



POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI Bc. Veroniky Vilímkové

Předložená diplomová práce je zaměřena na téma erytroidní diferenciaci s důrazem na roli faktoru HIF-2alfa. Tato jeho role je testována pomocí farmakologického (specifický alosterický inhibitor) a genetického přístupu (příprava genového knock-out v buněčné linii pomocí CRISP/Cas9 technologie).

Formát diplomové práce je ve shodě s doporučeními, obsahuje obecný úvod do problematiky, pečlivě vytvořený seznam zkratek, popsané metodiky, část výsledkovou i shrnující diskusi. Součástí práce je dostatečné množství citací. Práce obsahuje minimum formálních nedostatků typu překlepů či formulačních nepřesností, formát citací je mírně různorodý, což typicky není chyba studenta, ale generováním výstupů příslušného bibliografického software.

K PRÁCI BYCH MĚL NÁSLEDUJÍCÍ DOTAZY A KOMENTÁŘE:

Teoretický úvod

1. Na straně 14 zmiňujete, že varianta IPAS je exprimována především v Purkyňových buňkách mozečku a epitelu rohovky. Je pro tyto dva buněčné typy/histologické lokace něco společného – např. nutnost lokální inhibice angiogeneze nebo něco podobného? Existuje knock-out tohoto negativního regulátoru HIF1?
2. Na straně 15 uvádíte, že aktivity HIF je možné dosáhnout aplikací CoCl_2 , jaký by zde mohl být mechanismus účinku?
3. Na straně 17 píšete, že HIF ovlivňuje expresi GLUT – glukózových transportérů ale např. v lidském genomu kóduje 14 genů, jedná se o obecnou upregulaci glukózových transportérů, nebo se jedná jen o konkrétní variantu?
4. Na začátku str. 19 uvádíte řadu výhod enukleovaných erytrocytů. Ptáci (dinosauři) ale mají jaderné erytrocyty zajišťující velice efektivní oxidativní metabolismus při extrémním výkonu. Jak je to možné?
5. Dále na straně 19 píšete, že kompaktace jádra souvisí s kondenzací chromatinu, snížením podílem acetylovaných histonů, což snižuje pozitivní náboj histonů a to brání vazbě záporně nabitě DNA. Osobně tomuto molekulárnímu scénáři vysvětlujícímu zmenšení objemu jádra nerozumím, mohla byste prosím vysvětlit?
6. Dále na straně 19 píšete, že je jádro vyloučeno, pohlceno makrofágy – i proto, že má jaderná membrána jiné složení než retikulocyt – např. obsahuje ve vnějším listu fosfatidylserin. Mám tomu rozumět tak, že jádro opustí buňku bez toho, aby bylo obaleno plazmatickou membránou?
7. Je správné označení proteinu názvem proužek 4.1 (strana 20)?
8. Snad se nepletu, ale české názvy druhů se píší malým písmenem – správně by tedy myslím mělo být uvedeno dání pruhované. Možná zde ale platí nějaká výjimka.
9. Na závěr teoretického úvodu se věnujete erytrocytózám. Mohou mít tato onemocnění pozitivní vliv např. na sportovní výkon, nemohou se zde skrývat vysvětlení mimořádně vysokých hematokritů špičkových sportovců – např. slavný případ finského běžce na lyžích Eero Mäntyranty?

Materiál a metody:

1. Ocenil bych více informací o použité buněčné linii HEL.
2. Ocenil bych více informací o „compound 2“.
3. Na straně 27 by myslím bylo vhodné uvést, jakým koncentracím DMSO byly buňky vystaveny při aplikaci C2 – ve výsledkové části se zdá, že DMSO může ovlivnit fyziologické parametry testovaných buněk. Z vlastní zkušenosti vím, že DMSO za poměrně nízkých koncentrací může ovlivňovat diferenciaci např. buněčné linie HL60.

Výsledky:

1. Na straně 38 je relativní exprese genu pro VEGF vztažena k „housekeeping genům“ *GUSB* a *RPLP0*. Proč byly vybrány právě tyto geny? Nemění C2 expresi těchto genů.
2. Dále se věnujete apoptóze. Jaká je kauzalita mezi apoptózou a testovanou proerytroidní diferenciací?
3. Od strany 40 jsou uvedeny sloupcové grafy bez směrodatných odchylek, znamená to, že experimenty byly provedeny jen jednou?
4. Na straně 42 je popsán vliv inhibitoru C2 na myší erytroidní progenitory – jak si vysvětlujete výsledek pro 1 mikromolární koncentraci C2?
5. Na straně 46 popisujete výsledky nukleofekčních a lipofekčních experimentů. Lipofekce zdá se zvyšuje intenzitu červeného signálu indikujícího aktivitu CRISPR/Cas9 systému, nukleofekce pak expresi GFP kódovaného vektorem. Nebo je vysvětlení jiné. Na obrázcích možná díky rozlišení nevidím dvakrát pozitivní buňky. Chybí mi negativní kontrola pro nastavení gatování.

Diskuse:

1. Na straně 53 a 54 konstatujete, že jste svými výsledky potvrdili důležitou roli HIF2alfa v erytropoéze. Myslíte si, že na základě svých výsledků můžete dospět k takto jednoznačnému a silnému tvrzení?

Přes celou řadu připomínek bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce splňuje nároky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a doporučuji ji k obhajobě. Jsem zvědav, jak se uchazečka o magisterský titul popasuje s dotazy, výsledné hodnocení se bude odvíjet od kvality obhajoby. V tuto chvíli doporučuji hodnocení velmi dobře.

v Praze 25.1.2018

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.