

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Ing. Michaela Dostálová Merkerová, Ph.D. Datum: 18.8.2022
Autor: David Krbušek	
Název práce: Funkční analýza diferenciatně exprimovaných miRNA v buněčných liniích HPV pozitivních a HPV negativních odvozených od nádorů různé anatomické lokalizace	
<b>Cíle práce</b> Cílem práce je zjistit funkci vybraných diferenciatně exprimovaných miRNA v buněčných liniích HPV pozitivních a HPV negativních odvozených od nádorů hlavy a krku a karcinomu hrdla děložního. <ol style="list-style-type: none"><li>1. Predikce cílových mRNA miR-139-5p a miR-147-5p pomocí databáze miRDB a TargetScan.</li><li>2. Sledování změn proliferace a migrace daných buněčných linií po transfekci mimikující miR-139-5p.</li><li>3. Ověření změny exprese vybraných cílových genů po transfekci mimikující miRNA.</li></ol>	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO Rozsah práce (počet stran): 71 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova ANO, v abstraktu mi chybí krátký závěr Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> 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	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Metodika obsahuje 9 kapitol. 5 z nich považuji za hlavní experimentální metody.  Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, ale možná až příliš detailně	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, ale je nadměrně detailní Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? NE – výsledky studie jsou bohužel pouze negativního charakteru, proto by bylo třeba experimentální část rozšířit, tak aby projekt poskytl i nějaké pozitivní výstupy	
<b>Diskuze:</b> 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	

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO, možná příliš krátké

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

Formální úroveň splňuje nároky kladené na diplomovou práci, text je čtivý, srozumitelný s minimem překlepů, grafická i jazyková úroveň je taktéž bez připomínek.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Mám připomínku k cíli č. 1 (viz výše). V práci nebyly predikovány cílové mRNA pro miR-147-5p a celá práce se tak experimentálně zaměřuje výhradně na miR-139-5p. Většina cílů práce bohužel poskytla pouze negativní výsledky, což je ale naprosto v souladu s riziky výzkumné práce. Student nicméně plně prokázal schopnost experimentálně pracovat, analyticky vyhodnocovat data, porovnávat své výstupy s literaturou, a nakonec je kriticky zhodnotit v publikačním výstupu (tedy v této diplomové práci).

**Otázky a připomínky oponenta:****Připomínky:**

1. Práce je dle mého posouzení nadměrně technicky detailní, což od diplomové práce v této míře neočekávám. Konkrétně jako nadbytečné vnímám zejména detaily u metodiky i výsledků RT-qPCR a dále u migračních experimentů (např. detailní popisy replikátů, ředění, jamek s negativními kontrolami, dále několik obrázků by šlo úsporněji zaměnit jedním apod.).
2. V mé tištěné verzi práce chybí Příloha 1.
3. Když tabulka 6 uvádí sekvence TaqMan sond, bylo by vhodné uvést i sekvence primerů.

**Otázky:**

1. Protože se v textu používají označení 3p/5p pro miRNA, bylo by vhodné je vysvětlit v kapitole „Klasifikace miRNA“. Co tedy tyto zkratky znamenají?
2. Autor zmiňuje diagnostický potenciál cirkulujících miRNA, ale dále se o cirkulujících miRNA v souvislosti s tématem již nezmiňuje. Co je o cirk. miRNA známo v souvislosti s HPV+/- karcinomy? Z hlediska neinvazivity jejich odběru, nebylo by vhodnější se v budoucnu zaměřit právě na ně? Lze očekávat, že pokud je v nádorových buňkách deregulována např. studovaná miR-139-5p, bude stejným způsobem ovlivněna i její hladina v plasmě?
3. Otázka na efektivitu RT-qPCR: jak je možné, aby efektivita PCR byla významně odchýlena od 1, a to zejména směrem nahoru (efektivita 1,5-1,8)? A proč bylo nutné efektivitu měřit zvlášť u každé buněčné linie? Jak je možné, že se u jedné konkrétní miRNA efektivita PCR výrazně liší mezi různými liniemi?
4. Měřil autor kvalitu izolované RNA? Jak lze měřit a proč je to vhodné? Nemohla např. špatná kvalita RNA ovlivnit měření míry exprese?
5. Optimalizoval autor inkubační dobu od transfekce k expresním a buněčným experimentům? Nemůže nedostatečná či naopak nadměrná doba inkubace mít vliv na negativní výsledky experimentu?
6. Protože práce poskytla převážně negativní výsledky, zajímalo by mě, jaký další postup by autor navrhoval pro dosažení cílů projektu tak, aby bylo možné práci publikovat ve vědeckém časopise.

Návrh hodnocení oponenta

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: