

Oponentský posudek

Dizertant: Mgr. Martin Kučka
Název dizertace: Steroidné dehydrogenázy u kura (*Gallus gallus*): rekombinantná expresia enzýmu 20 β -hydroxysteroid dehydrogenáza v *Escherichia coli*
Vysoká škola: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie
Studijní program: Fyziologie živočichů
Školitel: Doc. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.,
Oponent: Prof. RNDr. R. Hampl, DrSc., Endokrinologický ústav, Praha

Předmětem dizertace je podrobné studium enzymu 20 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy u ptáků, s ohledem na jeho fyziologickou úlohu spočívající v ochraně mineralokortikoidních receptorů před nadbytkem glukokortikoidů.

Práce vznikla jako součást výzkumného programu řešitelského týmu školitele, zaměřeného na metabolismus a mechanismus účinku glukokortikoidů u ptáků. Zatímco u savců je hlavní cestou deaktivace glukokortikoidu v cílových tkáních pro mineralokortikoidy oxidace 11 β -hydroxyskupiny aktivního glukokortikoidu na neaktivní 11-oxo-metabolit účinkem 11 β -hydroxysteroidní NAD⁺ dependentní dehydrogenasy 2.typu, dosavadní nečetné práce naznačily, že by u ptáků (zatím studováno u kachen) by tuto úlohu mohl plnit i další enzym, konkrétně 20 β -hydroxysteroidní dehydrogenasa.

Práce obsahuje výstižný přehled dosavadních znalostí o steroidních oxidoreduktasách a jejich fyziologickém významu. Podle názoru oponenta by si tato rešeršní část zasloužila zveřejnění ve vhodném domácím nebo zahraničním přehledovém časopisu, pokud se tak již nestalo.

Ocenění zasluhuje komplexní metodický přístup k problematice, zahrnující pestrou škálu experimentů od enzymologických studií se značenými steroidními substráty, přes vazebné studie interakce se steroidními receptory, až po molekulárně biologické pokusy zahrnující klonování a namnožení cDNA sledovaného enzymu, jeho rekombinantní expresi v bakteriích a sledování exprese příslušné mRNA v různých kuřecích tkáních. Enzymologické studie autor neomezil jen na oxidoredukci na uhlících 20 a 11 steroidních molekul, ale i na sledování dalších enzymových aktivit s různými steroidními substráty.

Za prioritní považují zjištění, že u ptáků je důležitějším ochranným mechanismem redukce 20-oxoskupiny pomocí 20 β -HSD než oxidace 11 β -hydroxyskupiny, což otevírá cestu k studiím možného ovlivnění této metabolické cesty, i s praktickými dopady pro chov drůbeže. Další prioritou je originální příprava rekombinantního enzymu. Z fyziologického pohledu je zajímavý rovněž původní nálezy ovlivnění exprese 20 β -HSD syntetickým estrogenem.

K práci nemám kritických připomínek, pouze několik námětů k diskusi:

1. Autor zjistil vedle „klasických“ cílových tkáních pro mineralokortikoidy vysokou aktivitu 20 β -HSD u kuřat také v samčích sexuálních žlázách. U savců je přítomna

vysoká aktivita 11 β -HSD 2.typu také v Leydigových buňkách testes, kde tento enzym oxiduje nadbytek glukokortikoidů, které prostřednictvím svých receptorů jinak inhibují expresi receptorů pro lutropin. Může mít podobnou úlohu u ptáků 20 β -HSD?

2. V 50. a 60.létech byly využívány bakteriální steroidy-metabolizující enzymy, včetně autorem studovaných oxidoreduktas (např. *Pseudomonas testosteroni*), k průmyslové přípravě některých steroidů. Řada z těchto enzymů vykazovala více aktivit. Je známo z databází enzymů zda a nakolik jsou tyto bakteriální enzymy resp. příslušné DNA homologní s autorem studovanými steroidními oxidoreduktasami?

Výsledky práce autor publikoval v celkem pěti zahraničních časopisech s celkovým impakt-faktorem přes 9 (2005), z toho 1x jako první autor a na 4 mezinárodních konferencích.

Závěr

Podle názoru oponenta dizertace Mgr. M. Kučky splňuje veškeré požadavky kladené na doktorské dizertační práce, v souladu se zákonem o vysokých školách č. 111/1998 Sb a příslušnými zásadami Studijního a zkušebního řádu, platnými pro Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. Autor prokázal schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce a doporučuji proto, aby mu byl přiznán titul PhD.

V Praze dne 11. května 2007

Prof. RNDr. Richard Hampl, DrSc.

Nalezené drobné překlepy a jedna otázka (bez vlivu na vysokou kvalitu dizertace)

s. 12, Obr. 2: ve vzorci 5 α -dihydrotestosteronu má být na C17 17 β -OH

s. 20, poslední věta není ukončena, asi dvojtečkou

s. 55, kde získal autor RU-486 (antiglukokortikoid, známé abortivum)

s. 117, Chyba ve jménech Lapcik a Sterzl