

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Petra Zouhara: „Vztah n-3 polynenasycených mastných kyselin a buněčných senzorů energetického stavu AMPK a SIRT1“

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem mechanismů, kterými n-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) přítomné v tukách z mořských ryb stimulují v bílé tukové tkáni biogenezi mitochondrií a oxidaci mastných kyselin. Práce tak rozvíjí jedno z nosných témat Oddělení biologie tukové tkáně Fyziologického ústavu AV ČR, v. v. i. Tato problematika je v současnosti hojně studována, neboť nové poznatky by měly vést k účinným terapeutickým postupům při léčení obezity, diabetu 2. typu, inzulinové rezistence a dalších souvisejících příznaků shrnovaných pod termín „metabolický syndrom“. V této souvislosti představují n-3 PUFA jedny z nejslibnějších farmak/potravinových doplňků, jejichž nesporný benefiční účinek byl na zvířecích modelech již prokázán mimo jiné i na pracovišti diplomanta.

Diplomová práce sleduje klasické formální členění. V teoretické části jsou shrnuty znalosti o regulaci metabolismu tukové tkáně, autor se podrobně věnuje především hormonální regulaci a signálním proteinům ovlivňujícím expresi enzymů metabolických drah. Zpracování této části svědčí o dobré orientaci autora ve studované problematice, na závěr autor předkládá hypotézu, že pro metabolismus adipocytů je klíčová součinnost mocného triumvirátu tří proteinů – AMPK, deacetylázy SIRT1 a transkripčního koaktivátoru PGC-1 α .

Metodická část svědčí o širokém spektru metod, které si autor během práce osvojil – od izolace nukleových kyselin až po specializovaná funkční měření, jakými jsou stanovení mitochondriální respirace nebo oxidace mastných kyselin.

Výsledková část popisuje konkrétní práci diplomanta, jedná se především o zavádění a validaci nových modelů pro studium vlivu n-3 PUFA, jimiž jsou AMPK α KO MEF, a myši kmeny AMPK α 1 +/- a SIRT1 +/- . Autor upřímně prezentuje dílčí úspěchy i neúspěchy, které zavádění nových modelů nezbytně doprovázejí. Vyzdvihl bych nicméně dva velmi významné dosažené poznatky – i) výsledky experimentů na modelu SIRT1 +/- prokazují, že se tato deacetyláza účastní zprostředkování efektu n-3 PUFA, ii) n-3 PUFA v dietě podávané kontrolním myším v kombinaci s 10% kalorickou restrikcí vedou k více než zdvojnásobení rychlosti mitochondriální respirace v adipocytech izolovaných z gonadálního tukového depa. Výsledky jsou pak fundovaně komentovány v diskuzi.

K práci mám následující připomínky a otázky:

1. Formální připomínky – jako ve většině diplomových prací i v této se najde několik formálních nedostatků: i) v kapitole 6.2.2.1 je odkaz na neočíslovaný, navíc neexistující obrázek; obecně zařazení více obrázků a schémat by teoretickou část oživilo. ii) vyjímečně se objeví i nepřesné formulace – např. v kapitole 6.2.3. píšete, že v hnědé tukové tkáni je předpokladem efektivní tvorby tepla vybudování dostatečného protonového gradientu – ten je ale v této tkáni minimální, přesněji se jedná o masivní protonový tok (obousměrný) přes vnitřní mitochondriální membránu.
2. Z jakého důvodu jste se rozhodl stanovovat množství mitochondrií v tukové tkáni pomocí poměrně necitlivé kvantifikace mitochondriálních cytochromů. Ostatní metody (například semi-kvantitativní analýza obsahu OXPHOS proteinů pomocí Western blotu a imunodetekce) sice negenerují absolutní hodnoty koncentrací, ale mohly by být výhodnější z hlediska nižších nároků na množství analyzovaného materiálu. V práci uvádíte jen hodnoty cytochromu b, měřil jste i koncentrace ostatních cytochromů přítomných v komplexech respiračního řetězce (c nebo a),

jejichž obsah by měl být řádově stejný? Mohou být výsledky kvantifikace cytochromu b v membránové frakci tukové tkáně zkresleny přítomností mikrosomálního cytochromu b5?

3. Při měření mitochondriální respirace v kultivovaných AMPK α KO buňkách a v izolovaných adipocytech mohlo být použito širší spektrum substrátů. Jedná se o modelové systémy, které nejsou z hlediska funkce mitochondrií příliš podrobně prostudovány a experimenty s různými kombinacemi substrátů mohly přinést dosud nepublikované poznatky. Konkrétně se dal využít např. palmitoyl-karnitin, který by poukázal na schopnost respiračního řetězce oxidovat FADH pocházející přímo z β -oxidace. Nezavrhoval bych ani kombinaci askorbát/TMPD, které dodávají elektrony až na úrovni komplexu IV. Ten je sice, jak správně uvádíte, většinou v nadbytku oproti ostatním komplexům respiračního řetězce, jedná se ale o tkáňově-specifický fenomén a v adipocytech nebyl, myslím, dosud kvantifikován. Proč jste u měření s adipocyty používal nepříliš obvyklou normalizaci rychlosti respirace na množství DNA?
4. Nedochází u myšího modelu AMPK α 1 KO ke kompenzační upregulaci druhého subtypu aktivní kinázové podjednotky? V takovém případě by se tento modelový systém hodil ke studiu tkáňově specifity působení dvou izoform AMPK α .
5. Některé recentní práce uvádějí přítomnost SIRT1 i PGC-1 α v mitochondriích, kde by měly v součinnosti s mitochondriálním transkripčním faktorem A (TFAM) regulovat transkripci mitochondriálního genomu (Aquilano et al., JBC 2010, May6 epub ahead of print, PMID: 20448046). Mohl by vámi studovaný model SIRT1 +/- myší použít pro experimenty rozlišující mezi regulačním působením těchto proteinů na expresi genů v jádře a přímo v mitochondrii?
6. Jaké typy PUFA se vyskytují ve sladkovodních rybách, mohou také mít benefiční účinky na metabolismus tukové tkáně podobně jako EPA a DHA z mořských ryb?

Přes uvedené připomínky považuji předkládanou diplomovou práci Bc. Petra Zouhara za hodnotnou, autor splnil vytyčené cíle a získal některé cenné poznatky pro pochopení řízení metabolismu bílé tukové tkáně, které doufejme v budoucnu přispějí k vývoji terapií proti metabolickému syndromu.

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

V Praze 21. května 2010

Mgr. Petr Pecina, PhD.