

Posudek na doktorskou dizertační práci Ing. Romana Vozdeka s názvem „The metabolism and signaling of hydrogen sulfide: the role of CBS-related proteins in *Caenorhabditis elegans*“

Předkládaná práce Ing. Romana Vozdeka se zabývá velmi aktuálním tématem funkce H₂S jako signální molekuly. Cílem práce bylo identifikovat a charakterizovat proteiny podílející se na metabolismu H₂S u modelového organismu *Caenorhabditis elegans*, kde metabolismus sirovodíku dosud popsán nebyl, a zhodnotit potenciál *C. elegans* jako modelového organismu pro lidské poruchy metabolismu sirovodíku. Hlavní část práce je věnována detailní charakterizaci strukturních a biochemických vlastností jednotlivých enzymů a jejich porovnání s ortology v jiných organismech. Tato část přinesla zcela nové poznatky o doménové struktuře a regulačních mechanismech enzymu cystathionin beta-syntázy, odhalila přítomnost nové třídy O-acetylserin(thiol)lyáz a popsala biochemické a strukturní vlastnosti jejích zástupců. V další části se autor věnuje sirovodíku jako signální molekule a popisuje zapojení proteinu CYSL-1 v jejím přenosu. Práce odhalila úlohu CYSL-1 v regulaci chování *C. elegans* v závislosti na koncentraci kyslíku a dále popsala mechanismus přenosu H₂S signálu v hypoxickém prostředí. Rovněž tyto výsledky jsou zcela nové a mají důležité implikace i pro patologické stavy u člověka. Poslední část představuje souhrnný přehled o účincích H₂S jako signální molekuly s analýzou využití modelu *C. elegans* k jejich studiu.

Vzhledem k tomu, že veškeré předkládané výsledky byly publikovány v kvalitních impaktovaných časopisech (včetně vysoce impaktovaných), kde prošly nezávislou oponenturou, nemám nejmenších pochyb o jejich kvalitě.

Po formální stránce je práce na vysoké úrovni, jedná se o soubor čtyř publikací doplněný o teoretický úvod, komentář k jednotlivým publikacím a závěrečné shrnutí s nástinem dalšího směru výzkumu. Teoretický úvod je dostatečně obsáhlý a přitom čtenáře nezahltí přemírou informací, takže i člověk neznalý metabolismu sirovodíku získá dostatečný základ pro pochopení dalšího textu. Text samotný je psán srozumitelnou angličtinou s minimem chyb a stylistických nedostatků, zarazil mě jen trochu netradiční formát citací v textu (příjmení autora včetně iniciál). U jednotlivých publikací by bylo také vhodné uvést, která část je vlastní prací autora, minimálně tam, kde to není uvedeno přímo v publikaci.

K práci mám několik doplňujících otázek:

1) V práci charakterizující CBS-1 je uvedeno, že gen F54A3.4 je pravděpodobně pseudogen. Toto tvrzení se opírá o řadu indicií. Jednou z nich je i nedetekovatelný kompletní transkript, nicméně na stránkách Wormbase je možné dohledat odkaz s detekcí transkriptu pomocí vnitřních primerů (mv_F54A3.e). Zajímalo by mě, zda existuje nějaký formální „checklist“, co musí gen splňovat (ev. nesplňovat), aby byl gen označen za pseudogen.

2) V řadě experimentů s *C. elegans* mě překvapilo použití relativně pracné techniky RNAi pomocí mikroinjekce. Jaký je fenotyp např. *cbs-1* RNAi metodou „feeding“?


3) Pro zavedení spolehlivého modelu nedostatečnosti CBS je zásadní získat kmen mutovaný v *cbs-1*. V kapitole 3.3 je zmíněno testování dostupných kmenů s missense mutacemi v *cbs-1*. Jaká je pravděpodobnost, že některá z těchto mutací skutečně funkčně zasáhne CBS-1 protein? Nestálo by za úvahu vytvořit deleční alelu nebo využít nejnovějších postupů (TALEN/CRISPER) k vytvoření cílených mutací, které by gen inaktivovaly, případně kopírovaly mutace nalezené v pacientech?

4) Existují nějaká data o H₂S signalizaci u dauer larev? Liší se exprese CBS-like enzymů v tomto stadiu od jedinců v běžném reprodukčním cyklu?

5) Nakolik je odlišná doménová struktura CBS-1 proteinu a pravděpodobně odlišný mechanismus jeho regulace překážkou pro využití *C. elegans* jako modelu lidské CBS nedostatečnosti? Pro které aspekty lidské patologie tak může být tento model přínosný?

Závěr: Předložená práce dle mého názoru plně vyhovuje požadavkům na doktorskou dizertační práci, přináší nové a originální poznatky a dokládá schopnost autora samostatně vědecky bádát. Práci Ing. Romana Vozdeka proto doporučuji k obhajobě jako podklad pro udělení titulu Ph.D. za jménem.

V Praze 18.listopadu 2013


Marie Macůrková