

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: ÚLOHA PROTEINKINASY C A JEJÍCH CÍLOVÝCH PROTEINŮ V MECHANISMU KARDIOPROTEKCE

Autor: RNDr. Kristýna Holzerová

Disertační práce se zabývá úlohou dvou isoform proteinkinasy C (PKC) – PKC δ a PKC ϵ při různých modelech hypoxie – intermitentní hypobarické a kontinuální normobarické hypoxii. Je zaměřena na buněčnou lokalizaci fosforylovaných či nefosforylovaných forem těchto dvou regulačních proteinů v homogenátu cytosolu či partikulární frakci, dále se zabývá cílovými proteiny majícími úlohu v apoptose, autofagii, dynamice mitochondrií, odstraňování toxických aldehydů, metabolismem sfingolipidů a signalizací přes gap junctions. Práce je sestavena ze tří publikací v impaktovaných časopisech, přičemž u jedné je kandidátka prvním autorem a jedna byla v době psaní práce v recenzním řízení.

Autorka prokázala, že jednotlivé isoformy PKC mají odlišnou funkci v mechanismu kardioprotekce způsobené adaptací na chronickou hypoxii. Zatímco PKC δ se účastní protekce vyvolané intermitentní hypobarickou hypoxií, PKC ϵ naproti tomu hraje významnou roli v účinku kontinuální normobarické hypoxie. Další část disertační práce se zabývá analýzou cílových proteinů PKC po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii. Autorka zjistila, že v myokardu potkana dochází po adaptaci na intermitentní hypobarickou hypoxii jak ke zvýšení proapoptotických, tak antiapoptotických proteinů. Celkově však převládly antiapoptotické signály, což se projevilo snížením cytosolického cytochromu c a poklesem počtu apoptotických buněk v levé komoře myokardu. Logicky dále autorka zacílila na proteiny autofagických drah a zjistila zvýšené hladiny proteinů BNIP3 a LC3-B, které by mohly hormeticky odstraňovat poškozené či nějak narušené orgány.

Předložená práce je gramaticky bezchybná, obsahuje minimum překlepů, text je dobře čitelný a informativní. Nicméně k práci mám několik výtek.

- 1) Formát citací. Autorka uvádí citace ve formě autor + rok, ale nerozlišuje, zda práce vznikla v kolektivu nebo je autorem pouze vybraná osoba. Doporučuji tedy, aby v případě více autorů jedné publikace byla použita citace ve formátu autor a kol. + rok.
- 2) Pro větší přehlednost bych ocenil, kdyby práce obsahovala obrázky všech western blotů použitých pro analýzu a aby byly přiřazeny ke grafům ve výsledcích.
- 3) V práci je použito více různých tzv. house-keeping genů pro normalizaci. V takovém případě by bylo možné a možná i přehlednější po ukončené analýze vybraných proteinů nabarvit membránu pomocí coomassie blue a standardizovat ji na konečnou nanášku.
- 4) V práci se uvádí, že: „Protein LC3 (z angl. *microtubule-associated protein B-light chain 3*) je homolog kvasinkového Atg8 nacházející se ve dvou formách LC3-A a LC3-B. LC3-A je solubilní forma vznikající štěpením LC3 na jeho C-konci. Modifikací LC3-A vzniká membránově vázaná forma LC3-B, která je součástí autofagosomů.“ Správný výklad však zní, že proteiny z rodiny LC3 se rozdělují na čtyři isoformy, které mají různou tkáňovou distribuci. Přičemž isoformy LC3A a LC3B mohou být v některých případech detekovány stejnou protilátkou. LC3 proteiny jsou za normálních okolností solubilní a značí se jako LC3-I (LC3A-I; LC3B-I) a při jejich aktivaci v autofagii dochází k přidání fosfatidylethanolaminu a značí se jako LC3-II (LC3A-II; LC3B-II). LC3-I má na western blotu

přibližně 18kDa a LC3-II má mít 16kDa. Bohužel, z přiloženého western blotu nelze poznat, který band byl použit pro analýzu a zda je výsledek správně interpretován.

- 5) Dále autorka pracovala s proteinem Drp1 a Parkin, jejichž lokalizace může být cytosolická i mitochondriální, ale stanoveno bylo jen celkové množství v lyzátu. V případě Drp1 se neúspěšně pokoušela o stanovení jeho fosforylované formy. Pro stanovení těchto dvou proteinů doporučuji izolovat mitochondrie a měřit pouze formy translokované na mitochondrie, jelikož pouze tyto proteiny byly popsány jako aktivní.

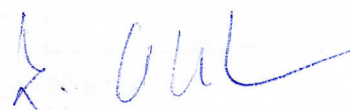
Dále mám na aspirantku následující otázky:

- 1) V práci je popsána PKC a její úlohy v buněčné fyziologii. Jaký je však vztah mezi HIF1-alfa signalizací a PKC isoformami.
- 2) V práci je rozebírán energetický metabolismus v hypoxii. Jaká je však energetická bilance v průběhu ischemie a následné reperfuze? Kdy by mělo docházet k maximální mitofagii (autofagii mitochondrií) a jakým způsobem k ní dojde?
- 3) V článku o PKC- δ Vám tento protein lokalizuje po hypoxii na mitochondrie. Jaké jsou jiné spouštěče mitochondriální lokalizace pro tento protein? A jaké jsou další cíle (kromě zmiňovaných mitodynamínů) PKC- δ v mitochondrii?

Celkově lze konstatovat, že RNDr. Kristýna Holzerová zvládla teoretickou, metodologickou i formální část postgraduálního studia na zadané téma a splnila všechny požadavky kladené na úspěšné absolvování postgraduálního doktorského studia. Předložená disertační práce splňuje podmínky stanovené zákonem.

Doporučuji k obhájení a získání titulu PhD.

V Praze dne 27.9.2016



RNDr. Lukáš Alán, PhD