

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Bc. Eliška Davidová

Název práce: Role of transcription factor Snail in mechanism of development of radioresistance in prostate carcinoma cell lines

Jméno a příjmení oponenta (včetně titulů): Mgr. Jan Benada

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označit křížkem **jednu** z možností - pomocí dojkliknutí levým tlačítkem myši na šedivě podbarvené pole a výběrem hodnoty "zaškrtnuto")

1. Rozsah práce a její členění

A	přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí	<input checked="" type="checkbox"/>
B	nevyrovnané, členění nelogické nebo rozsah některých částí nekoresponduje s jejich významem	<input type="checkbox"/>
C	uspokojivé, rozsah některých částí nedostačující	<input type="checkbox"/>
N	nedostatečné	<input type="checkbox"/>

2. Odborná správnost

A	výborná, bez závažnějších připomínek	<input type="checkbox"/>
B	velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (např. nejasnost výkladu, chyby v terminologii, nedokonalý popis metod nebo výsledků)	<input checked="" type="checkbox"/>
C	uspokojivá, s čtenějšími drobnými závadami	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, s hrubými chybami	<input type="checkbox"/>

3. Uvedení použitých literárních a jiných zdrojů

A	adekvátní, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce	<input checked="" type="checkbox"/>
B	uspokojivé, s občasnými neobratnostmi (zejm. v umístění odkazů) nebo s celkově nižším počtem citací	<input type="checkbox"/>
C	s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat)	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, velmi málo citací, eventuálně rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu) nebo používání neadekvátních citací	<input type="checkbox"/>

4. Jazyk práce

A	výborný, práce napsaná čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických nebo pravopisných chyb	<input type="checkbox"/>
B	velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické nebo pravopisné chyby	<input checked="" type="checkbox"/>
C	uspokojivý, čtenější slohové neobratnosti, gramatické nebo pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné nebo nejednoznačné formulace	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, s četnými hrubými chybami	<input type="checkbox"/>

5. Formální a grafická úroveň práce

A	výborná, bez překlepů a chyb ve formátování	<input checked="" type="checkbox"/>
B	velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky, apod.	<input type="checkbox"/>
C	uspokojivá, s ojedinělými většími nedostatky (např. vynechání stránky, uvádění obrázků grafů nebo tabulek bez odkazů v textu) nebo s čtenějšími drobnými chybami	<input type="checkbox"/>
N	nevyhovující, s četnými hrubými chybami	<input type="checkbox"/>

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5.:

Práce je po formální stránce zpracována velmi dobře. Velmi pozitivně hodnotím skutečnost, že autorka sepsala práci v anglickém jazyce. Práce je napsána srozumitelně. Drobné formulační chyby a překlepy nebrání v pochopení textu a nesnižují kvalitu práce. Rozsah a členění práce je standardní. Za velmi dobré považuji obrazové zpracování dat, zejména přehlednou prezentaci grafů a imunoblotů. Kvalita imunoblotů svědčí rovněž o tom, že autorka zvládla tuto metodu velmi dobře. Práci celkově hodnotím kladně a doporučuji ji přijmout k obhajobě.

Díličí připomínky:

1.) V přehledu primerů použitých pro stanovení exprese genů kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (strana 43) nejsou uvedeny primery použité pro stanovení exprese genu CCNB3. Naopak je uveden pár primerů pro gen CDH1, který již není v dalším textu zmiňován.

2.) V kapitole “5. Results” (strana 45) autorka uvádí “Figure 9.”, převzatý a správně očitovaný z publikace Sun *et al.*, 2012. Ačkoliv souhlasím s relevancí uvedení těchto dat, pro srovnání s výsledky dosaženými autorkou, neměla by být uvedena v kapitole “5. Results”, ale v následující kapitole “6. Discussion”.

3.) V podkapitole “5.1. Testing the role of ATM in regulation of Snail stabilization in response to DNA damage” (strana 45) píše autorka ne zcela správně: “To reveal a mechanistic link between genotoxic stress and above mentioned phenomena, we tested whether ATM kinase, activated by DNA damage, can directly phosphorylate and thus stabilize Snail (Figure 9), as was described recently (Sun *et al.*, 2012).” Otázku zda-li ATM přímo fosforyluje a tím reguluje stabilitu proteinu Snail, řeší extenzivně odkazovaná publikace Sun *et al.*, 2012. Nicméně vlastní experimenty autorky se pokoušejí zodpovědět otázku, zda-li aktivita kinázy ATM ovlivňuje proteinovou hladinu Snail. Děje-li se tak skrze přímou fosforylací proteinu Snail kinázou ATM však autorčiny experimenty nezjišťují.

4.) U imunofluorescenčních dat ve “Figure 14.” (strany 51 a 52) bych se přiklonil k oddělené prezentaci srovnávaných kanálů – z uvedeného obrázku se složenými kanály signálu Snail a p21 není jejich negativní korelace zcela zřejmá.

5.) Tvrzení, že “CCNB3 is involved in the cell cycle progression, specifically, in transition from G2 phase to mitosis through its association with Cdk2.” (strana 56) není vhodně formulováno. Ačkoliv funkce CCNB3 (Cyclin B3) v regulaci buněčného cyklu není zcela objasněna, jeho asociace s Cdk2 vstup z G2 fáze do mitózy patrně regulovat nebude. Aktivita Cdk2 kinázy reguluje za obvyklých podmínek přestup z G1 fáze do S fáze, přesun z G2 fáze do mitózy reguluje kináza Cdk1.

B. Obhajoba - dotazy k obhajobě

1.) U imunofluorescenčních dat ve "Figure 14." (strany 51 a 52) není patrný žádný signál EGFP u kontrol transfekovaných plasmidem pEGFP-empty. Byla transfekce kontrolním plasmidem pEGFP-empty úspěšná, případně jak si autorka vysvětluje absenci EGFP signálu?

2.) V citovaných publikacích Zhou *et al.*, 2004 a Sun *et al.*, 2012 je navrhováno, že stabilita proteinu Snail je regulována jeho fosforylační kinázami GSK-3 β a ATM a následnou změnou jeho lokalizace mezi buněčným jádrem a cytoplasmou. Pokusila se autorka pozorovat tuto změnu lokalizace, např. s využitím popsaného konstruktů pEGFP-C2 Snail?

3) Jak autorka v diplomové práci správně uvádí, aktivace odpovědi na poškození DNA (DNA damage response) a následné ustanovení kontrolních bodů buněčného cyklu (cell cycle checkpoint) jsou považovány za ochranné mechanismy organismu proti rozvoji rakoviny. Na druhé straně, farmakologická inhibice kontrolního bodu G2 (konkrétně např. kinázy Chk1) je aktuálně testována v klinických studiích pro radiosenzitizaci či chemosenzitizaci nádorů s nefunkčním proteinem p53. Je tento přístup testován i u rakoviny prostaty, případně existují preklinické studie na toto téma? Jak radiosenzitizace skrze inhibici kontrolního bodu G2 funguje a proč by měla selektivně fungovat u nádorů s nefunkčním proteinem p53?

Stanovisko k opravě chyb v práci

– opravný lístek/oprava v textu ~~JE~~ / **NENÍ** podmínkou přijetí práce (nehodící se škrtněte)

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / ~~NE~~ (nehodící se škrtněte)

Navrhovaná celková klasifikace (ve standardní stupnici 1 až 4): **1**

Datum vypracování posudku: 4.9.2015

Podpis oponenta: