



RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.
Odd. Strukturní biologie signálních proteinů
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
detašované pracoviště BIOCEV
Průmyslová 595
25250 Vestec
Tel.: +420 325873513
Email: veronika.obsilova@fgu.cas.cz

Oponentský posudek na práci

**Regulace aktivity katepsinu K pomocí reaktivních inhibičních molekul
využitelných v biomedicině**

Autor práce: Mgr. Jakub Benýšek

Předkládaná disertační práce Mgr. Jakuba Benýška se zabývá určením vazebného módu selektivních inhibitorů lidského katepsinu K (KatK). Disertační práce vznikla na ÚOCHB AV ČR, v. v. i. pod vedením RNDr. Michala Mareše, CSc.

Práce je psána klasickou formou a je členěna do obvyklých částí (abstrakt-úvod-literární úvod a přehled dané problematiky-cíle práce-materiál a metody-výsledky-diskuze-závěr-literární zdroje). Kopie tří publikací, které tvoří základ disertační práce Mgr. Jakuba Benýška, jsou uvedené formou přílohy. Všechny tři experimentální práce byly publikovány ve velmi kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Na první publikaci je kandidát součástí kolektivu autorů (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, IF = 3.641). Na druhé publikaci, která byla otištěna v 3. nejlepším časopise v medicíně (*Journal of Medicinal Chemistry*, IF = 7.446), je Mgr. Benýšek druhým autorem. Třetí prvoautorská publikace byla přijata v letošním roce do časopisu *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* s IF = 5.051.

Práce je psána česky, formální úroveň a grafické zpracování je na velmi dobré úrovni, i když se zde vyskytují mírné překlepy. Autor v literárním přehledu detailně popisuje proteolytické enzymy, lidské cysteinové proteasy, podrobněji pak aktivitu, strukturu a regulaci katepsinu K (KatK). V literárním úvodu nechybí velmi pěkné ilustrace a schémata, která usnadňují pochopit popisovanou problematiku. Cíle práce jsou jasně formulovány. Je škoda, že samotné metody jsou popsány velmi stručně jen na dvou stranách. Je zřejmé, že metody jsou uvedeny v příložených publikacích, ale autor mohl zmínit stručně alespoň některé z četných biochemických či enzymologických metod, které používal. Podrobněji jsou popsány jen metody exprese a purifikace KatK a rtg. krystalografie. Kapitola výsledky obsahuje úvod s přehledem výstupů dizertační práce, kde doktorand uvádí, jakým způsobem k práci přispěl, a dále popisuje vlastní výsledky. Kapitola diskuze obsahuje úvod s motivací celé práce, podrobnou diskuzi získaných výsledků rozdělenou do dvou částí a shrnující závěrečný odstavec. V rámci cílů práce se podařilo připravit lidský KatK v kvasinkách s výtěžkem přibližně 5 mg/l expresního

média, byl optimalizován proces autoaktivace, byla identifikována nová třída inhibitorů KatK, bylo vyřešeno celkem šest struktur komplexů KatK s peptidomimetickými inhibitory a dále byl určen vazebný mód a popsány klíčové interakce mezi inhibitorem a aktivním místem KatK. Disertační práce je završena závěrem. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány, literatura čítá cca 180 citací.

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám několik dotazů:

- 1) Pro purifikaci KatK jste používal iontově výměnnou chromatografii. Jaké bylo pI proteinu? Používal jste tedy kationtovou či aniontovou chromatografii?
- 2) Jaký pufr byl ve výsledku použit jako finální pro krystalizaci proteinů KatK? Jaká proteinová koncentrace byla optimální pro růst krystalů? Byla stejná pro všechny inhibitory? Jakým způsobem jste provedl kryoprotekci krystalů před mražením, aby nedocházelo k radiačnímu poškození (PEGem nebo glycerolem)?
- 3) Můžete v krátkosti popsat měření aktivity KatK pomocí peptidového fluorogenního substrátu? Dále pak vysvětlit tabulku 1 na straně 46, kde máte některé deriváty z nejasného důvodu označeny červeně.
- 4) Můžete popsat vizualizaci KatK za použití buněčné linie osteosarkomu, kterou nemáte uvedenou v metodách?
- 5) Testovali jste, zda inhibitory Gü2602 a Gü1303 jsou selektivní pouze pro KatK, či i jinou rodinu kathepsinů?
- 6) Jak tento výzkum prakticky přispěje k dalšímu vývoji specifických inhibitorů pro vývoj nových terapeutických přístupů či konkrétních léčiv? V jakém biologickém modelu budou testovány? Jakým směrem se bude ubírat Váš další výzkum v této oblasti?

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Jakuba Benýška představuje cenný přínos pro lepší pochopení regulace a funkce katepsinu K. Je zřejmé, že si kandidát při řešení vytčených cílů osvojil řadu velmi sofistikovaných technik, především metody především metody rekombinantní produkce proteinu v *Pichia pastoris*, různé biochemické a enzymologické metody a v neposlední řadě zejména metody proteinové krystalografie. Výsledky práce jsou dobře diskutovány a dávány do souvislostí. Autor ve své disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce. Předložená práce Mgr. Jakuba Benýška více než vyhovuje všem požadavkům kladeným na disertační práci, a proto ji plně doporučuji k přijetí.

V Praze dne 24. 2. 2022

RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.