

## Posudek na dizertační práci Mgr. Jana Milichovského

### Cílená mutagenese ve studiu lidských cytochromů P450 rodiny 1 a jejich interakčních partnerů

Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem vlivu složek mikrosomálního monooxygenázového systému na metabolismus řady chemických látek, např.: barviva Sudan I, aristolochové kyseliny, fenacetinu, apod. Hlavním motivem studia je vysledovat vliv cytochromu b5 a jeho reduktázy jako alternativních donorů redukčních ekvivalentů pro monooxygenázové reakce prováděné cytochromy P450 z rodiny I. Dále je velmi podrobně studován vliv mutovaných forem těchto enzymů P450 i cytochromu b5. Tato část je velmi originální a přináší zásadní poznatky pro další směřování výzkumu v oblasti molekulární toxikologie. Vědecky se tato dizertace zabývá velmi závažnou problematikou a lze tedy konstatovat, že téma disertační práce bylo zvoleno vhodně a v souladu s nároky kladenými na doktorandské studium.

#### Hlavní pozitiva dizertační práce.

Přehled literatury na více než dvaceti stránkách, bohatě doprovázených obrázky a tabulkami, uvádí čtenáře do studované problematiky. Velmi pěknou formou je shrnuta oblast znalostí o cytochromech P450 s hlavním důrazem na jejich strukturu, redoxní partnery a funkci. Dále je rozebrán význam cytochromu b5 a jeho reduktázy. Tento přehled působí konsistentně bez zbytečných podrobností a přitom nic podstatného není vynecháno.

Cíle práce jsou jasně stanovené, vyplývají z informací v teoretické části, a navržený postup je v souladu s moderními trendy výzkumu u nás i ve světě. Orientace na studium mutovaných forem enzymů představuje velmi důležitý příspěvek k různým *in silico* přístupům, které jsou dnes hojně využívány a nejednou selhávají ve srovnání s následnými *in vitro* daty.

Výsledková část je spojená s diskuzí a pojednává jednak o výsledcích již publikovaných ve čtyřech recenzovaných článcích v časopisech s impakt faktorem a navíc obsahuje dosud nepublikované originální údaje. Z popisu výsledků i přiložených originálních článků je patrné, že autor udělal ohromný kus práce. Diskuzní část výsledků je poměrně koncise a spíše shrnuje srozumitelnou formou dosažené výsledky.

Interpretace výsledků odpovídá naměřeným datům. Autor správně vyzdvihuje zásadní zjištění, která jsou jednoznačně podpořena řadou experimentů.

Závěry jsou odpovídající dosaženým výsledkům. Mezi hlavní a originální výsledky patří zjištění, že:

- 1/ některé cytochromy P450 jsou přístupné redukcí bakteriálními flavoproteiny a mohou tedy být použity jako katalytické jednotky i bez ko-exprese CYP reduktázy;
- 2/ aminokyseliny v polohách 135/137, 139/141 a 454/455 v P450 1A1/1A2 ovlivňují interakci s cytochromem b5;
- 3/ aminokyselina v poloze 65 cytochromu b5 do jisté míry limituje sílu interakce s P450 podrodiny 1A;
- 4/ pro metabolickou aktivaci aristolochové kyseliny jsou důležité aminokyseliny v poloze 122/124 enzymů P450 1A1/1A2 a rovněž aminokyselina v poloze 133 P450 1B1.

Čtyři publikace v impaktovaných časopisech, z nichž je Mgr. Milichovský prvním autorem na zásadní práci, o kterou se dizertace opírá, jsou jasným důkazem, že doktorská práce je velmi kvalitní a zasluhuje uznání.

### Komentáře a otázky k vlastní práci.

Vysokou vědeckou úroveň práce bohužel trochu sráží poměrně vysoký počet překlepů, které se často opakují a jsou přítomny i v nadpisech kapitol nebo v tabulkách. Dále práce obsahuje řadu formulačních neobratností. Některé příklady překlepů a nestandardních formulací:

- str. 24 a dále: pojem mutace se používá spíše pro vzácně se vyskytující alterace v DNA. Pokud se jedná o změnu s více než 1% frekvencí výskytu v populaci, např.: I462V pak hovoříme o polymorfismu.
- str. 24, třetí řádek zdola: ve větě „CYP1A2 mimo řadu karcinogenů a prokarcinogenů metabolizuje i celou řadu užívaných léčiv.“ se vyskytuje 2x slovo řada.
- legenda k obr. 9: ...residuí...
- str. 32, druhý odstavec zdola: ...spektrometrii...
- str. 33: druhý odst. shora: ...dvě možné interakce...a druhá E56...
- str. 34, druhý odst. zdola: ...byly pozorovány...
- str. 42, poslední věta: ...primery...nasedaly...
- str. 51, poslední odstavec: spíše než „Plasmid byl transformován do buněk...“ by bylo vhodné napsat: Buňky byly transformovány plasmidem...
- str. 62, konec odst. 3.4.5: „Aktivita byla spočtena jako rozdíl...“
- str. 65, poslední odst.: věta „Směs byla poté centrifugována po dobu 5 minut při.“ nemá konec.
- str. 69, poslední odstavec zdola: Plocha píku...
- Tab 11-14: termín „Doba metody“ (někde s překlepem) by bylo lepší nahradit: Délka analýzy.
- str. 74: popis opravy mutace přítomné v poloze 171 CYP1A1 by bylo vhodnější popisovat jako korekci či opravu mutace na normální variantu než tento postup nazývat opravnou mutací.
- Obr. 22: chybí popis co je na gelu v komínku označeném G.
- str. 77, text dole: místo pojmu „spektrálně správná forma“ by byl vhodnější termín P450 v nativním stavu dle spektrofotometrie.
- str. 86, odst. 4.1.4, první věta: slovo „databáze“ je zde dvakrát po sobě.
- str 96, čtvrtá věta shora: ve větě je dvakrát po sobě slovo „byly“.
- str 96: věta „Se všemi zvolenými cytochromy P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 a CYP2C8) byla provedena exprese u každé po třech lahvích v 25 ml média.“ vyžaduje reformulaci.
- str. 102, druhý odstavec shora: věta “Proto byly čisté rekombinantní proteiny CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 a jejich mutanti (S122A, T124V a A133S) odstraňující anebo naopak zavádějící hydroxyskupinu na totéž místo ve vazebné kavitě proteinu.” postrádá smysl.
- Obr. 48 a doprovodný text: v popisu by mělo asi zaznít to co v publikaci Milichovský et al., 2016, tzn. že byl sledován metabolit vznikající *O*-demethylací.
- str. 109, předposlední věta: “Je tedy patrné, že aktivita obou studovaných cytochromů P450 vůči všem substrátům byla zvýšena vůči všem substrátům.” nedává smysl.
- str. 116, první věta: „V případě CYP1A1 byla aktivita vůči fenacetinu většiny mutantů překvapivě srovnatelná s přirozenou formou.“ má problém se slovosledem.
- str. 121, poslední odstavec: zjevně byly prohozeny odkazy na obrázky a mělo by být uvedeno obr 60 a 61.
- str. 123, druhá věta zdola: ...R296Q (CYP1A2)...
- str. 125, začátky několika odstavců: formulace typu „Tendence mutantních forem CYP1A1 s mutacemi R135 a K455 k modulaci cytochromem b5 byla snížena v případě reakce se Sudanem I a fenacetinem.“ není úplně šťastná. Spíše bych použil ...Přítomnost mutací R135 a K455 v CYP1A1 omezovala schopnost cytochromu b5 modulovat přeměny Sudanu I a fenacetinu... nebo jinak

Všechny práce přiložené k dizertaci byly recenzovány renomovanými odborníky, a tudíž následující dotazy slouží spíše k podpoření diskuze a k širšímu náhledu na uvedenou problematiku.

1/ Úvod, Tab. 1: zajímalo by mne k čemu používají viry cytochromy P450.

2/ Mohl by autor rozvést na základě čeho byly vybrány polohy k mutagenezi jak v P450 tak v cytochromu b5?

3/ Na Obr. 22 a zejména 26 je v některých vzorcích patrná přítomnost poměrně velké řady kontaminujících proteinů (např. vzorky B a D na Obr. 26). Rovněž specifický obsah P450 kolem 5 (tab. 18) má daleko k homogenitě. Nemohly tyto kontaminace nějakým způsobem ovlivnit výsledky? Je něco známo o povaze těchto kontaminantů?

4/ Výsledky s mutovanými proteiny (Obr. 52-54) jsou vztaženy na reakci bez cytochromu b5. Zdá se mi vhodnější posuzovat spíše rozdíly mezi WT a mutovaným b5. Jaký byl důvod pro stávající porovnání?

5/ Mutace cytochromu b5 v poloze 71 zjevně omezila jeho redukovatelnost b5 reduktázou (Obr. 60 a 61). Předpokládám, že v reakcích na obr. 52-54 kde stimuloval reakce různých P450 se sledovanými substráty obvykle více než WT forma jej redukovala P450 reduktáza (POR). Bylo by pak možné spekulovat o tom, že mutace omezuje interakci s CYB5R3, ale stimuluje interakci s POR. Má toto zjištění nějaký praktický smysl?

**Dizertační práce dle mého názoru splnila svůj účel, protože autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce. Výsledky byly publikovány ve kvalitních odborných časopisech.**

**Z těchto důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.**

V Praze 22.8.2016



Doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.