

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Radky Bolehovské:

**Možnosti indukce UCP2 (uncoupling protein 2) v hepatocytech potkana v podmínkách *in vivo*.**

Mgr. Radka Bolehovská vypracovala svou disertační práci na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové pod vedením prof. MUDr. Zuzany Červinkové, CSc. Výzkumná problematika tohoto ústavu je dlouhodobě zaměřena na sledování změn a regulace metabolismu jaterních buněk, přičemž jako modely jsou využívány některé mezní situace v životě buněk, jako je regenerace jaterní tkáně po částečné hepatektomii, či působení hepatotoxických látek. Autorka hlavní úsilí zaměřila na vypracování a zavedení metodiky stanovující expresi mRNA rozpřahujícího proteinu 2 v jaterní tkáni a následně tuto metodiku použila pro stanovení hladin proteinu UCP2 za různých experimentálních podmínek. Naše představy o funkci mitochondriálních odpřahujících proteinů se za více než třicet let od jejich objevu významně rozrostly. Od původní víceméně jednoduché představy proteinu thermogeninu, který zkratuje protonový gradient a tím netřesově produkuje teplo, jsme se dostali k dnešnímu stavu, kdy známe nejméně pět isoform rozpřahujících proteinů u živočichů a další u rostlin. Je prokázáno, že tyto proteiny regulují celou řadu buněčných funkcí a zcela jistě bude potřeba ještě dlouhé řady experimentů, vědeckých pracovníků a grantových aplikací, než se podaří všechny funkce rozpřahujících proteinů objasnit. Mgr. Radka Bolehovská se do této řady připojila a na svém pracovišti připravila základy pro další rozvoj této zajímavé problematiky, která může přinést další plody jak v oblasti základního, tak i klinicky orientovaného výzkumu.

Disertační práce je klasicky členěna. K jednotlivým částem mám několik připomínek, které uvedu postupně ke každé části zvlášť.

1. Seznam zkratek mi připadá zbytečně rozsáhlý. Vysvětlení některých zkratek je podle mě zbytečné (LF – lékařská fakulta, či FN – fakultní nemocnice) a myslím, že potenciální čtenář díla zná zkratky pro ampér či volt. Jiné zkratky toho moc nevysvětlují, U je mezinárodní jednotka čeho?, a informace, že SURF1 je surfeit 1 někomu, kdo není obeznámen s biogenezí mitochondrií, mnoho neřekne.

2. Teoretický úvod práce je rozsáhlý přehled zkoumané problematiky, který zabírá téměř polovinu disertační práce. Po uvedení do obecné problematiky rozpřahujících proteinů se autorka věnuje UCP2 ze všech možných úhlů pohledu a seznamuje čtenáře s posledními poznatky na poli biochemie a molekulární biologie těchto proteinů a jejich možné úloze v

životě organismů. Závěr kapitoly je věnován thyreoidním hormonům a regeneraci jater. Celý literární přehled působí fundovaným dojmem a dokládá dobrou orientaci autorky v problematice a zvládnutí teoretických základů. Mám však pocit, že úzeji pojatý teoretický úvod k práci zabývající pouze vztahem UCP2 k jaterní tkáni by prospěl přehlednosti a čtivosti této kapitoly. Kvalitu textu bohužel znešvařují některé nejasnosti, či nepřesnosti. Uvedu pro ilustraci pouze některé: str. 11 – v současné době se počítá se 2,5 či 1,5 molekuly ATP na elektronový pár v závislosti na jejich zdroji; str. 13 – nikde jsem nenarazil na to, že George Emil Palade se někdy přepisoval jako Paladeus, součástí TOM komplexu je porin TOM40, kterým procházejí rozbalené proteiny; str. 14 – TIM komplex slouží pro přenos proteinů, ionty a substráty jsou přenášeny specifickými transportními systémy; str. 15 – jaký je rozdíl mezi dýchacím (elektron transportním) řetězcem a oxidativní fosforylací?, ve shrnutí produktů Krebsova cyklu schází GTP; str. 16 – v popisu funkce Komplexu III je pominut Q-cyklus a cesta elektronů v Komplexu IV a úloha cyt aa<sub>3</sub> a atomů mědi je poměrně dobře popsána; str. 18 – elektrony v 5. řádce jsou pravděpodobně protony; str. 40 – zde je zmínka o „snížení UCP“ u žen při orgasmu, ale žádná z okolních citací tento fakt nezmiňuje. Pokud se nejedná se o žert, jak se takové hodnoty získávají? Takovýchto nepřesností obsahuje text více, a i když podle mého názoru práci nediskvalifikují, zbytečně snižují její kvalitu.

3. Kapitola „Materiál a metody“ představuje detailní popis různých metodických přístupů a svědčí o snaze autorky popsat použité metody opravdu podrobně. To však někde působí kontraproduktivně, text trpí úpornou rozvleklostí a čtenář se místy může domnívat, že listuje návody pro základní praktická cvičení z molekulární biologie. Myslím, že v textech této úrovně není třeba podrobně popisovat principy western a northern blotu, PCR, či že víčko přístroje pro provádění real-time PCR tlačí na mikrodestičku vahou 31,8 kg. S touto, možná až přehnanou pečlivostí, kontrastují některé nedbalosti v jiných částech metodické kapitoly: na straně 66 v poslední řádce je koncentrace homogenátu pravděpodobně 1g/10ml, uvádět parametry centrifugace v otáčkách za minutu bez uvedení parametrů rotoru je bezcenné, nutné je uvést násobky gravitačního zrychlení či rcf. Pro stanovení aktivity GPDH (str. 68) je uvedena koncentrace zásobního roztoku glycerolfosfátu, ale koncentraci v kyvetě neznáme, je či není saturující?

4. Ve výsledkové části autorka shrnuje přehledně dosažené výsledky ve formě přehledných tabulek a grafů. Grafická stránka je dobrá, tabulky i grafy jsou dobře čitelné

včetně popisů os. Zaujal mě obr. 30A, kde se u mitochondrií potkanů ovlivněných T3 na western blotu objevuje ještě jedna skvrna, jedná se isoenzym stimulovaný hormonem?

5. V části Diskuse pak autorka rozsáhle a zasvěceně komentuje své výsledky, porovnává je s výsledky jiných autorů a na jejich základě vytváří vlastní závěry.

K práci mám ještě několik dotazů:

1. V modelu cyklujících mastných kyselin je postulován návrat protonovaných mastných kyselin z mezimembránového prostoru do mitochondriální matrix. Je známo jak tento transport probíhá? Je to prostá difuze či nějaký asistovaný transport (autorka zmiňuje flip-flop)? Nemůže tento transport interferovat s acylCoA-karnitin přenašečovým systémem? Jak dlouhé mastné kyseliny mohou takto procházet a má na přenos nějaký vliv přítomnost dvojných vazeb? Je známo jaká je koncentrace volných mastných kyselin v mitochondriální matrix?
2. Předpokládám, že aktivita GPDH byla měřena při koncentracích substrátu, který představoval násobky  $K_M$ , nepokusili jste se zjistit, zda kromě  $V_{max}$  není ovlivněna také Michaelisova konstanta?
3. Nebyl mi zcela jasný vztah mezi experimentální a in vivo koncentrací T3, může fyziologická koncentrace tohoto hormonu za fyziologických podmínek dosahovat v experimentu dosažených hodnot a je skutečně obsazenost receptorů mírou odpovědi?
4. V práci jsem narazil na tvrzení, že adenin nukleotidový translokátor (ANT) odpřahuje oxidační fosforylaci. Jaký je mechanismus tohoto odpřažení?

Přes uvedené výhrady či připomínky, jsem přesvědčen o tom, že Mgr. Radka Bolehovská ve své disertační práci přináší celou řadu nových a významných zjištění, které jistě přispějí k hlubšímu pochopení funkce mitochondriálních rozpřahujících proteinů. Tyto výsledky mají i důležitý klinický význam.

Mgr. Radka Bolehovská ve své disertační práci prokázala, že je schopna samostatné vědecké práce a doporučuji proto, aby ji na jejím základě byla udělena vědecká hodnost PhD.

V Praze, dne 22. 8. 2012



Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.