



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 403

fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice

www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek na PhD práci Mgr. Hany Nůskové s názvem Strukturní a funkční interakce mitochondriálního systému fosforylace ADP

Na začátek svého posudku bych ráda konstatovala, že mi bylo potěšením přečíst si a oponovat tuto PhD práci. Úvod je napsaný přehledně a stručně, zbytečně nezabývá do detailů, ale zároveň představuje tematiku dostatečným způsobem. Oceňuji taky citování prací, které vyšly nedávno a svědčí o dobré orientaci autorky v oboru. Cíle jsou napsané jasně a výstižně, a byly splněny během studia Hanky Nůskové. Výsledky jsou organizovány do šesti kapitol, každá představující jeden opublikovaný článek. Jeden článek je prvoautorský a při dalších pěti Hanka sehrála důležitou roli a přispěla minimálně jedním obrázkem. Kontribuce autorky k daným publikacím jsou jasně definovány v práci. Další publikace Hanky jsou jen vyčteny a je zřejmé, že v rámci týmu laboratoře jsou zkušenosti a znalosti Hanky uznávány a plně využívány.

Jelikož práce obsahuje pouze opublikované výsledky a články již prošly oponentským řízením, práce oponenta je silně ztížena. Práce by byla asi trochu více čtivější, pokud by obsahovala také nepublikované výsledky, které by byly komentovány pouze studentkou. Nicméně toto nikterak nesnižuje kvalitu práce, která je na velmi vysoké úrovni. Práce obsahuje přiměřenou metodiku, která je každodenně používána v laboratoři. Z práce nevyplývá, zda Hanka se někdy účastnila optimalizace některé metodiky, v tomto případě by byla vhodná daná část nepublikovaných výsledků. Publikáční aktivita studentky a laboratoře jasně vypovídá o tom, že výsledky jsou vždy na vysoké úrovni a posouvají obor zabývající se fyziologií savčí mitochondrie kupředu. Po formální stránce se práce zdá být na vysoké úrovni.

Své otázky budu směřovat ke každé publikaci zvlášť a pár otázek bude směřovat k uspokojení mé celkové zvědavosti.

Otázky:

Výsledek č. I

Tato práce se zabývá přítomností ATP syntasomu v určitých tkáních laboratorního potkana, ale také ve tkáňových kulturách fibroblastů ze tří zdravých jedinců a sedmi pacientů s různými defekty ve funkci ATP syntázy. Zajímavým výsledkem je zvýšená exprese ANT a PiC u fibroblastů nesoucí mutaci v TMEM70 a podjednotce ATP5E, kdežto exprese není nijak výrazně ovlivněna u mutace v ATP6 genu (Figure 2B). Mohla by autorka práce okomentovat, proč k této změně dochází, jaký to má vliv na funkci mitochondrie a zda se jedná o nějakou adaptaci buňky k tomu, aby zmírnila negativní efekt mutací v TMEM70 a ATP5E genů?



U Figure 4A mi trochu chybí negativní kontrola pomocí protilátek, které rozeznávají jiné proteiny vnitřní membrány mitochondrie, jenž by neměly interagovat s komplexem ATP syntázy. Navrhla by autorka pár těchto proteinů, které by stálo za to otestovat a použít je jako negativní kontrolu?

Závěrem této práce je, že ATP synthasome nejspíše existuje, ale většina ANT, PiC a ATP syntázy existují jako samostatné jednotky. Přítomnost ATP synthasomu je poměrně kontroverzní a jsou určité názory, že detekovatelné interakce jsou pouze artefaktem experimentů a použití detergentů.

Mohla by autorka práce rozvést nějakou metodiku, která by pomohla tuto kontroverzi vyřešit? Existuje možnost značení a detekce proteinových interakcí *in vivo*? Mělo by použití cross-linku či APEX tagu nějaký význam? Jak by se mohl využít rozvoj cryo-3D metodiky k detekci ATP syntasomu?

Výsledek č. II

Tato práce pojednává o přítomnost vysoko-molekulárního komplexu II (cII_{HMW}) a jeho interakce s dalšími komplexy OXPHOS. Pomocí immunoprecipitace je poukázáno na možnou interakci s komplexem V, nicméně jelikož velikost cII_{HMW} není změněna v buňkách s defektem cV , těžko říct, jestli signál v CNE obsahující cII_{HMW} také obsahuje cV . Komplexy cII_{HMW} jsou detekovatelné pouze v CNE ukazující na velmi delikátní interakce v rámci tohoto spojení.

Velice zajímavým zjištěním je, že komplexy cII_{HMW} nejsou zachovány v buňkách, které nemají mt DNA, nicméně je detekován monomer cII a další subkomplexy. V rámci diskuze je tento efekt vysvětlován pomocí sníženého proteinového importu a absenci dalších OXPHOS komplexů. Není mi zřejmé toto propojení, jelikož jednotlivé podjednotky jsou pravděpodobně importovány bez velkých problémů, jelikož monomer je detekován. Měla by autorka jiné hypotézy, proč k tomuto jevu dochází? Myslí si, že pokud by změřila aktivitu cII , byla by snížena ve srovnání s buňkou obsahující mtDNA ?

Také mi není úplně zřejmé, jak se cII a cV spoluúčastí vytvoření $mitoK_{ATP}$ póru. Mohla by autorka nastínit, jak tento pór funguje a jakou roli by hrály tyto dva komplexy v rámci tohoto uskupení?

