

Oponentský posudek na diplomovou práci

Oponent: Mgr. **Petr Pajer**, PhD.

Datum: 2.9.2012

Autor: Bc. Katarína Vaškovičová

Název práce: **Určení úlohy protein kinázy C α v améboidní invazivitě nádorových buněk**

Předložená diplomová práce se zabývá zkoumáním role protein kinázy C α (PKC α) v regulaci améboidní invazivity nádorových buněk a přímo navazuje na předchozí výsledky získané na pracovišti školitele při studiu migrace nádorových buněk. Výsledky naznačují, že se PKC α podílí na přechodu buněk mezi améboidním a mezenchymálním invazivním stavem a reguluje jej. Práce je sepsána v anglickém jazyce.

Z pohledu formálního lze předložené práci vytknout jen velmi málo; text je srozumitelný, přehledně členěný, bez jazykových chyb, obrázky jasně dokládají diskutované skutečnosti. Na úvod zaujme náznak trojjazyčnosti (název v českém jazyce, abstrakt v jazyce slovenském). Z drobných detailů, které formálně zasluhují výtku bych zmínil citovaný zdroj obrázku 4.17, str. 45, Szabadosová (2011), kterážto citace však chybí v seznamu literatury. V obrázku 7.13, str. 89, chybí popisky sloupců (typy barvení) a čtenář se musí složitě orientovat podle textu a podle obrázku 7.15.

Z hlediska experimentů a jejich realizace mám několik poznámek:

Experimenty v kapitole 7.1 ukazující nezměněnou hladinu celkového proteinu PKC α a jeho formy fosforylované na Thr497. Tyto navazují na předchozí nezávislé zjištění, že množství formy fosforylované na Ser657 po AMT přechodu významně pokleslo. Považoval bych za významné potvrdit rozdíl v množství formy fosforylované na Ser657 kontrolně i v tomto pokusu. Hodila by se k účelu kvalitativní i kvantitativní analýzy fosforylačního stavu PKC α hmotnostní spektrometrie?

Práce je z velké části založena na použití chemického aktivátoru (PMA) a represoru (Gö6976), které jsou považovány za „dostatečně“ specifické pro PKC α . Je to odůvodněno tvrzením, že „...proteomic analysis did not show any changes in other PKC isoforms than PKC α ...“ (str. 72), které ale není nikterak doložené, např. citací. Další vedlejší efekty těchto chemikálií v buňkách nelze podle mého soudu vyloučit.

V částech práce, kde je využívána siRNA proti PKC α je jako negativní kontrola používáno samotných transfekčních reagens („MOCK control“). Jak dokládají výsledky v kapitolách 7.6 a 7.8, jejich efekt je nezanedbatelný. Tato kontrola by měla být ještě rozšířena o případný nespecifický efekt přidání nerelevantní siRNA (např. proti genu, který se v daném buněčném typu neexprimuje nebo tzv. „scrambled“ oligonukleotidu).

Experimentováno je pouze s buněčnými liniemi a pouze za podmínek *in vitro*. Jak sama autorka zmiňuje, je otázkou, nakolik je amoeboidní pohyb relevantní *in vivo* (str. 31; Sabeh et al). Do budoucna bude tedy třeba výrazně rozšířit jak spektrum experimentálních přístupů, tak použitých buněčných modelů, aby bylo možné potvrdit obecnou platnost zde publikovaných zjištění.

Předkladatelka prokázala široký přehled o daném tématu, schopnost s rozmyslem plánovat experimentální práci i používat pokročilé techniky molekulární biologie, následně vyhodnocovat získané výsledky a zapojovat je do kontextu současných znalostí v oboru. Jakkoliv musí být popsána zjištění stále chápána jako pilotní a bude je třeba doplnit dalšími experimenty, předložené důkazy jsou silným argumentem pro další detailní zkoumání role protein kinázy C α v migraci a invazivitě buněk. Předložená práce obsahuje na závěr také návrh experimentů pro řešení nezodpovězených a nově nastolených otázek. Domnívám se, že generování dalších otázek je znakem dobře zvoleného tématu a jejich formulace znakem dobrého badatele.

Práce tedy dle mého názoru splňuje požadavky na diplomovou práci a proto navrhuji její přijetí.

Podpis oponenta: