

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Hana Hanzlíková
	Datum: 2. 7. 2020
Autor: <b>David Sekáč</b>	
<b>Název práce:</b>  The impact of mutant huntingtin on oxidative stress in primary fibroblasts isolated from Huntington's disease knock-in porcine model	
<b>Cíle práce</b>  The aim of the study was to isolate primary fibroblasts from wild-type and a minipig model Huntington's disease animals at the different life stages and subsequently measure intracellular ROS levels, lipid oxidation and the expression of selected associated genes.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO</b> Rozsah práce (počet stran): 53 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO 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? spíše ANO  Citace nejsou konsistentní...někdy je uveden jen první autor a rok, někdy navíc <i>et al.</i> Preferuji citovat více původních článků místo reviews.	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 4 Jsou metody srozumitelně popsány? spíše ANO – avšak velmi stručně	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? spíše NE - v čem jsou nedostatky? Vzhledem k malému počtu vzorků a tudíž nedostatečné statistice, která není do detailu popsána, by bylo potřeba prezentovat všechny výsledky jako bodové grafy, aby bylo možné udělat si konkrétní představu o daných měřeních.  Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? Částečně ANO. Většina výsledků je negativních, ale nejsou prezentovány s vhodnými pozitivními kontrolami. Tam kde byly naměřeny rozdíly, nejsou udělané konkrétní závěry.	

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? v podstatě ANO  
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO  
Student si ovšem na svá pozorování neutvořil názor, diskuze proto nikam nesměruje a vyznívá trochu zmatečně.  
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? NE

**Závěry (Souhrn):**

Jsou výstižné? NE

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

Formální úroveň práce dobrá, nicméně celkově v některých pasážích poměrně stručná. V úvodu chybí přehledná kapitola o poškození a opravě DNA zaměřena na 8-oxoG a BER (base excision repair). V sekci metody by si podrobnější popis zasloužil zvířecí model, izolace fibroblastů a analýza genové exprese pomocí qPCR a podobně i statistické vyhodnocení. Práce je napsaná v angličtině, některé odstavce nejsou úplně gramaticky správné, nicméně celkový obsah lze pochopit.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Cíle práce byly v podstatě splněny, nicméně konkrétní závěry výsledků, jak negativních, tak pozitivních, nejsou předloženy. Není přesně prezentováno, co se povedlo, nepovedlo a proč, jak se projekt díky studii posunul a kam bude směřovat. Diskuze je příliš povrchní, nesourodá a bez jasných hypotéz. Nicméně věřím, že student nás s tímto seznámí během obhajoby, a proto práci doporučuji.

**Otázky a připomínky oponenta:**

First of all, I would appreciate if you could describe your animal model in more detail, since I haven't found any relevant citation. How was the CRISPR targeted? Did you sequence the KI-HD animals? What is the phenotype of KI-HD-85Q minipigs and how severe it is? When is the onset of the disease? How many repeats is in the wild type animal? Why is the band of your mHtt on your WB weaker? You talk about quantification of your blots by Image Lab but I didn't find the data. Can you please present them to us?

Why and how did you select those particular 12 genes for qPCR measurement? For example, it's hard to understand that you have measured expression of NEIL2 and NEIL3 but you didn't look on NEIL1 and OGG1 (main DNA glycosylases responsible for the repair of oxidized bases). I would like to ask you when you present the gene expression data using bar charts, please overlay the corresponding data points (as dot plots) while giving your final talk. This is important mainly because the statistical significance (Student's T-test) on such a small number of samples is not 100 % correct. What do you mean by "Data represent the 3 independent experiments" in Figure legends R5 and R6? How many animals in total?

Results presented in Figure R6 are mostly negative. How do you know that those assays worked properly? Why you didn't use any positive control such as hydrogen peroxide? You have concluded that the highest levels of oxidative stress were observed in newborn

minipigs. This is still difficult to claim since your fibroblasts obtained from the different aged animals were measured separately as I understood. However, can you provide with some rationale behind this?

You describe some morphological changes and different proliferative activity in samples from KI-HD-85Q minipigs, however data are not shown. Could you please comment on those changes while giving a talk? I would also appreciate more general conclusion of your work. What do you think is the main cause of the disease in your opinion? I'm also interested where would you take your project further if you have a chance and what you would have done differently and why.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

