

## Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Mgr. Aleše Tichého předloženou pod názvem:

### „Apoptóza a proliferace v nádorových buněčných liniích: radiační a medikamentózní ovlivnění“.

Předkládaná doktorská disertační práce je věnována tématu působení ionizujícího záření (IZ) studovaného na modelu leukemických buněk *in vitro*. Zabývá se v souladu s nejmodernějšími vědeckými trendy studiem změn a detailních molekulárních mechanismů provázejících poškození DNA a jeho následnou reparaci a to dále v souvislosti s indukcí změn buněčného cyklu a apoptózy. Vhodně byly vybrány modely buněčných linií s funkčním proteinem p53 (MOLT-4) a negativní pro p53 (HL-60).

Disertace je psána česky a má formu klasicky členěného rukopisu. Je doplněna přílohou obsahující 4 publikace v zahraničních časopisech shrnující předkládané výsledky (u 2 je doktorand prvním autorem) a 1 anglicky psané review v tuzemském periodiku. Po formální stránce je práce (přestože představuje značně složitou problematiku) přehledná a jasná. Je psána téměř bezchybně, s minimem překlepů. Autor se snažil používat téměř výhradně českou terminologii, což není vždy snadné. Někde není sjednoceno psaní „s“ a „z“ (např. fosfatidylinozitol-3-kinasa, proteolýza, kaspasa).

Úvodní přehled (25 stran, členěný do jednotlivých kapitol) svědčí o velmi dobré orientaci autora v informacích týkajících se studované problematiky. Celá práce je doplněna více než 180 citacemi. Vychází z nejnovějších poznatků o procesech, mechanismech a molekulách majících souvislost s poškozením a reparací DNA a rovněž s regulací buněčné proliferace a apoptózy. Podrobné popisy jednotlivých signálních drah jsou doplněny několika schématy. Velmi podrobně je zpracována zejména kapitola o regulaci apoptózy a jejích složkách. Mgr. Tichý je rovněž autorem přehledové práce na toto téma. Předkládaná práce má jasně definované cíle, které kromě základního vědeckého poznání zahrnují i praktický aspekt využití získaných poznatků pro účely biodozimetrie ionizujícího záření.

V kapitole Materiál a metody jsou jednotlivé postupy velmi podrobně popsány. Výsledky jsou rozděleny do 2 hlavních celků zabývajících se 1) velmi podrobným studiem účinků IZ na reparaci poškození DNA v buňkách MOLT-4 zahrnující aktivace specifických kináz ATM a Chk-2 a změny proteinů MRN komplexu a p53 a 2) vlivem záření na indukci apoptózy u obou leukemických linií MOLT-4 a HL-60. Studie jsou dokumentovány 22 komplexními grafy zahrnují nejen detekci exprese a aktivace, ale i lokalizace celé řady proteinů. Velmi oceňuji pracný a časově náročný přístup zohledňující dávkové a časové závislosti, které poskytují ucelený pohled na dynamiku dějů po ozáření, což považuji za velmi přínosné. Autor vhodně prezentuje výsledky z Western blotů rovněž jako křivky dávkových či časových průběhů hodnot z denzitometrických měření. Zajímavou část studie tvoří experimenty zaměřené na efekt kofeinu na expresi a fosforylace p53, expresi p21 a indukci apoptózy v kombinaci s IZ. Opět byl zohledněn časový průběh a dynamika dějů. Ukázalo se, že kofeinem lze zablokovat reparaci poškození DNA, snížit aktivaci p21 a zrušit G2/M blok, což potencuje efekt IZ. Tyto výsledky mají praktický význam pro kombinované terapeutické přístupy. V práci bylo také použito a korelováno několik metod detekce apoptózy opět v dávkových a časových závislostech, což umožnilo srovnání odpovědi obou použitých buněčných linií. V souvislosti s apoptózou a v časovém horizontu až do 144 h (po dávce 6 Gy) byla sledována dynamika změn 2 důležitých

regulačních proteinů - antiapoptického Mcl-1 a proapoptického Bid - a dále uvolňování cytochromu c a aktivace kaspázy - 8 a - 9. Asi 10 stran Diskuse ukazuje opět na to, že autor je v dané problematice „doma“, vyvozuje z prezentovaných výsledků vhodné závěry zahrnující rovněž souvislosti změn jednotlivých parametrů a diskutuje je s pracemi jiných autorů. Významné jsou zejména návrhy použití změn některých parametrů pro biodozimetrické účely (fosforylace p53, exprese Mcl-1 či uvolňování cyt c).

Celkově lze konstatovat, že práce působí koncepčně uceleně a vyzrálé a přináší řadu originálních a velmi zajímavých výsledků, jejichž významnost a kvalita byla již dostatečně prověřena při oponentských řízeních v kvalitních odborných zahraničních časopisech, kde byly publikovány. Zúročila se v nich celá řada myšlenkových a metodických přístupů, které pomáhají odhalit detailní mechanismy působení IZ, zejména s ohledem na poškození a reparaci DNA a indukci apoptózy. Výsledky mají význam nejen pro základní vědecké poznání, ale zejména pro lékařskou praxi, kde je IZ stále jedním ze základních terapeutických přístupů v léčbě nádorového onemocnění.

K práci nemám žádné závažné připomínky, jen malé drobnosti a doplňující otázky či poznámky:

1) Experimentální práce zahrnuje opravdu úctyhodné množství dat vzhledem k množství měřených parametrů, metodik a dávkových a časových závislostí. V práci jsou rovněž prezentovány výsledky analýz IRIF z využitím vysoko rozlišovací konfokální mikroskopie a speciálních softwarů. Mohl by autor uvést zhruba svůj procentuální podíl na těchto experimentech, příp. publikacích?

2) Grafy z denzitometrických měření jsou výsledkem z jedné uvedené elektroforézy nebo jsou průměrem ze 3 opakování?

3) Apoptóza byla detekována několika parametry. Mohl by autor popsat jak souvisí detekované parametry časově s jednotlivými stadii apoptotického procesu (rané vs. pozdní stadium)?

4) Který z navrhovaných parametrů považuje autor za nejvhodnější pro rutinní použití v biodozimetrii?

### **Závěry:**

Předloženou dizertační práci považuji za velmi kvalitní s množstvím originálních a velmi významných a již většinou publikovaných výsledků. Plánované cíle byly jednoznačně a úspěšně splněny. Rukopis také splňuje všechny požadavky kladené na tento typ práce. Není pochyb, že autor prokázal, že je vyzrálým a zkušeným vědeckým pracovníkem s perspektivou dalšího vědeckého růstu. Z těchto důvodů plně doporučuji přijmout předložený rukopis jako podklad pro obhajobu a na základě úspěšné obhajoby udělit Mgr. Aleši Tichému akademický titul doktor (Ph. D.).

V Brně dne 30. 4. 2008

Doc. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.  
vedoucí vědecký pracovník  
Oddělení cytokinetiky  
Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i.,  
Královopolská 135, Brno