

Posudek disertační práce Mgr. Jany Česnekové „Functional characterization of LACE1 ATPase and mitochondrial AAA proteases YME1L and AFG3L2 in mitochondrial protein homeostasis“

Předkládaná disertační práce Mgr. Jany Česnekové představuje výsledky původního základního výzkumu na téma biochemie mitochondriálních proteáz, které je dlouholetým hlavním výzkumným zájmem školitele dr. Stibůrka z pracoviště mitochondriální laboratoře KDDL 1. LF UK a VFN v Praze. Sama studentka se tématu věnuje už od magisterské úrovně studia, předkládanou disertací navazuje na svoji diplomovou práci o YME1 proteáze, kterou úspěšně obhájila na Přírodovědecké fakultě UK.

Disertace si stanovila dva hlavní cíle – charakterizovat funkční kooperativitu proteolytických proteinů AFG3L3 a YME1L a odhalit úlohu proteinu LACE1 – lidského homologu kvasinkové ATPázy Afg1. Práce je uspořádaná v klasické dlouhé formě s obsáhlým teoretickým úvodem shrnujícím současné poznatky o mitochondriálních proteázách, následují cíle práce, metody, výsledky a diskuse. Jako příloha jsou součástí práce dva publikované články v impaktovaných časopisech (Biochemical Journal a Oncotarget) a jeden odeslaný manuskript, který je nyní už také přijatý k publikaci. U všech článků je Mgr. Česneková první autorkou.

Téma práce je vysoce aktuální, stejně jako i předchozí práce Mgr. Česnekové a jejího školitele se zaměřuje na charakterizaci savčích mitochondriálních proteáz s využitím buněčného modelu lidských HEK293 buněk. Dosažené výsledky tak

představují cenný příspěvek do studia problematiky, které je obvykle řešeno převážně na kvasinkovém modelu. Metodické rozpětí práce je velmi široké – od molekulární biologie při tvorbě plasmidových konstruktů, přes manipulaci genové exprese v HEK293 buňkách, proteinové analýzy pomocí nativních a denaturujících elektroforéz a imunoprecipitace, zobrazovací metody – imunocytochemie, fluorescenční i elektronová mikroskopie, až po funkční metody jako jsou měření enzymových aktivit a respirometrie. Použité metody jsou vzhledem k cílům práce adekvátní a Mgr. Česnekové se tak podařilo dosáhnout mnoha nových vědeckých poznatků. S využitím modelu HEK293 se současně utišenou expresí proteáz AFG3L2 a YME1L prokázala funkční kooperativitu komplexů m-AAA a i-AAA proteáz v udržování mitochondriální proteostázy. Za ještě významější výsledek pokládám primární charakterizaci LACE1 ATPázy a průkaz její nezbytnosti pro proteolytické štěpení neasemblovaných podjednotek komplexu IV respiračního řetězce v lidských buňkách. Získané poznatky představují nejen důležité nálezy základního výzkumu, ale jsou cenné i z medicínského hlediska, hlavně v kontextu vrozených mitochondriálních poruch, které jsou nezdědka asociovány s defekty biogeneze OXPHOS komplexů, kdy jsou na funkci mitochondriálních proteáz kladeny zvýšené nároky. Velmi zajímavý je též nález LACE1-dependentní translokace p53 do mitochondrií, který bude předpokládám na pracovišti dále rozvíjen a může mít implikace hlavně ve výzkumu nádorové biologie.

Přes nesporně zajímavé výsledky musím bohužel vyjádřit výhrady k formální stránce práce. V textu se vyskytuje nezanedbatelné množství překlepů i nepřesného užití tvarů anglických slov (např. cleaving x cleaving, needful). Celé některé věty mi bohužel nedávají smysl – např. „The processing of cytochrome c peroxidase protease is one of the several rhomboid-GlpG superfamilies of intramembrane peptidases in *S.cerevisiae*.“ V teoretickém úvodu se objevují i faktické nepřesnosti – např. úloha proteinu COX17 – je to chaperon a ne podjednotka COX, podobně Atp9 a Atp6 nejsou chaperony Atp10, ale naopak atd. Vnímám jsem též nekonzistentní úroveň detailu popisu jednotlivých proteáz – např. extrémně detailní popis katalytického mechanismu rhomboid proteáz oproti jiným. V úvodu bych uvítal i více doprovodného obrazového materiálu, zajímavým výstupem práce by určitě bylo schéma s porovnáním kvasinkového a savčího mitochondriálního proteolytického aparátu. Dále bych navrhoval text úvodu více gradovat směrem k cílům práce.

