



Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze

Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.
Hlavova 2030
127 43 Praha 2

Tel +420 220183 218

18.4. 2019

Oponentský posudek na práci

“Vývoj inhibitorů proteas z rodiny rhomboidů jako nástrojů pro studium jejich biologických funkcí”

(disertační práce)

Mgr. Anežka Tichá

Paní Mgr. Anežka Tichá předkládá disertační práci, vypracovanou na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR pod vedením Ing. Kvida Stříšovského, PhD. Práce je předkládána jako soubor 4 publikací opatřený velmi přehledně zpracovaným úvodem, stručným shrnutím použitých metodik, shrnutím výsledků jednotlivých publikací s jasně vyznačeným vlastním příspěvkem disertantky a závěrečnou diskusí. Přestože je tedy práce podávána jako soubor publikací, disertantka této příležitosti využila k tomu, aby své téma na více než 80 stranách zasadila do souvislostí vývoje oboru.

V úvodu autorka shrnuje současný stav problematiky. Zabývá se rhomboidy, mimořádně zajímavou rodinou proteolytických enzymů aktivních uvnitř plasmatické membrány. O tom, že se uvnitř membrán vyskytují proteolytické enzymy, které tam dosud neznámým mechanismem hydrolysuji své substráty, se spekulovalo už v 90. letech minulého století, ale tato představa byla enzymology často zpochybňována nebo i

zesměšňována: hydrolyza v ryze hydrofobním prostředí plasmatické membrány byla považována za nemožnou. Až na přelomu století se objevily jasné experimentální důkazy pro intramembránovou proteolýzu amyloidního prekursorového proteinu gama sekretasy, a právě pro štěpení membránově vázaného růstového faktoru u *Drosophily* transmembránovou serinovou proteasou nazvanou Rhomboid 1. Je příznačné, že tyto klíčové objevy publikovali neurobiologové (v případě gama sekretasy) a genetici (v případě rhomboidů), nespíš díky tomu, že jim nedostatek enzymologického vzdělání zabránil v tom, aby si uvědomili, jak převratné jejich pozorování je.

Dnes známe intramembránové proteasy čtyř různých velkých rodin s různými mechanismy účinku a řadou významných specifických substrátů. Brzo se prokázalo, že intramembránové proteasy hrají klíčovou při regulaci tak důležitých dějů jako je neurodegenerace, parazitární invaze nebo buněčná diferenciacie, a publikace o těchto nových typech proteas se objevovaly v časopisech jako *Science* nebo *Cell*. Většina z nás, kteří jsme to pole se zájmem pozorovali, nepochybovala o tom, že se tento výzkum bude dynamicky rozvíjet a rychle se objeví celá řada biologických modelů a medicínálních aplikací. Po skoro dvaceti letech mám pocit, že k tomu tak úplně nedošlo; na trhu není žádné léčivo, které by bylo založeno na blokování aktivity intramembránové proteasy (velké klinické pokusy s inhibitory gama sekretasy pro léčbu Alzheimerovy choroby velkolepě selhaly), strukturální informace o rhomboidech se stále víceméně omezují na studium rhomboidu GlpG z *E. coli*, objevy nových substrátů a biologických rolí intramembránových přibývají poměrně pomalu – aspoň viděno zpětně optimismem z přelomu století. Podle mne je hlavním důvodem tohoto (relativně) pomalého postupu mimořádná experimentální obtížnost práce s intramembránovými enzymy, a hlavně nedostatek chemických nástrojů pro jejich studium. Jak disertantka velmi pěkně shrnuje v úvodu své práce, aktivitní eseje rhomboidů, které byly dosud dostupné, byly velmi pracné, neumožňovaly uspořádání pro sériové testování velkých sérií látek („high-throughput testing“), a dosud jsme neměli k dispozici specifické a účinné inhibitory, použitelné v tkáňových kulturách nebo na buněčných modelech. Právě tyto nástroje se rozhodla vyvinout v rámci své disertační práce Mgr. Tichá: jak jsem se snažil vysvětlit v předcházejících odstavcích, význam tohoto úkolu je pro další rozvoj oboru zcela klíčový.

Cílem předkládané práce bylo tedy nalezení nových, citlivých a specifických substrátů rhomboidů, vhodných pro „high throughput screening“, a vyvinutí robustní

aktivitní eseje. Dalším cílem bylo nalezení účinných a selektivních inhibitorů rhomboidů a jejich kinetická a strukturní charakterisace.

S potěšením konstatuji, že se oba cíle podařilo svrchovaným způsobem splnit. V předkládané disertaci jsou výsledky shrnuty ve čtyřech publikacích ve špičkových časopisech biologické a medicínální chemie: v časopise *Journal of Biological Chemistry* (1. autorka), *Cell Chemical Biology* (1. autorka), *Biochemistry* (spoluautorka) a *Bioorg. Med. Chem. Letters* (spoluautorka). Je třeba zdůraznit, že Anežka Tichá je spoluautorkou dalších dvou publikací, které se týkají předmětu disertace (krásné a velmi cenné review v *Trends in Biochemical Sciences* a další publikace v *Bioorg. Med. Chem. Lett.*). Anežka se navíc podílela na dalších třech důležitých farmakologických pracech pocházejících ještě z doby jejího působení ve skupině Dr. Maletínské na UOCHB. Pohledem do *Web of Science* zjišťujeme, že je autorkou devíti publikací se 75 citacemi a má H-index 5. Viděl jsem habilitace, které vypadaly scientometricky mnohem hůř.... Ve všech případech jde o velmi dobré mezinárodní časopisy s velmi náročným recenzním řízením, které většinou představují naprostou špičku v oboru.

Za nejdůležitější část této disertace považuji práci v *Cell Chemical Biology*, která popisuje návrh a vývoj zatím nejúčinnějších selektivních inhibitorů rhomboidů, které byly dosud popsány. Autorka k tomuto cíli využila poznatky o substrátové specifitě rhomboidů, shrnuté ve své předchozí práci v *J. Biol. Chem.* Za obzvlášť brilantní nápad považuji rozhodnutí pokračovat ve vývoji inhibitorů založených na ketoamidové „hlavici“, ačkoli ketoamidy nebyly nejúčinnější skupinou testovaných inhibitorů; autoři velmi správně dali přednost možnosti modifikovat strukturu inhibitoru před přímočaře aritmetickým vyhodnocením účinnosti.

Z formálního hlediska je práce velmi dobrá: má velmi kvalitní obrázkový aparát, práce má dost málo překlepů a pokud mohu soudit, angličtina je velmi dobrá.

Metodické přístupy shrnuté stručně v disertaci jsou adekvátní a pomohly k získání zcela unikátních výsledků, kriticky důležitých pro další vývoj oboru: to se u disertací nepíše příliš často, ale jsem si jist, že v tomto případě jsou ta slova na místě. Podařilo se připravit metodické nástroje, které poskytly důležité informace pro vztah mezi strukturou a aktivitou rhomboidů a budou bezpochyby hojně využívány celou vědeckou komunitou širšího oboru. Aktuálnost tématu a jeho suverénní zvládnutí svědčí o mimořádné metodické pokročilosti a experimentální suverenitě školící laboratoře. I to je třeba přičíst disertantce k dobru: výběr školitele a laboratoře patří ke kvalifikaci dobrého postgraduálního studenta.

K této práci mám jen několik drobných připomínek a dotazů:

1/ Ketoamidové inhibitory rhomboidů mají zajímavý a netriviální mechanismus účinku. Na straně 51 se popisuje mechanismus nově připravených inhibitorů jako nekompetitivní reversibilní. Obrázek 4E (Příloha 2), který to má dokumentovat, byl však pro mne nejasný a ani jeho legenda příliš nepomohla. Mohla by disertantka ten mechanismus účinku blíže komentovat? V té souvislosti: jak vysvětlí, že i přes nekompetitivní mechanismus účinku studovala selektivitu svých inhibitorů pomocí kompetice s jinými inhibitory (EnPlex, obr. 21, str. 51)?

2/ Jak sama autorka experimentálně prokázala, mechanismus inhibice rhomboidů inhibitory odvozenými od sacharinu se liší od jiných serinových proteas, neboť zjevně nedochází ke vzniku kovalentní vazby na His254 (str. 53 a Příloha 3). Obrázek 22B na str. 53 a příslušná legenda jsou tedy zavádějící, toto není mechanismus inhibice rhomboidů.

3/ obecnější otázka k diskusi: plánuje disertantka (nebo laboratoř školitele) využít své „modulární a obecné strategie“ vývoje inhibitorů rhomboidů pro vývoj sloučenin potenciálně použitelných pro terapii (inhibice *Plasmodia* při malárii, například, o které se v Diskusi své práce přímo zmiňuje)? Lze využít těchto inhibitorů pro přípravu „activity based probes“ pro visualisaci a identifikaci rhomboidů *in vivo*?

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Anežky Tiché zcela naplňuje i velmi náročné požadavky, byla by ozdobou špičkových zahraničních pracovišť v oboru, a plně ji proto doporučuji k obhajobě.

V Praze, 18.4. 2019

Jan Konvalinka