

## Posudek na dizertační práci „Příprava a charakterizace myši s vyřazeným genem pro glutamátcarboxypeptidasu II“

**Předkladatelka: Mgr. Barbora Vorlová**

Školitel: RNDr. Pavel Šácha, Ph.D.

Předkládaná dizertační práce je založena na dvou rukopisech přijatých v renomovaných impaktovaných časopisech (*The Prostate* a *FEBS OpenBio*), kde v *The Prostate* je kandidátka prvním autorem. Barbora je rovněž první autorkou jedné souhrnné publikace (*Mol Biol Cell*) a spoluautorkou dvou dalších publikací zaměřených na studium racemasy serinu. Práce o celkovém rozsahu 174 stránek (včetně příloh) je psána v angličtině s klasickým členěním zahrnující přehledný úvod, metodiky, výsledkovou část, diskuzi, seznam citací a dva vložené rukopisy. Po formální stránce nemám k práci větší výhrady, pouze bych autorce do budoucna doporučil hojněji využívat určité/neurčité členy, kterých v práci postrádám relativně velký počet.

Stěžejním příspěvkem dizertace je příprava a charakterizace myši s vyřazeným genem pro glutamátcarboxypeptidasu II (GCPII) s využitím editace myšičího genomu pomocí TALENů. Vzhledem ke kontroverzním výsledkům několika předchozích publikovaných prací se jedná o vysoce aktuální téma a získané informace bezesporu jsou a budou přínosné pro širší vědeckou komunitu, jelikož GCPII je významným cílem pro *in vivo* diagnostiku a léčbu rakoviny prostaty. Výsledky práce jasně ukázaly, že KO myši jsou životaschopné, nemají reprodukční problémy a obecně nevykazují žádný výrazný fenotyp s výjimkou zvýšeného sklonu k obstrukci semenných váčků u starších jedinců.

Při přípravě a následné charakterizaci KO myši si Barbora osvojila široký rozsah experimentálních technik, zahrnující metody molekulární biologie (klonování, genotypizace, mutageneze), heterologní exprese v hmyzích a savčích expresních systémech, purifikační metody, biofyzikální a kinetickou charakterizaci rekombinantních proteinů a v neposlední řadě také metody fenotypizace a základy metabolomiky. Pevně věřím, že takto široké metodologické portfolio bude dobrým základem pro další kariéru předkladatelky ať už ve veřejném nebo privátním výzkumu.

Experimentální postupy, získaná data i jejich interpretace již prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech a tudíž by bylo zbytečné znovu detailně analyzovat data přijatá vědeckou komunitou. Rád bych nicméně kandidátce položil několik dotazů týkajících se obecně GCPII či jednotlivých experimentů:

1. Obrázek 21 ukazuje, že teplotní stabilita mutantu GCPII<sup>del3</sup> je ve srovnání s GCPII<sup>wt</sup> výrazně nižší. Rovněž enzymatická aktivita GCPII<sup>del3</sup> je, alepoň u membránově vázané verze, téměř nulová. Předpokládáte, že architektura aktivního místa GCPII zůstává zachována a absence

aktivita je způsobena pouze delecí glutamátu v aktivním místě nebo se spíše jedná o „komplexní“ zborcení trojrozměrné struktury GCPII? Bylo by možné s využitím termální stability určit, zda-li mutant GCPII<sup>del3</sup> interaguje s inhibitory GCPII?

2. V abstraktu zmiňujete, že „Pravděpodobný omezený vliv GCPII na funkci ledvin by mohl být užitečný pro vývoj protirakovinových léků cílených na GCPII“. Můžete toto tvrzení detailněji rozvést a uvést příklad(y), jak snížit nefrotoxicitu terapeutik cílených na GCPII?
3. Autorka využila k přípravě KO myši specifické nukleázy TALEN s poukazem na to, že tyto mohou být specifitější než v současnosti běžněji používané CRISPRy. Mohla byste stručně porovnat obecné výhody/nevýhody těchto dvou přístupů, včetně off-target specificity?
4. Připravené KO myši vykazují minimální fenotyp, což je bezesporu pozitivní zpráva pro využití GCPII jako molekulárního cíle léčebných postupů. Na druhou stranu KO myši zatím nepřinesly odpověď na otázku fyziologické funkce GCPII v ledvinách, slinných žlázách či nádorech. Mohla by autorka prezentovat svoji představu, jaké další experimentální přístupy by v budoucnu mohly být využity pro zjištění fyziologických funkcí GCPII?

Závěrem můžu konstatovat, že předkládaná dizertační práce splňuje všechny požadavky Oborové rady Biochemie a patobiochemie a proto ji doporučuji k obhajobě. Současně přeji Mgr. Barboře Vorlové hodně úspěchů v dalším profesním i osobním životě.

Ve Vestci, 18. říjen 2018

RNDr. Cyril Bařinka, PhD  
Laboratoř Strukturní Biologie  
Biotechnologický ústav AV ČR  
Průmyslová 595, Vestec, Česká republika  
telefon: +420-325-873-777  
e-mail: cyril.barinka@ibt.cas.cz  
<http://lsb.avcr.cz/>