

## **Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Ivany Žigové “Úloha autofágie v indukcii apoptózy mastnými kyselinami u pankreatických $\beta$ buniek” v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK**

Diplomová práce Bc. Ivany Žigové se zabývá molekulárními mechanismy, které vedou k odumírání pankreatických  $\beta$  buněk a následnému diabetu. Téma je to vysoce aktuální neboť počet nemocných cukrovkou se rapidně zvyšuje a dosahuje epidemických rozměrů. Jedním z důležitých faktorů ovlivňujících vznik diabetu je složení stravy a je prokázáno, že vysoký obsah nasycených tuků ve stravě v kombinaci se sníženým pohybem představuje významný faktor pro vznik cukrovky. Z tohoto pohledu je tedy zkoumané téma vlivu mastných kyselin na indukcii apoptózy velmi aktuálním a zacílení se na úlohu autofágie v tomto procesu je velmi zajímavé, protože poznatky o roli autofágie v indukcii apoptózy u pankreatických  $\beta$  buněk jsou víceméně kusé a nesourodé.

### **Formální kvalita předložené práce**

Práce je po formální stránce dobře zpracována, je zde pár nepřesností, kdy například název kapitol 3.3.2.4.1. a 3.3.2.4.2. v obsahu je napsán v jiném písmu než zbytek práce.

### **Jazyk**

Práce je psána ve slovenštině, nicméně překlepů a chyb je minimum.

### **Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce**

#### *1) Literární úvod*

V první části diplomové práce jsou vcelku zdařile shrnuty poznatky o molekulárních mechanismech apoptózy a autofágie. Dle mého názoru by ale bylo vhodné zdůraznit, že uvedená receptorová aktivace kaspáz a mitochondriální dráha indukce apoptózy jsou víceméně dělením spíše formálním a mohou se vzájemně ovlivňovat, což je v práci i popsáno (viz. Štěpení proteinu Bid). Také bych uvítal větší pozornost věnovanou různým typům buněčné smrti, neboť škála forem buněčné smrti je velice pestrá a nezahrnuje jen apoptózu a informace na toto téma jsou zmíněny jen okrajově. V úvodu by mohla být více diskutována role ER stresu a jeho spojení s autofagií.

#### *2) Cíle práce*

Cíle práce jsou jasně shrnuty do tří navazujících bodů, které si kladou za cíl charakterizovat úlohu autofágie v indukcii apoptózy mastnými kyselinami

#### *3) Metody*

Metody zahrnují stanovení hladin proteinů pomocí western blotu, konfokální mikroskopie, průtokové cytometrie a také umlčení exprese Atg7 pomocí siRNA technologie. Autorka zde ukazuje, že je schopna různých metodických přístupů, které se vzájemně doplňují. Rád bych zde zdůraznil, že použitý metodický přístup, kdy buňky jsou pěstovány bez přítomnosti séra, umožňuje sledovat specificky vliv jednotlivých mastných kyselin a je to z experimentálního hlediska velice dobrý model.

#### 4) Výsledky

Ve výsledcích nalezneme 10 obrázků, což je podle mého názoru relativně střídmy počet, nicméně k vyvození odpovídajících závěrů je dostatečný. Vlastní kvalita prezentovaný výsledků je velmi dobrá a svědčí o dobrém zvládnutí metod.

#### 5) Diskuse

V diskusi autorka předkládá svou představu o úloze autofagie v indukci apoptózy a dochází k závěru, že inkubace s nasycenými MK inhibuje autofagický tok a vede k zvýšenému počtu autofagozómů, podobně jako bafilomycin A. Ukazuje také, že nenasycená MK je schopna tyto změny potlačovat, přestože není schopna je úplně zablokovat. Co se týče vztahu autofagie a indukce apoptózy, zdá se, že ve zkoumaném experimentálním modelu jde o dva spíše nesouvisející děje, přičemž blokáda autofagie není schopna indukci apoptózy zabránit.

#### Další připomínky a otázky:

- 1) V literatuře se v poslední době spojuje proces autofágie a ER stresu. Například Bachar-Wikstrom E. et al., *Diabetes*, 2013 nebo Bartolome A. et al., *Autophagy*, 2012 prokazují pozitivní vliv indukce autofagie na ER stres a s ním spojený diabetes. Jaký je názor autorky na tyto studie?
- 2) Myslím, že pro potvrzení závěru, že autofagie nemá vliv na indukci apoptózy by bylo vhodné provést časový pokus, kde v přítomnosti buď inhibitoru nebo induktoru autofágie bude stanovena frakce umírajících buněk např. barvením propidium jodidem v časovém průběhu (autorka podobný pokus zmiňuje na konci diskuse). Je možné, že změny, které modulace autofágie může přinést, se odehrávají v časných fázích indukce apoptózy a v pozdějších časech se pak rozdíl stírají.
- 3) Má autorka nějaké vysvětlení proč podání rapamycinu u jejich buněčné linie neindukovalo autofagii? Myslím, že pro podpoření závěrů by bylo vhodné vyzkoušet i jiné induktory autofagie o kterých se sice v práci mluví, ale výsledky prezentovány nejsou (E64d/pepstatin A). Existují i další induktory autofagie, které cílí na mTOR1 i mTOR2 a to třeba Torin1, případně induktory nezávislé na mTOR jako lithium, resveratrol nebo trehalóza (Fleming et al., *Nature Chemical Biology*, 2011), uvažuje autorka o jejich použití pro další pokusy? Je pravděpodobné, že autofagie představuje cestu jak se chce buňka „vypořádat“ s nadbytkem MK a jelikož bafilomycin vykazuje podobný účinek jako samotné MK, tj. blok autofagického toku, bylo by vhodné využít naopak látky, které tento tok zvyšují. Existuje ještě nějaká další lidská pankreatická buněčná linie na které by bylo možné výsledky zopakovat?
- 4) Má autorka nějaký názor na to jakým molekulárním mechanismem lze vysvětlit efekt nenasycené MK, která inhibuje vznik autofagického bloku způsobeného nasycenými MK?
- 5) Měl bych jisté pochybnosti o časovém sledu přidávání bafilomycinu A jakožto inhibitoru autofagie, který byl přidán na posledních 6h před sklizením buněk. Z obrázků prezentovaných v diplomové práci vyplývá, že čase 12h je již aktivována kaspáza 7 a tudíž pro přidávat v tomto čase inhibitor (pro časy 18h) a zkoumat jeho vliv na apoptózu pravděpodobně nemusí odpovědět na otázku jak jsou tyto děje spojeny, když je již apoptóza spuštěna. Byly zkoušeny i ko-inkubace kdy byl inhibitor přidán společně s MK, případně byly zkoušeny i pokusy kdy by byl autofagický tok nejprve zablokovan bafilomycinem a MK by byla přidána později? Jaký je časový

průběh apoptózy vyvolané MK, když kaspáza 7 je již aktivována ve 12h? Pokud bafilomycin vykazuje při delších inkubačních časech nespecifické či toxické účinky, je možné vyzkoušet jiné inhibitory?

- 6) Při přípravě některých roztoků jako je 10% SDS je příprava popsána jako 10 g SDS a 100 ml vody, pokud jde ale o 10% roztok w/v (weight/volume) mělo by být 10g rozpuštěno ve vodě a doplněno do 100 ml celkového objemu.

#### **Celkové hodnocení diplomové práce**

Práci hodnotím jako zdařilou a doporučuji ji k obhajobě, autorka prokázala, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopna o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit závěry. Přeji autorce úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.

V Praze dne 27.5.2013

Mgr. Jaroslav Truksa Ph.D.