



Oponentský posudek doktorské disertační práce

Mgr. Andrey Kuthanové

Předkládaná práce - **Indukce a detekce programované buněčné smrti (PCD) v buněčných liniích tabáku** má 168 stran a je členěna do obvyklých kapitol od Cílů práce až po Seznam literatury. Grafické zpracování je dobré, výsledky jsou dokumentovány serií velmi kvalitních fotografií a grafů. Výhrady mám ke zpracování Cílů práce a Literárního úvodu.

Cíl práce Tato klíčová část práce neposkytuje jasně formulované zadání a popis jednotlivých kroků vedoucích k vytčenému cíli. K uvedenému textu si dovoluji položit 2 otázky:

1. Bylo opravdu hlavním cílem práce „...pochopit mechanismy vedoucí k programovanému umírání buněk...“? Nebylo by lépe v tak klíčové větě použít jiné sloveso?
2. Prosím o vysvětlení posledního odstavce: „V průběhu řešení se samozřejmě strukturovaly i další oblasti studia, původně neplánované – např. detekce projevu PCD (specifické fragmentace DNA)...“
V kapitole výsledků je ale fragmentace DNA vyvolaná působením obou stresorů stanovována Tunel metodou i elektroforeticky. Předpokládám, že o detekci tohoto projevu PCD bylo uvažováno již při zadání práce a k jejímu zpochybnění došlo až v průběhu práce.

Literární úvod Zpracování literárních údajů, bohužel, ukazuje na nesoustředěné, chaotické psaní, zatížené vysokým počtem překlepů a ne vždy vhodně formulovanými větami, z nichž některé nedávají smysl. Přehled současného stavu poznání je shrnut na 46 stranách, je koncipován do velké tématické šíře. Plynulost textu znesnadňuje používání nadměrného množství zkratk, které jsou v textu sice vysvětleny, ale při opakovaném použití se jejich značná část v seznamu zkratk nenajde. Je překvapující, že seznam naopak obsahuje zcela běžné zkratky typu: DNA, DNÁza, EDTA, NADPH, PCR, RNA. K uvedenému textu mám několik otázek:

1. Prosím o vysvětlení nesrovnalostí v počtu morfotypů PCD. Na str. 19 je uvedeno „PCD je většinou dělena do tří skupin...Morfotyp I, II a III.“
Následuje jejich popis. Na straně 20 je shrnující tabulka a tam je morfotypů 5.
2. Prosím o vysvětlení věty ze str. 36, odd. 3.2.3.2.
„Lancomme a Santa Crus (1999) vektor odvozený z viru mozaiky tabáku (TMV) a při overexpresi Bax se u rostlin tabáku vytvářely leze podobné těm, které vznikají při hypersensitivní reakci.“
3. Nevím zda jsem dobře pochopila začátek posledního odstavce na tr.37:
„Dva homology BI-1 byly nalezeny u *Brassica napus* (BnBI-1) a u *Nicotiana tabacum* (NtBI-1). Oba proteiny jsou vysoce identické k AtBI-1 a k lidským HuBI-1 (Bolduc et al. 2003). Jsou schopné potlačit PCD vyvolanou Bax u lidských embryonálních buněk ledvin 293.“
Byly opravdu rostlinné proteiny testovány na ledvinových buňkách?

4. Co je to unikátní místo proteinu? Str. 42 ...“štěpí tento protein v unikátním místě...”

Materiál a metody Popis rostlinného materiálu a široké spektrum použitých metod, shrnutých do 12 stran, demonstuje snahu autorky analyzovat účinek stresorů ze všech možných hledisek. Mám jen 2 drobné připomínky:

1. Nebylo by vhodnější přiřadit kapitolu „Synchronizace buněk BY-2“ k části Materiál?
2. Nebylo by možno lépe formulovat větu ze str. 74, druhého odstavce: „25 mg čerstvé hmotnosti suspenze bylo zmrazeno...”

Výsledky Podrobný popis výsledků s vynikající ultraskopickou dokumentací je shrnut do 45 stran. U každého stresoru je sledována viabilita buněk, stav vakuomu, tvarové změny buněk, morfologie jader, fragmentace DNA, změny v uspořádání aktinového cytoskeletu. Za důležité považují dobře zvolené koncentrace iontů kadmia, kdy kultivace buněk v přítomnosti nižší hladiny kadmia vedla k apoptoze a vyšší koncentrace v rychlému zabití buněk. Velmi dobře je zpracována kapitola „Buněčný cyklus a programovaná buněčná smrt.“ Ke kapitole „Rychlá buněčná smrt“ má jednu připomínku a jeden dotaz.

1. Při popisů výsledků v subkapitolách „Elektroforetická detekce“, „Tunel reakce“ a „Morfologie umírajících/mrtvých buněk“ bych doporučovala, aby popis těchto dílčích výsledků nezačínal opakováním výsledků získaných aplikací kadmia.
2. Přiznám se, že jsem potřebovala odstup několika týdnů od prvního přečtení práce na to, abych se vnitřně smířila s touto kapitolou. Zmrazení buněk v tekutém dusíku a jejich rozmrazení nebo jejich semletí kulovým mlýnkem je velmi drastické a samozřejmě okamžitě zničí integritu buněčných struktur, zabije buňku. Výsledky této části práce přispěly k pochopení možné autolýzy buňky a jsou již publikovány. Omlouvám se, ale není mi úplně jasné srovnání postupných reakcí buňky na dlouhodobý stres vedoucí až k fragmentaci DNA s drastickým, nefyziologickým zabitím buňky.

Diskuse Podrobná diskuse k jednotlivým kapitolám je shrnuta do 20 stran a dosažené výsledky jsou v odpovídajícím rozsahu konfrontovány s literárními údaji.

Souhrn a závěry Obě shrnující kapitoly dobře charakterizují dosažené výsledky v požadované stručné podobě. Autorka si neodpustila malý žert na konec a pošádila nás ...“celkovým přibýtkem biomasy..“.

Seznam literatury Literární zdroje na 17 stranách ukazují dobrou připravenost autorky.

Závěrem konstatuji, že předložená doktorská disertační práce Mgr. Andrei Kuthanové splňuje požadavky na práce tohoto typu kladené, proto ji doporučuji k obhajobě.

RNDr. Věra Čapková, CSc

V Praze dne 15. 5. 2008

