

Téma diplomové práce	Role proteinů hDia1 a hDia2 v invasi melanomových buněk
Jméno studenta, studentky	Jana Šťastná
Jméno oponenta	PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

II. Posudek oponenta

Předložená diplomová práce Jany Šťastné byla vypracována na Univerzitě v Heidelbergu během její stáže v rámci projektu Erasmus. Vlastnímu popisu experimentální práce předchází teoretická část, kde jsou shrnuty současné poznatky o mechanismech motility a invazivity nádorových buněk. Podrobně jsou zde představeny Rho GTPasy - rodina proteinů významných pro buněčnou migraci a dále forminy, efektorové proteiny Rho GTPas. V rámci pilotních experimentů diplomantka pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie popsala morfologii a cytoskeletální organizaci dvou melanomových buněčných linií - A375-P a z ní odvozené A375-M2. Dále byla optimalizována metodika RNA interference za účelem experimentální inhibice exprese genů pro proteiny hDia1 a hDia2 (human Diaphanous-related forminy 1 a 2). Účinnost RNAi byla ověřována pomocí western-blottingu. Hlavním cílem práce pak bylo studium role proteinů hDia1 a hDia2 v invazním chování melanomové buněčné linie A375-M2. Bylo prokázáno že zatímco inhibice exprese genu pro protein hDia1 snižuje migraci buněk přes Matrigelovou bariéru, blokáda hDia2 má opačný efekt. Ze získaných dat a na základě literárních údajů pak autorka v diskusi věrohodně navrhlá místa zapojení proteinů hDia1 a hDia2 v intracelulární signalizaci regulující invazivitu melanomových buněk. Vytyčené cíle práce tak byly beze zbytku splněny.

Po formální stránce má diplomová práce vynikající úroveň; je přehledná, napsaná velmi dobrou angličtinou a doložená kvalitní obrazovou dokumentací. Předloženou práci proto hodnotím velice pozitivně a mám pouze několik drobných poznámek a dotazů:

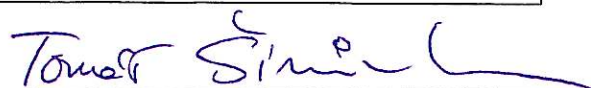
- Kdo a jak navrhl sekvence pro siRNA experimenty? Jaký byl zdroj siRNA oligonukleotidů?
- U siRNA experimentů uvádíte, že použití vyšších koncentrací oligonukleotidů mělo za následek vyšší odumírání experimentálních buněk. Jaká byla toxicita u použitých koncentrací (150 pmol u hDia1 a 200 pmol pro hDia2)? Jak byla toxicita stanovována (odhadována)?
- Použitá linie vykazovala migraci pouze v podmínkách gradientu séra (10% FCS) a lipofosfatidové kyseliny. Pokud bylo na obou stranách Matrigelové bariéry bezsérové médium, migrace neprobíhala. Zkoušeli jste migraci pokud by na obou stranách bylo médium se sérem?

Tyto připomínky v žádném případě nesnižují celkovou vysokou úroveň této práce, která podle mého názoru výrazně přesahuje požadavky na diplomové práce běžně kladené.

Předloženou diplomovou práci proto doporučuji k obhajobě s hodnocením „výborně“.

Navrhovaná klasifikace **výborně**

V Hradci Králové dne 20. května 2007



Podpis oponenta diplomové práce