

Posudek na dizertační práci „Regulace aktivity aspartátových a serinových proteas pomocí selektivních přirozených inhibitorů“

Kandidát: Mgr. Jaroslav Srp

Školitel: RNDr. Michal Mareš, CSc.

Předkládaná dizertační práce je založena na pěti rukopisech přijatých v renomovaných impaktovaných časopisech, kde v publikaci v časopise *Insect Biochem and Mol Biol* je kandidát prvním autorem.

Doktorand je taktéž prvním autorem souhrnného článku v *Chemických listech* a uvedeny jsou rovněž data k dalším dvěma připravovaným publikacím. Práce o celkovém rozsahu 160 stránek (včetně příloh) je psána v češtině zkrácenou formou, tedy jako komentovaný soubor publikací. Práce je z formálního hlediska v pořádku, nicméně větší pozornost mohla být věnována některým „detailům“, zvláště pak v autoreferátu (neúplný název práce, chybný název mateřské instituce, název školy atd...). Obecnou otázkou k diskuzi o dizertačních pracech by rovněž mohlo být doporučení Oborové rady Biochemie vypracovávat tyto práce v angličtině, což by bezesporu bylo prospěšné pro další profesní rozvoj kandidátů.

Stěžejním příspěvkem dizertace jsou detailní charakterizace trávícího proteolytického systému mandelinky bramborové a analýza substrátové specifity a selektivní inhibice epidermálních kalikreinů. V komplemenárním pohledu, zaměřeném na inhibitory, pak byly naplněny cíle práce při identifikaci přirozených mechanismů inhibiční regulace katepsinu D pomocí sfingolipidů a významnou část práce tvoří také nepublikovaná data popisující strukturní podstatu interakcí mezi inhibitory z Kunitzovy rodiny a jejich cílovými enzymy. V dizertační práci je zpracováno vysoce aktuální téma a publikovaná data budou bezesporu přínosná pro širší vědeckou komunitu zabývající se proteolýzou a obecným mechanismem fungováním proteas. V aplikační oblasti by pak informace o specifitě a mechanismech inhibice studovaných enzymů/inhibitorů mohly stát základem pro racionální vývoj nových inhibitorů využitelných v biomedicínských aplikacích nebo zemědělských biotechnologiích.

V dizertační práci kandidát prokázal, že vyspělým vědeckým pracovníkem, který si během postgraduálního studia osvojil široký rozsah experimentálních technik, zahrnující metody molekulární biologie (klonování, mutagenese), heterologní exprese v prokaryotních a eukaryotních systémech a purifikace rekombinantních proteinů, biochemické a enzymologické metody a v neposlední řadě i metody krystalizace a rentgenostrukturní analýzy. Pevně věřím, že takto široké metodologické portfolio bude dobrým základem pro další kariéru kandidáta ať už ve veřejném nebo privátním výzkumu.

Experimentální postupy, získaná data i jejich interpretace již prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech a tudíž by bylo zbytečné je znovu detailně analyzovat. Rád bych nicméně kandidátovi položil několik dotazů týkajících se kapitoly 4.2., kde jsou uvedena velmi zajímavá nepublikovaná data komplexů inhibitorů z Kunitzovy rodiny s cílovými proteasami:

1. Inhibitor PSPI má dvě nezávislá reaktivní centra odlišného typu a je uvedeno, že se jedná o „nanomolární inhibitor serinových proteas S1 rodiny chymotrypsinu“. Jakou metodou byly inhibiční konstanty stanoveny? Jsou inhibiční konstanty například vůči trypsinu identické pro obě reaktivní centra inhibitoru nebo inhibiční křivky ukazují na existenci dvou nezávislých center s rozdílnými afinitami vůči cílovému enzymu? Inhibuje PSPI přednostně chymotrypsin nebo trypsin?
2. Zajímavým zjištěním je, že v části komplexu reaktivního centra se dvěma smyčkami se do S1 kapsy trypsinu váže Trp29. Vzhledem k substrátové specificitě trypsinu pro kladně nabitě postranní řetězce – byla ve struktuře komplexu pozorována nějaká výrazná strukturní změna aktivního místa trypsinu? Mohl by kandidát takovou změnu (jestliže byla pozorována) dokumentovat na „přeložení“ struktur trypsinu s modelovým substrátem (Lys/Arg v P1 pozici) a komplexu s PSPI?
3. Jakou roli hraje Val59 v inhibici trypsinu? Blokuje/interaguje s aktivním místem mimo popsané vodíkové vazby s Lys58? (Mimochodem, na obrázku 9B je namísto valinu zvýrazněn postranní řetězec aspartátu).

Závěrem můžu konstatovat, že i přes některé drobné výhrady je předkládaná dizertační práce na velmi vysoké úrovni a splňuje všechny požadavky studijního programu Biochemie. Proto ji plně **doporučuji k obhajobě**. Současně přeji Mgr. Jaroslavu Srpovi hodně úspěchů v dalším osobním i profesním životě.

Ve Vestci, 14. prosinec 2018

RNDr. Cyril Bařinka, PhD
Laboratoř Strukturní Biologie
Biotechnologický ústav AV ČR
Průmyslová 595, Vestec, Česká republika
telefon: +420-325-873-777
e-mail: cyril.barinka@ibt.cas.cz
<http://lsb.avcr.cz/>