkově se jedná o velmi zdařilou disertační práci, ve které je patrný příběh a logika. Počáteční přístup k projektu byl založen na pozorování (Buryova et al., 2013), které naznačovalo, že jaterní ADAM17 může být významná pro rozvoj jaterní fibrosy. Autorka studii záhy logicky doplnila o ADAM10, jelikož je tento enzym rovněž exprimován v játrech (kromě mnoha jiných tkání) a zapojen v regulaci TNF a EGFR signalizace, dvou klíčových signálních drah pro rozvoj zánětu a hojení, jejichž dysregulace souvisí s fibrogenézí. Nakonec se autorka soustředila ještě na MMP19, která se uplatňuje při degradaci extracelulární matrix (což je rovněž významné při přestavbě matrix během fibrogeneze), je silně exprimována v játrech a v té době byla málo prostudovaná. Autorka zjistila, že jaterní deficiencie ADAM10 zvyšuje náchylnost k fibrose, zatímco jaterní deficiencie ADAM17 toto kompenzuje. Zjištění, že absence MMP19 je protektivní vůči jaterní fibrose je vědecky velmi hodnotné. Autorka ukázala složitost systému tím, že ADAM10 i ADAM17 se uplatňují jak v sekreci ligandů EGF receptoru, tak v sekreci TNF i shedding jeho receptoru TNFR I i cMet receptoru.

Otázky a komentáře

1. V úvodu mě překvapil deficit aktuálních informací o regulaci biogeneze a aktivity ADAM17. Od roku 2012 vyšlo již nejméně 15 prací ve špičkových časopisech z několika laboratoří (Freeman, Adrain, Blobel, Lang, Mak, Kelsell), které nade vsí pochybnost ukazují, že rhomboid pseudoproteasy iRhom1 a 2 (známé také jako RHBDP1 a 2) jsou klíčové pro trafficking ADAM17 z ER do Golgi a určují stabilitu, ovlivňují substrátovou specifitu a zajišťují rychlou aktivaci ADAM17 na plasma membráně a tím jsou klíčové pro TNF i EGFR signalizaci. Jelikož se v sekci 3.1.1 autorka rozsáhle zmiňuje o mechanismu aktivace ADAM17 např. i prostřednictvím PMA (s. 17) a fosfatidylserinu, považuji absenci zmínky o iRhomech kdekoliv v práci za smutné pochybení a nedostatek v pokrytí aktuální literatury.

2. S tím souvisí druhý komentář a související otázka. Nedávno bylo publikováno (Sundaram et al. *Sci Signal* 2019), že iRhom2 je protektivní vůči fibrose způsobené ligací žlučového. Jelikož je iRhom2 nutný pro aktivitu ADAM17, vypadá to, že i ADAM17 je protektivní vůči jaterní fibrose ve stejném modelu. Na první pohled je tento výsledek zcela opačný než v manuskriptu Zbodakova et al., kde je naopak jaterní deficit ADAM17 protektivní na pozadí deficitu ADAM10 a má jen minimální nebo žádný účinek sám o sobě (Results 5.4). Jsou výsledky zmíněných dvou prací vzájemně kompatibilní? Diskutujte možné příčiny pozorovaných rozdílů a jejich mechanistické odlišnosti.

3. Není výjimkou, že dva nebo více myších modelů deficientních v daném genu vykazují různé fenotypy. Hezkým příkladem z mně blízkého oboru jsou fenotypy iRhom deficientních myší z laboratoří M. Freemana (Cambridge/Oxford, UK) a Carla Blobela (Cornell, USA), jejichž odlišnost vyvolala nejistotu a diskuzi v oboru.

- Christova, Y., Adrain, C., Bambrough, P., Ibrahim, A., and Freeman, M. (2013). Mammalian iRhoms have distinct physiological functions including an essential role in TACE regulation. *EMBO Rep.* **14**, 884-890.
- Li, X., Maretzky, T., Weskamp, G., Monette, S., Qing, X., Issuree, P.D., Crawford, H.C., McIlwain, D.R., Mak, T.W., Salmon, J.E., and Blobel, C.P. (2015). iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 6080-6085.

Čerstvý článek z Jackson labs [Hosur, V., Low, B.E., Li, D., Stafford, G.A., Kohar, V., Shultz, L.D., and Wiles, M.V. (2020). Genes adapt to outsmart gene-targeting strategies in mutant mouse strains by skipping exons to reinitiate transcription and translation. *Genome Biol.* **21**, 168.] podrobil myši použité v těchto dvou studiích důkladné analýze a zjistil, že Blobelovy targetovací strategie vedly k alternativnímu splicingu a produkci pozměněného proteinu a jsou to vlastně pouze hypomorfi. Co je ale důležitější než vyřešení toho konkrétního případu je poukázání na obecnější riziko u myších mutantů vzniklých zejména editačními technologiemi (i.e. zanesení frameshiftu nebo stop-kodonů), na které tento článek poukazuje. Ve světle tohoto článku diskutujte Vámi použité strategie přípravy jaterně deficientních myší a rozveďte, jak bylo ověřováno, že Vámi použité mutantní kmeny byly skutečně deficientní v aktivitě daných enzymů a ne pouze hypomorfní.

4. V práci je zmíněno, že ursodeoxycholát (UDCA) inhibuje maturaci and PMA indukovanou aktivitu ADAM17. To je nápadně podobné deficienci iRhomu. Diskutujte prosím možnou mechanistickou podstatu účinku UDCA ve světle nejnovějších poznatků.

Závěrem konstatuji, že disertační práce splňuje formální požadavky definované oborovou radou, působí uceleným dojmem a uvedené výsledky splňují kritéria originální tvůrčí vědecké práce. Disertační práci tedy doporučuji k obhajobě a přeji uchazečce mnoho úspěchů v další výzkumné práci.

V Praze 19.8.2020

Kvido Stříšovský, PhD