

**Posudek k disertační práci : „Biochemical and functional manifestation of inherited disorders of the mitochondrial  $F_1F_0$  ATP synthase“, kterou vypracoval a předložil MUDr. Pavel Ješina z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky.**

Předmětem disertační práce je studium klinických projevů a patofyziologických dopadů izolovaných nukleárně i mitochondriálně podmíněných defektů mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy.

Disertační práce je předkládána formou teoretického úvodu a následného komentáře a shrnutí výsledků přiložených publikovaných prací.

V teoretické části autor prezentuje ucelenou formou základní buněčné, organelové, biochemické a molekulární aspekty systému oxidativní fosforylace. Podrobně popisuje strukturu, biogenesi a molekulární funkci mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy. Shrnuje současné znalosti o klinických projevech, biochemických dopadech, genetické podstatě a možné patogenezi defektů systému oxidativní fosforylace.

Vlastní experimentální práce byly zaměřeny na :

- A) charakterizaci strukturálních a funkčních změn mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy a cytochrome c oxidasy v důsledku mikrolece mitochondriálně kódované podjednotky *ATP6*
- B) objasnění funkčních dopadů homoplasmické mutace iniciačního kodonu *ATP6*
- C) korelaci biochemických dat a klinických projevů u 14 pacientů s nukleárně kódovaným defektem mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy
- D) charakterizaci patofyziologických mechanismů spojených s poruchou systému oxidativní fosforylace a zvýšené produkce volných radikálů u izolovaných defektů mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy

Dosažené výsledky jsou prezentovány v 5-ti přiložených člancích. Všechny články prošly recenzním řízením a byly publikovány v časopisech s definovaným impakt faktorem. Články č.1, 2 a 3 jsou experimentálního charakteru a prezentují výsledky zkoumání funkčních dopadů vybraných mutací v genu *ATP6*. Článek č.4 je mezinárodní studií klinického charakteru shrnující klinická a laboratorní data získaná u pacientů s nukleárním defektem ATP synthasy. Článek č.5 je přehledem o mitochondriálních onemocněních a geneticky podmíněných defektech ATP synthasy.

Pavel Ješina je prvním autorem jedné z uvedených prací. V ostatních pracích je spoluautorem. I když z předložených prací nevyplývá jednoznačně experimentální a intelektuální podíl autora na jejich vzniku, předpokládám, že minimálně v práci č.1, kde je uveden jako hlavní autor, a v práci č.4 kde je uveden jako první z českých autorů je jeho podíl významný. Tyto dvě práce jsou proto z mého pohledu pro hodnocení předložené disertace zásadní.

V práci č.1 je prezentováno víceméně úplné spektrum biochemických a molekulárně biologických metod, které se v současnosti používají k určení molekulární podstaty a následné funkční charakterizaci mitochondriálních onemocnění. Práce zahrnuje rodinnou anamnézu a základní klinické a biochemické charakteristiky pacienta s vzácným onemocněním a dokumentuje diferenciálně diagnostické schéma používané v současnosti u pacientů s podezřením na mitochondriálních onemocnění. Předkládá výsledky biochemické analýzy tělních tekutin, tkáňových biopsií a tkáňových kultur, vedoucí k podezření na izolovaný defekt ATP synthasy, které je následně potvrzeno pomocí sekvenační analýzy mitochondriálního genomu. Funkční dopady nalezené mutace jsou následně komplexně studovány a popisovány na úrovni genové (stupeň heteroplasmie mt DNA), transkripční (Northern blot, qPCR), proteinové (2D-elektroforéza, „pulse-chase“ experimenty) a biochemické (oxygrafie, produkce ATP, změny membránového potenciálu) se snahou korelovat získané výsledky s pozorovanými fenotypovými projevy. V rámci této práce autor prokazatelně zvládl celou řadu molekulárně biologických technik a pochopil systém a význam molekulární diagnostiky a funkční charakterizace nelezeneých genových mutací u dědičně podmíněných onemocnění. Tento postup a dosažené výsledky jsou následně uplatněny v práci č.4, která představuje světově unikátní soubor pacientů s poruchou mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy a je východiskem pro identifikaci doposud neznámých genů podmiňujících tuto skupinu onemocnění.

#### **Závěr**

Předložená disertační práce je ucelenou studií geneticky podmíněných defektů mitochondriální  $F_1F_0$  ATP synthasy. Řešené téma je aktuální. Výsledky rozšiřují znalost spektra mutací ve studovaných genech a poskytují základní informace pro studium patogeneze a léčby onemocnění. Koncepce studie je obdobná jako v celé řadě studií molekulární podstaty dědičně podmíněných onemocnění. Autor prokazatelně zvládl a využil celou řadu molekulárně biologických technik systému molekulární diagnostiky mitochondriálních onemocnění, které aplikoval na dostupném souboru pacientů.

Výsledky autor prezentoval ve 5-ti článcích (1 krát první autor) uveřejněných v zahraničních časopisech s impakt faktorem.

Z předložené práce je zřejmé, že se v osobě autora spojuje odbornost klinická s odborností experimentální. Toto spojení je nezbytné pro samostatnou tvořivou vědeckou práci v biomedicíně. Autor proto splňuje předpoklady k udělení titulu PhD.

V Praze, 31.7.2007

Ing. Stanislav Kmoch, CSc.

