

# **Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Veroniky Tomkové “Expression and regulation of the ABC transporters in tumour cells ” v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK**

Diplomová práce Bc. Veroniky Tomkové se zabývá charakterizací změn v expresi všech 49 dosud známých ABC transporterů mezi klasickou modelovou linií nádoru prsu MCF7 a z ní autorkou odvozené linie tam5R, která je rezistentní k indukci apoptózy působením 5  $\mu$ M tamoxifenu.

Navzdory intenzivnímu výzkumu na poli nádorové biologie stále není k dispozici efektivní léčba nádorových onemocnění, nádory prsu, nejčastější nádorové onemocnění u žen v ČR nevyjímaje. Klíčem k úspěšné terapii je pochopení molekulárních změn, které vedou k přeměně normálních buněk v buňky nádorové. Z tohoto hlediska je téma předkládané diplomové práce velmi aktuální a klade si za cíl doplnění dosavadních znalostí o zjištění, které ABC transportery se uplatňují v rezistenci k běžně užívanému terapeutiku tamoxifenu u buněk nádorů prsů. Studie tohoto typu jsou dobrým odrazovým můstkem pro hledání nových možností diagnostiky i terapie příslušných nádorů.

## **Formální kvalita předložené práce**

Diplomová práce má 95 stran plus 17 stran Supplementu, který obsahuje informace a data, která autorka nepovažovala za zásadní uvádět jako součást vlastní diplomové práce, např. sekvence použitých primerů nebo výsledky analýz exprese ABC transporterů, kde nebyl detekován signifikantní rozdíl v expresi. Práce je po formální stránce zpracována dobře, drobné formální nedostatky (viz dále) se vyskytují, avšak nenarušují nikterak vnímání vědecké kvality práce a věřím, že by byly odhaleny a odstraněny, kdyby autorka provedla ještě jednu kontrolu textu zaměřenou tímto směrem.

## **Jazyk**

Práce je psána solidní, srozumitelnou angličtinou, překlepy se vyskytují výjimečně. Některá vyjádření jsou však nepřesná a zasloužila vylepšit (např. „The load is normalized to  $\beta$ -actin“, Fig. 21B, strana 53). Dále by bylo vhodné dodržovat standartní způsob psaní čísl a jednotek, to znamená s mezerou mezi číslem a jednotkou. Též by bylo vhodnější používat termín „tamoxifen-resistant“ (s pomlčkou) místo „tamoxifen resistant“ (bez pomlčky).

## **Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce**

### *1) Literární úvod*

Literární úvod má 29 stran a obsahuje 16 obrázků a 1 tabulku. V rámci literárního přehledu seznamuje autorka čtenáře přehledným způsobem se základními fakty o nádoru prsu, jejich klasifikaci a způsoby terapie. Blíže se věnuje mechanismu působení tamoxifenu a shrnuje dosud známá fakta o možných příčinách rezistence buněk nádoru prsu k tamoxifenu. Jedna podkapitola literárního úvodu je věnována ABC transporterům, jejich struktuře, funkci a úloze v nádorové rezistenci.

## 2) Cíle práce

Cíle práce jsou jasně shrnuty do čtyř navazujících bodů, počínaje ustavením experimentálního modelu, t.j. tamoxifen-rezistentní linie tam5R odvozením od linie MCF7, přes verifikaci jejího tamoxifen-rezistentního fenotypu, analýzu změn v expresi všech 49 ABC transporterů na úrovni mRNA až po ověření získaných dat na úrovni proteinu pomocí metody western blot.

## 3) Metody

Metody použité v této diplomové práci zahrnují práci s tkáňovými kulturami, izolaci RNA, několik typů PCR v reálném čase, včetně „state of the art“ technik jako jsou Fluidigm PCR a NuPCR, a metodu Western blot. Drobnou výhradu mám k tabulkám na stranách 45, 46 a 48, u kterých chybí jakákoliv legenda, a krom tabulky ze strany 46 chybí v i textu jakýkoliv odkaz či informace, čeho se tabulky týkají, ačkoliv dané problematiky alespoň trochu znalý čtenář si toto je schopen domyslet.

## 4) Výsledky

Výsledky mají 23 stran, obsahují 16 obrázků a 1 tabulku. Kvalita prezentovaných výsledků je velmi dobrá a svědčí o dobrém zvládnutí metod. Na tomto místě bych ráda vyzdvihla zejména kombinaci několika různých metod, které autorka použila, aby dokázala věrohodně na úrovni mRNA stanovit změny v expresi všech 49 ABC transporterů a naplnila tak beze zbytku cíle své diplomové práce. Drobnou vadou na kráse zůstává, že se nepodařilo ověřit na úrovni proteinu veškeré odhalené změny v expresi ABC transporterů mezi tamoxifen-senzitivní a tamoxifen-rezistentní linií, jak bylo pravděpodobně původně zamýšleno. Důvody jsou však řádně vysvětleny a z vlastní zkušenosti mohu potvrdit, že detekce ABC transporterů na úrovni proteinu je náročným úkolem i pro experimentátora velmi zkušeného, mimo jiné i z důvodu obtížnosti nalezení fungujících protilátek, jak autorka též uvádí.

K výsledkové části diplomové práce mám následující drobné výhrady.

- V obrázku Fig. 20B chybí odchylky u datové řady CTRL a též část legendy chybí.
- Bývá zvykem uvádět směrodatné odchylky jednotným způsobem. V některých grafech jsou směrodatné odchylky uvedeny formou S.E.M, v jiných S.D., u některých grafů (Fig. 28 a Fig. 30) informace o tom, co chybové úsečky v grafu znázorňují, dokonce chybí úplně.
- Nezvykle působí u některých obrázků složených z více grafů rozdělení obrázku a legendy na několik nezávislých částí označených číslem obrázku plus A, B, ..., zejména když následuje celkem dlouhá legenda, která je, až na pár slov, obvykle název genu, celá zopakována, např. Fig.21A a Fig21B, Fig. 25A – Fig25C, Fig.30 A-F.) Bylo by vhodnější části jednoho obrázku buď uspořádat tak, aby legenda byla společná, nebo obrázek rozdělit na více samostatně číslovaných obrázků. Dále bych analogicky k tabulce 3 na straně 71 doporučovala doplnit kapitolu Výsledky ještě jednou tabulkou, sumarizující změny exprese ABC transporterů na úrovni mRNA získané pomocí všech použitých metod.

## 5) Diskuse

Diskuse je poměrně obsáhlá, má 9 stran a autorka v ní dává své výsledky do kontextu se současným stavem poznání studované problematiky. Autorka diskuzí dokládá, že je schopna nejen získat kvalitní

výsledky, ale též je kriticky zhodnotit. V závěru diskuze autorka naznačuje plánovaný směr dalšího výzkumu dané problematiky.

### 6) Závěry

V této kapitole autorka stručně shrnuje dosažené výsledky, které korespondují s vytyčenými cíli diplomové práce.

### 7) Bibliografie

Práce obsahuje 139 citací na převážně původní vědecké práce, včetně prací a 3 odkazy na webové stránky. Všechny citace jsou uvedené správně.

#### **Další připomínky a otázky:**

- 1) Je 5 $\mu$ M koncentrace tamoxifenu, použitá pro vytvoření tamoxifen-rezistentní linie v této diplomové práci, klinicky relevantní? V jaké koncentraci se tamoxifen vyskytuje v lidském těle při terapii?
- 2) Jaké další mechanismy rezistence k tamoxifenu jsou pravděpodobné v experimentálním modelu použitém v této diplomové práci? Lze očekávat i zapojení jiných typů transporterů, např. transporterů rodiny SLC (solute carrier transporters) v studovaném fenoménu?
- 3) Jaké je potenciální využití autorkou získaných výsledků v onkologii? Jaké jsou možnosti ovlivnění exprese a aktivity ABC transporterů u pacientů za účelem zvýšení jejich sensitivity k léčbě tamoxifenem, příp., jinými chemoterapeutiky?
- 4) Nesouhlasím s tvrzením v kap. IV.1.1, že metodikou barvení krystalovou violetí, popsanou v kap. III.3., je možné stanovit buněčnou viabilitu. V dalším textu už autorka správně pracuje s termínem „počet přeživších buněk“. Jaké metody by bylo možno použít pro stanovení viability?
- 5) V rámci 100%ního naplnění očekávání čtenáře po přečtení názvu práce bych doporučovala pro účely případných dalších prezentací dat z této diplomové práce upřesnit název na „Expression and regulation of the ABC transporters in tamoxifen-resistant breast tumour cells“.

#### **Celkové hodnocení diplomové práce**

Diplomová práce Veroniky Tomkové je velmi zdařilá a přečetla jsem si ji s chutí. Autorka splnila veškeré vytyčené cíle. Prokázala, že je schopna nastudovat vědeckou literaturu, je schopna o dané problematice přemýšlet, naplánovat a provést vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit příslušné závěry. Diplomovou práci Veroniky Tomkové mohu s klidným svědomím doporučit k obhajobě. Přeji autorce úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.