

## **Oponentský posudek**

### **na doktorskou disertační práci Mgr. Michala Navrátila nazvanou: „Human glutamate carboxypeptidases II and III“**

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Michala Navrátila je zaměřena na studium struktury a enzymatických vlastností lidských karboxypeptidas I a II (GCP II a III). Enzym GCP II je znám svou schopností hydrolyzovat N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) či poly- $\gamma$ -L-glutamylovanou kyselinu listovou (FolGlu<sub>n</sub>). GCP III je méně prostudovaným paralogem GCP II a je schopen hydrolyzovat  $\beta$ -citryl-L-glutamát (BCG) v přítomnosti iontů Ca<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup>. Obě tyto metaloproteasy jsou silně exprimovány v nádorech prostaty a proto představují atraktivní cíl pro diagnostiku a terapii tohoto onemocnění.

Hlavním cílem předložené disertační práce byla detailní kinetická a strukturní charakterizace a porovnání GCP II a III. První část práce je věnována biochemické charakterizaci substrátové specifity GCP II a III a jejich mutantních variant. Další část se soustředí na strukturní podstatu substrátové specifity těchto enzymů. V následujících částech práce se Mgr. M. Navrátil věnoval studiu tkáňové distribuce GCP III, vyřešení struktury GCP II H475Y a vývoji lipofilních inhibitorů GCP II a selektivních inhibitorů GCP III.

Mezi hlavní výsledky práce patří vysvětlení mechanismu vazby FolGlu<sub>n</sub> na GCP II pomocí rentgenostrukturní analýzy a charakterizace hydrolýzy FolGlu<sub>n</sub> tímto enzymem, zjištění, že BCG je specifickým substrátem GCP III, vysvětlení strukturní podstaty rozdílů v substrátové specifitě GCP II a III, strukturní charakterizace tzv. S2 vazebného místa GCP II a popsání tkáňové distribuce GCP III jak na úrovni proteinu, tak i mRNA. Výsledky této práce byly zatím publikovány ve třech publikacích v kvalitních časopisech s IF, přičemž Mgr. M. Navrátil je prvním autorem dvou z těchto publikací. Podle odkazů v práci je zřejmé, že další publikace budou následovat.

Disertační práce Mgr. M. Navrátila je psána standardní plnou (nezkrácenou) formou a obsahuje úvod do studované problematiky, cíle práce, popis použité metodiky, popis výsledků, diskusi, závěr a seznam citované literatury. Práce je psána pěknou angličtinou a z formálního hlediska je dle mého názoru vše v pořádku. Přítomnost gramatických chyb a formulačních nepřesností je nízká.

Předložená disertační práce ukazuje, že Mgr. M. Navrátil získal zkušenosti v celé šíři strukturní biologie a enzymologie a seznámil se s řadou klíčových technik včetně přípravy rekombinantních proteinů, stanovení kinetických parametrů studovaných enzymů, studia

jejich struktury pomocí rentgenové krystalografie či metod pro charakterizaci jejich stability (DSF).

K problematice diskutované v doktorské disertační práci mám následující dotazy, které jsou spíše náměty pro diskusi:

1. V práci zmiňujete myš s knockoutem GCP II a její využití při studiu funkce GCP III. Byl připraven i knockout GCP III či obou těchto enzymů?
2. Jaká je vazebná afinita GCP II a GCP III pro ionty  $Zn^{2+}$ ? Můžete ji porovnat s fyziologickou koncentrací  $Zn^{2+}$ ? Jsou známé vazebné afinity  $Ca^{2+}$  a  $Mn^{2+}$  pro GCP III? Pokud ano, můžete je porovnat s fyziologickými extracelulárními koncentracemi těchto iontů?
3. AAS analýza ukázala i u GCP II částečné obsazení vazebných míst pro  $Zn^{2+}$  (1,4 iontu  $Zn^{2+}$  na molekulu GCP II). Je důvodem způsob přípravy proteinu/vzorku, nebo i u GCP II může být jeden z iontů  $Zn^{2+}$  v klastru Zn1-Zn2 nahrazen jiným kovem jako to bylo pozorováno u GCP III? Mají ionty  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  atd. vliv na aktivitu GCP II?
4. Je možné odhadnout fyziologické koncentrace BCG a porovnat je se získanou hodnotou  $K_M$  pro GCP III? Jsou známy nějaké další funkce BCG kromě jeho pravděpodobné úlohy v transportu železa? Existuje souvislost mezi tkáňovou distribucí GCP III a enzymu, který BCG syntetizuje?

#### **Závěrem konstatuji:**

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Michala Navrátila představuje cenný přínos ke studiu struktury a kinetických vlastností lidských enzymů GCP II a III. Vzhledem k jejich vysoké expresi v nádorech prostaty představují tyto metaloproteasy atraktivní cíl z hlediska diagnostiky a terapie tohoto onemocnění. Identifikace specifických substrátů a selektivních inhibitorů poskytne nástroje nejen pro další studium jejich fyziologické úlohy, ale potenciálně i pro vývoj terapeuticky využitelných postupů. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech s IF. Autor ve své disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. Michala Navrátila vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.

V Praze 10. června 2016

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.  
Katedra fyz. a makromol. chemie  
Přírodovědecká fakulta UK, Praha