

Posudek habilitační práce RNDr. Pavlína Maloy Řezáčové, Ph.D.

Structure-assisted design of enzyme inhibitors

v oboru **Biofyzika**, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Habilitační práce RNDr. Pavlína Maloy Řezáčové, Ph.D. se věnuje designu a vývoji inhibitorů enzymů na základě strukturně biologických dat. Enzymy, které se podílejí na vzniku patologických stavů, jsou vhodným cílem terapeutického zásahu. Znalost třídimensionální struktury těchto enzymů na atomární úrovni a zejména pak strukturní podstaty interakcí těchto enzymů s příslušnými substráty či modulátory je mocným nástrojem pro racionální vývoj specifických a účinných inhibitorů. Dr. Maloy Řezáčová a její skupina se této problematice soustavně věnuje řadu let, přičemž hlavní pozornost byla věnována designu a vývoji inhibitorů HIV proteasy, lidských karbonanhydras a lidských 5'(3')-deoxynukleotidas. V případě HIV proteasy Dr. Maloy Řezáčová a její spolupracovníci připravili a strukturně charakterizovali komplexy tohoto enzymu s inhibitory na bázi metalokarboranů a ukázaly, že tyto látky jsou schopné specificky inhibovat HIV proteasu s nanomolární afinitou. Rentgenostrukturní analýza ukázala unikátní formu interakce těchto látek s HIV proteasou, která zajišťuje inhibiční účinnost i v případě rezistentních (mutovaných) variant HIV proteasy. Dalšími enzymy, kterými se tým Dr. Maloy Řezáčové zabýval, byly lidské karbonanhydrasy. Tyto metaloenzymy hrají důležitou roli v řadě lidských patologií, z terapeutického hlediska je pak zajímavá zejména isoforma IX, která se používá jako tumorový marker několika typů nádorů. Zde se týmu Dr. Maloy Řezáčové podařilo připravit a strukturně charakterizovat specifické inhibitory isoformy IX karbonanhydrasy (CAIX) na bázi karboranového klastru s navázanou sulfonamidovou skupinou. Poslední část habilitačního spisu Dr. Maloy Řezáčové tvoří publikace týkající se designu inhibitorů lidských 5'(3')-deoxynukleotidas, tedy enzymů katalyzujících defosforylaci deoxyribonukleosid-monofosfátů na příslušné deoxyribonukleosidy. Tyto enzymy jsou však odpovědné i za deaktivaci analog nukleosidů využívaných v terapii virových a nádorových onemocnění. V rámci této části se týmu Dr. Maloy Řezáčové podařilo připravit nanomolární inhibitory těchto enzymů a strukturně charakterizovat vazebné interakce inhibitorů s enzymem. Tyto informace budou následně využity v dalších studiích.

Habilitační práce se skládá z 19 stran úvodního textu a devíti klíčových původních prací, které Dr. Maloy Řezáčová a její kolegové publikovali na vybrané téma. Jedná se o publikace otištěné ve velmi kvalitních zahraničních časopisech, např. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *Journal of Medicinal Chemistry* či *Angewandte Chemie International Edition*. V databázi Web of Science je pod jménem Dr. Maloy Řezáčové evidováno ke dni zahájení habilitačního řízení (únor 2019) 106 záznamů (z toho 85 původních článků), které získaly 1303 citačních ohlasů bez autocitací, Hirschův index kandidátky byl 20. Mezi nejvíce citované patří publikace v *PNAS USA* týkající se designu inhibitorů HIV proteasy na bázi metalokarboranů, která byla citována 197x. To vše svědčí o tom, že práce Dr. Maloy Řezáčové a jejích spolupracovníků významně přispěla k problematice vývoje inhibitorů vybraných enzymů a získala značnou pozornost vědecké komunity v oboru.

Předložená habilitační práce jednoznačně ukazuje, že Dr. Maloy Řezáčová patří mezi přední strukturální biologky a to nejen v rámci České republiky, ale i v mezinárodním kontextu. Je expertkou na krystalizaci a rentgenostrukturální analýzu proteinů a jejich komplexů a aplikaci strukturálních dat při racionálním designu inhibitorů. Metodický záběr Dr. Maloy Řezáčové je však mnohem širší, kromě rentgenostrukturální analýzy využívá i metody jaderné magnetické resonance či kryoelektronové mikroskopie. V komunitě strukturálních biologů je Dr. Maloy Řezáčová také velmi ceněna i pro svoji pedagogickou činnost, neboť se již řadu let systematicky věnuje výuce metod řešení 3D struktury makromolekul na Přírodovědecké fakultě UK v Praze a spoluorganizaci mezinárodních FEBS pokročilých krystalizačních kurzů „Advanced methods in macromolecular crystallization“.


K předložené habilitační práci mám několik dotazů, které jsou spíše náměty do diskuse:

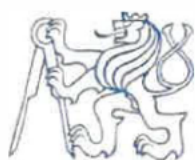
1. Pokračuje výzkum inhibitorů HIV proteasy a CAIX na bázi karboranů? Pokud ano, jaké jsou nejnovější výsledky? Pokud ne, co bylo důvodem přerušení tohoto výzkumu?
2. Byly při designu inhibitorů popsanych v habilitačním spisu použity přístupy založené na testování knihoven malých fragmentů? Myslíte, že je tento přístup produktivnější než testování knihoven „větších“ molekul?
3. Při racionálním designu popisovaných inhibitorů byly využity metody výpočetní chemie. Jaká byla shoda teoretických predikcí s experimentálními daty (např. výsledky molekulového dokování vs krystalové struktury).

Shrnutí posudku:

Závěrem konstatuji, že habilitační práce RNDr. Pavlína Maloy Řezáčové, Ph.D. rozsahem i kvalitou splňuje kritéria kladená na tento typ práce a udělení vědecko-pedagogické hodnosti docent a plně ji doporučuji k obhajobě.

Dne 3. září 2019


prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy



Oponent's review of Habilitation thesis of Pavlína Maloy Řezáčová

Structure-assisted design of enzyme inhibitors

in the field of Biophysics, Faculty of Science, University of South Bohemia in
České Budějovice

The thesis „*Structure-assisted design of enzyme inhibitors*“ briefly describes the application of structural approaches to design new inhibitors. All inhibitors mentioned in the thesis have potential in medical applications.

The thesis consists of brief Introduction (2 pages), Results (11 pages) divided into three sections (each supported by three papers), Summary and future perspective (2 pages), References and attached papers.

The introduction contains a brief overview of the methods and motivation for the thesis. Although this part is rather short, it contains all necessary information for further reading and evaluation of the following text.

Part Results is divided into three sections related to inhibition of three groups of enzymes with an application potential: HIV proteases, human carbonic anhydrases, and human 5'(3')-deoxynucleotidases. The thesis highlights novel inhibitors, especially the carborane inhibitors of the first two target enzymes. This observation has enhanced our understanding and possibilities to inhibit enzymes extensively.

The content of the thesis strongly depends on the availability of crystal structures that have been solved. My inspection of a few of the structures convinced me about the high quality of the crystallographic work that has been done and for which the applicant was responsible. All other work mentioned in the thesis fits well to the field of Biophysics and declares the high scientific quality of the applicant.

The level of the thesis is high and all results are supported by peer-reviewed publications in high-quality journals. Therefore, I have no question that would have to be answered before my recommendation to accept the thesis or not. Still, I have three questions beyond the scope of the thesis:

- 1) What is the global health risk of future application of the carborane inhibitors?



CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF NUCLEAR SCIENCES
AND PHYSICAL ENGINEERING



Břehová 7 115 19 Praha 1

- 2) How difficult it is to prepare specific modifications of the carborane inhibitors for further studies and improvement?
- 3) What is the reason for unfavourable pharmacokinetic properties of compounds containing the phosphonic acid moieties? Is it the chemical instability or rather a low efficiency to penetrate the cell membrane?

Summary of the review:

I recommend the acceptance of the habilitation thesis of Pavlína Maloy Řezáčová. The thesis is novel, supported by high impact publications, and declares high scientific profile of the candidate in the field of Biophysics.

Date 1.8.2019



doc. Ing. Petr Kolenko, Ph.D.,
FNSPE CTU

Posudek habilitační práce RNDr. Pavlína Maloy Řezáčové Ph.D.

Structure-assisted design of enzyme inhibitors

v oboru Biofyzika habilitačního řízení, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Téma a aktuálnost habilitační práce. Habilitační práce Mgr. Pavlína Maloy Řezáčové shrnuje devět původních vědeckých prací, které se zabývají strukturními aspekty návrhů léčiv cílených proti třem enzymům. Všechny tři jsou důležitými léčebnými cíli. Enzymy jsou obecně dobrými cíli pro struktorou inspirovaný návrh léčiv zejména proto, že mají dobře charakterizované a obvykle strukturně definované aktivní místo, na které se obvykle návrhy inhibitorů a potenciálních léčiv soustředí. Z tohoto pohledu je vědecký program autorky dobře cílený a dlouhodobě udržitelný.

