

Oponentský posudek disertační práce Ing. Tomáše Špačka:

Mitochondrial uncoupling and mitochondrial morphology in relation to type-2 diabetes

Ing. Tomáš Špaček vypracoval svou disertační práci v Oddělení biofyziky membránového transportu, Fyziologického ústavu AVČR pod vedením RNDr. Petra Ježka, DrSc. Kolektiv tohoto oddělení se problematikou mitochondriálních rozpřahujících proteinů v různých tkáních a s tím souvisejícími poruchami homeostáze organismu zabývá již dlouho a také úspěšně o čemž svědčí celá řada publikací v prestižních časopisech. Ing. Tomáš Špaček svou disertační práci zaměřil na mechanismus fungování rozpřahujících proteinů, možnou úlohu jedné isoformy při vzniku diabetes mellitus druhého typu a morfologické změny mitochondriálního retikula spojené s touto chorobou.

Naše představy o funkci mitochondriálních odpřahujících proteinů se za oněch 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, až po dnešní stav, kdy známe nejméně pět isoform rozpřahujících proteinů u živočichů a další u rostlin. Zdá se, že funkce těchto proteinů souvisí s celou řadou buněčných funkcí a zcela jistě bude potřeba ještě dlouhé řady experimentů, vědeckých pracovníků a grantových aplikací, než se podaří všechny funkce rozpřahujících proteinů objasnit. Ing. Tomáš Špaček se do této řady připojil a získal množství zajímavých výsledků.

Autor si stanovil několik cílů, snažil se přispět k objasnění mechanismu transportu protonů přes rozpřahující protein, určit interakci mezi rozpřahujícím proteinem 2 a mastnými kyselinami, blíže popsat energetický metabolismus buněk, které slouží jako model pro výzkum vlastností β -buněk Langerhansových ostrůvků a konečně pomocí atraktivní zobrazovací metody nalézt rozdíly v morfologii mitochondriálního retikula u normálních a diabetických β -buněk.

Autor celou řadu nových informací skutečně získal, jsou součástí sedmi publikací uveřejněných v zahraničních časopisech. Ve vlastní disertační práci jsou hlavní zjištění formulována ve čtyřech bodech. V těchto bodech uspokojivě odpovídá na čtyři otázky položené v úvodu práce.

Disertační práce je klasicky členěna. Teoretický úvod práce je ucelený přehled zkoumané problematiky. Je logicky členěný a seznamuje čtenáře s posledními poznatky na poli biochemie a molekulární biologie rozpřahujících proteinů a jejich možné úloze v životě organismů. Dále se věnuje problematice metabolismu buněk pankreatu a nakonec také

metodice 4Pi vysokorozlišující 3D mikroskopii. Celý literární přehled působí fundovaným dojmem a dokládá dobrou orientaci autora v problematice a zvládnutí teoretických základů. K této části práce mám několik připomínek: a) V úvodu je uvedeno, že v současné době existují dva navrhované mechanismy pro proton transportní funkci rozpřahujících proteinů, na straně 9 jsou pak uvedeny tři. Uvědomuji si, že druhý a třetí model jsou v podstatě modifikací jednoho, ale tato nesrovnalost působí zvláště. b) Na obrázku 1 se mi nepodařilo rozluštit, co znamená +ve u třech šipek a vysvětlení jsem nenalezl ani u uvedeného hesla ve Wikipedii. c) Na straně 20 se poměrně obecně píše o glukotoxicitě, jaké konkrétní produkty glykolýzy mohou působit toxicky a kde? d) Na straně 24 jsem se nemohl dopočítat v mitochondriích vzniklých molekul ATP. Proč maximálně 29 a ne 30 molekul ATP?

Kapitola Materiál a metody představuje úctyhodný soupis různých metodických přístupů a svědčí o snaze pojmout zkoumanou problematiku z mnoha různých úhlů. Na druhé straně, některé podkapitoly působí poněkud stroze a nejsem si jistý, zda by bylo snadné podle nich danou metodu opakovat.

V rozsáhlé výsledkové části autor shrnuje přehledně dosažené výsledky. K této části mám pouze jednu připomínku, která se týká velikosti prezentovaných grafů. Většina z nich by si zasloužila být větší, některé popisky se špatně čtou. U grafu č. 22 je šedá linie vyznačující vzorek v médiu s vysokým obsahem glukosy téměř neviditelná (možná pouze u mého výtisku disertační práce).

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

Disertační práce je napsána v anglickém jazyce, a to, pokud mohu soudit, angličtinou velice slušnou. Nalezl jsem pouze dvě gramatické chyby, pravděpodobně překlepy (str. 23 „glycolitic“ a str. 24 „tricarboxilic“).

K práci mám několik připomínek, popřípadě dotazů:

1. V modelu cyklujících mastných kyselin je postulován návrat protonovaných mastných kyselin z mezimembránového prostoru do matrix. Je známo jak tento transport probíhá? Je to prostá difuze či nějaký asistovaný transport? 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 matrix?

2. Autor píše o významu oxidačního stresu a jeho možném vlivu na vznik diabetu 2. typu. Zde by asi bylo vhodné zmínit, že zdrojem kyslíkových radikálů je také glycerol fosfátové kyvadlo, které, jak autor zmiňuje, je v β -buňkách aktivní.
3. Nerozuměl jsem úvaze o změnách koncentrací ATP a ADP. Pokud se koncentrace ADP prudce sníží a koncentrace ATP se změní pouze mírně, jaký je osud zmizelého ADP. Nebo se jedná pouze o důsledek výrazných rozdílů v koncentraci těchto nukleotidů.
4. Autor spekuluje o možné roli GTP vznikajícího v Krebsově cyklu. Je něco známo o aktivitě nukleosid difosfát kinázy, která reguluje poměry jednotlivých nukleotidů v buňce?
5. Existuje nějaká teoretická představa mechanismu, prostřednictvím kterého by snížený obsah mtDNA inicioval rozpad mitochondriálního retikula u b-buněk potkanů Goto Kakizaki? Neví se u těchto buněk něco o obsahu a případně aktivitě proteinů rodiny DRP či FIS1, které působí při dělení mitochondrií?

Přes uvedené výhrady či připomínky, jsem přesvědčen o tom, že Ing. Tomáš Špaček 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, neboť přispívají k objasnění příčin diabetes 2. typu, která dnes patří k závažným zdravotním ohrožením.

Ing. Tomáš Špaček ve své disertační práci prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce a doporučuji proto, aby mu na jejím základě byla udělena vědecká hodnost PhD.

V Praze, dne 27. 5. 2010

Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.