

Posudek na disertační práci Mgr. Rudolfa Andrýse s názvem:

Vývoj a aplikace afinitního nosiče pro izolaci lidských karbonyl-redukujících enzymů

Cílem disertační práce bylo vytvořit afinitní nosič na bázi potenciálního terapeutika oracinu a využít ho pro purifikaci karbonyl-redukujících enzymů. Smyslem bylo najít způsob, jak z jaterních extraktů získat enzymy, jejichž izolace s pomocí konvenčních chromatografických metod byla předtím neúspěšná. Vývoj zahrnoval různé typy nosičů a testování s identifikací zachycených proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Disertační práce je zpracována ve formátu vědeckého textu se zavedeným členěním a má 123 číslovaných stran. Převzatá tvrzení jsou citována standardním způsobem. Dále je součástí příloha publikovaných prací v časopisech, z nichž ve dvou případech je R. Andrýs prvním autorem, v jiném pohledu se dvě z těchto tří prací týkají řešeného tématu. Teoretická část shrnuje poznatky o karbonyl-redukujících enzymech s jejich přehledem a popisem funkce v metabolismu xenobiotik. Následuje text o metodách izolace proteinů s důrazem na afinitní separace a konečně je blíže představeno léčivo oracin a jeho redukční biotransformace v játrech. Dotazy a poznámky k teoretické části:

- *Píše se, že z lidských membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů byla purifikována pouze 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1, citace odkazuje k roku 2002. Nenastal od té doby nějaký posun v této oblasti? Pokud ne, každopádně by bylo vhodnější dát aktuálnější citaci.*
- *Na str. 16 se píše o exprimování enzymů v játrech. Tato formulace není přesná, exprese se týká genů, nikoli proteinů, v případě těch druhých by se mělo psát o produkci nebo tvorbě. Stejně pak na str. 89.*
- *Na str. 23 se nepřesně píše o lidském proteomu v rozsahu 30 000 proteinů, což by však znamenalo poměr zhruba 1 protein na 1 gen, což je představa ze 40. let 20. století (Beadle a Tatum). V literatuře se ale udává až 1 milion existujících proteoforem, tedy všech variant při započítávání posttranslačních modifikací!*

Metodická část uvádí především protokoly přípravy různých afinitních nosičů a izolaci cytosolové a mikrosomální frakce lidských jaterních buněk, kde se předpokládá přítomnost enzymových systémů přeměňujících oracin.

Dotazy a připomínky k metodice:

- *Proč byla pro navázání raménka na karboxylovou skupinu na magnetických částicích použita kombinace EDC a sulfo-NHS? Bis-aminopropylamin by bylo možné navázat již přímo po aplikaci EDC.*
- *Na str. 50 se píše o separaci solubilizovaných mikrosomů. Bylo by asi správnější psát o solubilizovaném obsahu mikrosomů.*

Výsledková část s diskusí byla zpracována na základě experimentů, kde byl oracin imobilizován různým způsobem na rozmanité nosiče za vzniku afinitního chromatografického materiálu. Celkem bylo připraveno 8 variant, které byly zkoušeny pro schopnost vázat karbonyl-redukující enzymy. Hodnocena byla vazebná kapacita, možnost eluce aktivního enzymu a chemická stabilita. Vazba ligandu proběhla prostřednictvím aromatického kruhu či dusíku, aby byla zachována redukovatelná karbonylová skupina

oracinu. Pro další experimenty byl pro svou efektivitu vybrán nosič AN05 odvozený od magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou, kam byl ester oracinu připojen aminolýzou přes triaminové raménko. Výtěžek zachycení modelového enzymu byl zvýšen přidavkem EDTA, byl optimalizován eluční pufr. Systém pro afinitní purifikaci byl pak v dalším vývoji převeden z magnetických částic na agarosové částice, přičemž bylo nutné upravit imobilizační postup. Nosič AN05 byl úspěšně vyzkoušen pro izolaci rekombinantní aldo-ketoreduktasy z lyzátu transformované bakterie *E. coli*. Konečně, izolováni byli vazební partneři oracinu z jaterní cytosolové i mikrosomové frakce. V mikrosomální frakci byly takto mj. identifikovány i interagující enzymy, o jejichž působení na oracin se dosud nevědělo. Tyto enzymy (RDH16 a DHRS1) byly následně připraveny jako rekombinantní proteiny

Úroveň sepsání celé této části je velmi vysoká, text je čtivý a svým charakterem se přímo blíží stylu detektivky, kde je čtenáři krok po kroku odhalován pachatel, v tomto případě podaný jako hledané potvrzení použitelnosti připraveného afinitního nosiče pro izolaci membránově vázaných karbonyl-redukujících enzymů z jaterní tkáně. Zvolené strategie byly důkladně promyšlené, reagující na dílčí potíže a ukazují výbornou schopnost plánování a vyhodnocování experimentů, což nakonec vedlo ke konečnému úspěchu. V tomto textu bylo pouze pár prohrěšků proti českému jazyku, zkratka DHRS pak není uvedena v seznamu zkratk.

Nabízí se pouze velmi omezený počet dotazů a komentářů:

- *Proč byla jako předseparační krok před použitím afinitního nosiče pro komplexní směs jaterních proteinů zvolena gelová chromatografie, která má obecně horší rozlišení i kapacitu než chromatografie iontoměničová?*
- *U výsledků z hmotnostně spektrometrických identifikací postrádám údaje o pokrytí sekvence identifikovaných proteinů potvrzenými peptidy a jejich počet, také není uváděno pravděpodobnostní skóre. Není tak možné udělat si představu o věrohodnosti identifikací, zvláště je-li v jednom obarveném pásu z gelu přítomno více proteinů.*

Autor splnil předpoklady, které jsou nutné k vypracování kvalitního vědeckého spisu. Závěrem mého posudku je jednoznačné doporučení disertační práce k obhajobě před odbornou komisí.

;V Olomouci dne 29. 2. 2016

Marek Šebela