Formální zpracování habilitační práce. Po stránce formální má disertační práce vysokou úroveň. Je napsaná formou komentáře k devíti publikovaným pracem a to dobrou angličtinou. Důraz je kladen na metodologii stanovení struktur pro návrh ligandů, typicky inhibitorů, enzymů a to zejména metodou X paprskové krystalografie. Všechny studie jsou ale multidisciplinární, doplněny biofyzikálními daty a většinou i daty biologickými.

Výsledky vědecké práce. Habilitační práce se věnuje strukturním studiím tří důležitých enzymů, HIV proteázy, lidské karbonické anhydrázy a lidské deoxynukleázy.

Oblast studia HIV proteázy a její inhibice je téma tradičně pěstované na ÚOCHB. V práci jsou prezentované novější výsledky, kdy se jako hlavní molekula pro další farmakologický výzkum ("lead compound") začaly na ÚOCHB studovat různě substituované metalokarborany. V této oblasti přinesla studia z laboratoře vedené autorkou několik vysoce rozlišených struktur komplexů proteáza-inhibitor. Ty pomohly pochopit základní módy interakce metalokarboranů jako nového a nekonvenčního typu inhibitoru a rovněž vedly k návrhu nově substituovaných metalokarboranů s vyšší afinitou.

Úspěšné zavedení metalokarboranů jako inhibitorů zjevně inspirovalo k jejich aplikaci na inhibici lidské karbonické anhydrázy. Z několika isoform tohoto enzymu je důležitá inhibice isoformy IX (CAIX), která může přispět k recesi rakovinného bujení. Současné inhibitory CAIX ale mají nedostatečnou specifitu, a inhibice několika isoform současně vede k nežádoucím vedlejším účinkům. Jako v případě HIV proteázy, byly i při hledání specifických inhibitorů CAIX použity krystalové struktury. Jejich vyřešení vedlo k návrhům inhibitorů s vyšší afinitou i specifitou k CAIX. Některé z těchto nově navržených inhibitorů CAIX byly patentovány a probíhá na nich preklinický výzkum.

Třetím enzymem dlouhodoběji studovaným v laboratoři autorky je lidská 5'(3')-deoxynukleotidáza. Vysoká aktivita tohoto enzymu, který katalyzuje defosforylaci mononukleotidů, vede ke vzniku rezistence k anti-HIV virostatikům. Strukturní studie z laboratoře autorky vedly k hlubšímu pochopení specifických interakcí inhibitorů se dvěma isoformami tohoto enzymu, cytosolickou a mitochondriální. Kombinace strukturních a biofyzikálních studií a biologických testů vedly k návrhům série nových inhibitorů, které mají vysokou afinitu a větší specifitu k cytosolické formě, která je pro potlačení rezistence důležitější.

Pedagogická činnost. Autorka je od roku 2003 garantem semestrální přednášky Určování trojrozměrné struktury makromolekul na Přírodovědecké fakultě UK. Předmět je nabízen Katedrou biochemie a je přednášen autorkou spolu se dvěma kolegy.

Významná a rovněž dlouhodobá (od roku 2001) je aktivita autorky při organizování kurzů o krystalizačních technikách. Kurzy jsou spoluorganizovány JU (doc. Kutá-Smatanová) v Univerzitním

a akademickém centru Nové Hrady. Protože jde o "FEBS advanced courses", jedná se o významnou aktivitu s výrazným mezinárodním přesahem.

Autorka je školitelka studentů bakalářského (tři absolventi), magisterského (čtyři absolventi) a postgraduálního (dva absolventi) studia na Univerzitě Karlově.

Poznámky a otázky. U CA je z lékařského hlediska nutné cílit zejména na isoformu CAIX. Reportované krystalové struktury jsou komplexy inhibitorů s isoformou CAII. Byla důvodem špatná krystalizace inhibitorů s CAIX?

Jaké perspektivy vidí autorka pro budoucí spolupráci s JU? Bude pokračovat v organizaci kurzů FEBS, plánuje rozšířit svou pedagogickou aktivitu na výuku na JU?


Shrnutí posudku:

Autorka výrazně překračuje Doporučená kritéria pro úspěšné habilitační řízení na PŘF JU, zejména v počtu publikací, hodnotou Hirschova indexu a počtem citací svých prací.

Důležité je, že se autorka dlouhodobě systematicky věnuje oblasti pedagogické práce. V první řadě je garantkou předmětu na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Na UK Praha rovněž školí bakalářské, diplomové, i postgraduální studenty. Ve spolupráci s JU spoluorganizuje mezinárodní pokročilé kurzy FEBS.

Z těchto důvodů doporučuji udělit Mgr. Pavlíně Maloy Řezáčové titul docent před jménem.

Dne 26. srpna 2019


Bohdan Schneider
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.