
Dne 12.5. 2009

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Marcely Chmelařové

Oponovaná diplomová práce:

Význam regulací signální cesty proteinu p53 v protinádorové léčbě: Inhibitory ATM

Autor práce:

**Bc. Marcela Chmelařová, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-
technologická , Katedra biologických a biochemických věd**

Oponent:

Prof. RNDr. Jiřina Vávrová, CSc., Vachkova 830, 500 09 Hradec Králové 9

zaměstnavatel: Fakulta vojenského zdravotnictví UO, Katedra radiobiologie, Hradec
Králové

Oponovaná diplomová práce Bc. Marcely Chmelařové má celkem 70 stran. V rozsáhlém (31 stran), velmi dobře zpracovaném, literárním úvodu autorka vysvětlila pojem programované buněčné smrti a molekulární mechanismy, které tuto buněčnou smrt iniciují. Podrobně je popsána fosforylace ATM kinasy, ke které dochází u leukemických buněk po poškození DNA genotoxickým stresem vyvolaným např. cytostatiky nebo ionizujícím zářením. Autorka se věnovala především mechanismům zastavujícím buněčné dělení v tzv. klíčových bodech a souvisejících s reparací poškození. Z literárního úvodu vyplynuly hlavní cíle práce, zhodnotit indukci apoptózy vyvolanou mitoxantronem (MTX) - cytostatickou látkou užívanou v terapii leukémií a lymfomů a prokázat význam inhibice ATM kinasy pomocí jejího nespecifického inhibitoru kofeinu.

Jako experimentální model byly vybrány buňky buněčné linie T-lymfocytární leukémie MOLT-4. Při sledování účinku mitoxantronu byly použity jednak metody flow-cytometrické analýzy a dále elektroforéza spolu s metodou western blot. Použité metody jsou popsány velmi podrobně na osmi stranách textu. Výsledky a diskuse obsahuje kapitola 4 (23 stran).

Z výsledků je zřejmé, že autorka se seznámila a prakticky prováděla řadu špičkových metodik molekulární biologie. Z výsledků flow-cytometrické analýzy je

patrné, že 72 h inkubace buněk se samotným kofeinem indukuje především časnou apoptózu, avšak při kombinovaném účinku kofeinu a vysoké dávky MTX je apoptóza nižší než při inkubaci pouze s MTX. Je to způsobeno především faktem, který autorka prokázala, že kofein ruší zástavu buněk v G2/M fázi a tyto pak nevstupují do apoptózy ale vstupují do buněčného cyklu s nereparovanou DNA. Zatímco 3. den po začátku inkubace měl kofein ochranný efekt, za 6 dní již mezi oběma skupinami nebyl rozdíl a naopak u skupiny s nižší dávkou MTX kofein účinek MTX potencoval.

Pomocí western-blot analýzy sledovala proteiny mající význam především v indukci apoptózy a zástavě buněčného cyklu. Kofein snižoval množství proteinu p53 a p21, jejichž zvýšenou expresí autorka pozorovala po inkubaci leukemických buněk s MTX.

Graficky je práce dobře dokumentována 9 obrázky a 19 grafy či reprezentativními záznamy z vlastní práce na flow-cytometru a western blot analýze. Literatura obsahuje 50 citací, kde autorka dodržela citační normy. Práce je sepsána srozumitelnou formou, s minimem překlepů. Z předložené diplomové práce je zřejmé využití celé škály **špičkových metodických přístupů**, jsou velmi dobře popsány metody jak western blot analýzy, tak metody flow-cytometrické a je zřejmé dobré pochopení těchto náročných metod. Autorka prokázala, že ovládá metody statistického zpracování výsledků.

Otázky a připomínky recenzenta:

1/ Vysvětlete funkci proteinu p21 v odpovědi buňky na genotoxický stres a jeho vztah ke klíčovým bodům a také obecně k inhibici ATM kinasy po genotoxickém stresu..

Závěr :

Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem a rozšířila vědecké poznatky týkající se molekulárních mechanismů účinku kombinovaného efektu MTX a inhibitoru ATM kinasy kofeinu. Byly použity moderní metodiky v souladu se současnými světovými trendy. Předložená práce **vyhovuje** všem předpisům stanoveným pro diplomové práce. Proto ji navrhuji **přijmout** a vzhledem ke kvalitě předkládané práce ji hodnotím známkou **výborně**.

Prof.RNDr. Jiřina Vávrová, CSc.

