



Posudek dizertační práce Mgr. Terezy Rákosníkové „Study of etiopathology of mitochondrial disorders“

Předkládaná dizertační práce Mgr. Terezy Rákosníkové představuje výsledky původního základního výzkumu na téma odhalování nových genetických determinant mitochondriálních poruch a jejich etiopatologie, které je dlouholetým výzkumným zájmem školitelky dr. Tesařové z pracoviště mitochondriální laboratoře KDDL 1. LF UK a VFN v Praze. Sama studentka se tématu věnuje už od magisterské úrovně studia, předkládanou dizertací navazuje na svoji diplomovou práci, kterou úspěšně obhájila na Přírodovědecké fakultě UK.

Disertace si stanovila tři hlavní cíle – charakterizovat úlohu ACBD3 proteinu, jakožto kandidátního původce mitochondriálního defektu, analyzovat dopad nově nalezených mutací v mtDNA na mitochondriální energetický metabolismus a prozkoumat sekundární změny ve funkci mitochondrií u dědičných poruch N-glykosylace. Práce je uspořádaná v klasické dlouhé formě s přiměřeně dlouhým teoretickým úvodem shrnujícím současné poznatky o mitochondriálním OXPHOS aparátu a mitochondriálních onemocněních, s ohledem na cíle práce je hodně prostoru věnováno respiračním superkomplexům a mechanismům transportu lipidů mezi organelami. Výsledky a diskuse jsou členěny podle jednotlivých cílů práce. Jako příloha jsou součástí práce dva publikované články v impaktovaných časopisech, kde je Mgr. Rákosníková první autorkou (International Journal of Molecular Sciences a BMC Pediatrics) a dva manuskripty připravované k odeslání (první, resp. druhá autorka). Oceňuji, že výsledková a diskusní část práce je založená na originálních textech,

odlišných od textů v publikovaných pracích a psaných s důrazem na cíle dizertační práce a vlastní experimentální činnost autorky. Metodické rozpětí práce je velmi široké – od molekulární biologie při tvorbě KO buněčných modelů pomocí CRISPR-Cas, přes proteinové analýzy pomocí nativních a denaturujících elektroforéz, až po funkční metody jako jsou měření enzymových aktivit a respirometrie.

Po formální stránce je práce na vysoké úrovni, upozornil bych jen na občasné gramatické nedostatky, např. při používání tvarů sloves „bind“ a „find“.

Téma práce je vysoce aktuální a věrně odráží současný stav výzkumu mitochondriálních chorob, který v posledních 10 letech prodělal ohromný skok v souvislosti s využitím NGS pro odhalování jejich genetických příčin. Kandidátní mutace jsou čím dál častěji nalézány v genech bez zjevné souvislosti s fungováním mitochondrií a průkaz jejich patogenity je tak značně komplikovaný. Tak je tomu i v případě ACBD3 proteinu, kde i přes dlouholeté intenzivní úsilí autorky není jasně prokázáno, že jsou jeho mutace příčinou mitochondriálního onemocnění. Práce nicméně přinesla cenné poznatky o fungování tohoto proteinu v Golgi aparátu, které byly publikovány v časopise s vysokým IF. Naopak u rozsáhlé studie charakterizující dopad mutací v mtDNA genech kódujících podjednotky komplexu I byla jejich patogenita nesporně doložena, včetně poprvé popsaných mutací v ND1 a ND5. Oceňuji i využití strukturního modelování záměnové mutace Tyr277His v ND1 a formulaci zajímavé hypotézy, že vede ke stabilizaci neaktivní formy enzymu. Studie dopadu poruchy glykosylace na podkladě PMM2 defektu prokázala sekundární změny v OXPHOS aparátu a mitochondriálním metabolismu, způsobených stresovými signálními drahami asociovanými s UPR. Znamená to, že při hledání etiopatogenních mechanismů dědičných poruch metabolismu je záhodno brát v úvahu a analyzovat fungování mitochondrií i v případě, kdy jejich postižení není primární genetickou příčinou.

Kvalita dosažených již publikovaných výsledků byla prokázána už recenzním řízením, mám nicméně několik obecných dotazů a připomínku k nepublikovaným výsledkům:

1. V teoretickém úvodu zmiňujete možnou úlohou ACBD proteinů při transportu cholesterolu do mitochondrií ve steroidogenních tkáních v souvislosti se syntézou steroidních hormonů. Mohla byste pro ilustraci uvést, u jakých steroidů probíhá syntéza nebo její část v mitochondriích? Daly by se využít buněčné linie z takových tkání pro průkaz patogenity nalezených ACBD3 mutací?

2. Troufala byste si uvést, jestli jsou některé změny v množství nebo funkci komplexu I, ať už na vzorcích ze svalových biopsií nebo z fibroblastů, korelovány s klinickým projevem mutací v mt-ND genech? Jinými slovy, jestli lze čistě na základě biochemických dat určit, jestli se bude mutace projevovat jako LHON nebo spíš jako multisystémová mitochondriální porucha např. MELAS?
3. V publikacích v rámci dizertační práce je využívána metoda MEGS. Jak hodnotíte její vhodnost pro stanovení defektů komplexu I, např. v porovnání s klasickými měřeními enzymových aktivit pomocí spektrofotometrie, i třeba s ohledem na pracnost metody a množství vzorku pro analýzu.
4. U glykosylačního defektu způsobeného PMM2 defektem nesporně dochází ke změnám v OXPHOS aparátu, nicméně nejsem na základě prezentovaných dat úplně přesvědčen, že dochází k relativnímu zvýšení množství respiračních superkomplexů. Bylo by možné obrázky z BN-PAGE doplnit kvantifikací a statistickým testem? Nejjednodušeji například porovnat relativní obsah COX v monomeru vůči superkomplexu, nebo množství komplexu III v dimeru versus v superkomplexech.

Závěrem lze konstatovat, že předkládaná práce obsahuje unikátní vědecké poznatky, na jejichž získání měla Mgr. Rákosníková klíčový podíl. Proto dle mého názoru disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

V Praze 11. 1. 2022

Mgr. Petr Pecina, PhD.

Odd. bioenergetiky
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.