

## **Oponentský posudek doktorské práce**

### **Michal Navrátil: Human glutamate carboxypeptidases II and III**

Cílem doktorské práce Michala Navrátila byl výzkum lidských proteinů glutamát karboxypeptidasy II a III. Oba dva navzájem si blízce příbuzné proteiny se vyskytují v membráně lidských buněk v řadě tkání a jejich extracelulární část vykazuje karboxypeptidasovou aktivitu vůči různým peptidovým substrátům. V některých tkáních je fyziologický význam této aktivity částečně objasněn, (například hydrolysa NAAG pomocí GCPII za vzniku NAA a volného L-glutamátu v mozkových buňkách), v jiných případech (např. aktivita GCPII v buňkách prostaty) zůstává fyziologický a patofyziologický význam těchto enzymových aktivit zatím neznámý. Předložená práce řešila poměrně široké spektrum úkolů, z nichž lze jmenovat např. výzkum nových, hydrofobnějších inhibitorů enzymu GCPII, které by snáze překonávaly hematoencefalickou bariéru, nebo celé spektrum úkolů, majících za cíl porovnávat oba dva příbuzné proteiny (GCPII a GCPIII) z hlediska jejich enzymových specifit a výskytu v jednotlivých lidských tkáních. Při práci byly využívány jak proteiny připravené rekombinantní expresí ve hmyzích buňkách, tak i přirozený materiál a byly použity i metody výpočetní chemie.

Práce Michala Navrátila má 106 stran, obsahuje 28 obrázků, je psána dobrou angličtinou a členěna klasickým způsobem. Ve velmi dobře a čtivě napsaném Úvodu je čtenář nejprve obsáhle seznámen s oběma studovanými molekulami z hlediska jejich biochemického a fyziologického významu. Následuje uvedení cílů práce a specifikace použitého materiálu a metod. Práce pokračuje částmi Výsledky a Diskuse, které představují její vlastní jádro a je zakončena Souhrnem, krátkým náčrtem budoucích výhledů výzkumu a seznamem citované literatury, obsahujícím 190 citací. Práce má dobrou grafickou úpravu a velmi málo tiskových chyb. Výsledky získané během výzkumu autor publikoval ve 3 publikacích ve kvalitních časopisech, přičemž na dvou publikacích je uveden jako první autor.

Domnívám se, že předložená práce má vysokou hodnotu, obsahuje velmi mnoho cenných dat získaných pomocí opravdu širokého spektra metod a tato data jsou velmi dobře interpretována a zařazena do celkového kontextu výzkumu. Za jeden z nejdůležitějších přínosů práce považuji zavedení celé řady nových metod detekce enzymové aktivity uvedených proteinů. Pro mě osobně byly nejzajímavější ty části, které se týkaly bližšího studia GCPIII s jeho nově objeveným vysoce specifickým substrátem  $\beta$ -citryl-L-glutamátem. Tato oblast výzkumu se totiž otevírá zcela nově a naznačuje řadu doposud netušených souvislostí.

K práci mám tyto připomínky:

1. Chtěl bych upozornit na skutečnost, že při detekci aktivity GCPII a GCPIII byla použita celá řada lidských tkání, což zvyšuje význam získaných výsledků např. oproti experimentům na zvířatech.

2. Při úvahách o možné roli GCPIII v distribuci železa v organismu nebyla v textu zmíněna příbuznost GCPIII s transferinovým receptorem. Předpokládám, že tato podobnost může být dalším náznakem posilujícím uvedenou hypotézu.

Dále bych rád položil kandidátovi následující dotazy:

A. Byla při pokusech o vyřešení struktury inaktivního mutantu molekuly GCPIII s jeho substrátem použita také metoda „soakingu“ substrátu do hotového krystalu?

B. Budou dále testovány charakterizované lipofilnější inhibitory proteinu GCPII?

C. Z obrázku 26 vyplývá, že kosterní svalstvo a leukocyty byla jediná dvě místa, kde byla nalezena mRNA pro GCPIII, přičemž nebyla detekována žádná mRNA pro GCPII. Byly při návrhu sond pro qPCR uvažovány všechny možné sestřihové varianty proteinu? A pokud je dané zjištění skutečně pravdivé, lze z něho usuzovat cosi ohledně rozdílných rolí obou proteinů?

D. V textu bylo zmíněno, že objev BCG jako substrátu enzymu GCPIII byl učiněn nezávisle na jeho publikaci F. Collardem roku 2011 v J. Biol. Chem. Bylo by možné stručně popsat, jak se podařilo tento substrát identifikovat?

Závěrem bych chtěl říci, že celou práci považuji za velmi kvalitní. Podle mého názoru splňuje všechny podmínky které jsou na ni kladeny a plně ji doporučuji přijmout k další obhajobě.

Praha, 31. května 2016

RNDr. Jiří Pavlíček, Ph.D.