

## **Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Matěje Běhounka “Buněčná smrt jako důsledek železem indukovaného buněčného poškození” v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK**

Diplomová práce Bc. Matěje Běhounka se zabývá vlivem akutního a chronického vlivu nadbytku železa aplikovaného na vybrané buněčné linie, Hep G2 a NES2Y, které jsou odvozeny z jater a slinivky, a reprezentují tak orgány nejčastěji postižené nadbytkem železa. Dlouhodobé působení nadbytku železa na buňky *in vitro*, zvláště pak na úrovni molekulárních mechanismů, není příliš prozkoumáno a představuje tak zajímavý experimentální model.

### **Formální kvalita předložené práce**

Práce je po formální stránce dobře zpracována, najdeme zde pár drobných chyb, kdy např. na straně 61 chybí specifikace anti-SOD2 protilátky a například obrázek 2.3. má horší rozlišení a je hůře čitelný, či v obrázku 4.12 A je dvakrát popisek Prokaspáza-2, kdy jeden z nich má být štěpená kaspáza-2.

### **Jazyk**

Práce je psána v češtině, psána je čtivě a chyb je zde minimum, i když pár překlepů či gramatických chyb jsem našel, např. na straně 31 „glykosilována“ či na str. 59. dochází k „emitaci“ signálu. Také není zcela konzistentní psaní „s“ a „z“ neboť někdy je používán pravopis progresivní a jindy ne (viz. endoplazmatické retikulum vs. diskuze)

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

#### *1) Literární úvod*

V první části diplomové práce jsou zdařile shrnuty poznatky o metabolismu železa, mechanismech stresu endoplazmatického retikula, molekulárních mechanismech apoptózy či autofagie. Dle mého názoru je tato část zpracována pečlivě a v rozumném rozsahu. Subjektivně bych zařadil i krátkou kapitulu o alternativních módech buněčné smrti kromě klasické apoptózy a nekrózy.

#### *2) Cíle práce*

Cíle práce jsou jasně shrnuty do čtyř navazujících bodů, které si kladou za cíl vytvořit modely pro studium akutního a dlouhodobého působení železa u vybraných linií, stanovit vliv železa na expresi proteinů regulujících metabolismus železa, stanovit expresi markerů oxidativního stresu, stresu endoplazmatického retikula a autofagie a sledování aktivity kaspáz u vytvořených buněčných modelů.

#### *3) Metody*

Metody zahrnují jednak stanovení počtu buněk pomocí bürkerovy komůrky, specifickou detekci proteinů a také sledování profilu buněčného cyklu pomocí barvení propidium jodidem. Práce tak má relativně užší metodický záběr, ale na druhé straně prezentovaná data svědčí o dobrém zvládnutí metod.

#### *4) Výsledky*

Ve výsledcích nalezneme 15 obrázků a dva grafy, většina z nich jsou složené obrázky western blotů a ukazují tak skutečně velké množství dat, která jsou dostatečná k vyvození odpovídajících závěrů. Vlastní kvalita prezentovaných výsledků je na velmi dobré úrovni. Výsledky ukazují, že v obou modelech nadbytku železa dochází k potlačení příjmu železa a naopak k ukládání nadbytečného intracelulárního železa ve formě ferritinu. V případě akutních vysokých dávek pak dochází k potlačení funkce IRP1 a IPR2, indukci stresu endoplazmatického retikula a indukci antioxidantního enzymu SOD2. Naopak v případě dlouhodobé mírnější aplikace železa nedochází k signifikantní indukci

stresu enpolazmatického retikula, antioxidačních enzymů ani autofagie a hladiny regulačních proteinů IRP1 a 2 se mění pouze v linii NES2Y. V obou modelech pak dochází k aktivaci exekučních kaspáz.

### 5) *Diskuse*

V diskusi autor předkládá svou představu o mechanismech působení nadbytku železa na pozorované buněčné linie, které se liší v obou zkoumaných modelech. Je diskutována role kaspázy-2 a kaspázy-8, která se zřejmě liší v obou modelech. Diskuse do jisté míry znovu opakuje výsledky, ale dává je do kontextu známých skutečností a svůj úkol plní.

#### **Další připomínky a otázky:**

- 1) Toxicita železa je založena na produkci kyslíkových radikálů. Nebylo by vhodné etablované modely charakterizovat měřením radikálů pomocí fluorescenčních barev na FACSu?
- 2) Model akutního nadbytku železa, kdy je používána 15 mM koncentrace citrátu železitého mi nepřipadá ideální. Použité koncentrace jsou v diskusi komentovány jako „zcela relevantní“ (str. 90), ale citované zdroje mluví o přetížení řádově menším v koncentraci jednotek mM. Vzhledem k použité koncentraci citrátu železitého mě spíše překvapilo, že buňky neskončily nekroticky, ale apoptoticky. Model je to zajímavý, a získané výsledky mohou být i relevantní a zajímavé, ale přesto jde o model do značné míry umělý. Na druhou stranu model chronického přetížení železem je velmi relevantní, a prezentované hodnoty mohou být dosaženy u pacientů s přetížením železa.
- 3) Prezentovaná aktivace kaspázy-2 (obr. 4.7.) v akutním nadbytku železa mě nepřesvědčila, je zde jasně vidět úbytek prokaspázy-2, ale aktivace štěpu kaspázy-2 je v porovnání s kaspázou-8 i exekučními kaspázami vcelku slabá. Je možné aktivaci kaspázy potvrdit i nějakým např. kolorimetrickým měřením pomocí značeného peptidového substrátu? Naopak, aktivace kaspázy-2 se zdá být prominentní při dlouhodobém působení železa a může být vysvětlením toho, proč je vidět aktivaci exekučních kaspáz bez aktivace ostatních prokaspáz.
- 4) Práce detekuje přítomnost apoptózy v buňkách dlouhodobě vystavených železu, přestože buňky zřejmě normálně, i když pomaleji proliferují. Dochází zde tedy k nějaké selekci, kdy část buněk apoptoticky umírá a část se přizpůsobí a proliferuje? Dle mého názoru by bylo vhodné změřit a kvantifikovat apoptózu a nekrózu pomocí značeného AnnexinuV a propidium jodidu a zjistit, jak velká část buněk je apoptotická.
- 5) Jaký je autorův názor na možnou roli ferroptózy při působení nadbytku železa?
- 6) Rychlost proliferace buněčných linií mi připadá dost velká, dle grafu 4.1 se obě linie dělí každých cca 24h. Dle mých zkušeností totiž HepG2 linie nepatří mezi nejrychleji rostoucí linie. Je nějaký důvod psát linii jako HEP-G2? Já jsem většinou narazil na Hep G2?

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

Práci hodnotím jako zdařilou a určitě ji doporučuji k obhajobě, autor prokázal, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopen o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit závěry. Práce je psána velmi detailně a poctivě a ukazuje na velké úsilí autora při získávání dat a sepsování práce. Přeji autorovi úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.