

Dne 12.5. 2009

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Marty Seifrtové

Oponovaná diplomová práce:

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

Autor práce:

**Bc. Martina Seifrtová, 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. Marty Seifrtové má celkem 73 stran. Na 32 stranách velmi dobře zpracovaného literárního úvodu autorka vysvětlila úlohu mitogeny aktivovaných proteinkinás po ovlivnění leukemických buněk DNA poškozujícími látkami, což je úloha nelehká. Lze souhlasit s autorkou, že po poškození DNA v buňkách jsou souběžně s cestami vedoucími k buněčné smrti aktivovány, alespoň v časně fázi, signály zajišťující přežití a proliferaci buněk. Jednou z těchto cest je aktivace rozsáhlé sítě MAPK. Velmi hezky jsou tyto signální cesty shrnuty na obr. č.4. Jedna z těchto signálních cest přes Ras, Raf MEK1/2 a ERK1/2 kinasy je studována u leukémií, neboť vede k buněčnému růstu a zástavě apoptózy. Inhibice této signální cesty by mohla být významná v terapii nádorových onemocnění. Autorka použila inhibitor kinás MEK1/2 U0126.

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 deseti stranách textu. Výsledky a diskuse obsahuje kapitola 4 (19 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 inhibitorem U0126 zvyšuje u inkubovaných buněk procenta positivity annexinu V, při kombinovaném účinku U0126 a mitoxantronu (MTX) je apoptóza vyšší než při inkubaci pouze s MTX. Autorka prokázala, že společná (24h) inkubace buněk s 0,5 nmol MTX a U0126 vede ke zvýšení bloku buněk v G2/M fázi.

Pomocí western-blot analýzy sledovala celkové množství kinas ERK1/2, které se ve sledovaném modelu neměnilo, ani po inkubaci buněk s MTX, ani po přidání inhibitoru, možná by větších změn bylo dosaženo při studiu fosforylovaných forem ERK1/2. Z výsledků je zřejmé, že vzestup p53 a jeho fosforylace je spojena především s ovlivněním buněk MTX než účinkem inhibitoru.

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 70 citací, kde autorka dodržela citační normy. Práce je sepsána srozumitelnou formou, s minimem překlepů. V metodické části je u popisu protilátek použito označení ERK, ale z textu je zjevné, že se jedná o ERK1/2. 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/ V současné době jsou testovány inhibitory Raf-1 kinasy pro svoje protinádorové účinky. Ve vaší práci jste studovala účinek inhibitoru U0126. Popište kinasy, které tyto dva inhibitory ovlivňují.

Závěr :

Práce byla naplánována, provedena a sepsána vědecky odpovídajícím způsobem a rozšířila vědecké poznatky týkající kombinovaného efektu MTX a inhibitoru U0126. 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.