

Oponentský posudek diplomové práce Hany Nůskové: „Mitochondriální cytochrom c oxidasa: inhibice kyanidem a vliv defektu asemblačního faktoru Surf1“.

Předkládaná diplomová práce představuje příspěvek k poznání funkce cytochrom oxidasy, IV. komplexu mitochondriálního systému oxidační fosforylace. Autorka použila dva experimentální modely. Tím prvním byly izolované jaterní mitochondrie a u nich sledovala vliv inhibitoru (KCN) na různé funkce cytochrom oxidasy, tedy transport elektronů, pumpování protonů a afinitu ke kyslíku. Druhým modelem byly fibroblasty myši, u kterých byla vyřazena předpokládaná funkce proteinů působících při sestavování komplexu cytochrom oxidasy, konkrétně jaderně kódovaného proteinu SURF1. Problematika biosyntézy podjednotek jednotlivých komplexů oxidační fosforylace a jejich sestavení do funkčních celků je velice složitá, neboť tyto komplexy jsou, s výjimkou druhého, kódovány jak jaderným tak i mitochondriálním genomem a k jejich správnému sestavení je společně se strukturními proteiny zapotřebí i celá řada proteinů pomocných.

V úvodní části diplomové práce jsou přehledně shrnuty nejdůležitější poznatky o stavbě a bioenergetické funkci mitochondrií. Další část je věnována komplexu cytochrom oxidasy, její stavbě, funkci, sestavování při biosyntéze a nakonec také poměrně podrobně inhibici tohoto enzymu inhibitory, zejména pak kyanidem. Celý úvod působí zasvěceným dojmem a podle mého názoru svědčí o dobré orientaci autorky v dané problematice

K teoretické části práce mám několik připomínek. Autorka se v úvodu zmiňuje o savčím mitochondriálním genomu, ve výčtu genů však chybí zmínka o dvou genech pro ribosomální RNA. Nebyla mi také jasná pasáž o původu vnější mitochondriální membrány. Z literatury jsem získal dojem, že také ona je bakteriálního původu, viz např. existence porinů u bakterií a semiautonomních organel či shodná stavba komplexu pyruvát dehydrogenasy u mitochondrií a gram-negativních bakterií, které jsou považovány za mitochondriím nejbližší. Propásl jsem tedy něco a představy se změnily? Co se týče obrázku 2.2 na str. 15, za mírně matoucí považuji počty pumpovaných H^+ , někde odpovídají současné představě o počtu pumpovaných protonů na elektronový pár a na syntézu jedné molekuly ATP, jinde tomu tak není. Podle mě by stačilo pouze přehodit čtyři červené vodíkové kationty u čtvrtého komplexu se dvěma u komplexu třetího, aby obrázek vypadal jako z učebnice biochemie. V kapitole o protekci proti kyanidu je zmínka o fyziologické přítomnosti dihydroxyacetonu, kde tato sloučenina v organismu vzniká?

Metodická část diplomové práce ukazuje, že Bc. Hana Nůsková ovládla a použila široké spektrum experimentálních metod, které jí posloužilo pro zevrubné zkoumání zvolené problematiky. K této části mám jedinou připomínku, a to k obrázku 3.10. Zařazení podobrázku E podle mě svědčí o estetickém cítění autorky či o jejím smyslu pro humor, nebo o obojím. Domnívám se, že grafické vynesení závislosti $\Delta A/\text{min}$ na koncentraci KCN je dostatečně přesvědčivé. Navíc jsem musel použít holmesovské deduktivní metody a zvětšovacího skla, abych zjistil, že označení poslední, nejtemnější kvety není 10, ale 40 se zmrzačenou nožičkou u čtyřky.

Výsledková část je logicky rozdělena na dva oddíly, ten první je věnován kyanidové inhibici cytochrom oxidasy a ten druhý defektu SURF1 proteinu. V části Diskuze pak autorka rozsáhle a fundovaně komentuje své výsledky, porovnává je s výsledky jiných autorů a na jejich základě vytváří vlastní závěry. Opět mám několik drobných připomínek, na straně 71, na 12. řádku shora se píše o aktivitě celého dýchacího řetězce, byla to ale část od Komplexu II, nebo se mýlím? Na straně 72 jsem nerozuměl větě začínající na 5. řádce odspodu, neschází tam zápor? A není nějaké přijatelné české slovo pro, na první pohled nepěknou, „upregulaci“?

Na závěr jsou hlavní výsledky přehledně shrnuty do čtyř bodů a doprovozeny ilustrativním schématem i s pirátskou vlajkou.

Práci vysoce hodnotím z hlediska formální úpravy, ani po pečlivém přečtení jsem nenarazil na překlep či prohřešek proti českému pravopisu. Výborným dojmem působí také pečlivě provedené grafy, jejichž barevnost a kontrast ve mně probouzejí již lety zasutou závist a vzpomínku na lopotnou dřinu s tuší, trubičkovými pery, žiletkou a vynálezem zvaným Propisot. Možná bych jen zvolil větší velikost obrázků, zejména u grafů, které obsahují ještě graf vložený.

K práci mám následující otázky:

1. Proč byly v práci použity pouze substráty pro Komplex II a Komplex IV a ne také NAD dependentní substráty, které by mohly ukázat případnou úlohu Komplexu I?
2. V úvodu autorka spekuluje o možné kompetitivní inhibici sukcinát dehydrogenasy oxalacetátem, nezkusila to? Nemělo by to být obtížné, stanovení K_i pro malonát je úlohou v praktických cvičeních z biochemie.

3. S tím souvisí další otázka, při použití vysokých koncentrací pyruvátu za účelem odstranění kyanidové inhibice, nemůže v pyruvát karboxylasové reakci vznikající oxalacetát interferovat s elektrontransportním řetězcem (SDH)?
4. Je znám mechanismus přenosu elektronů z askorbátu a TMPD na cytochrom oxidasu?
5. Má autorka nějakou pracovní hypotézu o příčinách rozdílů v úloze proteinu SURF1 u myší a lidí?

Přes uvedené připomínky považuji diplomovou práci Bc. Hany Nůskové za hodnotnou. Autorka získala pomocí celé řady metod mnoho nových poznatků, které mohou významně přispět k bližšímu pochopení mechanismu poruch mitochondriálního energetického metabolismu a zároveň ke zlepšení péče o oběti otravy kyanidy.

Předkládaná práce podle mého názoru splňuje všechny požadavky kladené na práci diplomovou a doporučuji ji proto jako takovou přijmout.

V Praze 21. května 2010

Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.