

Oponentní posudek na dizertační práci RNDr. Dity Královcové „Kvantifikace genové exprese u Hep-2 a HL-60 buněk po indukci apoptózy“

Problematika kvantifikace genové exprese představuje výkonný nástroj pro studium metabolických drah v buněčné biologii a je zvláště cenná při studiu mechanismů apoptózy. Dizertantka využila pro kvantifikaci genové transkripce metodu PCR v reálném čase, tedy poměrně moderní postup současné molekulární biologie. Proto se domnívám, že téma zvolené dizertantkou i jeho řešení je zajímavé a především aktuální.

Práce je vypracována na 101 stranách textu a je členěna do obvyklých kapitol. Její informační hodnota je zvýšena několika grafy a obrázky a je doprovázena citací 173 zdrojů převážně aktuálních literárních odkazů. Zde však musím podotknout, že použitá forma citování literárních odkazů se nedrží v současnosti platné citační normy. Autorka si však zaslouhuje pochvalu z důvodů volby aktuálního tématu své práce, ale musím také ocenit minimální množství překlepů a gramatických chyb, které podobnou práci nevyhnutelně provází.

V literárním přehledu je stručně zpracován význam a mechanismy apoptózy, což čtenáři umožňuje získat základní přehled o současných názorech a poznatcích v uvedené oblasti. Literární přehled tak dokumentuje, že doktorandka je dobře seznámena s řešenou problematikou a získané poznatky dokáže zformulovat v odborném textu.

Předložená práce je založena na kvantifikaci exprese dvou pro-apoptotických (TP53 a BAX), jednoho anti-apoptického (BCL2) genu a genu DFFB na modelovém systému dvou buněčných linií po ovlivnění etoposidem. I když čtenář v práci najde kapitolu definující metodické cíle práce, zcela chybí představa o obecnějším smyslu snažení autorky, ale také odpověď na otázku proč se zaměřila právě na ony dvě buněčné linie a proč právě na ony tři zmiňované geny. Zvláště nejasné je pak zařazení TP53 genu, který je exprimován jen u jedné linie a není proto možné vzájemné porovnání.

V metodické části práce je popsán postup relativní kvantifikace genové exprese jeho vztahem k transkripci referenčního PBGD genu. Tato kapitola je popsána poměrně podrobně a srozumitelně a nemám k ní podstatnější připomínky nebo dotazy.

V kapitole „výsledky“ jsou shrnuta data optimalizace použitých real-time PCR postupů a pochopitelně také kvantifikace jednotlivých analyzovaných genů. K této části práce mám spíše formální připomínku, která se týká kvality předkládaných fotografií a malé rozlišovací schopnosti použitých agarozových gelů, které v některých případech neumožňují posoudit závěry vyvozované autorkou, především co se týče optimalizace jednotlivých reakcí.

Vlastní výsledková část práce analyzuje expresi čtyř genů, jejichž úloha v procesu apoptózy byla popsána jinými autory. Výsledky práce však, přinejmenším v případě buněčné linie Hep-2, neodpovídají teoretickým předpokladům o úloze BCL-2 a BAX genu. Teprve v tomto okamžiku začíná být, doposud poněkud popisná, dizertační práce zajímavá. Autorka se však spokojuje s konstatováním, že Hep-2 buňky zřejmě regulují apoptózu jinými procesy, ale již se nezajímá o to jakými. Domnívám se, že práce by měla být rozšířena přinejmenším o kvantifikaci obou proteinů nebo o kvantifikaci exprese dalších genů spojených s apoptózou.

Přes tyto mé výhrady je však možné přijmout předkládanou práci jako základ pro odborné řízení a doporučuji, aby RNDr. Ditě Královcové byla po úspěšné obhajobě práce udělena odpovídající vědecká hodnost.

V Brně, dne 26. 11. 2008

doc. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.