

## Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Filipa Lhoty

### Studium alternativních sestřihových forem estrogenního receptoru alfa v buněčných liniích karcinomu prsu

Předkládaná diplomová práce se zabývá vědecky velice zajímavou a medicínsky velmi aktuální tematikou. Jedná se o studium vlivu sestřihových forem ER na chování nádorových buněk karcinomu prsu. Úkolem práce bylo připravit modelové systémy, které by umožnily podrobné studium významu nejčastěji se vyskytující sestřihové varianty ER.

#### Hlavní pozitiva diplomové práce

Téma diplomové práce bylo zvoleno vhodně neboť řeší problematiku, která může přispět k odhalení molekulárních mechanismů resistance nádorových klonů vůči hormonální terapii.

Úvod je velmi pěkně koncipován jak obsahově tak formálně. Předkládá přehledný náhled na studovanou problematiku sestřihových mechanismů obecně i specifický stav poznání v oblasti ER. Velmi krátce je zmíněna i situace v ČR s ohledem na incidenci, mortalitu a léčebné možnosti u karcinomu prsu.

Cíle jsou jasně stanoveny a představují řešení vědecky hodnotného problému.

Z metodického hlediska je práce na vysoké úrovni a využívá moderní metodiky buněčné biologie a genetiky, jmenovitě např.: analýzu genomové DNA pomocí PCR, restrikční analýzy a sekvenace, hodnocení hladin transkriptů pomocí semikvantitativní RT-PCR a kvantitativní PCR s využitím řady kontrolních genů, sledování hladin proteinů pomocí imunoblotingu. Buněčné manipulace zahrnovaly konstrukci shRNA k umlčení transkripce, naklonování expresního insertu ER a transfekci buněk tímto vektorem, selekci buněčných klonů a hodnocení základních buněčných funkcí pomocí real-time analýzy na přístroji xCELLigence.

Výsledková část s bohatým grafickým doprovodem ukazuje, že autor udělal velký kus práce. Statistické zpracování výsledků a jejich prezentace jsou na vysoké úrovni. Studie působí velmi harmonicky a je pečlivě vypracovaná. Zároveň poskytuje dostatek podnětů k diskusi a zamyšlení nad možnými interpretacemi výsledků.

Mezi hlavní výsledky práce patří:

- 1/ charakterizace sestřihových variant ER v modelových liniích MCF-7.
- 2/ Příprava konstruktů sestřihové varianty ER $\Delta$ el7 a klonů buněk MDA-MB-231 prokazatelně exprimujících tuto variantu.
- 3/ Vytvoření konstruktů obsahujícího shRNA proti ER $\Delta$ el7 – podařilo se připravit jeden klon MCF-7 se sníženou expresí ER $\Delta$ el7 o cca 50%.
- 4/ Základní analýza růstových křivek klonů vytvořených ad 2 a 3 ve srovnání s kontrolními liniemi. Studium vlivu přídatku estradiolu a tamoxifenu na růstové křivky.

Diskuse výsledků je vedena věcně a dobře reflektuje získané výsledky.

## Kritické připomínky a otázky k vlastní práci.

1/ Drobné překlepy a nejasnosti:

- str. 19: zkratka ERE není při prvním použití definována (na rozdíl od ostatních zkratek)
- str. 27, řádek 5 odspoda: k čemu se vztahuje Obr.X ?
- str. 30, druhý odstavec: Cílem této práce bylo *navržení systému* pro ...
- kapitola 3.1: zde je patrné nejednotné používání českého i anglického způsobu psaní desetinných míst (čárka vs. tečka)
- metody obecně: při uvádění výrobce by bylo vhodné uvést i město a zemi sídla výrobce
- str. 34, řádek 12: Výsledná DNA *byla* kvantifikována...
- str. 39, předposlední řádek: *Roztok A* ...
- str. 40, řádek 4 odspoda: zkratka RT-PCR zde není vysvětlena
- tabulka 1: u některých primerů chybí specifikace F a R
- tabulka 2, nadpis: ... normalizovaná *na* expresi...
- gely na obr 18 a 23 postrádají "self-explanatory" popis komínků jako je tomu u ostatních fotek gelů
- str. 62, konec prvního odstavce: ... expresí wt *ER-α* ...

Otázky:

2/ V popisu qPCR (kapitola 3.4) píšete, že jste použil definované množství cDNA. Jak jste měřil koncentraci cDNA? V metodách to není uvedeno. Pokud se jedná o přepočet přes úvodní množství RNA pro cDNA syntézu jak byla kontrolována účinnost této syntézy?

3/ Jakým způsobem byly čištěny oligonukleotidy použité pro konstrukci shRNA (kapitola 3.12)?

4/ Jak si vysvětlujete to, že klon 7 MDA-MB-231 obsahující prokazatelně ERdel7 konstrukt (Obr. 19) nevykazoval genovou expresi (Obr. 20)? Je to při transfekcích častý jev?

5/ Jak dopadly imunoblotty kontrolního proteinu aktinu (viz. kapitola 3.15) k obrázkům 22 a 27? Obecně vzato obrázek 27 neposkytuje příliš jasnou informaci o situaci v kloních MCF-7.

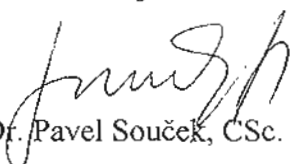
6/ Jaká je koncentrace estradiolu v 5% séru a jak koresponduje s použitou koncentrací v 5% séru suplementovaném  $10^{-8}$  M E2 vs. v 15% séru samotném (Obr 31)?

Výše uvedené otázky slouží k rozšíření obzoru a nijak nesnižují vysokou kvalitu práce.

**Diplomová práce Bc. Lhoty podle mého názoru zcela splnila svůj účel, protože autor prokázal schopnost vědecké práce na poměrně složitém tématu a osvojil si velký počet metod.**

**Z výše uvedených důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.**

V Praze 7.5.2010

  
RNDr. Pavel Souček, CSc.