

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jana Milichovského „Cílená mutagenese ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a jejich interakčních partnerů“

Disertační práce se zabývá velmi významnými proteiny cytochromy P450 (CYP), které se podílejí na metabolismu jak endogenních sloučenin (např. různých lipidů), tak rozsáhlé řady cizorodých látek, jako jsou léčiva, kontaminanty životního prostředí vyvolávající nádorové a jiné onemocnění.

Stěžejním cílem této práce bylo objasnění detailního mechanismu nitroreduktasové aktivity cytochromů P450 rodiny 1, při které se tvoří reaktivní produkty modifikující genetickou informaci buňky. K tomu účelu bylo zapotřebí provést heterologní exprese vybraných členů P450 rodiny 1, a dalších spolupracujících proteinů: cytochrom P450-NADPH reduktasy (CPR), cytochromu b5, NADH:cytochrom b5 reduktasy (CYB5R3). Také bylo třeba pro některé z nich pomocí metody cílené mutagenese připravit a exprimovat mutantní varianty. Všechny proteiny bylo třeba izolovat v aktivních formách a následně bylo nutné připravit požadované varianty rekonstituovaného systému a provést metabolické experimenty. Výsledky těchto experimentů mimo jiné významně objasnily identitu aminokyselinového residua aktivního centra CYP pro nitroreduktasovou aktivitu, aminokyselinové zbytky, které jsou v kontaktu s cytochromem b5.

Z formální stránky je práce členěná standardně a navíc zahrnuje 4 spoluautorské publikace, které jsou základem k sepsání této práce. V této práci jsou obsaženy také výsledky, které dosud nebyly součástí publikace. Jsou snadno identifikovatelné, neboť autor tento fakt specifikoval v příslušné části textu. Hlavní část výsledků byla tedy podrobená v publikačního procesu složité recenzní proceduře a jako oponent mám tedy při hodnocení usnadněnou práci.

Úvodní kapitola pojednává rozsáhle o cytochromu P450 (CYP) a proteinech, které se spoluúčastní na tvorbě komplexů. Autorovi se dokonale povedlo velmi komplikovanou tematiku podat věcně a přístupným způsobem i pro čtenáře, kteří se s touto problematikou seznamují poprvé. Úvod je natolik vynikající, že by, podle mého názoru, mohl příslušný překlad do angličtiny být publikován jako přehledný článek v příslušném odborném časopisu. Má jediná připomínka vztahuje k nepřítomnosti informací o místně cílené mutagenese, která by si vzhledem k významu pro cíl práce zasloužila jeden odstavec.

Materiály a metody jsou sice stručné (většinou odkázáním na připojené vlastní publikované práce), ale postupy pro podobné experimenty jsou alespoň jednou podrobně popsány. Široký rozsah jak biochemických, tak molekulárně-biologických metod, které musel Mgr. Milichovský zvládnout během řešení vytčených cílů v této disertační práci, je jednoznačným důkazem jeho připravenosti provést i vést budoucí metodickou a vědeckou práci ve svém oboru.

Rozsáhlá část disertační práce je zabraná kapitolou Výsledky a diskuse. Zdá se, že autor předem vytvořil prototyp („mustr“) pro presentace výsledků a využil pro podobné typy. Jednotný způsob vyjádření svou přehledností usnadňuje orientovat se ve výsledcích jednotlivých experimentů a pohodlně mezi sebou porovnávat. Poté jednotlivé výsledky byly rovnou „na místě“ prodiskutovány a případně porovnány s literaturou, což je podle mě chvályhodné.

Disertační práce je zakončena velmi stručnou kapitolou „Souhrn“ ve které jsou zvládnutě dosažené významné výsledky.

Z hlediska celkového hodnocení, Mgr. Jan Milichovský splnil všechny vytčené cíle: mimo jiné ukázal ovlivnění mechanismu nitroreduktasové aktivity CYP1 na prokázaném karcinogenním substrátu CYP1 aristocholové kyselině pomocí místně cílené mutagenese v aktivním centru těchto enzymů. Dalším jeho výsledkem je, že hostitelské bakterie *Escherichia coli* použité pro exprese (konkrétně jejich protein flavodoxin) mohou redukovat savčí cytochromy P450. Také ukázal na možné polohy aminokyselinových zbytků pro interakci cytochromu P450 s cytochromem b5.

Připomínky a otázky:

str. 41 ..16 ul izolátu, 10-12 ul štěpeného genu, i v dalších stranách např. str. 48, 49 : Udávání objemu neznámé koncentrace látek je nic neříkající.

str. 77 Chybí popis jedné dráhy gelu pod písmenem G.

str. 96 na konci prvního odstavce~~byly~~ byly....

str. 108, 6. řádek zdola: ~~ve~~ případě pětkrát..

str. 112 na začátku věty:~~nebyly~~ výsledky neprokázaly.....

str. 117, 5. řádek zdola: opravit na K455Q

str.118, 2. řádek zdola: metabolickou ...?...neprovádí

str.121 poslední odstavec: opravit na- Obrázek 61 na obrázku 60.

str. 124 poslední věta předposlední odstavce:~~mechanický~~ požadavek....

1. Jaký je rozsah molekulových hmotností různých forem cytochromu P450 nacházejících se od virů až po člověka?
2. Není mi jasné jestli EryCII s jistotou je CYP(včetně ostatní "CYPy" bez hemu) nebo není.
3. Lze informacím ze strany 24 na prvním odstavci rozumět tak, že odštěpení 4 aminokyselin z N-konce potkaního CYP1A1 se odkrývá signální sekvence k přesunu do mitochondrie?
4. Indukce CYP i vlastními substráty je známá věc, dochází také současně k indukci „spolupracujících“ proteinů CPR, CYB5R3 a cytochromu b5?
5. V návaznosti k otázce 4, dle výsledků zvýšení molárního poměru cytochromu b5 vůči CYP zvyšuje množství přeměny substrátu za stejný čas neboli aktivitu CYP (například obrázky 50 a 51). Jaká je variace těchto proteinů v různých tkáních?
6. Je velmi zajímavé, že dochází k redukci CYPu bakteriálním flavodoxinem. Může mít tento jev (pato)fyzilogický význam, třeba v tenkém střevě?
7. Při izolaci proteinů zůstal zachován C-koncový histidinový tag v exprimovaných cytochomech P450. Domníváte se, že jeho přítomnost nevede k ovlivnění aktivity či jiných vlastností cytochromů P450?

Závěrem, předloženou disertační práci Mgr. Jana Milichovského hodnotím jak po odborné stránce tak ve způsobu sepsání (formální stránce) za velmi zdařilou. Tato práce patří mezi nejlepší, u kterých jsem měl příležitost být oponentem. Proto jednoznačně doporučuji po úspěšné obhajobě, aby tato disertační práce byla podkladem k udělení titulu Ph.D. ve smyslu zákona o vysokých školách a navazujících provádějících předpisů.

V Praze dne 31. 08. 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Befeckadu', written in a cursive style.

RNDr. Befeckadu Asfaw Debela, CSc.

Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF. UK