

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jitky Šantorové:

### **Úloha proteinů CIDE při apoptóze a morfologie mitochondriální sítě v patogeneze**

Mgr. Jitka Šantorová svou disertační práci zaměřila na dva okruhy problémů spojených s mitochondriemi. V první části práce se pokusila blíže charakterizovat zatím málo známý mitochondriální protein CIDEa, který je podezřelý z účasti ve vnitřní buněčné apoptotické dráze. V té druhé části se zaměřila na charakterizaci morfologie mitochondriální sítě u vybraných buněk a její změny spojené s různými metabolickými a patofyziologickými stavy. V obou případech se jedná o aktuální, atraktivní a v současnosti intenzivně studované problémy. Vždyť poruchy apoptotických procesů často vedou k neřízené proliferaci buněk, tedy k nádorovému bujení a následně k záhubě celého organismu. Také naše představy o mitochondriích, jejich morfologii a funkcích v buňce se v posledních letech významně posunuly. Dnes víme, že to nejsou pouze ony příslovečné buněčné elektrárny, ale jejich význam je mnohem širší a sahá od produkce energie přes regulaci iontového hospodářství až po již zmíněnou zásadní funkci ve vnitřní apoptotické dráze.

Autorka získala některé nové poznatky, které jsou kromě předkládané práce obsaženy také ve dvou publikacích uveřejněných v zahraničních časopisech. Je jen škoda, že ve vlastní disertační práci není o těchto publikacích ani zmínka (alespoň já jsem žádnou nenalezl) a jsou uvedeny pouze v autoreferátu disertační práce společně s ostatními publikacemi autorky. Ve vlastní disertační práci jsou hlavní zjištění formulována v několika bodech. Mgr. Šantorová prokázala, že obsah mRNA pro zkoumaný protein CIDEa se liší v různých tkáních a potvrdila jeho, do té doby ne zcela jistou, lokalizaci v mitochondriích. Zároveň prokázala, že indukovaná overexprese tohoto proteinu vede k apoptóze a zkoumaný protein je přitom transportován do buněčného jádra. Postulovala hypotézu, podle které se protein CIDEa účastní apoptotické dráhy, která nezahrnuje kaspázové kaskády. Druhá část práce obsahuje atraktivní 3D zobrazení mitochondriálního retikula u dvou typů tkáňových buněk. Tato zobrazení byla získána pomocí zdokonalené konfokální mikroskopie a umožnila autorce přesněji definovat rozměry a tvar mitochondriální sítě a charakterizovat změny, ke kterým v této síti dochází při různé dostupnosti substrátu, či přítomnosti látek interagujících s oxidační fosforylací.



Po formální stránce má práce klasické členění. Teoretický úvod předkládané disertační práce tvoří shrnutí zkoumané problematiky. Je přehledně členěný a seznamuje čtenáře se strukturou a funkcí mitochondrií s důrazem na jejich působení v apoptóze. Metodická část se rozkládá na téměř třiceti stranách, což svědčí o širokém spektru metod, které byly využity pro získání dat pro disertační práci. Ve výsledkové části jsou získaná data přehledně prezentována až na některé temné obrázky, které mají dokládat lokalizaci fluorescenčně značených proteinů, ale možná jsem měl pouze smůlu na tmavou kopii. Souhrn výstižně vyzdvihuje nejdůležitější výsledky a vhodně je dává do vzájemných souvislostí.

K práci mám následující připomínky, popřípadě dotazy:

Domnívám se, že práce by si zasloužila ještě alespoň jedno pečlivé přečtení. Obsahuje totiž překlepy v množství rozhodně větším než malém a to by u prací tohoto typu nemělo být (např. jen na str. 8 jsem jich našel 5 a celkově jich mohou být desítky). Narazil jsem i na chyby gramatické, chybějící interpunkci, či špatný slovosled, které mění význam věty. Některé anglicismy nejsou podle mě nezbytné a na některých místech kolísá také velikost písma.

Zarazila mě absence citací na prvních stránkách literárního přehledu (první je až na straně 9), podle mě ne všechna zde uváděná fakta jsou dávno známá a potvrzená.

Na straně 12: elektrony nejsou přenášeny z  $\text{FADH}_2$  na Komplex II, koenzym je jeho součástí. Dále mi na této straně připadá nejasná pasáž o spřažení oxidační fosforylace a protonmotivní síle. Spřažením se rozumí vztah mezi oxidací a fosforylací a vyjadřuje v podstatě míru nepropustnosti vnitřní mitochondriální membrány pro protony. I ve stavu IV mohou být mitochondrie rozspřaženy a naopak ve stavu III těsně spřaženy. Index respirační kontroly udává poměr respirace ve stavu III a IV.

Na straně 34: Jedno z matematických vyjádření Lambert-Beerova zákona je:

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon \quad \text{z toho tedy plyne, že} \quad c = A / l \cdot \epsilon$$

Úpravou uvedeného vzorce lze dále snadno odvodit, že rozměr molárního absorpčního koeficientu je  $\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ .

Na obrázku 4.5. nejsou vyznačeny statisticky významné rozdíly mezi podíly TUNEL pozitivních buněk



Proč autorka stanovovala hladiny mRNA pro CIDEa v bílém tuku a hladinu tohoto proteinu v hnědém tuku, když právě srovnání stejných tkání vzhledem k posttranskripční regulaci mohlo poskytnout zajímavé hodnoty?

Pokud na Western blotech byly detekovány pravděpodobně trimery CIDEa spojené disulfidickými můstky, nezkusili jste elektroforézu s redukčním činidlem, např. DTT?

Proč buňky HEP2G přecházejí při vysoké koncentraci glukózy na glykolýzu, jedná se o mléčné kvašení a jaký je mechanismus utlumení oxidační fosforylace?

Poměrně odvážná mi připadá hypotéza o úloze zvýšené aktivity enzymů cyklu trikarboxylových kyselin a následně GTP v iniciaci mitochondriální fúze. Succinyl CoA syntetáza se u živočichů vyskytuje ve dvou izomerech specifických pro GDP a ATP a hlavně, poměr mezi různými nukleotidy je v cytoplasmě i v mitochondriích udržován enzymem nukleosid difosfát kinázou.

Přes uvedené výhrady či připomínky se domnívám, že Mgr. Jitka Šantorová ve své disertační práci přináší celou řadu nových a významných zjištění, které přispějí k hlubšímu pochopení funkce a struktury mitochondrií. Mgr. Jitka Šantorová ve své disertační práci podle mého názoru prokázala, že je schopna samostatné vědecké práce a doporučuji proto, aby jí na jejím základě byla udělena vědecká hodnost PhD.

V Praze, dne 9. 11. 2008

RNDr. Martin Kalous, CSc.