Výsledek č. III

Tato práce představuje pravděpodobně nejdůležitější kontribuci Hanky Nůskové, jelikož tento článek byl přijat do velmi prestižního časopisu a je také dobře citován. Článek byl publikován již v roce 2010, tudíž pravděpodobně na začátku Hančiného PhD. U této práce budu mít otázky spíše obecného charakteru.

Jako velmi zajímavé zjištění považuji fakt, že mutovaná podjednotka epsilon je schopna se inkorporovat do komplexu, představující ~ 30% původního množství a tento komplex je funkční. Jak je toto možné? Existují určité další adaptace v rámci tohoto komplexu, které toto umožňují? Stálo by za to, vytvořit kvasinkovou linii obsahující ekvivalentní mutaci, aby se dal komplexu obsahující mutovanou podjednotku epsilon vypurifikovat a dále studovat? Je celková hodnota membránového potenciálu zvýšena v buňkách pacienta a



pokud ano, podílí se na fenotypu také zvýšená hladina ROS? Má akumulace podjednotky c negativní vliv na buňku? Myslí se autorka, že akumulace podjednotky c je specifický pouze pro tuto podjednotku, anebo tento jev by byl pozorován i u dalších membránových podjednotek komplexu. Liší se od sebe degradační dráhy matrixových a membránových mitochondriálních proteinů? Jelikož tato práce vyšla již před pěti lety, byly publikované další studie zabývající se stejnou problematikou a lépe objasňující roli podjednotky epsilon v komplexu ATP syntázy?

Výsledek č. IV

Tato publikace také vyšla v roce 2010 a pravděpodobně na ní bylo pracováno ve stejnou dobu jako na publikaci předchozí. RNAi podjednotky epsilon u HEK293 buněk potvrzují výsledky získané z fibroblastů pacienta s mutací v této podjednotce. Metodika a závěry jsou velmi podobné jako ve výsledku č. III. Jak si autorka vysvětluje, že nebyl pozorován žádný růstový fenotyp a to i buněk, kde došlo ke snížení exprese mRNA podjednotky epsilon o 84% (shEa) a cV není detekovatelný v těchto buňkách (Fig. 1B)? Fig. 2B také ukazuje na více výraznou redukci cV u linie shEb než u linie shEc, nicméně mRNA byla snížena výrazněji u linie shEc (o 71%). Jak je toto možné?

Výsledek č. V

Tato práce pojednává o velmi zajímavé mutaci mtDNA, která ovlivňuje expresi dvou mt genů a to ATP6 a cox3.

V abstraktu je zmíněné že, cituji: lack of cox3 limits the biosynthesis of COX but does not alter the structure of the enzyme. Abych pravdu řekla, této větě nerozumím, jak to, že není změněna struktura komplexu při absenci cox3 podjednotky, když tento komplex není detekován v BNE (Fig. 4C)? Jak velká je podjednotka a v savčích buňkách? Odpovídá redukce velikosti ATP syntázy o 60kDa absenci pouze této podjednotky, anebo i dalších? Co se děje v těchto buňkách s podjednotkou ATP8? Je její exprese ovlivněna?

Výsledek č. VI

Poslední práce pojednává o úsilí zmapovat osud OXPHOS komplexů ve fibroblastech 10 pacientů nesoucí mutaci v *TMEM70* genu. Bylo pozorována upregulace OXPHOS komplexů cI – cIV na úrovni proteinů a komplexů, nikoliv na úrovni mRNA. Z metodiky není jasné, zda mRNA expresní profily byly dělány u všech deseti pacientů, anebo selektivně jen u pár. Zvýšení abundance OXPHOS komplexů není úplně ideální strategie buňky, která při nefunkčnosti cV se musí vypořádat se zvýšeným membránovým potenciálem a zvýšenou hladinou ROS a celkové zvýšením OXPHOS tuto situaci pravděpodobně jen zhoršuje. Měla by autorka nějakou hypotézu, proč buňky tímto způsobem reagují? Jedná se o adaptaci, jak se vypořádat s danou mutací, anebo jde spíše o negativní efekt mutace, který přispívá k negativním fenotypickým projevům?



Obecné otázky

Můj pocit po přečtení této práce je, že mutace genů proteinů zodpovědných za sbalování a strukturu ATP syntázy jsou extrémně vzácné. Jak funguje celosvětově detekce těchto mutací u pacientů a následný výzkum pacientových buněk? Funguje dobře přemostění mezi klinikou a vědeckou laboratoří? Jsou fibroblasty pacientů volně k dispozici, anebo jejich získání je výsledkem složité komunikace? Jak dlouho mohou být fibroblasty kultivovány v laboratoří? Mají určitý maximální počet dělení? Jaké je maximum buněk, které jsou vědci schopni získat na biochemickou analýzu? Je dostatečné množství materiálu limitující pro dané studie?

Na závěr svého oponentského posudku bych ráda konstatovala, že práce odpovídá požadavkům, které jsou kladené na doktorské práce, práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práce a tím pádem k udělení titulu Ph.D. za jménem. Práci Mgr. Hany Nůskové doporučuji k obhajobě.

Alena Zíková

V Českých Budějovicích, 8.1.2016

