

## MOLECULAR MECHANISMS OF DIAMOND-BLACKFAN ANEMIA

Disertační práci z 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy jsem měl k dispozici jak v tištěné tak i elektronické formě. Byla vypracována v Laboratoři buněčné fyziologie na Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Školitelem byl RNDr. Jiří Petrák, CSc. Text je psán anglicky, celkový rozsah výtisk formátu A4 je 120 stran. Svým charakterem jde o souvislý vědecký text doplněný přílohami ve formě tří publikovaných prací. Členění zahrnuje abstrakt, cíle práce, obsah a předmluvu, kde se stručně píše o roli buněčných organel ribozómů, jejich stavbě a defektech biosyntézy, které souvisejí s poruchou tvorby ribozomálních proteinů. V úvodu koncipovaném jako přehled literatury související se studovanou problematikou se nejprve popisují ribozomy a jejich biogeneze. Následuje část věnovaná regulaci biosyntézy, kde jsou představeny kinasové regulační dráhy a zmíněna je role aktivovaného proteinu p53 při ribozomálním stresu. Představeny jsou nemoci, které s biogenezí ribozómů souvisejí, včetně Diamond-Blackfanovy anémie (DBA), jejíž molekulová podstata je předmětem disertace. Významnou kapitolou úvodní části je problematika krvetvorby, zejména pokud jde o červené krvinky, kde správný průběh vyžadující vysokou produkci hemoglobinu závisí na bezchybném ribozomálním aparátu. V závěru je detailně komentována DBA, její klinické symptomy, příčinné geny a terapie.

Výsledková část je uvedena tématem hledání nových defektů v genech kódujících ribozomální proteiny. Odtud se odvíjí vlastní příběh disertace, který shrnuje data získaná experimentální prací v laboratoři, kde byly analyzovány vzorky odebrané na základě dat z registru pacientů s DBA v ČR. Výsledky potom v detailu představují objev dalších genových příčin DBA, tedy mutace genů RPS17, RPL5 a RPL11. Objevena byla i záměna důležité aminokyseliny v argininmethyltransferase 3, která by mohla ovlivňovat metylaci proteinu RPS2. Na základě analýzy rekombinantních forem enzymu se záměnami této důležité aminokyseliny (původně Tyr87) měřením aktivity bylo možné posoudit důsledky mutace pro interakci methyltransferasy s RPS2 jako substrátem. Experimentální data jsou bohatě diskutována, přičemž diskuse je směřována k úvaze o nutnosti hledat příčinu DBA i mimo defekty v ribozomálních proteinech. Seznam citované literatury má více než 200 položek, většinou odkazujících na původní vědecké články, což je jistě chvályhodné.

Práce je psána čtivě a srozumitelně. Anglický jazyk je precizní a bezpochyby na vysoké úrovni. Chyby, které jsem našel, jsou víceméně formální jako je např. občas chybějící koncovka -s u přítomného času sloves ve třetí osobě jednotného čísla. K použití gramatických členů se jako nerodily mluvčí nemohu zodpovědně vyjadřovat, nicméně zejména pokud jde o používání neurčitého členu, našel jsem některá opomenutí. Chybí některé citace (např. [1]-[4] v úvodu textu), u kumulovaných citací se často nedodrhuje vzestupné číslování v závorkách, např. [157, 118, 132] na str. 56 namísto [118, 132, 156]. V úvodním přehledu ani výsledkové části s diskusí by rozhodně neměly být citovány práce, které tvoří podstatu disertace a zároveň jsou přílohami vlastního textu. Postrádám stručný komentář k tomu, jaká metodika byla k dispozici pro analýzu genových mutací, i když je možné ji *in extenso* dohledat v přílohách. Práci by rovněž slušel přehled použitých zkratk. Naopak, zpracování závěrečného shrnutí výsledků je adekvátně stručné a přitom vysoce informativní. Formální chyby jsem opravoval tužkou přímo v textu.

*Dotaz: Záměna Tyr za Cys v methyltransferase projeví v rozdílné hodnotě  $pK_a$ . Bylo zjištěno, že aktivita enzymu s Cys je výrazně snížena, to však může být důsledkem změny  $pH$  optima enzymu. Byla tato možnost při měření aktivity rekombinantních mutantů ověřována?*

Závěrem mohu konstatovat, že disertace přináší kvalitní a originální výsledky, které již z části byly publikovány ve vědeckých časopisech a jsou proto přínosem pro obor lékařské chemie a biochemie. Výstupy svědčí o zvládnutí požadavků na zpracování informací, plánování experimentů, samostatnou a reprodukovatelnou vědeckou práci v laboratoři, správné vyhodnocování výsledků a formulaci závěrů. Doporučuji přijetí práce k obhajobě a po úspěšném obhájení souhlasím s udělením titulu Ph.D. podle příslušného zákona o vysokých školách.