PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

Katedra biochemie
Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Hlavova 8, 12840 Praha 2
Tel. +2-2195-1281

Oponentský posudek doktorské disertační práce
Mgr. L'ubice Škultétyové
s názvem: „Zinc-Dependent Hydrolases: Structure-Function Study of Glutamate Carboxypeptidase II and Histone Deacetylase 6"

Předkládána doktorská disertační práce Mgr. L'ubice Škultétyové popisuje vztah mezi strukturou a aktivitou vybraných metalohydrolas závislých na zinečnatých iontech. Konkrétně se jedná o lidskou glutamátkarboxypeptidasu II (GCPII) a histondeacetylasu 6 (HDAC6). Práce je členěna do několika oddílů. První oddíl objasňuje funkci obou enzymů v savčích organismech, poté následují s krátkým komentářem čtyři publikace včetně jedné prvoautorské, které na dané téma vyšly v kvalitních recenzovaných periodicích (2x J. Med. Chem., Bioorg. Med. Chem. Lett. a Sci. Rep.), nakonec vše uzavírá diskuze, kde se autorka snaží zasadit výsledky své práce do širšího kontextu studované problematiky. Práce tak vypadá uceleně a z formálního i vědeckého hlediska dle mého názoru splňuje všechny požadavky, které jsou nutné pro úspěšné obhájení zkrácené verze doktorské disertační práce.

První publikace popisuje přípravu nových lipofilních inhibitorů GCPII a strukturní charakterizaci jejich vazby na zmíněnou metalohydrolasu. Přestože nové inhibitory byly připraveny ve spolupráci s partnerskou laboratoří, podstatná část projektu byla řešena Mgr. Škultétyovou, které se podařilo vyhodnotit difrakční data komplexu GCPII s nově objeveným lipofilním inhibitorem (N-acetyl-aspartyl-methionin) a vysvětlit principy interakce na molekulární úrovni. Ve svém dalším článku navazuje na své předcházející zkušenosti s řešením struktury komplexu GCPII s inhibitorem. Opět byla zodpovědná za interpretaci difrakčních dat a popsání interakce další generace inhibitorů s GCPII. Získané informace mohou být v budoucnu využity pro návrh efektivnějších lipofilních inhibitorů, kde je nahrazen zbytek glutamátu v pozici P1. V poslední práci ze série týkající se metalohydrolasy GCPII se Mgr. Škultétyova podílela na strukturní charakterizaci komplexu GCPII a inhibitoru s fluoridovou sondou. I zde uplatnila poznatky z dřívějších studií a na základě difrakčních dat objasnila interakci fluoridové sondy s GCPII. Výsledky studie jsou přenositelné do klinické diagnostiky pro odhalování raných stádií rakoviny prostaty. Poslední uvedená publikace popisuje deacetylační vlastnosti metalohydrolasy HDAC6 v přítomnosti různých forem lidského tubulinu. Výsledkem studie je zajímavé zjištění, že HDAC6 preferenčně deacetyluje dimerní formu tubulinu. Oproti předcházejícím studiím zde Mgr. Škultétyová neměla na starosti vyhodnocování difrakčních dat, ale úspěšně navrhla a optimalizovala genové konstrukty pro expresi různých forem proteinu HDAC6 v lidských buňkách. Také pro příslušnou studii navrhla postup pro sledování aktivity připravených forem proteinu HDAC a částečně se podílela na jejím sepsání. Odměnou ji bylo přiznáno prvoautorství na publikaci.

Z předkládané doktorské disertační práce je patrné, že v průběhu svého studia se Mgr. Škultétyová naučila celou řadu technik současné biochemie a strukturní biologie (rekombinantní exprese proteinů, stanovení enzymové aktivity, interpretace difrakčních map proteinových krystalů a rafinace navržených strukturních modelů). Zároveň prokáza-

Přírodovědecká fakulta UK

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Katedra biochemie
Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Hlavova 8, 12840 Praha 2
Tel. +2-2195-1281

la, že získaná data je schopna interpretovat v kontextu současného poznání. Po formální stránce práci nelze nic podstatného vytknout, přestože je psána v anglickém jazyce, až na drobnost, že mezi začátkem a koncem jejího studia se Universita Karlova stačila přejmenovat. Nicméně práce vykazuje drobné nedostatky ve vědecké části. Přestože je úvod do problematiky metalohydrolas dobře čitelný a pochopitelný, nezapadá do expertízy slečny magistry, protože největším přínosem Mgr. Škultétyové nebyly pokusy ukazující na fyziologickou a patologickou významnost studovaných proteinů, ale byly to hlavně techniky moderní biochemie. Úvod rozebírající úskalí heterologní exprese bílkovin nebo interpretace difrakčních obrazců by práci dle mého názoru odpovídal lépe. I přesto doporučuji předkládanou práci k obhajobě. Závěrem mám několik dotazů.

1) V první publikaci popisujete použití jiných protokolů pro divoké a mutantní formy CGPII. V dalších dvou jsou opět použity jiné postupy rekombinantní exprese v hmyzích buňkách. Můžete vysvětlit, jaký byl důvod použití jiných postupů rekombinantní exprese proteinu CGPII?
2) Metalohydrolasa CGPII je lidský transmembránový protein, který bude ve své struktuře s největší pravděpodobností obsahovat biantenární sialované oligosacharidy. Použitý hmyzí systém takovou glykosylaci neumožňuje. Byla někdy provedena studie, jestli typ glykosylace může mít vliv na prostorové uspořádání aktivního místa enzymu? Pokud ne, proč jste se rozhodli pro hmyzí systém, když ve své poslední prací ukazujete úspěšné zvládnutí exprese v lidských buňkách?
3) V poslední práci věnované proteinu HDAC6 uvádíte, že byla provedena heterologní exprese zmíněného proteinu v lidských buňkách. Proč se domníváte, že šlo o heterologní expresi?
4) Ve stejné práci se píše, že post-translační modifikace byly vyloučeny na základě dekonvoluce LC-MS/MS dat. Lze dekonvolucí LC-MS/MS dat získat informaci o post-translačních modifikacích? Navrhněte způsob, jak byste post-translační modifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie určila?

V Dolních Břežanech dne 15. 5. 2018

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta UK

RNDr. Petr Novák, Ph.D.

adresa: Albertov 6, 128 00 Praha 2 **telefon:** 221 951 281 **e-mail:** novakpe1@natur.cuni.cz
ičo: 00216208, **dič:** CZ00216208 **fax:** 221 951 283 **web:** www.natur.cuni.cz