

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Lukáš Alán, PhD
	Datum: 3.9.2021
Autor: Bc. Alexandra Urbančoková	
Název práce: Detekce genetických modifikací asociovaných s pankreatickým adenokarcinomem	
<p>Cíle práce Hlavním cílem předkládané práce bylo zjistit přítomnost mutací ve vybraných genech primárních nádorů pankreatu. Dílčími cíli byly:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) <i>in silico</i> analýza pomocí genomových databází za účelem stanovení nejčastěji mutovaných proteinů. 2) optimalizace izolace DNA, PCR a vlastní sekvenace 3) detekce mutací a vyhodnocení sekvenací genů KRAS, TP53, CDKN2A a SMAD4 4) vyhodnocení expresních profilů proteinů K-Ras, p53, p16 a Smad4 	
<p>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 70 stran textu + 10 stran citací Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova ANO Je uveden seznam zkratk? ANO</p>	
<p>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? ANO</p>	
<p>Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? <i>In silico analýza, izolace DNA, PCR, SDS PAGE a western blot</i> Jsou metody srozumitelně popsány? ANO</p>	
<p>Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO</p>	
<p>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</p>	
Závěry (Souhrn) :	

Jsou výstižné? ANO

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

Obrazová a grafická úroveň práce je dobrá. Vytknul bych jen používání zkracovače webových adres. V jednom případě mi odkaz vůbec nefungoval. V případě čtení tištěné verze diplomové práce se z takto zkrácených odkazů nepozná, ze kterého portálu data pocházejí.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Předkládaná práce splňuje všechny požadavky na diplomovou práci. Studentka prokázala, že se orientuje v literatuře, genomových databázích a následně ovládla praktickou část i s analýzou a diskuzí. V samotné práci byla schopná definovat cíle, které následně splnila. Samotná problematika analýzy mutací v rakovině pankreatu je velice zajímavá a její budoucí navrhované propojení se studiem metabolismu by mohlo přinést významné výsledky pro diagnózu a léčbu tohoto zákeřného onemocnění. Práci tedy doporučuji k přijetí a dalšímu řízení.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) V metodách studentka ve zkratce popisuje způsob, jakým se izolovaly a připravovaly organoidy z pankreatických nádorů. Studentka sice tuto část práce manuálně nedělala, ale pro lepší srozumitelnost bych doporučoval uvést celý protokol. Čtenář by tak získal přehled o použitých chemikáliích či době kultivace *in vitro*, což jsou faktory, které mohou přispívat k tvorbě dalších mutací.
- 2) Na straně č. 40 studentka píše o zvýšení specifity produktů pomocí další PCR reakce. Pokud je mi známo, tak PCR zvyšuje počet molekul a může mutace i indukovat. Co bylo tedy cílem kromě zvýšení množství samotné DNA?
- 3) Na straně č. 52 studentka uvádí citlivost sekvenace na 25%. Zajímalo by mě, jakými dalšími způsoby by šlo zvýšit citlivost sekvenace? Jedná se mi zejména o případ TP53, kdy studentka dostala na gelu několik amplikonů a chromatogram z PCR byl v podstatě nečitelný. A nemyslím tím sekvenování pomocí reverzního primeru, jak je uvedeno v práci.
- 4) U obrázku č. 25 Analýza western blotu mi chybí standardizace. Rozumím, že gel obsahuje mix tkáňových kultur různého původu a organoidů, tudíž se asi nehodí aktin či jiné house-keeping proteiny, ale existují metody barvení pomocí Ponceau či Coomassie blue. Při porovnání expresí mezi vzorky by tato standardizace měla být přítomna.
- 5) Co je zdrojem Acetyl-CoA v K-RAS mutovaných buňkách pankreatického duktálního adenokarcinomu? A jakým způsobem dochází k propojení metabolismu a následné buněčné signalizaci, která vede k onkogenezi?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

