

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče: Bc. Ján Kuzmík

Název práce: Inhibitors of rhomboid proteases as tools for cell biology

Diplomová práce Jána Kuzmíka se zabývá testováním variant peptidyl α -ketoamidových inhibitorů rhomboidových proteas, konkrétně dosud nejlépe charakterizované proteasy GlpG z modelového organismu *E. coli*. Serinové proteasy z rodiny rhomboidů a jejich neaktivní varianty, tedy pseudoproteasy, hrají významnou roli v řadě buněčných procesů. I když u mnoha z nich není známá substrátová specifita, je jejich role spojována s několika významnými onemocněními a patogeny. Vývoj specifických inhibitorů rhomboidových proteas je předmětem předkládané práce.

Tematicke předchází velmi podrobně a poutavě zpracovaný úvod a je zřejmé, že Ján teoretické příprave věnoval velké úsilí. Na kvalitě ubírá snad jen nedostatečná velikost a čitelnost některých obrázků (například obrázek 10 a 11). Metodická i výsledková část dostatečně popisují náplň práce a jsou dobře srozumitelné. Repertoár použitých metod je poměrně velký – student se seznámil s metodou exprese a purifikace membránového proteinu a podrobně se zabýval stanovením aktivity a inhibice *in vitro* a *in vivo*. Ve spolupráci s kolegy z pracoviště UOCHB AV ČR byl dále sestaven výpočetní model vybraných komplexů na základě krystalových struktur dříve získaných v laboratoři školitele. Student tak měl výbornou příležitost usadit získaná data do strukturního kontextu, což umožnilo kritickou analýzu výsledků a jejich bohatou diskuzi. Diskuze výsledků rovněž vypovídá o dobrých teoretických základech studenta a zodpověděla všechny enzymologicky orientované otázky, které vyplývaly z výsledkové části.

Práce si kládla za cíl vylepšit studovanou skupinu inhibitorů z hlediska specifity proteas z rodiny rhomboidů za účelem studia jejich biologických rolí a farmakologického testování. Zejména k tomuto záměru se váží níže uvedené dotazy.

1. V diskuzi na str. 46 poukazujete, že i když jsou některé Vámi testované varianty peptidyl α -ketoamidového inhibitoru (například zde uvedený inhibitor **22**) více potentní *in vitro* než varianta inhibitoru **11** (z publikace Tichá et al. 2017a), ze kterého návrh vycházel, *in vivo* inhibiční konstatny jsou horší než u inhibitoru **11**. Můžete na základě získaných dat navrhnout, jak by bylo možné směřovat vylepšení těchto vlastností (z hlediska membránové propustnosti a *in vivo* stability) v peptidylové části inhibitoru a v oblasti koncového substituentu amidického dusíku?
2. V cílech práce je uvedeno, že inhibitory budou dále použity pro studium biologických rolí rhomboidových proteas. Můžete prosím popsat strategii těchto pokusů

v případě bakteriálního GlpG?

3. Na straně 47 je uvedeno, že v další fázi práce budou varianty Vámi charakterizovaných inhibitorů testovány proti vybraným lidským homologům rhomboidových proteas. Jaké jsou sekvenční homologie těchto vybraných proteas s bakteriální GlpG? Dále by mě zajímalo, jestli jsou rhomboidové pseudoproteasy (které se hojně vyskytují v eukaryotických organismech) významně odlišné z hlediska sekvenční homologie od aktivních proteas a jestli lze očekávat zkříženou reakci u některých inhibitorů.

4. V úvodu na straně 2 je zmíněn evoluční model rhomboidových proteas (jako “the proposed evolution model”), podle kterého se tyto proteiny vyvinuly z proteolyticky neaktivní formy v době před společným předchůdcem, tedy LUCA. Jiná studie z roku 2003 (Koonin et al. 2003, která je v práci také citována v jiném kontextu) ale uvádí zcela jinou teorii původu těchto proteinů. Podle fylogenetické analýzy z této studie může za téměř univerzální výskyt rhomboidových proteas horizontální genový transfer a studie tak předkládá teorii o bakteriálním původu těchto proteinů s pozdější ztrátou proteolytické aktivity u některých eukaryotických variant. Nestudovala jsem tyto články podrobně, ale zajímalo by mě, proč jste vybral zrovna tu první ze zmíněných teorií a je-li teorie z článku Koonin et al. považována za vyvrácenou a případně z jakých důvodů.

Na závěr předloženou diplomovou práci magisterského studijního oboru Imunologie, Katedry buněčné biologie, PŘF UK plně doporučuji k obhajobě.



V Praze 4.9.2019

Klára Hloučová PhD