



**Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Anežky Tiché
„Development of rhomboid protease inhibitors as tools for cell biology“**

Doktorská disertační práce Mgr. Anežky Tiché sestává z úvodního textu a příloh – separátů publikací z velmi kvalitních časopisů, na nichž se disertantka spoluautorsky podílela. Formálně je práce velmi dobře a pečlivě formálně presentovaná, je přehledná, psaná dobrou angličtinou, čtenáři napomáhá seznam použitých zkratk. Velmi užitečným prezentačním instrumentem jsou rovněž autorkou připravená rozšířená abstrakta, provázející jednotlivé práce v přílohách disertace.

Rhomboidy představují skupinu „molekulárně a funkčně“ méně obvyklou (ovšem velmi zajímavou) intramembránových proteas (a pseudoproteas), s postupně odkrývaným biologickým posláním a medicínským potenciálem. V případě enzymově aktivních členů této skupiny jejich struktura a uložení v membráně poněkud komplikují jejich metodické uchopení. Proto trvá potřeba vývoje nástrojů pro jejich další studium: vhodných substrátů (jejichž současné spektrum má mnoho limitů) a účinných specifických inhibitorů, pro případ biologických studií netoxických (které dosud de-facto dostupné nejsou vůbec).

Úvodní část práce skvěle popisuje skupinu rhomboidů, jejich nomenklaturu, vlastnosti, distribuci, lokalizaci, katalytický mechanismus. Tato state of the art část zahrnuje informace o studovaných molekulách, jejich (potenciálních) inhibitech, konceptech jejich možného vývoje a mapuje limity současných syntetických substrátů. Popis in vitro stanovení aktivit rhomboidů je provázen odkazy na strukturně-funkční vztahy substrátů a chystá východisko pro vlastní práci předkladatelky, směřující k racionálnímu designu a funkčnímu ověření substrátů a inhibitorů nových.

Užitý metodický arsenál plně odpovídá potřebám definovaným cíli práce. Spektrum metod je imponující a opírá se jak o vlastní zázemí pracoviště navrhovatelky, tak o živou spolupráci s dalšími klíčovými vědeckými skupinami, s nimiž má skupina školitele dlouhodobou a produktivní spolupráci (například řešení krystalových struktur, či některé syntetické přístupy a docking studie).

Výsledky práce jsou rozvinuty v publikacích provázejících disertaci. Za velmi impresivní považují i autorské týmy publikací, kde je disertantka prvním autorem a jejími spolupracovníky jsou renomovaní vědci „proteářské“ oblasti z několika států. Výsledky získané racionální analýzou strukturně-funkčních vztahů (v některých případech využívající SW predikce) generují fluorogenní

substráty vhodné pro high throughput screening a inhibitory (tři skupiny, včetně kandidátů per analogiam vhodných pro eventuální klinické využití), jejichž další charakterizace, počínaje molekulárními interakcemi mezi enzymem a substrátem až po in vivo analýzy jednoznačně prokazuje využitelnost nově vytvořených originálních molekul pro požadované aplikace ve studiu biologických vlastností rhomboidů, včetně jejich hydrolyticky neaktivních variant. Zároveň výsledky získané s novými precizně charakterizovanými substráty přispěly k dalšímu detailnímu poznání katalytických mechanismů rhomboidů.

Výsledky práce představují evidentní přínos pro oblast výzkumu rhomboidů, včetně přesahu do aplikací jak z hlediska rozšíření experimentálního instrumentaria, tak i jako příslib pro budoucí medicínskou chemii.

Práce jednoznačně naplnila všechny ve svém úvodu deklarované cíle, přinesla zásadní poznatky a rozšířila portfolio „proteánského výzkumu“ nejen o perfektně charakterizované, ale i nové patentově chráněné látky. Dokumentace spojená s disertací – odkaz na další kvalitní publikace nad rámec pěti přímo s projektem spojených paperů - zároveň prokazuje široké propojení práce petenta s dalšími projekty jeho domovského pracoviště.

Na základě zjevné závažnosti tématu a ZÁSADNÍHO přispění kandidáta k poznání v oboru s potěšením a bez výhrad DOPORUČUJI práci přijmout jako podklad pro udělení hodnosti PhD.

Pro diskusi předkládám následující otázky, poznamenané mou především biologickou a medicínskou orientací:

Petentka zmiňuje význam rhomboidů v patogenezi několika onemocnění (především malárie a neurodegenerace). Dokáže si představit systémovou inhibici rhomboidů jako klinicky využitelný koncept?

V práci je zmíněn, dosud spíše hypotetický, význam rhomboidů pro signalizaci cestou EGFR. Proč tuto signální cestu zmiňuje striktně v souvislosti s patogenezí kolorektálního karcinomu?



V Praze, 18.4.2019

Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc