

Oponentský posudek práce Bc. Terezy Mikulové: **Zastoupení komponent ATP synthasomu v různých tkáních potkana a u pacientů s defektem ATP synthasy.**

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na charakterizaci základních komponent fosforylační složky systému oxidační fosforylace, lokalizované ve vnitřní mitochondriální membráně. Je složena ze tří částí, komplexu mitochondriální ATP synthasy a dvou přenašečových proteinů, adenin nukleotidového translokátoru a přenašeče anorganického fosfátu. Zatímco představa o existenci superkomplexů složených z některých komplexů elektron transportního řetězce se pomalu stává součástí vysokoškolských učebnic, poznatky o interakcích mezi složkami fosforylačního aparátu jsou poměrně kusé. Bc. Tereza Mikulová se ve své diplomové práci pokusila přispět k objasnění stechiometrie a vzájemných interakcí jednotlivých složek tzv. ATP synthasomu.

Práce je klasicky členěná. Literární přehled je skutečně přehledný, uvádí čtenáře postupně do problematiky, netrpí rozvláčností, ale zároveň neopomíná skutečnosti nezbytné k pochopení studované problematiky. Z textu je patrná autorčina formulační obratnost, se kterou je schopna srozumitelně popsat a vysvětlit i komplikované procesy probíhající v mitochondriích. Text je vhodně doplněn atraktivními obrázky. Z formálního hlediska je tato část velmi dobře vypravena, což konec konců platí i pro celou práci. Narazil jsem na jediný překlep (text u obrázku 2.5. na straně 21 – „snythasy“). Za zmínku také stojí to, že se autorka rozhodla použít starší český pravopis pro názvy enzymů s koncovkou –asa a důsledně tento pravopis v práci dodržuje. Čtenář, který vyrůstal v éře socialismu, studoval na gymnasiu a později navštěvoval universitu, kde se dozvídal o ribosomech či chromosomech, takový pravopis ocení. O to více zamrzí, že šestá kapitola se jmenuje Diskuze. Z obsahového hlediska mám jen dvě drobné připomínky: na straně 26 autorka píše o katalytických konstantách K_M . Tato formulace je trochu zavádějící, neboť katalytická konstanta (k_{cat}) je něco jiného než Michaelisova konstanta. Nebyla mi jasná pasáž o detergentech na straně 27, skutečně je jedním z nejvhodnějších detergentů pro izolaci superkomplexů Triton X-100 a proč ho v tom případě autorka nepoužila?

Také metodická část je přehledně sepsána, na jedné straně popisuje použité metody tak, aby bylo možné je případně opakovat, na straně druhé však nezabíhá do zbytečných a zavádějících podrobností. Tato kapitola svědčí o širokém spektru metod, které autorka v průběhu přípravy své diplomové práce musela zvládnout a soudě podle výsledků, úspěšně.

K této části mám také některé připomínky či dotazy: proč autorka použila Ultrathorax pouze při homogenizaci kosterního svalu a ne již svalu srdečního a dají se předpokládat změny v uspořádání ATP synthasomu u různých populací svalových či mozkových mitochondrií? Při enzymovém testu pro stanovení hydrolytické aktivity ATP synthasy (str. 52) koncentrace ATP neklesá, je regenerováno spřaženou pyruvát kinasovou reakcí a absorbance klesá kvůli klesající koncentraci NADH, které je využito v reakci laktát dehydrogenasové. Po formální stráncearážá pouze to, že z pěkného a úhledně plynoucího textu na straně 39 vyčnívá odpudivé slovo „rozalíkovatovaný“, vedle kterého i nedaleké nepěkné slovo „vortexovaný“ vypadá jako přední čekatel na zařazení do slovníku spisovné češtiny.

Výsledková část nabízí přehledný souhrn výsledků, které Bc. Tereza Mikulová získala v průběhu svého magisterského studia a na první pohled je zřejmé kolik času a úsilí musela do experimentální činnosti vložit. Presentované obrázky se vyznačují vysokou grafickou kulturou, jednotlivé podkapitoly na sebe logicky navazují a čtenář rychle získá představu jak o získaných experimentálních datech, tak o souvislostech mezi jednotlivými etapami výzkumné práce. Mám jedinou drobnou připomínku, většina grafů obsahuje sloupce různých barev, což není v popisku grafu nijak komentováno a musel jsem chvíli pátrat co toto barevné odlišení znamená.

Kapitola Diskuse potom korunuje celkově vydařené dílo. Autorka zde shrnuje veškeré získané výsledky, zasvěceně je komentuje a dává do souvislostí se skutečnostmi již známými. Komentuje i věci, které se nezdařily, a rozebírá možné příčiny neúspěchu, což považuji také za přínosné pro další bádání v této oblasti výzkumu.

K předkládané práci mám několik otázek:

1. Autorka vztahovala obsah některých mitochondriálních proteinů k obsahu porinu jakožto proteinu obsaženého pouze ve vnější mitochondriální membráně. Je známo o jaký porin se jedná? Domnívám se, že název porin je obecné označení pro transmembránový protein se strukturou β -soudku, který kromě mitochondrií a chloroplastů můžeme najít také u bakterií. Jednalo se o v práci zmíněný VDAC, nebo o TOM40, či o nějaký jiný porin?
2. Zaujal mě nález měřitelné aktivity cytochrom c oxidasy u ρ_0 buněk, jak si ho autorka vysvětluje?
3. V diskusi jsem postrádal alespoň krátké zamyšlení nad rozdíly v některých hodnotách mezi dospělými a novorozenými potkany. Proč vlastně byla do

experimentů zařazena skupina novorozených potkanů? Navíc je známo, že rozvoj energetického metabolismu je po narození velice rychlý a rozdíly mezi třídenními a pětidenními potkany mohou být v určitých metabolických parametrech výrazné.

Na závěr mohu shrnout, že podle mého názoru představuje předložený opus nadprůměrnou diplomovou práci, která svědčí jak o pílí autorky, tak o jejích schopnostech pracovat ve vědecké laboratoři. Bc. Tereza Mikulová získala celou řadu cenných poznatků, které posunují výzkum mitochondrií o kousek dál.

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

V Praze 9. září 2012

Doc. RNDr. Martin Kalous, CSc.