

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Mgr. Klára Grantz Šašková, Ph.D.
	Datum: 6.9. 2021
Autor: Bc. Monika Slámová	
Název práce: Rakovinotvorný a metastatický potenciál nádorových buněk s nefunkčním ubiquitinačním komplexem CRL4 (Cancerogenic and metastatic potential of cancer cells with non-functional CRL4 ubiquitination complex)	
Cíle práce Cílem diplomové práce bylo vytvořit stabilní buněčnou linii s vyřazeným či nefunkčním CRL4 a to pomocí vyřazení či umlčení genu <i>DDB1</i> , a její následná charakterizace <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> na myším modelu.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): práce má celkem 95 stran Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Více než 13 Jsou metody srozumitelně popsány? NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
Závěry (Souhrn): Jsou výstižné? ANO	

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň práce je nízká. Literární přehled je psán sice čtivě, autorka ale často používá nepřesné nebo nevhodné formulace, někdy i doslovný překlad. Formálních chyb se v textu vyskytuje poměrně hodně. Kapitoly jsou vhodně zvoleny, vzhledem k tématu práce bych však kladla větší důraz na problematiku CRL4 komplexu a DDB1, spíše než pasážím o extraktu z krabího krunýře jako možného terapeutika z diskutabilní práce Rezakhani et al., 2017 (str.19). Obrázky a grafy jsou většinou převzaté, často bohužel v nekvalitním rozlišení, některé nadbytečné (např. *Graf 3 Vyhledání pojmu LNCaP v databázi PubMed*). V některých pasážích úvodu bych naopak obrazový doprovod ocenila (např. přehled cullin-RING ubikvitin ligáz či model ukazující vazbu thalidomidu na CRBN). Obrázek 2 je zastaralý, Obrázek 4 by mohl být konkrétnější, někde je legenda k obrázku nedostatečná (např. Obrázek 3 „Ubikvitin“). Ocenila bych lepší návaznost na jednotlivé kapitoly.

Za málo zdařilou považuji kapitolu „Metody“. Materiál použitý k jednotlivým experimentům je uveden ve zvláštních podkapitolách, ne vždy je jejich členění vhodné (např. první podkapitola 4.1 „Agarózová elektroforéza“, atd.). Přehled primerů a oligo sekvencí mohl být v tabulce, značení primerů je nedostatečné, chybí, kde byla oliga syntetizována. Chybí původ HEK293 buněk (stačí uvést laboratoř Dr. Sedláčka), původ imunodeficientní linie "NSG™" mohl být lépe uveden, u četných chemikálií není uveden výrobce. Až na výjimky (Lago X, Spectral Instruments Imaging) nejsou v práci uvedené žádné použité přístroje. Považuji za nešťastný popis klonování a přípravy jednotlivých vektorů, který z metodického postupu „sklouzává“ k popisu, který by byl vhodnější do výsledkové části. Metodika pro western blot má být řádně popsána v metodické části nikoliv v doplňujících informacích, kde je uvedena v anglickém jazyce. Často chybí v metodikách složení pufrů, ředění protilátek... Chybí kapitola statistického zpracování výsledků. Kapitola 4.2.2, na kterou se autorka odkazuje v kapitole 6.3.4.2 s tím, že v ní popisuje návrh primerů, zcela chybí.

V kapitole „Výsledky“ chybějí na vhodných místech zcela odkazy na kapitoly v metodické části (např. na str. 59 „Amplifikovaná sekvence byla ligována do vektorů PX458 a PX459 metodou In Fusion a přes protokol Crispr.“, atd.). V úvodu kapitoly 7.2 „Knock-out *DDB1* u LNCaP buněk vykazuje buněčnou letalitu“, kde je zmíněna i příprava plasmidů pro knock-out genu *Ddb1*, bych velmi ocenila přehledné schéma ilustrující a) znázornění lidského genu *Ddb1* a lokalizaci navržených gRNAs, b) postup klonování včetně zvolených technik. Často chybějí v textu odkazy na obrázky-výsledky, někdy jsou odkazy dublovány. Obrázek 18, 19 a 20 má nepřesnou legendu. Implantace LNCaP buněk s podmíněně downregulovaným *DDB1* je shrnuta do jediné věty, možná by si zasloužila samostatnou kapitolu. U Obrázku 24B chybí popis osy ypsilon, taktéž u Grafu 6, 7 a 8. U histologického Obrázku 25 chybí informace o způsobu barvení a zvětšení.

V seznamu literatury se bohužel také vyskytuje celá řada chyb, ať v uvedeném formátu citací, či vůbec začleněním citací na webové databáze (ty by měly být v textu, případně za seznamem literatury, v každém případě jsou v textu špatně citovány).

Informace obsažené v „Doplňujících informacích“ měly být začleněny v textu.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce Moniky Slámové bohužel není z formálního hlediska prací zdařilou. Formální zpracování by si jistě zasloužilo větší pozornost a dotazení v podstatě všech kapitol, včetně obrázkové dokumentace, citací a literárního přehledu. Po vědecké stránce je však práce poměrně povedená. Monika si osvojila širokou škálu metod a z množství výsledků i jejich interpretace usuzuji, že Moniku práce v laboratoři bavila. Cíle práce byly splněny. Výsledky jsou adekvátně interpretovány.

Práci i přes formální nedostatky doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázky:

- 1) Jaké jsou klinicky používané diagnostické markery pro detekci karcinomu prostaty? Jsou vhodné? O jakých dalších se případně uvažuje?
- 2) Skutečně byl thalidomid podáván v USA, jak uvádíte na str.74? Ví se na molekulární úrovni, čím je zapříčiněn teratogenní účinek thalidomidu a proč zasahoval do vývoje končetin? Při jakých onemocněních se thalidomid používá a v jaké oblasti základního výzkumu je hojně využíván?
- 3) Mohla byste uvést příklady některých prozkoumaných CRL4 komplexů, jejich funkcí a jakým způsobem se manifestuje jejich poškození?
- 4) Jak si vysvětlujete výsledky získané z experimentu vlivu různých koncentrací thalidomidu na zacelování ráhy?
- 5) V jakých modelech byl zkoumán knock-out *Ddb1* a s jakými výsledky? Může být DDB1 cílem virového agens a pokud ano v jakých souvislostech?
- 6) Je v Tabulce 2 „Makroskopické nálezy nádorů“ skutečně váha nádoru uvedena v gramech?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Klára Grantz Šašková