KATEDRA BIOCHEMIE

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Hlavova 2030
CZ-128 40 Praha 2

Posudek na disertační práci Mgr. Lucie Škarydové

Posuzovaná disertační práce Mgr. Lucie Škarydové, nazvaná **„Role reduktas v nádorovém onemocnění"**, je koncipována jako ucelené vědecké dílo, které je předepsaným způsobem členěno a obsahuje všechny závazné oddíly. Jedná se o prezentaci původních vědeckých výsledků, které se staly podkladem pro dvě publikace v impaktovaných mezinárodních periodicích se souhrnným impaktním faktorem 5,913.

Práce obsahuje 92 stran textu včetně přehledu 153 použitých literárních odkazů. V přílohách jsou kromě doplňujících tabulek a schémat především 2 reprinty uveřejněných článků a odkazy na 2 manuskripty v přípravě, které se vztahují ke studovanému tématu. Autorka práci až na několik formálních opomenutí a chyb celkem pečlivě sepsala a přehledně rozčlenila na tyto části: Přehled do současného stavu problematiky (30 stran), jehož součástí je konkrétně formulovaný Cíl práce, Experimentální část (13 stran), Výsledkovou část kombinovanou s Diskusí (22 stran) a Souhrn v českém a anglickém jazyce. Velmi pozitivně lze hodnotit, že se autorce podařilo výsledky výzkumu uveřejnit v impaktovaných mezinárodních časopisech a navíc i to, že disertantka je v obou případech prvým autorem.

Úvodní literární přehled, označený jako Teoretická část, logicky setříděnými informacemi čtivou formou čtenáře uvádí do problematiky klasifikace karbonylreduktas, jejich komplexní úlohy u živočichů a účasti jednotlivých enzymů na metabolismu endogenních a cizorodých sloučenin. Autorka se soustřeďuje na problematiku karcinogenese a podrobně se proto zabývá rolí jednotlivých karbonylreduktas především při ovlivnění procesu proliferace nádorových buněk. Vhodně je přičleněn i oddíl shrnující poznatky o redukčním metabolismu několika vybraných cytostatik. Protože je oblast úlohy karbonylreduktas zejména v procesu karcinogenese u člověka dosud jen nedostatečně probádána, zvolila si autorka právě tuto problematiku za cíl své disertační práce.

Experimentální část obsahuje výsledky dvou elegantních studií změřených na lidské karbonylreduktasy. Prvá studie rozpracovává problematiku inhibice rekombinantní karbonylreduktasy AKR1C3 dvaceti vybranými flavonoidy a několika dalšími fytochemikáliemi. S použitím modelového substrátu AKR1C3, oracinu, se autorce podařilo vytipovat nejúčinnější inhibitory a pro ně určit hodnoty IC50. Nejnižší hodnoty vykazovaly překvapivě zástupci různých skupin flavonoidních sloučenin: 2'-hydroxyflavanon, naringenin a 7-hydroxyflavon. Inhibiční schopnost 2'-hydroxyflavanonu předurčuje tuto sloučeninu pro další výzkum z pohledu jejího využití jako potenciálního léčiva. Druhá studie vycházela z velmi reálného předpokladu existence další mikrosomální karbonylreduktasy schopné, na

rozdíl od již identifikované 11β-HSD1, preferenčně metabolizovat oracin na (+)-enantiomer 11-dihydrooracin. Autorka dokumentuje náročné hledání postupu pro izolaci předpokládané karbonylreduktasy ze vzorků lidských jater, včetně optimalizačních pokusů, až po snahu o komplexní charakterizaci této reduktasy. Vhodně zvolenou metodou solubilizace mikrosomů v kombinaci s dvěma chromatografickými purifikačními kroky se podařilo připravit preparát s vysokou specifickou reduktasovou aktivitou pro tvorbu (+)-enantiomeru 11-dihydrooracinu a ten následně charakterizovat kinetickými parametry Km a Vmax. Ovšem i přes veškerou snahu disertantka při nejrůznějších provedeních PAGE nedokázala detekovat proteinovou zónu s reduktasovou aktivitou a naplnit tak konečný záměr, kterým byla charakterizace proteinu hmotnostní spektrometrií. Přestože se nepodařilo novou formu karbonylreduktasy zcela identifikovat, Mgr. Lucie Škarydová i v druhou oblast vytčenou v cíli práce velmi dobře zvládla.

Jako v každé rozsáhlejší práci, tak i v předkládané disertaci se vyskytuje řada odborných nepřesností a opomenutí, jazykových neobratností a formálních nedostatků, z nichž si dovolím připomínkovat jen ty závažnější.

