

## **Oponentský posudek**

### **na doktorskou disertační práci Mgr. Václava Navrátila nazvanou: „Development of analytical tools for quantification and screening for inhibitors of glutamate carboxypeptidase II and III“**

Hlavním cílem předložené doktorské disertační práce Mgr. Václava Navrátila byl vývoj nových metod pro kvantifikaci glutamátcarboxypeptidas II (GCPII) a III (GCPIII) a hledání jejich inhibitorů. 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 GCPIII se také podílí na štěpení NAAG v centrální nervové soustavě a jeho vlastnosti nejsou zatím příliš známy. Lze tedy konstatovat, že téma této doktorské disertační práce je velmi aktuální.

Disertační práce Mgr. Václava Navrátila má bez příloh 77 stran, je psána anglicky zkrácenou formou, tedy jako komentovaný soubor publikací doktoranda. V teoretickém úvodu autor popisuje základní vlastnosti GCPII a III, jejich strukturu, uvádí přehled známých inhibitorů a sumarizuje využití GCPII pro terapeutické účely při léčbě karcinomu prostaty. Dále autor uvádí přehled metod selektivní detekce proteinů a hledání nových inhibitorů. Následují cíle práce, část s výsledky založená na čtyřech publikacích (doktorand je prvním autorem jedné z nich, u každé publikace je uveden podíl doktoranda na prezentovaných výsledcích), diskuse, závěr a přehled citované literatury.

První publikace se týká charakterizace enzymových vlastností lidských GCPII a III vůči jejich známým substrátům NAAG, BCG a FolGlu<sub>x</sub>. Doktorand byl v této práci odpovědný zejména za vývoj metodiky qRT-PCR pro kvantifikaci obou studovaných enzymů.

Druhá publikace se také věnuje enzymologické charakterizaci GCPII, konkrétně rekombinantní hmyzí GCPII, a studii exprese GCPII v tkáních myši. Doktorand byla v této práci odpovědný za část výsledků týkající se qRT-PCR esejím, izolaci RNA, testování její integrity a její přepis do cDNA.

Třetí publikace se týkala prokázání přítomnosti a aktivity GCPII v lidské krevní plasmě. Doktorand byl v této práci odpovědný za testování nových protilátek proti GCPII a optimalizaci purifikace vybrané protilátky 2G7.

Čtvrtá publikace, kde je Mgr. Václav Navrátil prvním autorem, je bezesporu hlavním výsledkem této doktorské disertační práce. Práce popisuje vývoj velmi citlivé metody pro detekci a kvantifikaci enzymů a hledání nových inhibitorů. Metoda byla nazvána DIANA (DNA-linked Inhibitor ANtibody Assay) a je založena na tom, že cílový enzym je imobilizován pomocí protilátky a následně detekován pomocí detekční sondy, která se skládá z nízkomolekulárního inhibitoru příslušného enzymu a řetězce DNA. Tato DNA je následně detekována pomocí qPCR. Interakce enzymu s protilátkou a inhibitorem zajišťuje vysokou selektivitu, detekce připojeného řetězce DNA prostřednictvím qPCR pak poskytuje vysokou citlivost. Jako modelové enzymy pro testování metody byly použity GCPII a CAIX (karbonanhydrasa IX). Práce ukázala, že pomocí této metody lze detekovat extrémně malá množství enzymů v komplexních biologických matricích. Práce dále ukázala, že tuto metodu lze využít i při hledání nových inhibitorů testováním velkých knihoven organických látek. V této studii hrál doktorand klíčovou úlohu, byl odpovědný za její design, vývoj metodiky, její testování a validaci. Dále se podílel na analýze získaných dat a sepsání publikace.

Předložená doktorská disertační práce je psána srozumitelnou angličtinou, množství překlepů či formulačních nepřesností je minimální, z formálního hlediska je práce v pořádku. Mgr. Václav Navrátil je prvním autorem jedné ze čtyř publikací, které jsou základem této disertační práce. Kromě toho, je spoluautorem sedmi dalších publikací (na jedné z nich je prvním autorem). Předložená disertační práce jasně ukazuje, že Mgr. Václav Navrátil získal značné zkušenosti v celé šíři metod proteinové biochemie, imunochemie a medicínální chemie.

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

1. Je nějaké vysvětlení pro pozorovaný rozdíl v tkáňové distribuci GCPII u člověka a u myši?
2. GCPII je integrální membránový glykoprotein nacházející se v plasmatické membráně buněk. V práci III byla GCPII detekována v krevní plasmě. V jaké formě je zde GCPII přítomna, když krevní plasma neobsahuje krevní buňky?
3. Použití metody DIANA na detekci/kvantifikaci enzymu vyžaduje existenci inhibitoru, který se na daný enzym váže s vysokou afinitou. Lze v případech, kdy takový inhibitor není k dispozici nahradit tuto část sondy např. protilátkou.
4. S jakou minimální afinitou musí enzym vázat inhibitor, aby se metoda DIANA dala použít? Jaká je maximální koncentrace DMSO, ve které je DIANA funkční?

### **Závěrem konstatuji:**

Předložená doktorská disertační práce Mgr. Václava Navrátila představuje cenný přínos ke studiu funkce enzymů GCPII a III a vývoji nových citlivých biochemických metod detekce a kvantifikace enzymů. Práce je psána srozumitelně, pečlivě, výsledky práce byly publikovány v kvalitních mezinárodních časopisech. Autor ve své disertační práci dokázal, že je vyspělým vědeckým pracovníkem, schopným samostatné výzkumné práce.

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

V Praze 5. září 2018

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