V metodické části by bylo vhodné se častěji odkazovat pomocí citací k původním metodickým pracím, ze kterých se vycházelo. K samotným metodám mám následující dotazy:

1. Úplně jsem z popisu metod nepochopil rozdíl mezi ko-imunoprecipitací a afinitní purifikací, kdy se podle mě liší jen použitým typem detergentu pro solubilizaci mitochondrií před samotnou imunoprecipitací.
2. Vzorky pro BN-PAGE byly veskrze připravovány jen s využitím dodecyl maltosidu. Pro hodnocení rozdílných fenotypů buněk s utišenou expresí AFG3L2 nebo YME1L by bylo zajímavé sledovat respirační superkomplexy solubilizované digitoninem. Zkoušeli jste tento postup, případně máte nějaké byť třeba neúplné výsledky?
3. Zkoušeli jste i jinou metodu pro stanovení apoptózy než elektroforetickou analýzu štěpení PARP proteinu, např. annexinového barvení?
4. Prosím o upřesnění popisu metody pro měření aktivity komplexu III, z textu vyplývá, že se jedná spíše o stanovení kombinované aktivity komplexů II a III. Pozor též na záměnu substrátu cytochromu *c* za cytochrom *c* oxidázu (v textu COX).

Kvalita dosažených výsledků byla prokázána už recenzním řízením při publikaci v impaktovaných časopisech. Domnívám se ale, že vzhledem k tomu, že byla disertace zpracována dlouhou formou, mohlo být ve výsledkové části prezentováno více experimentů než jen ty, které byly vybrány pro finální publikace, třeba i jen zajímavé výsledky pilotních experimentů.

Dotazy k výsledkům:

1. Akumulace podjednotek respiračních komplexů po utišení exprese dané proteázy je dokumentována většinou obrázky jednoho Western-blotu, jakým způsobem byla data kvantifikována a statisticky hodnocena? Totéž se týká i hodnocení zastoupení jednotlivých variant OPA1 proteinu.
2. Pomocí 2D-PAGE jste odhalila několik komplexů s přítomností LACE1. Zkoušeli jste detekovat kolokalizaci některých proteáz v těchto komplexech? Např. YME1L, která s LACE1 ko-imunoprecipitovala?
3. Z obr. 4.9 interpretujete nižší signál mutovaných variant LACE1 jako snížení akumulace v mitochondriích. Nejedná se spíše jen o obecně sníženou stabilitu

změněných variant proteinu, nemáte k dispozici i Western-blot z celobuněčných lyzátů?

4. Jaká je úroveň množství overexprimovaných LACE1-FLAG variant oproti endogennímu proteinu, u LACE1 WT je vidět snížení COX4 oproti kontrolním buňkám, což by mohl být důsledek abnormálního množství LACE1. Na obrázcích je pouze detekce s xFLAG protilátkou, máte k dispozici i detekci s x LACE1 protilátkou? Ještě naléhavější je tato otázka v souvislosti s hodnocením akumulace p53 v mitochondriích, po transfekci LACE1 do kontrolních buněk se výrazně mění i mitochondriální retikulum, což může nasvědčovat masivní nadexpresi.
5. U popisu obr. 4.12 C nejsou vysvětlené zkratky jednotlivých respiračních stavů, ani v metodách. Můžete ukázat typický záznam z měření na kyslíkové elektrodě s vyznačením úseků respirace, jejichž hodnoty jsou uvedeny v grafu?
6. Dřívější práce zmiňují asociaci p53 s mitochondriemi formou p53-indukovaného zvýšení exprese SCO2 – asemblačního faktoru cytochrom c oxidázy. Může s tímto fenoménem souviset Váš nález LACE1-dependentní translokace p53 do mitochondrií?
7. Kromě dvojitého knock-downu AFG3L2 a YME1 by bylo zajímavé konstruovat buněčné modely pro studium funkční interakce LACE1 a těchto proteáz, např. rescue experiment knock-downu LACE1 pomocí nadexprese YME1L. Zkoušeli jste nebo plánujete rozvíjet Váš výzkum tímto směrem?
8. Můžete na základě dosažených výsledků odhadnout, jaký vliv by měla knock-down nebo nadexprese LACE1 vliv u buněk s defektem asemblace cytochrom c oxidázy – např. u HEK293 modelů s KD COX podjednotek nebo u fibroblastů pacientů s defekty asemblačních faktorů?

I přes výtky k formální stránce práce je nesporné, že předkládaná práce obsahuje unikátní vědecké poznatky, na jejichž získání měla Mgr. Česneková klíčový podíl. Proto dle mého názoru disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

V Praze 20. 1. 2019

Mgr. Petr Pecina, PhD.

Odd. bioenergetiky
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

