

BIOLOGICKÝ ÚSTAV

Lékařská fakulta MU
Univerzitní kampus Brno-Bohunice
Kamenice 5, budova A7
625 00 Brno
Telefon: 549492394

V Brně dne 21.11.2008

Oponentský posudek na disertaci

RNDr. Dita Královcová:

Kvantifikace genové exprese u Hep-2 a HL-60 buněk po indukci apoptózy.

Tématika předložené práce spadá do oblasti problematiky regulace genové exprese v souvislosti s apoptózou, kde každé nové poznatky jsou příspěvkem také pro podrobnější poznání zákonitostí vzniku a průběhu nádorových onemocnění a samozřejmě také rozšiřují perspektivy jejich léčení. Detailní pochopení zákonitostí indukce apoptózy nádorových buněk vnitřními a vnějšími signály má zásadní význam pro jejich využití v diagnostice a cílené destrukci tumorů. S tím samozřejmě souvisí potřeba poznání kvantitativních změn v expresi genů podílejících se na indukci a průběhu apoptózy nádorových buněk. Vytýčená problematika předložené práce náleží proto do významné oblasti molekulární a buněčné biologie s perspektivním významem pro nádorovou biologii.

V literárním přehledu autorka prokázala dobrou znalost současného stavu vědomostí o podstatě buněčné smrti, jejích formách a širším biologickém významu. V této části práce shrnuje přiměřeným způsobem důležité recentní poznatky o morfologických a biochemických změnách a zmiňuje dosud popsané mechanismy indukce apoptózy vnějšími i vnitřními signály. Z jejího podrobného popisu úlohy vybraných genů TP53, BCL2, BAX, DFFB a referenčního genu PBGD logicky vyplývá zaměření jejího projektu na kvantifikaci jejich exprese po indukci zevním signálem.

Metodická část úvodu o metodách molekulární detekce genové exprese je až příliš podrobná, ale sepsána srozumitelně a přehledně. Důkladný přehled autorka uvádí v části literárního přehledu o kvantifikaci genové exprese u různých buněčných linií. Kromě literárních dat ke pěti genům použitých ve vlastní práci komentuje údaje k dalším nejméně 11 genům. Důležité je porovnání těchto dat z laboratorních výzkumů s výsledky kvantifikace exprese ve tkáních pacientů a tady uvádí kromě údajů ke „svým“ pěti genům citace k dalším 14 genům. Na konci této části bych přivítal určitý závěr vyúsťující ve vysvětlení proč autorka zvolila právě zmíněné čtyři geny a je-li to možné i učinit nějaký obecnější závěr z uvedených literárních dat o rozdílu v kvantifikaci exprese v *in vitro* podmínkách a ve tkáních pacientů. Výběr etoposidu jako experimentálního induktoru apoptózy považuji za dobrou volbu vzhledem k jeho relativně širokému využívání v léčení celé řady druhů rakovin.

Na konci podkapitoly metodické části o použitých buněčných liniích, dobře a podrobně popsaných jsem postrádal logické zdůvodnění použití a výhod právě dvojice Hep-2 a HL-60.

Kapitola Materiál a metody je vzorně zpracovaná, obsahuje všechny potřebné náležitosti a výběr použitých technik odpovídá vysokému standartu molekulárně biologických technik.

Výsledky jsou popsány velmi podrobně, přehledně a jsou dobře dokumentovány tabulkami, grafy a reprodukcemi elektroforetických gelů. Velmi pracná byla jistě optimalizace real-time RT-PCR pro každý z pěti studovaných genů, ale mohla být také začleněna do metodické části práce. Svědčí pro to také název následující podkapitoly „4.2. Experimentální část“. V této části jsou popsány a jasně zdokumentovány kvantitativní rozdíly v expresi 4 experimentálních genů vzhledem k referenčnímu genu PBGD po 6 a 12 hodinové indukci apoptózy etoposidem.

V diskusní části práce autorka nachází logická vysvětlení pro kvantitativní rozdíly v expresi sledovaných genů u obou buněčných linií a v dostatečné míře porovnává své výsledky s recentními literárními údaji.

První odstavec závěru je spíše začátek souhrnu, neobsahuje žádné zobecnění a opakuje jen co a jak bylo děláno. V ostatní části jsou pak stručně shrnuty dosažené nové zajímavé a jistě i cenné výsledky, které významným způsobem přispívají k poznání nesmírné složitosti přediva vztahů mezi induktory apoptózy, její genovou regulací pokud se týká různosti genů i míry jejich exprese, charakteristik buněčných typů a časových faktorů.

Seznam citované literatury má 173 položek, které tvoří bohatý informační materiál ze kterého autorka v průběhu svého studia a práce čerpal.

Po formální stránce je práce velmi kvalitně provedena, jednotlivé části jsou v optimálních proporcích, bezchybně sepsána s kvalitní dokumentací. V mém posudku uvádím některé připomínky nebo i námítky, které však nikterak nesnižují mé celkové velmi kladné hodnocení vědeckého záměru disertace, jejího obsahu i formy provedení. Obsah práce splňuje vytýčený cíl a přináší nové vědecké poznatky o kvantifikaci genové exprese čtyř genů účastnících se apoptózy nádorových buněk.

Proto doporučuji předloženou disertaci k obhajobě.

K diskusi v rámci obhajoby připojuji následující otázky:

Které další geny, případně další buněčné linie a další induktory apoptózy by bylo potřebné studovat?

Jak rozdílné jsou účinky etoposidu na nenádorové buňky ve srovnání s tumorovými a jaká je jeho přednost ve srovnání s jinými induktory apoptózy?

Jaký je kvantitativní efekt účinku etoposidu pokud jde o výskyt morfologických změn v buněčné populaci?

Jsou objektivní data o rozdílech kvantifikovatelných morfologických změn mezi buňkami normálními a nádorovými po působení etoposidu a dalších induktorů apoptózy?

Prof. MUDr. Roman Janisch, DrSc.