

## Oponentský posudek diplomové práce Bc. Petra Dostála

---

**Název práce:** Studium chemorezistence u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených 5-fluorouracilem

**Autor:** Bc. Petr Dostál

Předkládaná diplomová práce o rozsahu 77 stran se zabývá analýzou chemorezistence k široce používanému léčivu 5-fluorouracilu (5-FU) u pacientů s kolorektálním karcinomem. Pro studium chemorezistence byl vybrán set 42 pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) a *in vitro* CRC model (buněčná linie DLD-1), včetně rezistentních klonů k 5-FU. První část diplomové práce se soustředila na stanovení celého transkriptomu senzitivních a rezistentních buněčných linií s cílem charakterizovat změny způsobené působením 5-FU pomocí bioinformatické analýzy. Vybrané kandidátní geny, jakožto potencionální biomarkery byly následně ve druhé části diplomové práce analyzovány ve vybraném setu pacientů s kolorektálním karcinomem.

Cílem práce bylo připravit knihovny z buněčných linií se záměrem stavit celo-transkriptomový profil a identifikovat a charakterizovat změny pomocí bioinformatické analýzy. S následnou validací vybraných kandidátů u pacientů s kolorektálním karcinomem léčených 5-FU. Lze říci, že diplomová práce k těmto cílům dospěla.

Diplomová práce je strukturně přehledná, je klasicky členěná a obsahově odpovídá požadavkům kladeným na diplomovou práci, včetně anglického abstraktu a seznamu zkratk. Práce je členěna na 7 kapitol (1. Teoretický úvod, 2. Cíle a hypotéza práce, 3. Materiál a metody, 4. Výsledky, 5. Diskuze, 6. Závěr a 7. Seznam použité literatury).

V kapitole **Teoretický úvod** autor shrnuje na 15 stránkách současné poznatky z odborné literatury z recentní doby zabývající se problematikou kolorektálního karcinomu od epidemiologie po současné možnosti léčby. Následuje shrnutí problematiky rezistence buněk a úvod do využití molekulárních biomarkerů v managementu nádorových onemocnění. Teoretický úvod je doplněn 9 obrázky a 1 tabulkou pomáhající orientaci a porozumění teoretické části, zejména metabolismu 5-FU.

V kapitole **Materiál a metody** jsou postupně shrnuty použité chemikálie, vybavení a přístroje. Následně jsou detailně popsány metody použité pro řešení cílů diplomové práce, s důrazem na přípravu knihoven pro sekvenování. Tato kapitola však obsahuje několik chyb, např. Agilent DNA 6000 Nano kit (viz. Tabulka 2) neexistuje, MycoAlert Mycoplasma Detection kit je dle mých znalostí vyráběn firmou Lonza, některé názvy výrobců nejsou uvedeny správně (např. Agilent či u RStudio – Inc, USA), přesný model používaných přístrojů bioanalyzer, fragment analyzer či luminometr, či verze použitých softwarů pro analýzu. Dále překlepy jako 51% koncentraci CO<sub>2</sub> v inkubátoru pro pěstování buněčných kultur, nebo chemikálie QIAshredder. Tabulky č. 8 a č. 9 by bylo dle mého názoru lepší zařadit do kapitoly č. 4 - Výsledky. Výše zmíněné chyby/překlepy avšak nezamezují komplexnímu porozumění použité metodiky, zejména přípravě knihoven.

V kapitole 3.9 Statistická analýza, na straně 48 se bohužel nachází faktická chyba, ale předpokládám, že vznikla ve spěchu. Student píše: „Směrodatná odchylka mezi jednotlivými počty cyklů amplifikace triplikátů označovaná jako Cycle Treshold (CT) musela být nižší než 0,5.“ Směrodatná odchylka není cycle treshold (CT). To jsou dvě kompletně odlišné věci. S tím souvisí i mylně vysvětlená zkratka CT v Seznamu zkratk v úvodu diplomové práce.

Kapitola **Výsledky** je primárně soustředěna na výsledky RNA sekvenování a diferenciální exprese mezi WT DLD-1 linií a jejími rezistentními klony (DLD-1 R40 a DLD-1 R160). Výsledková kapitola je doplněna vhodným grafickým zobrazením výsledků a přehledovými tabulkami s výsledky. Kromě samotné analýzy transkriptomu a diferenciální exprese byla taktéž provedena funkční analýza pro kandidátní geny z prvotní analýzy. Druhá část kapitoly je věnována výsledkům validační studie

vybraných kandidátních genů (*HIST1H2BE*, *ALDH1L1*, *CD44*, *DKK1*, *ABCC2*) ve vybraném setu pacientů s kolorektálním karcinom.

Co považuji, za největší nedostatek diplomové práce jsou chybějící výsledky statistického hodnocení pro analýzu diferenciální exprese, jak p-hodnoty, tak případné korigované q-hodnoty. Prosim o doplnění do Přílohy 1 a 2 předkládané práce.

**Diskuze** je vedena přehledně, je zaměřena na všechny vybrané kandidátní geny a srovnání vlastních výsledků s již publikovanými daty zaměřených na problematiku rezistence u nádorových onemocnění k 5-FU. Zde se také nachází chyba, která bude pravděpodobně překlepem, *ALDH1L1* patří do skupiny aldehyddehydrogenáz, ne aldehyddehydrogenáz 1.

Kapitola **Závěr** stručně shrnuje dosažené výsledky během řešení diplomové práce.

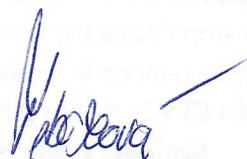
**Seznam použité literatury** je celistvý a obsahuje celkem 62 citací.

#### **Otázky doporučené k bližšímu vysvětlení při obhajobě:**

- 1) Byla nějakým způsobem kontrolována kvalita depletované RNA před samotnou přípravou knihoven?
- 2) Co je značí žlutá barva na obrázku č. 12 zobrazující buněčné linie pod mikroskopem?
- 3) V kapitole 3.9 uvádíte, že v případě vyšší rozlišnosti než 0,5 mezi hodnotami CT byla hodnota vyřazena? Co to přesně znamená? Pro hodnocení byl následně využit pouze duplikát? Či byl rovnou z analýzy vyřazen celý vzorek?
- 4) V kapitole 4.2 uvádíte, že během analýzy terciální dat byly odfiltrovány geny s nulovou expresí a expresí pod patnáctým percentilem. O kolik genů se přesně jednalo a kolik jich zbylo pro samotnou analýzu diferenciální exprese?
- 5) Kolik bylo celkem identifikováno diferenciálně exprimovaných genů v jednotlivých porovnáních?
- 6) V kapitole 4.2 uvádíte, že na ose y v obrázku č. 14 jsou znázorněny geny s největší expresí? Co to přesně znamená? Nejvíce diferenciálně exprimované geny v porovnání WT linie s rezistentními klonů?
- 7) Jaký nástroj byl použit pro funkční analýzu, jejíž výsledky jsou prezentovány v obrázku č. 17? Proč byly pro analýzu vybrány pouze up-regulované geny?
- 8) Co znamenají různé spojovací barvy v obrázku č. 18? Mají nějaký význam?
- 9) Máte nějaké vysvětlení pro rozdílný směr deregulace exprese pro gen *DKK1*, který jste pozoroval v porovnání DLD1-WT a obou rezistentních klonů?

#### **Závěr:**

Diplomovou práci studenta Bc. Petra Dostála i přes výše zmíněné nedostatky doporučuji k obhajobě před komisí a po zodpovězení dotazů a doplnění požadovaných dat, navrhuji klasifikaci velmi dobře.



Mgr. Karolína Šeborová, Ph.D.

V Praze 27. 05. 2024