

Oponentský posudek na magisterskou práci

Bc. David Lorenc: Studium mitochondriální morfologie v pankreatických β -buňkách v závislosti na přítomnosti různých druhů sekretagogů

Školitel: Ing. Dlasková Andrea, Ph.D.

Celkové hodnocení

Předkládaná práce se zaměřuje na studium mitochondriální funkce a morfologie u pankreatických beta buněk v závislosti na dostupných metabolických substrátech – glukóze a α -ketoizokapronátu, metabolitu z dráhy degradace leucinu. V souladu s předpoklady potvrzuje centrální roli glukózy v regulaci mitochondriálního metabolismu beta buněk, ale zároveň dokumentuje pouze velmi omezený vliv α -ketoizokapronátu na mitochondriální respiraci, a to i přesto, že byl dokumentován jeho vliv na sekreci inzulínu.

Formální kvalita

Práce je po formální stránce velmi dobře zpracovaná, pracuje s velkým citačním aparátem. Formátování je konzistentní, kvalita obrazové dokumentace je rovněž na velmi slušné úrovni. Výtky jsou spíše drobného rozsahu, jako například typy jazykových chyb, které neodhalí kontrola pravopisu a zůstaly tedy nepovšimnuty nebo (nejspíše) chybné odkazy na některé obrázky (domnívám se, že na str. 53 odkaz na obrázek 12A má být odkazem na obrázek 13A).

Připomínky k jednotlivým částem práce

Literární přehled

Literární přehled je velmi dobře strukturovaný a vyčerpávající, přitom mu ale neschází čtivost. Některé aspekty (například struktura MICOS komplexu jsou s ohledem na souvislost s výsledkovou částí možná až zbytečně podrobné, ale se zájmem jsem si je přečetl. Namátkově uvádím některé drobné formální chyby, které jsem v textu zaregistroval:

- Str. 6 – je diskutována evoluční variabilita mitochondriálních genomů, ale následně se uvádí, že mitochondriální genom kóduje 13 mRNA, 22 tRNA a 2 rRNA – zde třeba upřesnit, že již se nebavíme o mtDNA obecně, ale diskutujeme savčí mtDNA
- Acetyl koenzym A vs. Acetylkoenzym A
- Chybný index u FADH²
- Opakované použití termínu cardiolipinů místo kardiolipinů
- Kapitola 1.2.2.2 a označení H₂O₂ jako radikálu – jde o reaktivní formu kyslíku, ale ne radikál!
- Domnívám se, že u fosforylace můžeme polemizovat, zda je oxidační nebo oxidativní, stres je vždy oxidační (str. 8).

Materiál a metody

Jediná kapitola, lehkou výtku. V rámci metodické sekce jsou velmi podrobně popsány principy jednotlivých experimentálních přístupů, což oceňuji a chválím. Hůře se mi ale tato kapitola uchopovala z hlediska reálného popisu prováděných experimentů. Složení různých pufrů je uvedeno až v závěru kapitoly (sekce 3.18) a vzhledem k jejich relativně generickému označování (měřicí pufr,

solubilizační x lyzační pufr) není úplně snadné si je přiřazovat k metodám. Mnohde pak chybí detaily – použité objektivy a snímací podmínky u mikroskopů, typ homogenizéru a počet strobů u přípravy mitochondrií, ředění siRNA a RNAiMAX „cca. 1:50“... Úplně pak chybí popis izolace pankreatických ostrůvků z myši, které byly následně používány pro TEM.

Výsledky

Výsledková sekce je prezentována pečlivě a experimenty jsou seřazeny v logické návaznosti. Rovněž obrazová dokumentace je na vysoké úrovni. Měl bych jen drobné připomínky:

- Systematicky chybí informace o množství replikátů pro jednotlivé experimenty
- U Obr. 6 bych ocenil, kdyby byla vynesena i oligomycin citlivá porce a hodnocení statistické významnosti v jejich rozdílech. Ty jsou číselně zmiňovány v diskuzi, ale chybí ve výsledcích a jejich statistická hladina významnosti není nikde zmíněna.
- Popisek u Obr. 19 – uváděno 15mM α -KIC, i když se jedná o 3mM GLC+15mM α -KIC. Z kontextu je to zřejmé, ale formálně je to zavádějící.
- Obr. 20 a 24 – chybí mi zde loading control. Tak, jak jsou kvantifikovány (v obr. 21 a 25), tedy relativní zastoupení jednotlivých forem, není loading kontrola nezbytná, ale pokud je v textu zmiňováno (str. 62), že „kvantifikace ukázala vyšší obsah a a b forem v 11 mM glukóze než v 3 mM glukóze“, měla by být součástí obrázku.

Diskuze

Diskuze je obsáhlá a zdařilá, autor zručně zasazuje výsledky do širšího kontextu. Je zjevné, že se v problematice orientuje a zná související literaturu.

Dotazy oponenta

1. Na str. 1 uvádíte, že ATP je z mitochondrií beta buněk intenzivně exportováno. Co se ví o izoformách/regulaci aktivity ANT translokátorů u těchto buněk? Mohly by se rovněž podílet na regulaci inzulínové sekrece?
2. Na str. 68 a 69 zmiňujete možnou úlohu proteinu UCP2 v regulaci mitochondriálního metabolismu u beta buněk. Je tento koncept stále relevantní? Existuje recentní literatura podporující zapojení UCP2 do regulace inzulínové sekrece?
3. Jako alternativní vysvětlení pro funkci α -ketoizokapronátu v regulaci inzulínové sekrece uvádíte, že by mohl přímo interagovat s proteiny tvarujícími krystal. Dokázal byste navrhnout pokus, který by takové interakční partnery identifikoval?
4. V částech 4.2.1 a 4.2.2 dokumentujete změny v klastrování ATP syntázy v závislosti na koncentraci glukózy. Domníváte se, že jde o přímou reorganizaci supramolekulárních struktur ATP syntázy v rámci remodelace krist nebo se jedná pouze o jiný průkaz změny morfologie mitoretikula dokumentovaný v dalších částech práce? Máte k dispozici data z dSTORM mikroskopie pro jiný protein z vnitřní membrány, který by se přímo nepodílel na strukturní organizaci krist (např komplex respiračního řetězce)?
5. Testovali jste dobu potřebnou pro ustavení rovnovážné koncentrace TMRE? Uvádíte, že sonda byla k buňkám přidána pouze po dobu 10 min, což je pro redistribuční sondu a intaktní buňky překvapivě krátká perioda.

Shrnutí

Jedná se o velmi zdařilou diplomovou práci, která svědčí o schopnostech autora zpracovat vědecký projekt a provádět experimentální výzkum v laboratoři. Práce splňuje nároky kladené na diplomovou práci a jednoznačně ji tedy doporučuji k obhajobě.

V Praze 31.5.2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'T. Mráček', written in a cursive style.

RNDr. Tomáš Mráček, Ph.D.