

OPONENTSKÝ POSUDEK

**doktorské disertační práce Mgr. Daniely Fornůskové:
„Biochemical and molecular studies of cytochrome c oxidase and ATP
synthase deficiencies ”**

předkládá: Prof. MUDr. J. Hyánek, DrSc.

Doktorská práce Mgr. Daniely Fornůskové vznikla při řešení náročných grantových úkolů GAUK, IGA, GAČR, kterými „disponovala“ Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch (MP) a Klinika dětského a dorostového lékařství I. LFUK v letech 2004-2010. Vychází z dlouholetého zaměření pracoviště pro studium mitochondriálních onemocnění protože to vědecké centrum představuje „unikátní evropské servisní centrum MP“ nejenom pro ČR a SR. Diagnostika, klinický průběh i eventuelní výsledky kauzálního léčení a prognóza těchto onemocnění jsou stále problematické a jsou „černou mřinou“ nejenom pediatrů a internistů, ale i dětských neurologů, metabologů, klinických biochemiků, klinických genetiků a dalších. Soustavná práce disertantky vyústila dosud ve 2 vlastní a 2 spoluautorské kvalitní zahraniční publikace s vysokým impaktem, které představují výsledky disertace a jsou její přílohou.

Doktorská práce představuje 92 stránek rukopisu, z toho 20(!) stránek 200 recentních literárních citací a 5 vyobrazení. Představuje tak ucelený doklad současné úrovně poznání těchto mitochondriálních onemocnění a známých metabolicko-genetických změn. Práce je výsledkem 6-leté práce disertantky pod vedením zkušených mentorů a jejich nejbližších spolupracovníků ve snaze prokázat specifické mol-genetické a následné funkční změny u MP. Prvá část sestává ze studia buněčného materiálu od vybraných závažných pacientů s MP- konkrétně studovala význam těchto vybraných mtDNA-kodovaných mutací pro porušenou funkci OXPHOS systému: Leigh sy (8363G>A); MERF sy (8344A>G); MELAS sy (3243A>G); 9205delta TA v ATPasové podjednotce. V druhé objemnější části, kde se disertantka věnovala biogeneze cytochrom c oxidasy (CcO) a komplexu IV OXPHOS, jež hraje

rozhodující úlohu v oxidačním metabolismu. Zde defektivní CcO vyústuje v heterogenní skupinu dědičných poruch převážně postihujících tkáň s vysokým energetickým obrátem, jež resultují v těžkou encefalopatii. Tady použila disertantka pro studium stabilní buněčnou linii HEK-293 pro důkaz exprese vybraných strukturálních podjednotek cytochrom c oxidasy (Cox4i1, Cox5a, Cox6a1, 7a a 7b) a genu oxidasového assemblátu 1-like (OXA1L), aby mohla na tomto humánním homologu mitochondriální Oxal1 translokázy z kvasnic pohodlně studovat nové aspekty této složité assemblační cesty.

Metodika studia mitochondriálních genových změn a ultrastruktur v buňkách je rozsáhlá s vyčerpávající spektrem náročných vyšetření rozdílné povahy a na velmi vysoké odborné úrovni odpovídající renomovanému pracovišti světové úrovně; soubory buněčných kultur postačující k solidním závěrům; a kritický pohled dizertantky k těmto zcela novým nálezům; svědčí o dostatečné literární či odborné vzdělanosti a přehledu v této oblasti.

Reálným přínosem Mgr Fornůskové pro laboratorní diagnostiku MP, kterého si velice vážím je:

- a) zjištění, že zatímco podjednotky Cox4 a Cox5a jsou nezbytné pro assemblaci funkčního proteinu CcO, Cox6a podjednotka je důležitá pro její stabilitu.
- b) zjištění, že v izolovaných mitochondriích kosterního svalu, srdečního svalu, jaterní tkáň a tkáň frontálního kortexu získaných od pacientů s MP našli tkáňově specifické rozdíly v dopadu těchto mt-tRNA mutací na OXPHOS mozku lišících se od impaktu těchto mutací v ostatních tkáních
- c) u mtDNA mikrolece 9205deltaTA v ATP6 genu je významně omezena syntéza podjednotky a komplexu ATPasy a postižena biogeneze CcO.

Z pohledu starého pediatra a metabologa je to sice jen další perlička nebo nový barevný kamínek do velice složité mozaiky MP, která ale slibuje při úspěšném dořešení lepší terapeutický, diagnostický nebo preventivní úspěch.

Po přečtení této disertace si neodpustím kritickou otázku:

-které ty Vámi nalezené změny za pomoci dosti sofistikované metodiky jste už v mitochondriální laboratoři mohli zavést do rutinní praxe ke zlepšení diagnostiky a event. hodnocení léčby MP? Nebo zatím zůstávají jen na akademické úrovni k lepšímu pochopení biogenezy a pathogenezy?

Práce ve výborné angličtině je velice pečlivě stylisticky připravena; seznam literatury, vydatný seznam zkratk pro rychlé porozumění textu, tabulky i vyobrazení vzorné; ani v obsáhlé literatuře jsem nenašel žádné závažné překlepy.

Mgr.Fornůsková svými publikacemi i předloženou kvalitní disertací splnila plán své disertační přípravy předepsané pro postgraduální studium biomedicíny na KU. Doporučuji proto komisi pro obhajobu doktorských disertačních prací v oboru biochemie, aby souhlasila s udělením titulu PhD pro, který splňuje všechny podmínky.

Praha, 16.12.2010.

Prof. MUDr. J. H. 

Metabolická am 

Odd. klin. biochemie Nemocnice Na Homolce

150 30 Praha 5, Roentgenova 2.