

Posudek na disertační práci „Acetyl-CoA karboxylasa – evoluce a inhibice“ Mgr. Dominiky Chalupské

Disertační práce Mgr. Dominiky Chalupské je zaměřena na klíčový enzym metabolismu mastných kyselin – acetyl-CoA karboxylasu z hlediska evoluce a inhibice. Je to velmi zajímavá a aktuální problematika. Detailní studium tohoto enzymu na úrovni nukleové kyseliny či proteinu umožní nejen získání nových poznatků o jeho aktivitě, ale i jejich praktické využití.

Předložená disertační práce je psána formou komentovaného souboru publikací. Její součástí jsou 3 již publikované články. V úvodu (19 stran) autorka uvádí informace o struktuře, biochemii, biologické roli a regulaci acetyl-CoA karboxylasy u různých organismů a možnosti použití autorkou zjištěných mutací tohoto enzymu k rychlé detekci plevelných rostlin rezistentních vůči herbicidům. Tento enzym autorka také představuje jako vhodný cíl účinku léčiv proti obezitě u lidí. Dále se autorka věnuje problematice evoluce pšeničných genomů a možnosti využití genů kódujících acetyl-CoA karboxylasu pro rozšíření znalostí evoluce pšenice srovnávací analýzou genomu.

Použitá literatura je řádně citována. Mgr. Dominika Chalupská jasně definovala cíle své disertační práce.

Metodická část (2 strany) obsahuje stručný popis použitých metod. Detailní informace jsou uvedeny v příložených publikacích. Pozitivem práce jsou schémata jednotlivých genů, použitých konstruktů či schémata týkající se evoluce pšenice, která názorně dokumentují strategie a výsledky pokusů, často velmi složitých. Práce obsahuje řadu molekulárních a biochemických metod – izolaci BAC DNA, přípravu knihovny fragmentů BAC DNA, sekvenování, analýzu sekvencí, klonování, transformaci, selekci a sporulaci kvasinek, izolace proteinů a *in vitro* testování jejich enzymové aktivity a inhibice.

V kapitole výsledky a diskuse (22 stran) autorka popisuje přehlednou formou čeho při experimentální práci dosáhla. Experimentálních dat je uvedeno hodně, autorka zvládla širokou problematiku, pracovala s geny acetyl-CoA karboxylasy různých organismů, zejména s geny rostlin a člověka, byla použita celá řada konstruktů a inhibitorů tohoto enzymu. Autorka získala mnoho cenných informací a výsledků. Vedle časově náročné experimentální práce musím ocenit i teoretický přístup, patrný z komplexního přístupu autorky k řešení problematiky a hledání vzájemných souvislostí.

Disertační práce obsahuje závěr, seznam publikací a odborné literatury a 3 přílohy, které obsahují 3 již publikované články autorky.

Z Obr. 1.2. není zřejmé, co vyjadřují různé barvy porovnávaných částí acetyl-CoA karboxylasy. Doporučila bych toto specifikovat v popisu obrázku. Drobná připomínka se týká biotinu na str. 13, který je uveden jako vitamín B6 místo B7, občasných překlepů či chybějících čárek před spojkami v souvětích.

K disertační práci mám následující dotazy:

- 1) Jakým způsobem byla vložena kazeta s genem LEU2 do kódující sekvence genu acetyl-CoA karboxylasy?
- 2) Rozdělí se plazmid nesoucí cizí gen acetyl-CoA karboxylasy při sporulaci do haploidních buněk rovnoměrně?
- 3) Stačí pro získání rezistence vůči herbicidům pouze 1 zmutovaná alela? Pokud ano, vysvětlíte, proč zdravá alela nezastoupí funkci té zmutované. Je možné, aby se obdobné mutace objevily i u lidí např. působením nějakého léku a co by to mohlo mít za následek? Je známo, zda a jak se liší substrátová specifita zmutovaného enzymu vůči nezmutovanému?
- 4) Vysvětlíte, jak může být relativní optická hustota kultury záporná (str. 53, Obr. 4.10.)?

5) Výpočet doby oddělení genomů je založený na počtu neutrálních mutací. Jak lze rozlišit neutrální mutace od ostatních mutací?

6) V témže roce, kdy vyšla Vaše publikace o vysoce kapacitním testovacím systému pro identifikaci silných inhibitorů acetyl-CoA karboxylasy, australští vědci testovali vliv této inhibice na acetyl-CoA karboxylasu 2 u myši a zjistili, že sice došlo ke zvýšení oxidace mastných kyselin, ale zároveň se nevyužitě sacharidy či jiné metabolity přeměnily zpět na mastné kyseliny. Nedošlo ke změně energetické bilance. Po skončení testování se hmotnost těla pokusných zvířat tudíž nelišila od kontrolních myši. Potvrdilo se tedy to, že bez negativní energetické bilance, kdy výdej energie je větší než příjem, nelze zhubnout.– Víte o nějaké jiné publikaci, která by potvrdila či naopak vyvrátila výsledky této studie? Myslíte, že by se kromě blokování acetyl-CoA karboxylasy 2 mohlo ovlivnit ještě něco dalšího ve prospěch hubnutí?

Acute or Chronic Upregulation of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Has No Net Effect on Whole-Body Energy Expenditure or Adiposity

Kyle L. Hoehn, Nigel Turner, Michael M. Swarbrick, Donna Wilks, Elaine Preston, Yuwei Phua, Himani Joshi, Stuart M. Furler, Mark Larance, Bronwyn D. Hegarty, Simon J. Leslie, Russell Pickford, Andrew J. Hoy, Edward W. Kraegen, David E. James, and Gregory J. Cooney

Cell Metabolism 11, 70–76, 2010

Předložená disertační práce obsahuje mnoho nových vědeckých informací, které již byly publikovány v prestižním mezinárodním časopise a prošly recenzním řízením, a proto tuto kvalitní práci doporučuji přijmout k obhajobě a po uspokojivém zodpovězení dotazů doporučuji udělení titulu PhD. podle stávajícího vysokoškolského zákona a prováděcích předpisů MŠMT.

Dr.rer.nat.Ing. Helena Plchová
Laboratoř virologie
ÚEB AV ČR, v. v. i. v Praze

V Praze, 22. 11. 2012