
Dne 12.5. 2009

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Soni Zemánkové

Oponovaná diplomová práce:

**Význam regulací signální cesty proteinu p53 v protinádorové léčbě:
Inhibice p53**

Autor práce:

**Bc. Soňa Zemánková, 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. Soni Zemánkové má celkem 73 stran. Na 32 stranách, ve velmi dobře zpracovaném literárním úvodu autorka vysvětlila úlohu proteinu p53, označovaného také jako strážce genomu v indukci apoptózy a zástavě buněčného cyklu po ovlivnění buněk DNA poškozujícími látkami. Autorka podrobně popsala strukturu a funkce proteinu p53 a dále pak jeho degradaci. Významná část literárního úvodu je věnována také fosforylaci tohoto proteinu. 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 proteinu p53 pomocí inhibitoru označeného jako pifitrin-alfa.

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 devíti 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 24 h inkubace buněk se samotným pifitrinem-alfa zvyšuje u inkubovaných buněk procenta annexinu V, při kombinovaném účinku pifitrinu-alfa a 0,1 nM MTX je

apoptóza vyšší než při inkubaci pouze s MTX. Autorka prokázala, že inhibice p53 nevede k ovlivnění bloku buněk v G2/M fázi.

Pomocí western-blot analýzy sledovala celkové množství p53 a jeho fosforylaci na serinu 392 a serinu 15. Prokázala pokles množství p53 u buněk MOLT-4 po inkubaci se samotným pifitrimem-alfa, což dokazuje jeho inhibiční efekt. V případě kombinovaného ovlivnění MTX a pifitrimem-alfa došlo k poklesu pouze v intervalu 4 h po začátku inkubace. MTX vedl k fosforylaci p53 jak na serinu 15, tak na serinu 392. Dalším důležitým proteinem spojeným s indukcí p53 po genotoxickém stresu je inhibitor CDK protein p21. Autorka prokázala mírný pokles množství tohoto proteinu za 4 h po kombinovaném podání MTX a pifitrimu-alfa ve srovnání se samotným MTX. V pozdějším období (24h) již množství p21 nebylo pifitrimem-alfa ovlivněno.

Graficky je práce dobře dokumentována sedmi obrázky a 17 grafy či reprezentativními záznamy z vlastní práce na flow-cytometru a western blot analýze. Literatura obsahuje 74 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 význam fosforylace p53 (na jednotlivých místech) v odpovědi buňky na genotoxický stres

Závěr :

Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem a rozšířila vědecké poznatky týkající se molekulárních mechanismů účinku kombinovaného efektu MTX a inhibitoru proteinu p53 - pifitrimu-alfa. 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.