



Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Hany Radilové

Disertační práce Mgr. Radilové je zaměřena na bližší vymezení molekulárních interakcí, které v buňkách řídí klíčový enzym metabolismu kyseliny arachidonové - cyklooxygenáza. Vzhledem k tomu, že právě tento enzym je cílem účinku klinicky široce používaných nesteroidních antiflogistik a je prokazatelně zapojen do procesu tvorby nádorů, je zvolené téma práce velmi atraktivní.

Disertační spis je rozdělen do logicky navazujících kapitol, které jsou zpracovány přehledně a čtivě a jejich rozsah je vyvážený. V úvodním přehledu jsou představeny všechny molekuly, kterými se autorka ve svých experimentech zabývala a stručně popsány mechanismy RNA interference, které spolu se sledováním genové exprese pomocí PCR v reálném čase představují základní metodický přístup disertace. Oceňuji zde i v dalších částech spisu snahu o přesné a stručné vědecké vyjadřování autorky v českém jazyce. Cíle práce jsou jasně deklarovány a spočívají ve studiu účinků specifické inhibice izoforem cyklooxygenázy na expresi "vybraných" genů v buňkách karcinomu děložního čípku Hep2. V další části práce jsou tyto geny specifikovány, ale postrádám informaci, na základě čeho byly právě tyto geny do studie zahrnuty. **Nebylo by vhodnější provést nejdříve např. srovnání transkriptomů kontrolní linie a linie se sníženou expresí cyklooxygenázy technikou mikročipů a pak se zaměřit na diferenciálně exprimované geny pomocí real-time PCR?** Z výsledkové části vyplývá, že autorka neobyčejně pečlivě a systematicky přistoupila k přípravě derivátů buněk Hep2 s ovlivněnou expresí COX. Nejprve prozkoumala úroveň exprese COX-1 a COX-2 technikou real-time PCR u 16 lidských buněčných linií a pro další analýzy zvolila právě Hep2, jako linii s dostatečnou hladinou obou sledovaných transkriptů. Následně buňky této linie podrobila transfekci plazmidy s příslušnými sekvencemi shRNA a prostudovala vliv tohoto zásahu na expresi COX nejprve pro směs klonů a pak pro jednotlivé klony transfektantů odděleně. U

klonů s významně sníženou hladinou transkriptu COX-1 autorka prokázala i sníženou hladinu jeho proteinového produktu jak analýzou jeho fyzické přítomnosti westernovým přenosem, tak funkčním testem ELISA. Hladinu COX-2 se však stejným postupem snížit nepodařilo. V další části práce autorka pro snížení exprese COX-1 použila syntetické siRNA. Zařazení tohoto kroku se mi zdá jako poněkud nelogické. **Proč se syntetickými siRNA nepokusila snížit expresi spíše COX-2 než COX-1, když klony s potlačenou expresí COX-1 již úspěšně připravila pomocí shRNA, zatímco COX-2 nikoliv?** V poslední části práce byly COX-1 negativní klony použity pro sledování exprese několika genů a jejich srovnání se standardní kontrolou. Takto se podařilo prokázat, že absence COX-1 u buněk Hep2 vede k snížení exprese mikrozomální prostaglandin E syntázy a zvýšení exprese tromboxan A syntázy 1 a genu ABCC4. V části diskuse jsou získané výsledky přiměřeně komentovány a rozebrány. Přílohou práce je rovněž kopie publikace v časopisu Mol. Cell. Biochem. (IF 1,764), jehož je uchazečka první autorkou a kde jsou prezentovány hlavní výsledky disertace. Kromě toho je spoluautorkou dalších 7 vědeckých prací.

Celkově práci hodnotím jako zdařilou, jak po stránce objemu odvedené práce a náročnosti zvolených metod, tak po formální stránce kvality disertačního spisu. Kromě dotazů zvýrazněných v předchozím textu mého posudku bych rád autorku požádal o vyjádření k následujícím dvěma dotazům:

1. Proč se na straně 51 objevuje název Hep2 pro linii buněk rakoviny hrtanu (předposlední odstavec) a karcinomu děložního čípku (poslední odstavec)?
2. Na téže straně u dvou linií uvádíte, že jsou kontaminovány buňkami HeLa. Jak ke kontaminaci došlo? Není možné linie "přečistit" klonováním?

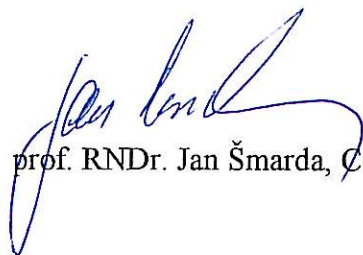
Další drobné připomínky, na které autorka nemusí reagovat:

- pokud odkazujete na tabulky, či obrázky v "odlehle" části textu, uvádějte i čísla příslušných stránek (případ tabulky 1, na straně 29, na kterou odkazujete na straně 51 a čtenář ji musí usilovně hledat)
- snažte se omezit spojování českých předpon se slovy s cizím základem (používete "izolován" místo "vyizolován", "klonován" místo "vklonován" či "zaklonován", apod.)
- vhodným českým ekvivalentem anglického termínu "housekeeping gene" je "provozní gen"

Závěr:

Předložená disertační práce, prokazuje že Mgr. Radilová je schopná provádět samostatnou vědeckou práci na požadované úrovni. Je zřejmé, že musela zvládnout široké spektrum moderních metod současné molekulární a buněčné biologie a podařilo se jí získat původní výsledky, které byly úspěšně publikovány v zahraničních časopisech, kde prošly náročným oponentním řízením. Proto doporučuji, aby disertační práce byla přijata k obhajobě a stala se podkladem pro udělení titulu Ph.D.

V Brně, dne 14.8.2009



prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

