



Posudek na disertační práci "Molecular Mechanisms of Homocystinuria: Spatial Arrangement of Human Cystathionine  $\beta$ -synthase" Ing. Aleše Hnízdy, 1. LF UK.

Ing. Aleš Hnízda se ve své disertační práci zabýval studiem molekulových mechanismů vedoucích k chybnému sbalování mutantních forem CBS. Chybné sbalování CBS vede k deficitu enzymu a k následné homocystinurii.

Řešené téma považuji za vysoce aktuální a to nejen z hlediska získání nových poznatků základního významu o důležitém lidském enzymu metabolismu sirných aminokyselin, ale i z hlediska praktického významu pro objasnění příčin homocystinurie. Použité metody a postupy sledávám ve velké většině aktuální a vhodné pro řešené úkoly.

Výsledky práce přinesly cenné nové poznatky o mechanismu deaktivace CBS v důsledku chybného sbalování proteinu díky specifickým mutacím. Dále byla pomocí diferenčního kovalentního značení exponovaných aminokyselin identifikována styčná plocha mezi katalytickým jádrem a regulační doménou CBS a byl navržen strukturní model pro enzym plné délky. Rovněž byla identifikována a studována forma CBS z nematoda *C. elegans*, která se svou doménovou architekturou výrazně liší od lidské formy CBS. Dále byly učiněny úspěšné pokusy o detekci specifické aktivity CBS v lidské plasmě, což může být využito pro diagnostiku nedostatečnosti funkce CBS.

Po formální stránce byla disertační práce zpracována formou krátkého obsahu doplněného o připojené publikace. Plně respektuji tuto formu zpracování, která ale možná klade větší nároky na čtenáře hledajícího případně některé experimentální detaily nebo jiné podrobné informace.

Celkově se domnívám, že práce představuje špičkový výzkum mezinárodního významu, což je dokumentováno několika příloženými publikacemi ve velmi kvalitních časopisech. Práce významnou měrou přispěla k rozvinutí poznání vlastností CBS. Detekce aktivity CBS by mohla být použita pro identifikaci nedostatečnosti CBS v praxi.

Disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu Ph.D.

Na závěr přikládám seznam několika dotazů týkajících se disertace a budu se těšit na jejich zodpovězení při obhajobě.

- Existují specifické inhibitory CBS a pokud ano, byly použity *in vivo* na zvířecích modelech a pokud ano, s jakým účinkem ve srovnání s projevy CBS deficientní myši?
- Co je molekulární příčinou patologických projevů u CBS deficientních pacientů, zvýšená hladina Hcy či snížené hladiny Cys a glutathionu? Či je příčina ještě někde jinde?
- Na str. 17 autor zmiňuje 5 různých reakcí katalyzovaných CBS. Které z nich jsou biologicky relevantní?

- Na straně 18 je uveden katalytický mechanismus CBS. Je CBS schopna metabolizovat i D-serin jehož vysoké koncentrace se nacházejí v mozku? Je CBS přítomna v mozku?
- CBS je enzym primárně lokalizovaný v cytosolu a jádře. Co by mohlo být příčinou jeho přítomnosti v plasmě? Nebylo by možné detekovat v plasmě přímo molekulu enzymu pomocí hmotnostní spektrometrie?
- Jaký je význam studia CBS z *C. elegans* pro poznání lidského enzymu?
- Nemůžou být výsledky proteolýzy v surových buněčných lyzátech ovlivněny přítomností extrahovaných proteáz?
- Disertační práce obsahuje velké množství experimentálních technik a výsledků. Je mi zcela jasné, že dnešní špičkový výzkum je týmovou záležitostí, ale uvítal bych upřesnění, které experimenty byly prováděny přímo autorem, a které byly provedeny jeho spoluautory na publikacích.

V Praze, 29. května 2012, Jiří Jiráček

