

**Posudek doktorské disertační práce Mgr. Miroslavy Rovenské s názvem:
„Structural studies and tissue distribution of human glutamate carboxypeptidase II and
characterization of its rat and porcine orthologs“**

Hlavním obsahem předkládané anglicky napsané disertace jsou 3 publikace zabývající se enzymem glutamát karboxypeptidázou II (GCP II), které vyšly v l. 2007 a 2008 v mezinárodních impaktovaných časopisech *The Prostate*, *J. Med. Chemistry* a *J. Molecular Biology*. Práce jsou vždy, jak dnes ani nemůže být jinak, výsledkem týmového úsilí několika členů oddělení doc. J. Konvalinky, CSc. z ÚOCHB, v.v.i., AVČR, které se daným enzymem úspěšně zabývá již několik let. Disertace je uvedena stručným ale zasvěceným rozbořením problematiky a současných znalostí, každý z článků pak nástinem jeho účelu, výčtem dosažených výsledků event. postupů a krátkou úvahou o jejich významu a souvislostech. Na závěr je disertace doplněna celkovou stručnou a zdařilou diskusí výsledků obsažených ve všech třech publikacích. U každé z publikací se uvádí konkrétní podíl disertantky.

Na první práci s názvem „Tissue Expression and Enzymologic Characterization of Human Prostate Specific Membrane Antigen and Its Rat and Pig Orthologs“ (*The Prostate*, 2008) je M. Rovenská prvním autorem. Jak uvádí, provedla v ní všechna kinetická měření a imunochemické analýzy, což také představuje hlavní část této publikace. Proto se jí budu v otázkách a poznámkách také zabývat nejvíce neboť jak uvádí, její podíl na zbývajících dvou pracích byl sice také významný ale menší.

Není pochyb o tom, že GCP II je důležitým enzymem v lidském organismu a tak i významným potenciálním cílem pro diagnostiku a farmakologickou intervenci. Proto je nutno objasnit jeho strukturu, charakterizovat enzymatickou aktivitu a mechanismy jeho interakce se substráty a inhibitory i poznat jeho distribuci a expresi v jednotlivých tkáních. Tím vším se také disertantka zabývá ve své práci a o kvalitě dosažených výsledků už jasně svědčí jejich publikování v mezinárodních časopisech s velmi lichotivými IF (3,724; 5,115; 4.89). Vedle molekulární charakterizace katalytického místa GCP II a jeho flexibility založené zejména na krystalových strukturách enzymu s různými inhibitory, což jsou výsledky důležité nejen pro základní výzkum, ale i farmakologii (práce v *J. Med. Chem.* a *J. Mol. Biol.*), upozorňuje pak práce v *The Prostate* na další závažné skutečnosti. Jednou z nich je přítomnost GCP II ve většině z 21 testovaných tkáních u lidí a dále fakt, že ačkoliv z hlediska aktivity se lidská, prasečí či krysí GCP II asi mnoho neliší, tkáňová distribuce lidské GCP II se mnohdy zásadně liší od distribuce GCP II u obou běžně používaných modelových zvířecích organismů. Všechny tyto nálezy tak představují jak významný přínos pro racionální navrhování nových ligandů/inhibitorů, kterými by se dala GCP II řídit, tak zároveň upozorňují jaké skutečnosti je nutno mít na zřeteli při jejich event. zkoušení a aplikaci *in vivo* či diagnostickém využití.

Dotazy a poznámky:

- 1) Ví se něco o nějakém příčinném vztahu mezi zvýšenou expresí GCP II a rozvojem nádorového onemocnění v prostatě u lidí? Tj. např. dochází také ke zvýšení produkce glutamátu? Prosím o komentář a to i v souvislosti s tím, že při poškození neuronů vede zvýšená produkce glutamátu k neuronové smrti (obr. 12) a ne k proliferaci. Z toho hlediska je také velmi zajímavá zmínka uvedená v disertaci v úvodu, že karcinom prostaty nebyl popsán ani u opic ani u prasat a to spolu s malou nebo žádnou expresí GCP II. Nicméně na obr. 3, v článku disertantky v časopise *The Prostate*, se exprese GCP II v prostatě prasat detekuje. Vysvětlení?

- 2) Jak uvedeno v disertaci, průměrná intracelulární koncentrace glutamátu v mozku činí 11 mM. Jaká je asi koncentrace jeho prekursoru NAAG při uvolnění v synapsích?
- 3) Jaká je stabilita, poločas aktivity GCP II samotné a ve tkáních a jaká je stabilita její mRNA?
- 4) Jaká je aktivita nezkrácené intaktní hGCP II ve srovnání s rekombinantní zkrácenou hGCP II, která se zřejmě v disertaci používá? Je tato zkrácená forma hGCP II použita i jako standard v obr. 2 v čl. z The Prostate?
- 5) Neexistuje někde nějaký přirozený (bílkovinný) inhibitor GCP II jak je to obvyklé u proteáz?
- 6) V úvodu, str. 23 se tvrdí, že v endotheliálních buňkách vaskulatury normálních tkání se nedá detekovat ani PSMA mRNA ani PSMA protein. V obr. 3, v článku v časopisu The Prostate se však detekce PSMA v endothelu kapilár lidských ledvin popisuje. Jak to tedy je?
- 7) Pokusil se někdo o přípravu organismu s KO genem pro PSMA nebo alespoň o knock-down tohoto genu?

Závěr: Předložená disertace Mgr. Rovenské přináší originální a cenné vědecké výsledky, prokazuje její orientaci ve studované vědecké problematice, osvědčuje její schopnost provádět samostatnou experimentální práci i schopnost kritické interpretace a zhodnocení dosažených výsledků. Proto práci plně doporučuji k obhajobě a dalšímu řízení k udělení hodnosti PhD.

V Praze dne 12.5. 2008

Profesor MUDr. Jiří Jonák, DrSc.