

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Venduly Karbanové:

**Mitochondrial ATP synthase deficiencies of a nuclear genetic origin.**

Mgr. Vendula Karbanová vypracovala svou disertační práci na Oddělení bioenergetiky Fyziologického ústavu AVČR pod vedením MUDr. Josefa Houšťka, DrSc. Výzkumná činnost tohoto pracoviště je zaměřena na studium mitochondriálního energetického metabolismu. Zmíněné oddělení se problematikou mitochondriální oxidační fosforylace, jejích poruch a zejména pak biogenezí jednotlivých komplexů zabývá již dlouho a o úspěšnosti jeho výzkumu svědčí celá řada publikací v prestižních časopisech.

Předkládaná disertační práce je zaměřena obecně na mitochondriální energetický metabolismus, zejména na studium biogeneze komplexu V systému oxidační fosforylace a jejích poruch. K tomuto účelu úspěšně využívá jako modelu buňky získané od pacientů s vrozenými poruchami mitochondriálního metabolismu.

Oxidační fosforylace představuje unikátní systém složený z pěti komplexů, které jsou tvořeny dohromady z více než 80 proteinových podjednotek kódovaných jak jaderným, tak i mitochondriálním genomem. Na biosyntéze a sestavení jednotlivých komplexů se navíc podílí pravděpodobně desítky dalších pomocných proteinů, z nichž většina na objevení zřejmě teprve čeká. Z toho vyplývá, že míst, ve kterých může dojít k poruše a dysfunkci celého systému oxidační fosforylace je skutečně mnoho. Posloupnost a mechanismus sestavování jednotlivých komponent do funkčních komplexů jsou zatím nedostatečně objasněny a právě vrozené genetické vady, které způsobují poruchy oxidační fosforylace, představují užitečný model sloužící k odhalování mechanismu biogeneze jednotlivých komplexů oxidační fosforylace.

Mgr. Vendula Karbanová se ve své disertační práci zaměřila na poruchy Komplexu V, tedy  $F_0F_1$  ATP syntázy způsobené mutacemi jaderných genů. V první části práce se zabývá zkoumáním a charakterizací, na mateřském pracovišti, nově objeveného genu pro dosud neznámý mitochondriální protein fungující jako asemblační faktor pro Komplex V. Druhá část je věnována mutaci genu, který kóduje jednu ze strukturních podjednotek  $F_1$  části ATP syntázy. Autorka se ve své disertační práci pokusila přispět k objasnění procesu biogeneze pátého komplexu v systému oxidační fosforylace, zejména pak úlohu nově objeveného asemblačního faktoru a podjednotky centrálního stonku  $F_1$  subkomplexu.

Předkládaná disertační práce svědčí o tom, že autorka získala celou řadu cenných poznatků vtělených do 5 publikací, které tvoří integrální součást práce. Jedná se o publikace

v mezinárodních časopisech s vysokým IF a u dvou publikací je Mgr. Vendula Karbanová uvedena jako první autorka. Výsledky obsažené v připojených publikacích jsou, jak jinak, výsledkem badatelského úsilí širokého týmu lidí, autorka však ve své disertační práci přesně uvádí, jaký byl její osobní podíl na získaných datech. V každém případě z disertační práce vyplývá, že Mgr. Karbanová ovládla a použila široké spektrum laboratorních metod, od kultivací tkáňových buněk, přes biochemická měření až po metody molekulární biologie

Teoretický úvod předkládané disertační práce představuje ucelený přehled zkoumané problematiky. Je přehledně členěný a seznamuje čtenáře s posledními poznatky na poli biochemie a molekulární biologie mitochondriální oxidační fosforylace, zejména pak Komplexu V a svědčí o dobré orientaci autorky v problematice a vynikajícím zvládnutí teoretických základů. Také souhrn výstižně prezentuje nejdůležitější výsledky obsažené v jednotlivých publikacích a vhodně je dává do vzájemných souvislostí. Ve čtvrté kapitole jsou přehledně seřazeny všechny hlavní výsledky obsažené v disertační práci.

Po formální stránce je práce velice pěkná. Je psána v anglickém jazyce, a pokud mohu soudit, na výborné úrovni. Narazil jsem na minimum překlepů (str. 14, dvakrát tRNA v šestém řádku odspodu, či tvrzení, že gen *OPA1* kóduje GTP na str. 45). Obrázky jsou až na jednu výjimku úpravné a názorné, i když někdy by si zasloužily větší rozměr (Fig. 5).

K práci mám následující připomínky či dotazy:

1. Na obrázku 1 je ukázán Paladeho klasický vaflový model mitochondrie a jejích krist. V současnosti však začíná být přijímán model tubulárních krist. Pěkný obrázek je k nalezení např. v pátém vydání „Molecular Cell Biology“ od Lodishe a spol. (str. 525).
2. Zajímalo by mě, které další geny, kromě *ATP6* a *ATP8*, se v savčím mitochondriálním genomu překrývají.
3. Jsou všechny mitochondriální proteiny kódované jadernou DNA transportovány posttranslačně.
4. Autorka na str. 18 a 21 tvrdí, že počet  $H^+$  transportovaných jednotlivými komplexy elektron transportního řetězce (I, III a IV) je 4, 2, 4 na elektronový pár. Podle mě, a koneckonců i učebnic biochemie, je tento počet 4, 4, 2 protony na  $2 e^-$ .
5. V literárním úvodu mě zaujala zmínka o kvasinkách *S. cerevisiae* a *pombe*, které nemají Komplex I. Je známo jak oxidují NADH?

6. Neporozuměl jsem obrázku 8. Ač jsem na střední škole bez větších problémů absolvoval deskriptivní geometrii, nedokázal jsem si představit zmíněné úhly  $70-90^\circ$  a  $40^\circ$ . Postrádal jsem také popis různobarevných obdélníků ve struktuře ATP syntázy. Čtenář, který strukturu tohoto enzymu zná, se nakonec dovtípí co je co, ale chvíli to trvá.
7. Autorka v tabulce sumarizující skupiny pacientů nesoucí mutaci v genu TMEM70 uvádí etnikum Arab Muslim. Jedná se o zvláštní etnikum, které se kromě vyznání liší i jinak od arabských křesťanů či ateistů?
8. Má autorka nějakou pracovní hypotézu o tom jak se studované proteiny podílejí na biogenezi Komplexu V? Jaký je možný mechanismus působení nového asemblačního proteinu TMEM70? Proč podjednotka  $\epsilon$ , která je součástí centrálního stonku, ovlivňuje biogenezi c-kruhu? Podle současné představy o biogenezi Komplexu V (obr. 10, str. 34) se zdá, že F1 část a c-kruh vznikají nezávisle.

Přes uvedené výhrady či připomínky, jsem přesvědčen o tom, že disertační práce Mgr. Venduly Karbanové je prací vysoce nadprůměrnou a přináší celou řadu nových a významných zjištění, které jistě přispějí k hlubšímu pochopení procesu biogeneze a funkce mitochondriální ATP syntázy a jejích poruch. Tyto výsledky mohou mít v konečném důsledku i významný klinický dopad.

Podle mého názoru Mgr. Vendula Karbanová ve své disertační práci prokázala, že je schopna samostatné vědecké práce a doporučuji proto, aby jí na jejím základě byla udělena vědecká hodnost PhD.

V Praze, dne 11. 3. 2013



Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.