Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : Terezie Rohlenová

Název práce: Úloha mitochondriálního metabolismu v iniciaci a adaptaci buněk na hypoxii

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte **právě jednu** z možností)

	1. Rozsah DP a její členění
x	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N – nedostatečné

	2. Odborná správnost
x	A - výborná, bez závažnějších připomínek
	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

	3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů
x	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

	4. Jazyk práce
	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
x	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - upokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

	5. Formální a grafická úroveň práce
x	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Diplomová práce je precizně vypracována. Problematika výzkumu je řádně nastíněna v literárním přehledu, metody jsou detailně popsány, výsledky jsou prezentovány a následně interpretovány v rámci diskuse, která, i přesto že by mohla jít více do hloubky, zasazuje naměřené výsledky do širšího kontextu. Určitým nedostatkem práce jsou drobné nepřesnosti a určitá stylistická zaváhání, která by mohla být na škodu čtivosti textu. Zde bych autorce doporučil na sobě více pracovat. Též poněkud překvapivý je fakt, že ačkoliv autorka věnuje značnou pozornost měření buněčné respirace, nevysvětluje nikde detailně funkci respiračního řetězce, ačkoliv pro pochopení experimentů je toto relativně důležité. Až na tyto drobné nedostatky, které patrně plynou z autorčiny relativní nezkušenosti a které jistě budou minimalizovány další praxí, autorka generovala mnoho zajímavých výsledků a práce obsahuje data, která jsou relevantní pro porozumění role mitochondriálního metabolismu v adaptaci na hypoxii. Úloha buněčného metabolismu v iniciaci a propagaci nádorového bujení je v současné době intenzivně studována a autorčina práce přináší nové poznatky, které mohou přispět k dalšímu pokroku v porozumění jeho vlivu.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě
Otázka 1: Autorka správně uvádí, že ačkoliv tzv. Warburgův jev, tj. zvýšená spotřeba glukózy rakovinnou buňkou projevující se jako relativní zvýšení aerobní glykolýzy na úkor oxidativní fosforylace, je pozorován u většiny nádorových linií, není zcela univerzální a mezi rakovinnými liniemi panují značné rozdíly ohledně míry jejich využití oxidativní respirace a aerobní glykolýzy. Kam by autorka zařadila linii karcinomu jater HepG2 s níž pracovala? Má tato linie v porovnání s ostatními liniemi spíše glykolytický nebo spíše oxidativní metabolismus, a myslí si autorka, že toto může ovlivnit interpretaci výsledků? Otázka 2: Autorka ve své práci porovnává určité aspekty metabolismu HepG2 linie v normoxii a hypoxii. V textu uvádí, že ačkoliv normoxické podmínky v játrech (přirozený habitat z něhož HepG2 linie pochází) jsou 5% kyslíku, linie se adaptovala na 21% kyslíku při nichž je běžně kultivována in vitro, a tudíž snížení na 5% kyslíku pro ni představuje hypoxii. Může autorka nějak podpořit toto tvrzení a nemyslí si, že případné snížení hladiny kyslíku na řekněme na 1% by mělo vyšší relevanci? Otázka 3: Jak si autorka vysvětluje pozorování, že buňky pěstované v 25mM glukóze produkují za hypoxie méně laktátu než buňky pěstované v 5mM glukóze (viz obr. 21 a 23)? Toto je poněkud překvapivé vhledem k vyšší rychlosti růstu HepG2 buněk v 25mM glukóze za hypoxie (viz obr. 16) a vyšší dostupnosti glukózy pro glykolýzu. Bylo by toto možno vysvětlit rozdíly v příjmu glukózy buňkou, a je nějaký důvod proč to nebylo experimentálně ověřeno např. pomocí stanovení příjmu značené glukózy (NBDG). Mění se velikost buňky v hypoxii? Vhledem k vztažení produkce laktátu na množství buněk by to mohlo hrát roli. Otázka 4: Obr. 24 ukazuje, že buňky pěstované v 25mM glukóze respirují víc než buňky pěstované v 5mM glukóze. Též obr. 34 ukazuje, že rezervní kapacita buněk v 25mM glukóze je vyšší. Má pro to autorka nějaké vysvětlení, jelikož díky Crebtree efektu by se dal očekávat spíše opačný výsledek? Otázka 5: Korekce buněčné respirace pomocí signálu Tim23 přineslo poněkud rozporuplné výsledky. Není možné, že buňky rostoucí na galaktóze vykazují zvýšený import proteinů do mitochondrií, a nebylo by tedy účelnější provést jinou metodu korekce (měření mitochondriálního

Dotazy k obhajobě
objemu pomocí mitotrackeru green nebo aktivity citrát syntázy), popřípadě se úplně vyhnout tomuto problému měřením respirace na izolovaných mitochondriích? Otázka 6: Mohla by autorka okomentovat určitý rozpor mezi signálem pro Tim23, který je zvýšený u buněk pěstovaných v galaktózových mediích (obr. 26), a signálem pro PDH, který se pro buňky pěstované v galaktóze a glukóze neliší (obr. 19)? Myslí si autorka, že toto znamená že PDH je celkově nižší (přepočítáno na jednu mitochondrii) v buňkách pěstovaných v galaktózovém médiu, nebo je naopak toho názoru že Tim23 je v této situaci špatný marker (popř. má uplně jiné vysvětlení)? Otázka 7: Proč je stabilizace HIF1a v galaktózovém médiu nejpomalejší? Souvisí to s nižším oxidativním stresem za hypoxie v tomto mediu, a existuje pro to nějaký experimentální důkaz? Hraje oxidativní stress roli ve vyšší stabilizaci HIF1a v hyperglykemických mediích i za normoxie? Otázka 8: Autorka uzavírá svou práci rekapitulací svého pozorování, že "galaktózové buňky se množí dvakrát pomaleji než buňky glykemické, a to i v hypoxickém prostředí" a zakončuje poněkud odvážným tvrzením, že "tohoto by bylo možno využít při léčbě rakoviny". Mohla by autorka rozvést toto své tvrzení a uvést jak si to konkrétně představuje?

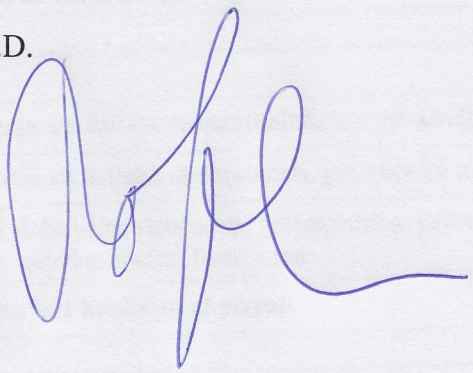
Stanovisko k opravě chyb v práci:
opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / **NE**

Navrhovaná celková klasifikace: **1**

Datum vypracování posudku: 15. května 2013

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS):

Mgr. Jakub Rohlena, Ph.D.