

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Aleny Vojtíškové: Application of biophysical methods for functional studies of defects of mitochondrial energy transformation.

Předkládaná práce se zabývá několika teoretickými a experimentálními aspekty přeměny energie v mitochondriích z hlediska detekce, diagnostiky a určení mechanismu některých vrozených mitochondriálních poruch.

Práce je uspořádána jako 57-stránkový anglický text který uvádí 7 článků publikovaných v uznávaných mezinárodních časopisech.

V úvodním textu jsou velmi pěkně shrnuty podstatné informace o mechanismu fungování přenosu energie na mitochondriích. Problematika mitochondrií je rozebrána jak z hlediska jednotlivých stupňů přeměny energie, tak z hlediska genetiky mitochondrií a mitochondriálních proteinů a tvorby volných radikálů jako nežádoucího průvodního jevu jejich činnosti. Celý úvod je směrován k rozboru mechanismů různých vrozených poruch přeměny energie v mitochondriích významných v klinické praxi. V metodické části jsou kriticky zhodnoceny různé metody měření mitochondriálního membránového potenciálu. Zvláštní důraz je kladen na metody využívající fluorescenční sondy k měření na permeabilizovaných buňkách. Rozbor ukázal, že z řady publikovaných metod s použitím fluorescenčních sond je nejvhodnější metoda průtokové cytometrie na permeabilizovaných kožních fibroblastech (aby byl odstraněn vliv potenciálu na plasmatické membráně buněk) pomocí barviva TMRM (tetramethylrhodaminmethylester). Výhodou této metody je, že zvolené barvivo samo poměrně málo ovlivňuje respiraci mitochondrií. Důmyslnou metodou, rozebranou v článku 1, je možné měření kalibrovat pro získání hodnot potenciálu přímo v milivoltech. Ve většině experimentů ale postačovalo vynesení grafu počtu buněk v závislosti na intenzitě fluorescenčního signálu. Druhou metodou používanou ke studiu funkce oxidativní fosforylace bylo měření spotřeby kyslíku pomocí kyslíkové elektrody. Tyto dvě metody byly kombinovány s řadou metod biochemických a s vyhledáváním genetických odchylek pomocí metod molekulární biologie.

K upřesnění, který krok v činnosti mitochondrií je funkčně postižen byla využita detailní znalost farmakologie jednotlivých kroků reakce. Různé části respiračního řetězce byly farmakologicky blokovány nebo aktivovány a účinek byl detekován změnami v mitochondriálním potenciálu nebo spotřebě kyslíku. Při porovnání výsledků z buněk pacientů a buněk zdravých kontrol bylo možné detektovat postižený funkční krok. Úvodní část je zakončena stručným shrnutím výsledků přiložených článků a obsáhlým seznamem použité literatury.

Je zřejmé, že hlavní téžiště práce doktorandky a její podíl na publikovaných pracích je především v biofyzikálních a zejména fluorescenčních metodách měření mitochondriálního potenciálu a jeho změn. Samotný fakt, že jednotlivé práce úspěšně prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech dokazuje, že téma prací jsou aktuální, použité metody jsou na

vynikající úrovní a výsledky jsou oceňovány v mezinárodním srovnání. Současně je na práci významné i to, že spojuje vyspělé experimentální techniky s použitím v klinické praxi.

Drobné formální připomínky k úvodnímu textu jsme již prodiskutovali předem a zbývají 4 otázky, které nijak nesnižují úroveň práce :

1) Na str.17 se hovoří o roli transportu Ca^{2+} do mitochondrií v regulaci respirace. Uvažuje se o roli regulovaného pohybu Ca^{2+} kationtů při převádění části elektrického komponenty protonmotivní síly na ΔpH komponentu?

2) Stav 3 respiračního řetězce, několikrát zmíněný v textu označuje rozpřažení vlivem FCCP, nebo vysokou respiraci v přítomnosti dostatku ADP, nebo obojí? Do jaké míry jsou takto v literatuře označované stavy definovány jednoznačně.

3) Kalibrace pomocí Mito Trackeru je založena na tom, že značení touto sondou není závislé na potenciálu. Měření ukazuje, že závislost na potenciálu je malá, ale barvení není reverzibilní. Do jaké míry je barvení TMRM „vratné“ to znamená do jaké míry je nutné připravit mitochondrie v určitém „stavu“ a pak označit a měřit, nebo napřed mitochondrie označit a pak něčím ovlivnit potenciál?

4) Návrh ke grafu č.6 ve článku 2 str. 60 ukazujícímu různou citlivost mitochondrií kontrol a pacientů k částečnému rozpřažení pomocí FCCP. Kdyby se graf upravil v logaritmické škále intenzit, možná by to bylo názornější protože v této škále by údaj který přímo ukazuje depolarizaci byl vynesen proti údaji, který je úměrný zkratujícímu proudu.

Předkládaná práce má celkově vynikající úroveň a dosažené výsledky jsou velice hodnotné. Autorka jasně prokázala schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce a splnila požadavky kladené na disertační práci a proto si dovoluji doporučit práci k dalšímu řízení.

