

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra bichemických věd

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2021

Autor/ka práce: **Nikola Jaščevská**

Vedoucí práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Konzultant/ka: Mgr. Veronika Skalická

Oponent/ka: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název práce: **Vliv topoisomerasy II beta na citlivost nádorových buněk k protinádorové terapii**

Rozsah práce: 83 stran, 23 obrázků, 16 tabulek, 114 citací

**Hodnocení práce:**

- |  |             |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části:               | výborná     |
| b) Náročnost použitých metod:                                  | výborná     |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost):   | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat:                     | výborná     |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost):          | velmi dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy:              | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:                | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:            | velmi dobrá |
| i) Splnění cílů práce:   | výborné     |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů:                   | výborné     |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):          | výborná     |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | výborná     |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Předložená práce diplomantky Nikoly Jaščevské zabývající se topoisomerasou II beta a jejím působením v nádorových buňkách je poměrně zdařilá. Velmi povedená je teoretická část, která je na vysoké odborné úrovni s celou řadou citací, nezatížená triviálními kapitolami. Pochválit bych chtěla také úvod, který opravdu pěkně uvede čtenáře do projektu, jehož součástí předkládaná práce je, a vymezí roli, kterou diplomantka v celém projektu měla.

V metodické části je opět pěkně srozumitelně uvedeno, jakým způsobem byly linie HL-60 s mutací v TOP11b připraveny. Zde bych pouze chtěla vytknout, že se práce nedrží pouze jednoho označení; v cílech práce je uvedeno, že se pracuje s mutantními liniemi 49 HL-60 a 71 HL-60, které jsou ale dále označovány jako homozygotní HL-60/- a heterozygotní a HL-60+/-.

Popis výsledků má poněkud kolísavou kvalitu a někdy není příliš srozumitelný. Statistické rozdíly jsou zmiňovány, nikde ovšem není popsáno jakým způsobem bylo toto testováno

Diskuze je celkem zdařilá v oblasti kontextu citované literatury, ale závěry, které vycházejí z vlastní práce nejsou zcela v pořádku.

Vytyčené cíle byly beze zbytku splněny, ale formulace závěrů není zcela přesná (použití primerů a tedy stanovení přítomnosti/nepřítomnosti mutovaného genu neodhalují depleci enzymu).

Dotazy a připomínky:

poznámky

V metodické části v tabulce 1 (s.36) by měla být uvedena i koncentrace primerů. Na s. 43 popisujete stanovení viability a koncentrace DEX a DAU jsou uvedeny v µl.

Z obr. 15 je vidět z křivek tání, že při nepřítomnosti templátu vzniká také produkt, tyto primery, tedy evidentně nejsou vhodné, protože při použití nspecifického barviva SYBR Green budou dávat falešné výsledky, závěry vyvozené experimentů s použitím těchto primerů nemusí být správné.

U návrhu primerů je uvedeno, že byly vytvořeny také varianty reverse primerů, jejich sekvenci, ale nikde nevidíme. Trochu matoucí je pak tabulka, která ukazuje použití primerů forward i reverse se stejnými čísly. Zde by bylo dobré uvést i délky předpokládaných produktů, když ve výsledcích je ukázána i separace na agarózovém gelu. Na obr. 16 by měl být popis velikostí fragmentů v žebříčku DNA, také rozlišovací schopnost na tomto gelu není ideální, v případě vzniku velmi krátkých fragmentů by mohlo být vhodnější použití akrylamidového gelu pro separaci.

dotazy:

V teoretické části popisujete regulaci transkripce zprostředkovanou TOPIIbeta. Můžete vysvětlit blíže větu ze s.15 „TOPIIb byla nalezena v oblasti promotoru těchto genů...“. Případně jakou metodou se detekuje „přítomnost TOPIIb v promotoru“?

U popisu qPCR uvádíte použití kontroly NWF, k čemu tato kontrola slouží, co konkrétně kontroluje? Byla použita i v následujících experimentech s navrženými primery?

s.36 Tab. 2 . Ukazuje použitý program, obvykle je vlastní PCR složeno ze tří teplotních kroků. Kdy dochází k nasedání primerů ve vašem experimentu?

Na s. 35 uvádíte, že byl z panelu referenčních genů vybrán B2M, na další straně uvádíte, že byly použity tři "housekeep geny". Můžete objasnit jak byly referenční geny vybírány?

Souvisí spolu nějak tab. 14 a graf na obr. 21? Není mi jasné, co znamenají normalizované hodnoty signálu, kde například u heterozygótní linie u enzymu TOPIIa jsou čísla řádově jinde než ostatní čísla, ale v grafu je bez detekce TOPIIb. Není možné, že došlo k nějaké záměně?

Jak si vysvětlujete, že v heterozygótní linii nebyl detekována přítomnost TOPIIb?

V diskuzi uvádíte, že i přes přítomnost zkrácené formy mRNA nevzniká v buňkách protein nebo je rychle degradován. Může při delecí 13 nukleotidů v kódující oblasti genu vznikat protein, který by byl detekovatelný specifickými protilátkami?

**hodnocení, práce je: výborná**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

18. května 2021

podpis oponenta/ky