

prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Tel. +420-221-951-303
E-mail: obsil@natur.cuni.cz

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci Mgr. L'ubice Škultétyové nazvanou: „Zinc-Dependent Hydrolases: Structure-Function Study of Glutamate Carboxypeptidase II and Histone Deacetylase 6“

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce Mgr. L'ubice Škultétyové byla strukturní a funkční charakterizace dvou metalohydrolas závislých na zinku: glutamátcarboxypeptidasy II (GCPII) a histondeacetylasy 6 (HDAC6). Hlavní pozornost byla konkrétně věnována studiu interakcí těchto dvou enzymů s přirozenými substráty a různými inhibitory. GCPII v centrální i periferní nervové soustavě katalyzuje odštěpení glutamátu z neuropřenašeče N-acetylaspartylglutamátu (NAAG) a v tenkém střevě z folátů přijatých v potravě. GCPII je spojována s několika neurologickými poruchami a karcinomem prostaty a proto je perspektivním cílem terapeutické intervence. Druhý studovaný enzym HDAC6 je hlavní deacetylase tubulinu a také představuje nadějný cíl v léčbě nádorových a neurodegenerativních onemocnění. Lze tedy konstatovat, že téma této doktorské disertační práce je velmi aktuální.

Disertační práce Mgr. L'ubice Škultétyové má celkově 150 stran, je psána anglicky zkrácenou formou, tedy jako komentovaný soubor publikací doktorandky. V teoretickém úvodu autorka popisuje základní vlastnosti obou studovaných enzymů, jejich strukturu, posttranslační modifikace a jejich úlohu ve fyziologických a patologických dějích. Následují cíle práce, část s výsledky založená na čtyřech publikacích (doktorandka je první autorkou jedné z nich, u každé publikace je uveden podíl doktorandky), diskuse, závěr a přehled citované literatury.

První publikace se týká vývoje nových inhibitorů GCPII vykazujících vyšší lipofilicitu. Stávající inhibitory GCPII jsou vysoce polární látky, což omezuje jejich použití k inhibici GCPII v centrálním nervovém systému. Proto byl připraven a testován panel nových inhibitorů odvozených od dipeptidového substrátu GCPII. V této práci byly dále vyřešeny čtyři krystalové struktury GCPII v komplexu s vybranými dipeptidy. Doktorandka byla v této práci odpovědná za vyřešení jedné z těchto struktur.

Druhá publikace se také věnuje vývoji nových více nepolárních inhibitorů GCPII, tentokrát na bázi derivátů močoviny. V rámci této práce bylo vyřešeno šest krystalových struktur komplexů GCPII se studovanými inhibitory. Doktorandka byla v této práci odpovědná za vyřešení dvou z těchto struktur.

Třetí publikace se týká přípravy a charakterizace 18F-značených peptidových inhibitorů GCPII, který se dá využít pro diagnostiku rakoviny prostaty. Jedním ze znaků nádorových buněk prostaty je vysoká exprese GCPII a toho se dá využít k diagnostickým či terapeutickým účelům. Doktorandka byla v této práci odpovědná za vyřešení struktury komplexu GCPII s inhibitorem CTT1056.

Čtvrtá publikace, kde je Mgr. L'ubica Škultétyová první autorkou, je zaměřena na studium interakcí HDAC6 s tubulinem a dále na biochemickou charakterizaci deacetylase různých typů tubulinu HDAC6. Tato práce ukázala, že HDAC6 výrazně rychleji deacetyluje nepolymerovaný tubulin v porovnání s mikrotubuly. Pomocí technik fluorescenční spektroskopie bylo dále ukázáno, že deacetylase mikrotubulů probíhá náhodně podél celé délky mikrotubulu. V této práci byla doktorandka odpovědná za přípravu různých variant HDAC6, vypracování metody pro sledování deacetylase tubulinu a dále se podílela na sepsání publikace.

Předložená doktorská disertační práce je psána srozumitelnou angličtinou, množství překlepů či formulačních nepřesností je malé, z formálního hlediska je práce v pořádku. Mgr. L'ubica Škultétyová je první autorkou jedné ze čtyř publikací, které jsou základem této disertační práce. Předložená disertační práce jasně ukazuje, že Mgr. L'ubica Škultétyová získala značné zkušenosti v celé šíři metod proteinové biochemie a proteinové krystalografie.

Závěrem konstatuji:

Předložená doktorská disertační práce Mgr. L'ubice Škultétyové představuje cenný přínos k vývoji inhibitorů GCPII a objasnění funkce HDAC6. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky práce byly publikovány. Autorka ve své disertační práci dokázala, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

Jelikož předložená práce Mgr. L'ubice Škultétyové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně ji **doporučuji** k přijetí.

V Praze 7. května 2018

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

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

1. Na straně 4 uvádíte, že součástí struktury GCPII je i iont Ca^{2+} , který je kritický pro aktivitu tohoto enzymu. Nicméně z popisu metody použité pro měření aktivity GCPII (str. 47 či 91, 92) není zřejmé, že by do pufru pro měření aktivity byly přidávány Ca^{2+}

ionty. Analogicky to stejné platí pro ionty Zn^{2+} . Jak je tedy zajištěna saturace enzymu těmito pro aktivitu klíčovými ionty?

2. Dále uvádíte, že součástí struktury GCPII je i iont Cl^- , který ovlivňuje konformaci kladně nabitých residuí při vazbě substrátů či inhibitorů. Jak bylo prokázáno, že se jedná opravdu o ion Cl^- ? Je aktivita GCPII ovlivněna v nepřítomnosti iontů Cl^- ?
3. Podílela jste se na dvou studiích týkajících se syntézy lipofilních inhibitorů GCPII. V jedné práci byly vyvíjeny inhibitory na bázi dipeptidů s navázaným nepolárním alifatickým řetězcem a v druhé na bázi derivátů močoviny. Která z těchto dvou strategií se Vám jeví jako perspektivnější?
4. V poslední práci bylo ukázáno, že HDAC6 preferenčně deacetyluje dimery tubulinu. To naznačilo, že populace volných dimerů tubulinu v buňce bude spíše deacetylovaná a k acetylaci Lys40 α -podjednotky dochází až na polymerních mikrotubulech. Má deacetylaci volných dimerů tubulinu nějaký biologický význam? Např. ovlivňuje acetylaci Lys40 volných dimerů tubulinu tvorbu mikrotubulů (polymeraci tubulinu) či další posttranslační modifikace dimerů tubulinu?