K autorce mám následující připomínky a dotazy:

1. Práce je celkem pečlivě a přehledně sepsána, ale došlo k chybě v číslování oddílů, kdy počínaje oddílem „Experimentální část", jsou čísla o jednotku posunuta, což neodpovídá údajům a odkazům v textu ani v Obsahu.
2. Srozumitelnost práce často snižuje nadměrné používání z angličtiny přejatých slovních spojení a sousloví, která rozhodně lze přeformulovat a vyjádřit česky – např. „tabák-specifického" (str.7, 2.odst.zd., 4.ř.), „zinek-dependentní" (str.13, 3.ř.zd.), „redox aktivní o-chinony" (str.25, 5.ř.), „silver stain" (str.66., 2.odst., 7.ř.zd.) či formulace na str.21, 2.ř. „aktivuje receptor aktivovaný peroxisomovými aktivátory".
3. V biochemicky zaměřené práci se lze jen těžce smířit se zápisem – „metyl" či „etyl" bez „th", komolením firemního názvu síťovaného agarosového gelu „Sepharose" a nesystematickým označováním enzymů - závazná nomenklatura vyžaduje používat např. pro reduktasy formát: „akceptor:donor elektronů oxidoreduktasa".
4. V práci se vyskytuje řada nepřesností – např. chybí údaj o kationtech používaných fosfátových pufrů (např. str.36, 2.ř.zd.), údaj o počtu jednotek enzymu Glc-6-P dehydrogenasy v regeneračním systému NADPH je nedostatečný bez udání objemu reakční směsi (str.39, 3.ř.), neobvykle vysoké koncentrace glycinu, TRIS a SDS, uváděné pro složení elektrodového pufru, jsou zřejmě chybné (str.41,1.odst.,5.ř), limitní rychlost enzymové reakce Vmax nemůže být uváděna s rozměrem [mmol/30min/mg] (str.60, obr.27).
5. Styl disertační práce by měl působit podstatně odborněji (vědečtěji) s minimem emocionálních a osobních sdělení a formulací a s vyvarováním se laboratorního „slangu". Ani mnohanásobné opakování stejných faktů nepůsobí dobře, i když snahu o vytváření souhrnů a zobecnění lze pozitivně hodnotit. Očekával bych, že Souhrn práce bude v koncentrované formě sumarizovat dosažené výsledky, nikoli připomínat literární přehled kombinovaný s diskusí.
6. Tvrzení, že byla purifikována nová lidská karbonylreduktasa (např. str.74, 11.ř.zd.), se mně zdá až příliš odvážné, uvážíme-li, že se dosud nepodařilo přiřadit nalezenou reduktasovou aktivitu žádnému proteinu. Pokud již tak nebylo učiněno, doporučil bych v této souvislosti zařadit jako možný izolační krok, který by mohl odpovídající enzym specificky koncentrovat, afinitní chromatografii na 2',5'-ADP-Sepharose, sorbentu vhodném pro reduktasy využívající NADPH.

Dotazy:

1. V Teoretické části práce hovoříte o aktivační a inhibiční úloze steroidních hormonů v procesu karcinogenese. Mohou i metabolity steroidů působit jako „přímá" mutagenní agens?
2. Porozuměl jsem správně, že ne všechny lidské SDR jsou skutečnými reduktasami (str.10, 2.ř.)? Jedná se o enzymy s jinou funkcí či zatím bez nalezené katalytické aktivity? Můžete tuto záležitost detailněji vysvětlit?
3. V čem se lišily použité chromatografické sorbenty na bázi matrice Sepharosy s fenolickými substituenty? Jaký parametr mohl způsobit to, že došlo k retenci reduktasové aktivity jen na jednom z těchto sorbentů?
4. Jako velmi účinné se z hlediska inhibice AKR1C3 ukázaly 2'-hydroxyflavanon, naringenin a 7-hydroxyflavon. Je možno na základě rozboru jejich struktur odvodit obecnější představy o významu pozic substitucí a typu skeletu flavonoidu, které určují inhibiční chování? Jsou flavonoidy např. AKR1C3 redukovány?
5. Můžete blíže specifikovat Vámi použitý postup „negativního aktivitního barvení" (asi obdoba zymogramu) při PAGE purifikované karbonylreduktasy? Očekával bych, že reduktasy přenášejí elektrony z donoru, např. NADPH, na akceptor, kterým je v tomto konkrétním případě tetrazoliová modř a přeměňují ji tak na nerozpustný formazan.
6. Souhlasím, že je velmi obtížné izolovat enzym, který je určen pouze určitým typem metabolické aktivity. Nedalo by se na základě předpokladu sekvenční homologie s jinými, již poznanými formami karbonylreduktas, nalézt v jejich sekvencích společný charakteristický sekvenční „pattern" a na jeho základě připravit antipeptidové protilátky, které by umožnily velmi citlivě monitorovat purifikaci neznámé karbonylreduktasy na PAGE i bez nutnosti zajištění nedenaturujích podmínek pro aktivitní testy? Existuje nějaká homologní karbonylreduktasa s již vyřešenou krystalovou strukturou?

Uvedená drobná opomenutí a ojedinělé formální nedostatky nikterak nesnižují kvalitu předkládané práce.

Závěrem je možno konstatovat, že Mgr. Lucie Škarydová prokázala velmi dobrou orientaci ve studované problematice a schopnost vědecké práce, včetně publikace získaných výsledků v impaktovaných mezinárodních časopisech. Při řešení studované problematiky byly získány originální výsledky poskytující nové pohledy na lidské karbonylreduktasy. Tyto výsledky jsou významným přínosem k výzkumu enzymologie redukčního metabolismu v souvislosti s přeměnou léčiv a karcinogenů v lidském organismu. Unikátním výsledkem je rozhodně průkaz existence nové karbonylreduktasové aktivity v lidských hepatocytech.

Předkládanou disertační práce hodnotím jako kvalitní, která splňuje požadavky kladené na disertační práce. Na základě těchto skutečností doporučuji udělit disertantovi vědeckou hodnost Ph.D.

V Praze 14.11.2009

Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.