

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
Ing. Jiří Suttnar, CSc.
Datum: 20.5.2024

Autor:
Bc. Michaela Myšáková

Název práce:
Investigation of the role of the KEAP1-NRF2 antioxidant pathway in the therapy of secondary acute myeloid leukaemia

Výzkum role antioxidantní dráhy KEAP1-NRF2 v terapii sekundární akutní myeloidní leukémie

Cíle práce

Cílem práce bylo testovat hypotézu, že aktivace NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) a zvýšený redoxní stav v leukemických buňkách jim propůjčuje odolnost vůči vybrané anti-leukemické terapii.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 113 + příloha 13 stran
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO
Je uveden seznam zkratk? ANO

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO
Je napsán srozumitelně? ANO
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO
Kolik metod bylo použito?
Práce obsahuje 11 okruhů metod zahrnujících celkem 24 protokolů
Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO
Je dokumentace výsledků dostačující? ANO
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Jen pár poznámek.

Str. 50, ř. 10: Podmínky centrifugace jsou uvedeny jako "10 minutes at 3,000 rpm at 4 °C." Bez udání typu rotoru pro danou centrifugu není rpm postačující k opakování experimentu na jiném pracovišti. Takový popis podmínek centrifugace se v práci vyskytl pouze jednou, jinde byly důsledně použity násobky g. Domnívám se, že v této části by měly být uvedeny citace prací k některým metodám jako je značení iodoTMT a SDS-elektroforéza.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

K jazykové úrovni práce, psané v angličtině, se nebudu vyjadřovat. Mohu jen konstatovat, že text je rozčleněn do přehledných celků a dobře se mi četl. Práce obsahuje řadu obrázků v literárním přehledu a rovněž obrázky a grafy, které přehledně dokumentují výsledky. Bylo by vhodné doplnit v experimentální části schema či obrázek k použití iodo TMT. Na str. 74 je odkaz na Fig. 19C, který jsem nenašel. Na str. 24 je uvedeno: „GSSG is then reduced...with NADP+“, má být NADPH.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce splnila zamýšlené cíle a přispěla k poznání úlohy antioxidační dráhy KEAP1-NRF2 v terapii sekundární akutní myeloidní leukémie. Autorka vynalézavě použila řadu technik, aby prozkoumala zmíněnou dráhu, kdy zjistila, že hraje důležitou roli jak v mechanismu léčebného účinku 5-azacytidinu (AZA), případně v kombinaci s pevonedistatem (Pevo), tak v rezistenci na tuto kombinovanou léčbu. Jako modelový systém využila buněčnou linii OCI-M2, pro kterou prozkoumala citlivost vůči AZA a Pevo a vytvořila linie rezistentní vůči AZA (AZA-R), částečně rezistentní k Pevo a kompletně rezistentní vůči AZA (PEVO-PR), a klon rezistentní k AZA i Pevo (PEVO-R). S těmi provedla podstatnou část experimentů, kde využila průtokovou cytometrii, imunodetekční techniky a metody redoxní proteomiky.

K prozkoumání souvislostí mezi změnou redoxní homeostázou a změnami v citlivosti terapie vytvořila ještě model s nadměrnou expresí mutantní isocitrátdehydrogenasy 2 (IDH2 R172K) v buňkách OCI-M2, kde zjistila snížené hladiny glutathionu.

Souhrnně lze říci, že jde o velmi kvalitní práci, obsáhlou a v dílčí problematice prioritní. Její teoretická část přináší čtenáři výborný úvod do studované problematiky. Autorka prokázala svoji schopnost pracovat s dostupnými daty, širokým spektrem laboratorních metod i schopnost samostatného řešení výzkumného problému

Celkově hodnotím uvedenou práci jako výbornou a doporučuji ji přijmout k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

1. V práci je používána buněčná linie OCI-M2. Odkud byla získána?

2. Na Obr. 12B je znázorněna proložená křivka viability buněk OCI-M2 v závislosti na logaritmu koncentrace Pevo, která zřejmě nebere v úvahu body o jeho nízké koncentraci.

Jakým způsobem bylo proložení provedeno a jak vysvětlíte, proč je viabilita při nízkých koncentracích Pevo na úrovni asi 65%? Podobně je na Obr. 15A znázorněna viabilita buněk OCI-M2 na logaritmu koncentrace AZA za přítomnosti inhibitoru NRF2 (fialová proložená linie). Jakým způsobem bylo proložení provedeno a jak vysvětlíte, proč je viabilita při nízkých koncentracích AZA na úrovni asi 60%?

3. V AZA-R buňkách inkubovaných s Pevo jste našli v KEAP1 oxidované Cys 23 a 38. Oxidované Cys (151, 226, 273, 288, 613, 622, 624) v KEAP1, uvedené v práci Suzuki, Takahashi et al. 2023 jste nenalezli? Pokud ne, čím by to mohlo být způsobeno?

4. Uvažujete u buněk OCI-M2 s exprimovanou mutantní IDH2 R172K o studiu změn v pentosofosfátovém cyklu a sledování koncentrace NADPH/NADP+?

Návrh hodnocení oponenta

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: