

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Bc. Gabriela Presová

Název práce: PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE BUNĚČNÝCH MODELŮ
LYSOSOMÁLNÍCH DĚDIČNÝCH ONEMOCNĚNÍ - MUKOPOLYSACHARIDOS

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
x	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické nebo rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
	A - výborná, bez závažnějších připomínek
x	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
x	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
x	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
x	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Předkládaná diplomová práce popisuje vývoj buněčných modelů čtyř typů mukopolysacharidos (MPS). K tomuto účelu byly z mononukleárních buněk periferní krve připraveny indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC), v nich byly inaktivovány geny asociované s MPS pomocí CRISPR/Cas9 a modifikované iPSC byly následně podrobeny chondrogenní diferenciaci. Již z tohoto krátkého popisu vyplývá, že odborná úroveň práce je vysoká, autorka prokázala, že je schopna obsáhnout široké spektrum metod a zpracovat velké množství experimentálních dat. Práce je velmi dobře zpracovaná, dále uvádím několik poznámek, které jsou míněny spíše pro inspiraci, a které neovlivňují celkovou úroveň práce.

Práce je psána čtivě, přehledně, autorka ukazuje svou schopnost pracovat s literaturou. Velmi vzácně se objevují stylistické neobratnosti a gramatické chyby, např.

- (1) Str 12: membránové proteiny zajišťují snímání dostupnosti živin - volila bych spíše monitorování, sledování
- (2) Str 22: laboratorní diagnostika se používá pro identifikaci ohrožených členů rodiny a heterozygotů (potencionálních přenašečů) – autorka zřejmě měla na mysli presymptomatické rodinné příslušníky
- (3) Str 28: Ačkoliv by mohli být ESC užitečné
- (4) Str 49: po rozrostení kolonií bylo provedeno... - např. u narostlých kolonií bylo provedeno
- (5) Str 74: vyšší exprese glykosaminoglykanů.

Kapitola Metody je zpracována pečlivě a přehledně.

- (6) Pro zvýšení atraktivitu textu pro čtenáře z jiných oborů bych doporučovala vysvětlit, proč byly některé postupy prováděny – např. na str. 41 vysvětlit, proč byly myší embryonální fibroblasty ozařovány. Takto se lze jen dohadovat, že šlo o zabránění rizika infekce.
- (7) Na str. 47 autorka popisuje, že v liniích obsahujících mutaci v genu *GALNS*, *GLB1* a *ARSB* byla testována aktivita β -galaktosidasy (GLB1). Pro lepší orientaci v textu by bylo dobré už na tomto místě vysvětlit, že GLB1 byl použit jako kontrolní enzym pro linie s *GALNS* a *ARSB* deficitem (popsáno až ve výsledcích).

Kapitola Výsledky a diskuse obsahuje úctyhodné množství výsledků, text je doprovázen 18 obrázky a 20 tabulkami

- (8) V tabulce 4.4. na str 60 by v hlavičce místo Délka amplikonu bylo přesnější použít Délka amplikonu wt alely (nebo divoké alely)
- (9) Z obrázku 4.6. na str. 59 vyplývá, že linie GLB1 3c nese homozygotně inserci 1N (konkrétně dAMP), v Tab 4.4. je ale uvedena delece 1N.
- (10) Slabinou systému CRISPR/Cas9 je tvorba mutací mimo cílové místo (off-target sites). Autorka si je problému vědoma, popisuje ho v úvodu. Experimentální řešení tohoto problému je nad rámec diplomové práce, ale postrádám k tomuto tématu alespoň zmínku v diskusi (např. jakým způsobem bylo riziko vzniku nespécifických mutací ošetřeno, zda *in silico* analýza identifikovala nějaká nespécifická místa apod.).

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

- 1) Je známo 11 typů MPS. Cílem práce byla příprava buněčných modelů pro čtyři z nich - MPS IIID, MPSIVA, MPSIVB, MPSVI. Proč byly vybrány právě tyto čtyři typy MPS?
- 2) Na obrázku 4.3. jsou znázorněny výsledky průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie není popsána v oddíle Materiál a metody. Může autorka podle obrázku 4.3. popsat, jak byl experiment proveden a jakým způsobem je získán výsledek - procentuální zastoupení úspěšně transfekovaných buněk?
- 3) Úspěšná inaktivace cílových genů byla v případě 3 typů MPS testována stanovením aktivity příslušného enzymu. Pro model MPS IIID není metoda stanovení aktivity N-acetyl-glukosamin-6-sulfatasy dostupná. Jak bude v budoucnu funkčnost modelu pro MPS IIID prokázána?
- 4) V tabulce 4.16 je demonstrován vliv mutací v genu *ARSB* na aktivitu arylsulfatasy B: Buněčná linie 4a obsahuje nulovou mutaci na obou alelách, buněčná linie 4c nese nulovou mutaci na jedné alele a in frame delecii na druhé alele. U obou linií byla zjištěna enzymová aktivita 10% vzhledem ke kontrolní buněčné linii. Zejména v linii 4a by se dala očekávat aktivita podstatně nižší. Jak si vysvětlujete poměrně vysokou zbytkovou aktivitu? Jaká je aktivita u pacientů s dvěma nulovými mutacemi?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci doporučuji k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / **NE**

Navrhovaná celková klasifikace: Práci hodnotím po odborné i formální stránce jako velmi kvalitní. Doporučuji přijetí práce jako podkladu pro obhajobu a navrhuji klasifikaci "výborně" (A).

Datum vypracování posudku: 29.6.2020

Jméno a příjmení, podpis oponenta : RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.

