

Oponentský posudek disertační práce Dany DOUDĚROVÉ „Structural-function correlations of hydroxymethylbilane synthase“

Disertační práce Dany Douděrové, rozené Ulbrichové, se zabývá vysoce aktuální problematikou, která významně přispívá k rozvoji několika biomedicínckých vědních disciplin. Konkrétně především biochemie a molekulární biologie. Disertační práce se zabývá poznáním genetických změn (mutací v DNA) jednoho z klíčových enzymů biosynthesy hemu, hydroxymethylbilan synthasy (HMBS), u pacientů trpících akutní intermitentní porfyrií (AIP). Tato choroba, řazená mezi akutní jaterní porfyrie, je totiž u pacientů způsobena nižší aktivitou uvedeného enzymu. Zajímavou skutečností pak je, že genetické změny v genu HMBS jsou násobné a je stále diskutabilní, které z nich jsou pro chorobu stěžejní. Pochopitelné je, že podstatná pro pacienty trpící AIP (a jejich blízké příbuzné) je včasná diagnostika choroby. Dosud používané metody jsou však poněkud náročné a ne vždy dostatečně sensitivní. Molekulární analýza DNA pacientů trpících AIP (DNA diagnostika), která byla zvolena pro detekci genetických změn v genu HMBS již dříve v písemnictví uvedených či originálně poznaných mutací v genu tohoto enzymu, je metodou pro identifikaci potenciálních pacientů navýsost vhodnou. V průběhu vypracovávání disertační práce byla navíc úspěšně použita (vyvinuta) metoda nové generace, jmenovitě metoda „High-resolution melting“ (HRM). Ta významně zvyšuje citlivost a snižuje časovou i finanční náročnost diagnostiky. Práce kolegyně Douděrové navíc nezůstává pouze na úrovni sledování mutací DNA v genu enzymu, zabývá se též podstatou změn v proteinové struktuře (a následně i enzymové aktivitě) HMBS. Jedná se tedy o vysoce komplexní studii na špičkové světové úrovni. O tom též vypovídá mezinárodní rámec týmu, který na studii, jež kolegyně Douděrové v disertační práci prezentuje, participoval. Disertace byla vypracována nejen v laboratořích 1. Lékařské fakulty University Karlovy v Praze, ale i za součinnosti laboratoří řady vědeckých institucí Slovenské republiky, USA, Indie, Švýcarska a Izraele.

Vědecká práce D. Douděrové byla konkrétně zaměřena na testování genetických změn v genu HMBS pacientů z rozličných koutů světa (např. Indie, Slovenská republika, Izrael) a po poznání nových, dosud nepopsaných mutací v genu tohoto enzymu připravila v prokaryotickém expresním systému proteiny mutovaných enzymů. Ty pak charakterizovala pomocí strukturních analýz a enzymově-kinetických studií. Objem experimentální práce kolegyně Douděrové je obdivuhodný.

Význam výsledků získaných v průběhu vypracování disertační práce podtrhuje úspěšnost publikačních aktivit Dany Douděrové. Výsledky práce byly publikovány v šesti původních

vědeckých prací v časopisech s výbornými hodnotami impaktového faktoru. Rukopis další publikace je připraven k odeslání. Dana Douděrová je první autorkou ve třech publikovaných pracích, v jedné je prvou autorkou spolu s dalším pracovníkem (X. Schneider-Yin). Spoluautorkou je rovněž na jedné publikaci identifikující nové mutace a na dvou takovýchto reportech zaslaných k publikaci. Výsledky práce tedy prošly celou řadou náročných recenzních řízení a není k nim téměř co dodat. To vše ilustruje, že kolegyně Douděrová dosáhla skutečně úctyhodných výsledků, a že zvolené téma disertační práce jí řešené je opravdu aktuální.

Z disertační práce je patrné, že autorka je velmi zdatnou experimentátorkou, která ovládá širokou paletu experimentálních metod užívaných ve špičkovém výzkumu. Vysoká metodická úroveň experimentální práce pak byla zárukou pro získání hodnotných výsledků, které významně rozvíjejí základní teoretické poznání. Výsledky disertační práce Dany Douděrové, dle mého názoru, plně odpovídají vytčeným cílům. Práce přináší původní vědecké výsledky, které byly, jak již bylo uvedeno, publikovány. Z práce je zcela patrné, že autorka pracovala v badatelských týmech světově špičkové vědecké úrovně, což tvoří významný předpoklad i pro její další odborný růst.

Disertační práce Dany Douděrové sestávající z textu čítajícího 64 stran a příloh publikací již uveřejněných či k publikaci zaslaných, je jak po stránce formální tak i obsahové velmi pěkně vypravena. Je psána v angličtině, což bylo nutné vzhledem k mezinárodnímu rámci jejího doktorského studia. I když již výsledky byly většinou publikovány, je psána téměř klasickým způsobem, používaným pro doktorské disertační práce (Úvod, Výsledky a diskuse a Závěr). Metodická část není presentována, neboť je detailně popsána v publikacích tvořících přílohy práce. Získané výsledky jsou v disertační práci adekvátně hodnoceny a tvoří vysoce hodnotný základ pro rozvoj vědeckého bádání v této oblasti i do budoucnosti. Pro přehlednost rukopisu bych preferovala uvedení citované literatury hned za úvodní část práce, ne jako poslední část rukopisu. To však nijak nesnižuje vysokou úroveň a hodnotu rukopisu disertace.

K práci mám následující dotazy, které slouží především jako podklad pro následnou diskusi.:


- 1) Je možné posoudit, které z více jak 300 mutací v genu HMBS jsou stěžejní pro změnu v enzymové aktivitě enzymu provázející akutní intermitentní porfyrii (AIP)?
- 2) Mutanty proteinu enzymu HMBS byly exprimovány v prokaryotickém modelu *E. coli*. V čem spatřujete výhody a nevýhody tohoto modelu?

- 3) Je jasné, že struktura a funkce mutovaných enzymů v lidském organismu nejsou známy. Přesto by mě zajímalo jak vysokou korelaci předpokládáte ve struktuře a funkci (aktivitě) proteinů těchto enzymů exprimovaných v *E. coli* s enzymy pacientů?

Závěr

Disertační práce Dany Douděrové je vynikající vědeckou prací. Dle mého názoru práce rozhodně splňuje požadavky kladené na disertační práce obdobného typu. Přináší původní vědecké výsledky, které již také byly publikovány. Práci plně doporučuji k přijetí k obhajobě. Doporučuji rovněž, aby byl po úspěšné obhajobě předložené práce Dany Douděrové přiznán vědecký titul **Ph.D.**

V Praze, 5. 10. 2009


Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK