



# Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika

IČO: 67985904, DIČ: CZ67985904

T: 315 639 532, F: 315 639 510

ID Datové schránky: tw6hm2a

E: [uzfg@iapg.cas.cz](mailto:uzfg@iapg.cas.cz), URL: <http://www.iapg.cas.cz>

Doc. RNDr. Petr Šolc, Ph.D., Laboratoř integrity DNA, Pigmod Centrum, E: [solc@iapg.cas.cz](mailto:solc@iapg.cas.cz)

## Posudek na dizertační práci

Autorka dizertační práce: **Mgr. Zuzana Naščáková**

Název práce anglicky: ***Genomic instability associated with formation of RNA:DNA hybrids and molecular mechanisms of its suppression***

Název dizertační práce česky: **Genomová nestabilita spojená se vznikem RNA:DNA hybridů a mechanismy jejího potlačení**

Školitelka: RNDr. Jana Dobrovolná, PhD

Konsultant: Dr. Pavel Janščák, PhD

Předložená anglicky psaná dizertační práce se zabývá vznikem tzv. RNA:DNA hybridů především ve formě tzv. *R-loops* a jejich vlivem na genomovou nestabilitu. *R-loops* (česky též R-smyčky) jsou struktury, kdy je jedno vlákno dvouřetězcové DNA vytěsněno jednořetězcovou RNA, vzniká tak RNA:DNA hybrid na základě párování bází. Vytěsněné vlákno DNA pak představuje jednořetězcovou DNA, která je více náchylná ke vzniku DNA zlomů. Takováto struktura typicky vzniká, např. při RNA transkripci.

Práce je pojatá jako komentovaný soubor tří publikací v renomovaných časopisech (*Nature Communications*, *Molecular Cell*, *Cell Reports*).

Práce má tři nosná podtémata:

- I. Úloha masivního nárůstu transkripce a kontranskripčně vzniklých *R-loops* na genomovou integritu buněk po jejich infekci patogenem *Helicobacter pylori*.
- II. Kolize mezi transkripcí a replikací – role *R-loops* a vliv na genomovou integritu.
- III. cGAS signalizace detekující fragmenty DNA v cytoplasmě u buněk s narušenou genomovou integritou.

Sjednocujícím tématem celé dizertace je tak klíčové téma integrity genomu.

V úvodu (kapitola 2) se autorka nejdříve věnuje patogenní bakterii *Helicobacter pylori*, její patogenitě, a roli při vzniku onemocnění žaludku, jako jsou chronická gastritida, vředová choroba nebo rakovina žaludku. Dále je věnována pozornost odpovědi vrozené imunity a NF- $\kappa$ B signalizace na infekci *H. pylori*. Je též diskutováno, že infekce *H. pylori* vyvolává poškození DNA infikovaných buněk a je položena hypotéza, jestli tento nárůst DNA poškození nesouvisí s nadměrným vznikem *R-loops*.

Dále se autorka detailně věnuje vzniku *R-loops*, mechanismům, jakým se buňka snaží bránit jejich nadměrné akumulaci, a jak *R-loops* vzniklé v důsledku transkripce mohou přispívat k narušení integrity genomu především při kolizi mezi replikací a transkripcí. Prezentované téma *R-loops* a genomové integrity je velmi zajímavé a aktuální a má vztah k mnoha onemocněním, nejenom k rakovině.

V kapitole 3 jsou jasně definovány cíle dizertační práce korelující s mnou výše uvedenými nosnými tématy. V kapitolách 4 a 5 jsou pak komentovány a diskutovány dosažené výsledky.

Práce je velmi pěkně sepsána a úvod poskytuje skutečně zdařilý přehled problematiky. Text se mi velmi dobře četl a inspiroval mne k dalšímu zamyšlení nad prezentovanými tématy a ke studiu dalších zdrojů. Shrnutí vlastních výsledků je dobře sepsáno a přímo vybízí k přečtení vlastních publikovaných prací autorky. Ze čtení dizertační práce jsem měl skutečně radost.

Autorka v dizertační práci a v příložených publikovaných pracích ukazuje:

1. Infekce epiteliální buněk žaludku bakterií *H. pylori* způsobuje v rámci vrozené imunity aktivaci transkripce pomocí NF- $\kappa$ B signalizace, která vede nadměrné akumulaci *R-loops*, které vyvolávají replikační stres a nárůst DNA poškození.
2. Mechanismus, jakým buňky řeší restart replikace po zastavení replikační vidlice při setkání s *R-loops* vzniklých z důvodů probíhající transkripce.
3. Mechanismus, který nádorové buňky, obvykle obsahující velké množství fragmentované DNA v cytoplasmě, využívají k stimulaci produkce interferonu typu I a iniciování imunitní odpovědi.

K vlastnímu textu dizertační práce bych měl jen tyto drobné výtky:

1. Kapitola 2.1 věnující se *H. pylori* by si zasloužila větší množství obrázků ilustrujících danou problematiku především proto, že dizertační práce je jinak orientována na integritu genomu, takže pro jejího potencionálního čtenáře to bude pravděpodobně nové téma.
2. V textu je občas špatné zarovnání řádků (vycentrováný text, místo zarovnání do bloku).
3. Chybí vlastní obrázek 8.
4. Bylo by dobré si pohlídat jednotný styl formátování textu (použité fonty).

**Pro diskuzi při obhajobě mám na autorku následující otázky:**

1. V kapitole 2.1.6 uvádíte, že vznik DNA zlomů po infekci buněk *H. pylori* lze omezit experimentální deplecí nukleáz XPG a XPF, které jsou zapojeny do tzv. *Nucleotide Excision Repair* (NER) dráhy. Je hypoteticky možné, že se NER podílí na vzniku DNA zlomů nejenom přes zapojení XPG a XPF do štěpení *R-loops*?

2. V kapitole 2.2.1 uvádíte, že DNA sekvence mající vysoký obsah G nukleotidů přispívají ke stabilizaci *R-loops*. Existuje představa, jak jsou stabilní *R-loops* přímo v buňce v momentě, kdy vytěsněné DNA vlákno v *R-loop* neobsahuje větší množství G nukleotidů?
3. **V textu opakovaně zmiňujete, že excesivní transkripce může představovat výzvu pro genomovou integritu kvůli zvýšené produkci *R-loops*. Šlo by tento fakt dát do kontextu replikačního stresu a replikační katastrofy v souvislosti s recentně prezentovaným modelem, kde se pro vznik replikačního stresu jeví jako kritická dostupnost replikačního proteinu A (Mol Cell. 2017 Jun 15;66(6):735-749.)?**
4. Jaká je role replikačního proteinu A ve vzniku *R-loops*?
5. V práci Bauer et al 2020 ukazujete, že obecná inhibice transkripce redukuje vznik DNA poškození buňky po infekci *H. pylori*. Pro inhibici jste použili inhibitor triptolide. Myslíte si, že by stejný efekt na DNA poškození měla i inhibice transkripce pomocí  $\alpha$ -amanitinu? Liší se mechanismem účinek triptolidu a  $\alpha$ -amanitinu?
6. Pro kvantifikaci DNA poškození jste využila imunofluorescenční detekci faktoru 53BP1. Vzhledem k tomu, že jste analyzovali stovky buněk, rád bych se zeptal na způsob, jak byly počítačově detekovány a analyzovány tzv. 53BP1 foci? Jak tato analýza přistupovala k různé velikosti foci?

V závěru mohu konstatovat, že předložená dizertační práce je vysoce kvalitní, zabývá se velmi aktuální problematikou a obsahuje soubor tří článků publikovaných ve velmi kvalitních časopisech. Velmi oceňuji, že dizertační práce vznikla na základně intenzivní mezinárodní spolupráce. Po její úspěšné obhajobě ji doporučuji jako podklad pro udělení titulu Ph.D.

V Liběchově dne 4. 1. 2021

doc. RNDr. Petr Šolc, Ph.D.