

## Oponentský posudek na disertační práci „Nové inhibiční mechanismy regulace aktivity katepsinu D“.

Autorka práce: Mgr. Iva Hánová, PŘFUK, Praha; studijní program/obor: Biochemie

Datum odevzdání/obhajoby: 2020/2021

Posudek vypracoval: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D., Katedra parazitologie PŘF UK, Praha

Předložená disertační práce zahrnuje výsledky více než desetiletého výzkumu zaměřeného na dosud neznámé či málo známé mechanismy inhibice aspartických peptidas pepsinové rodiny, konkrétně lidského a klíštěcího katepsinu D. V případě lidského KatD se zaměřila jednak na vytipované potenciální endogenní inhibitory ze skupiny sfingolipidů, jednak na konstrukci optimalizovaných mimetických inhibitorů na bázi bakteriálního inhibitoru aspartických peptidas - pepstatinu. V případě IrKatD1 se zaměřila na nově objevený mechanismus alosterické inhibice enzymové aktivity zprostředkovaný N-terminálním oktapeptidem vlastní prosekvence enzymu.

Práce byla připravena obvyklým způsobem, tj. zahrnuje český a anglický abstrakt, teoretický literární úvod v rozsahu 28 stran, jasně formulované cíle práce, stručný přehled používaných metod, tři původní publikace v mezinárodních impaktovaných časopisech, závěrečnou shrnující diskusi, stručné závěry a prohlášení spoluautorů podepsané školitelem o významném podílu kandidátky na přípravě publikací zahrnutých v práci. Tím jsou splněny formální požadavky kladené na tento typ prací.

Teoretický úvod do problematiky je sepsán čtivou formou a je vhodně doplněn vysvětlující obrazovou dokumentací. Je založen na slušném počtu 211 citací, které jsou relevantní a při namátkové kontrole jsem nenašel chyby v jejich použití či zahrnutí do seznamu literatury. Text je informativní, má jasný vztah k přiloženým autorčiným původním publikacím a nezabíhá do zbytečných podrobností. Je přehledně členěn na podkapitoly. Ačkoliv je text psán česky (což je spíše s podivem, u disertační práce bych spíše předpokládal angličtinu), obsahuje jisté množství gramatických chyb, zejména co se týče patřičného skloňování přívlastků ve shodě s pádem podmětu, některé překlepy, chyby v interpunkci, v psaní latinských názvů organismů, ve skloňování podstatných jmen (nesprávné rody přejatých slov, správně palpa - palpami, chelicera - chelicerami, homolog – homology, viz str. 27 poslední věta + Diskuse první věta), nejednotnost v psaní výrazů (vitelin x vitellin, caspasa x katepsin) a dalších. Míra těchto chyb však není nijak extrémní a nezpůsobuje problémy s porozuměním textu. Nedostatky jsou víceméně formálního charakteru, odborná úroveň textu je na velmi dobré úrovni. Zmíním pár drobnějších faktických připomínek: 1) zbytečné používání pleonasmů atributivního charakteru – spojení „parazitické motolice“ a „parazitických klíšťat“ (str. 13 odst. 2 a str. 26 kapitola 1.3) – všechny motolice a všechna klíšťata jsou parazitické organismy bez výjimky, neznáme neparazitické zástupce; 2) str. 5 poslední věta – informace se týká i parazitických červů (helmintů), kteří jsou zde úplně opomenuti; 3) str. 15 druhá věta – podle mne zde chybí citace (psáno „podle některých studií“, ale není uveden ani příklad); 4) kapitola 1.3.3 v nadpisu uvádí, že se bude týkat katepsinu D1 z *Ixodes ricinus*, ale hned v druhé větě je uveden „*Boophilus yokl procathepsin*“ – v této kapitole nebo v úvodu ke klíštěcí problematice by bývalo bylo vhodné zmínit, že se výzkum (nejen) peptidas provádí i na jiných rodech a druzích klíšťat, která rovněž mohou být vektory jiných důležitých onemocnění člověka a zvířat. Některé další nepřesnosti si nechávám nakonec ve formě otázek pro kandidátku obhajoby. Nicméně pro upřesnění musím uvést, že žádná z těchto mých připomínek nezpochybňuje zásadně kvalitu této části práce.

Všechny tři publikace, které jsou součástí této disertační práce, považuji za velmi kvalitní, o čemž svědčí i relativně vysoké impakt faktory časopisů, ve kterých byly vydány (Biochim Biophys Acta 4,4;

Cell Chem Biol 6,8; J Med Chem 6,1). Kandidátka je přitom prvním autorem dvou z nich, což dokládá její zásadní podíl na těchto publikacích. Je evidentní, že si během postgraduálního studia osvojila řadu moderních metod molekulární biologie, proteinové biochemie, enzymologie a strukturní chemie. Měla přitom možnost se zapojit do práce laboratoří na ÚOCHB a stát se platným členem kvalitního vědeckého týmu. Získané výsledky, jež zde nebudu opakovat, protože jsou mj. velice pěkně shrnuty v závěrečné diskusi a závěrech disertační práce, považuji za velice přínosné jak v oblasti základního výzkumu vlastností aspartických peptidas, rozšíření znalostí o spektru endogenních i exogenních (včetně mimetických) inhibitorů a o mechanismech inhibice, tak v oblasti možných budoucích (bio)medicínských aplikací.

Připomínku mám ke kapitole Diskuse, kde jsou sice přehledně shrnuty významné výsledky celé práce, avšak diskusní část je minimální. Chápu, že je zbytečné opakovat bohatou a relevantní diskusi obsaženou v publikacích, ale autorka se mohla např. pokusit zasadit práci do širšího kontextu výzkumu aspartických peptidas, případně nastínit budoucí směry výzkumu a zatím nevyřešené otázky.

Závěrem konstatuji, že přes veškeré mé dílčí připomínky, které jsou většinou formálního charakteru, považuji práci celkově za velice kvalitní, rozhodně nadprůměrnou, a s klidným svědomím ji mohu vřele doporučit k obhajobě jako podklad pro získání vědeckého titulu Ph.D.

Ke kandidátce mám několik dotazů:

- 1) Jaký byl důvod k sepsání disertační práce v českém jazyce a jaký byl tedy váš reálný podíl na sepsování anglického textu publikací?
- 2) Na str. 13 uvádíte: „SmKatD2 byl nalezen v dospělých parazitech, SmKatD3 v larvách schistosomulách“. Jedná se o poměrně rozšířenou nepřesnost, resp. chybu, bohužel i v parazitologických kruzích. Z ontogenetického hlediska – jaké stadium je skutečnou larvou schistosom (i ostatních motolic)? A jak jinak by bylo správnější nazvat stadium schistosomul?
- 3) Na str. 31 (Cíle) uvádíte, že u vyšších organismů nebyly dosud objeveny endogenní inhibitory katepsinu D. Jak je v v případě PDI z lilku bramboru a vlastního KatD u této rostliny? Slouží tento inhibitor Kunitzova typu (a jiné inhibitory rostlinných aspartických peptidas) pouze k ochraně před hmyzem (díky inhibici trypsinu)? Využívá hmyz při trávení proteinů ve střevě KatD nebo jiné aspartické peptidasy? Mohou být rostlinné inhibitory aspartických peptidas vstřebávány herbivorním hmyzem ze střeva do hemolymfy a ovlivňovat správné procesování vitelogeninu/vitelinu?
- 4) Domníváte se, třeba v kontextu vašich výsledků s lidským KatD a jeho abundancí v organismu, že makrocyclická mimetika pepstatinu by byla vhodnou cestou k vývoji nových antiparazitik či parazitostatik, třeba i v kombinaci s K11777 inhibitorem některých parazitárních cysteinových katepsinů?

Dne 27. 3. 2021

Libor Mikeš