

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Lukáš Valíhrach, PhD

Datum: 8/9/2023

Autor: Bc. Barbora Kuttichová

Název práce:

ADP-ribosylace v ARH3-deficientních buňkách a její vliv na buněčné funkce

### Cíle práce

Obecný cíl práce byla studie mutace proteinu ARH3, jeho vlivu na ADP-ribosylaci a související neurologické poruchy.

Specifické cíle byly:

- Zhodnocení hladiny proteinu ARH3 ve fibroblastech pocházejících od pacienta s mutací ARH3
- Detekce ADP-ribosylace v ARH3-mutovaných fibroblastech odvozených od pacienta
- Zjištění citlivosti buněk s deficitem ARH3 na inhibitory PARP
- Příprava indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) z fibroblastů pacienta a otestování jejich pluripotence
- Zavedení modelu mozkových organoidů pro studium účinků mutací ARH3 na architekturu mozku

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 104

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

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? ANO

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? >10

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?  
ANO

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Formální úroveň práce je na vysoké úrovni. Práce je napsána srozumitelně a čtivě, její jednotlivé části mají logickou strukturu a jsou doplněny dobře zpracovanou obrazovou dokumentací. Rovněž jazyková úroveň je velmi vysoká.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Vědecký projekt, na jehož řešení se autorka diplomové práce podílela, je velmi kvalitní, zajímavý a aktuální. Mutace proteinu ARH3 a jeho vliv na vznik onemocnění u člověka byly popsány teprve nedávno (v roce 2018) a od té doby bylo popsáno pouze 43 případů. Z těchto 43 případů jsou v rámci diplomové práce zahrnuty tři patientské linie, z nichž jedna je zcela nová a získaná ve spolupráci s klinikou na Slovensku. Z velké části neznámá patologie poskytuje velký prostor na řadu objevů a přímých dopadů vědecké práce celého řešitelského týmu, který se problematice defektů v opravě poškozené DNA již dlouho věnuje. Ač je toto primární zásluha vedoucí diplomové práce a celého projektu, z předložené práce je dobře patrné, že autorka řešenou problematiku plně pochopila a významnou měrou přispěla k celkovým cílům projektu, které přesahují možnosti a kapacitu jedné diplomové práce. Kromě výborné formální úrovně práce, autorka měla možnost získat zkušenosti s celou řadou experimentálních metod (přes „tradiční“ metody analýzy proteinů či RNA, až k moderním metodám modelování onemocnění pomocí organoidů). Subjektivně mi spektrum metod přijde na úroveň magisterského studenta velmi působivý a poskytují autorce skvělé předpoklady pro další vědeckou práci. Nutno zmínit, že část práce byla provedena na pracovišti v Bernu, ukazující na schopnost autorky efektivně spolupracovat v mezinárodním vědeckém týmu. Diplomovou práci hodnotím výborně. Děkuji autorce za skvělou práci a přeji ji hodně úspěchů.

**Otázky a připomínky oponenta:**

1) V úvodu práce se uvádí, že odstranění terminální mono-ADP-ribózy pomocí glykohydrolázy ARH3 je nezbytné pro umožnění přístupu opravných faktorů na poškozenou DNA. Dále je však tato informace vyvrácena nedávnou prací Vašeho řešitelského týmu, zavádějící termín „mono-ADP-ribose scar“. Rád bych poprosil o vysvětlení.

2) V práci byly testovány inhibitory poly-ADP-ribóza polymeráz (PARPi), běžně využívané při léčbě některých typů rakovin, jako potenciační terapeutikum pro pacienty s mutovaným ARH3 proteinem. Z mého pochopení textu je však aktivita PARP nezbytná pro označení poškozené DNA, kdy následně dochází k odstranění této „značky“ pomocí dalších enzymů, včetně ARH3, a následně iniciaci opravy poškozené DNA. Není mi tedy jasné, jakým způsobem by se vybalancoval negativní efekt nefunkčních PARP, které jsou zřejmě nutné pro správnou funkčnost mechanismů na opravu DNA?

3) V navaznosti na přechodící otázku by mě zajímalo, zda jste neuvažovali o jiných způsobech

terapie (opravě mutovaného genu, nahrazení nefunkčního/resp. méně aktivního ARH3 proteinu apod.)? A jaký je Váš názor na aplikovatelnost těchto alternativních přístupů?

4) Z technického hlediska by mě zajímalo, jak si vysvětlujete různou míru exprese ARH3 proteinu u různých iPSC klonů odvozených od identického pacienta - Fig. 27 (za předpokladu, že se jedná o reprodučibilní výsledek)? A jak tento fakt plánujete zohlednit v dalších experimentech na cerebrálních organoidech?

5) Závěrem bych Vás rád požádal o stručné představení experimentálních plánů na cerebrálních organoidech, které plánujete provést v nejbližším období (některé byly obecně naznačeny v diskuzi). A zda na probíhajících kultivacích je již pozorovatelný nějaký fenotyp? Samozřejmě, za předpokladu, že Vám nevadí tyto informace sdílet...

6) Uplně poslední otázka se týká vzniku zmíněných „mono-ADP-ribose scar“ a jejich potenciální role na ovlivnění následných epigenetických modifikací opravených úseků. Plánujete nějakých způsobem adresovat tento potenciální mechanismus vzniku onemocnění?

Návrh hodnocení oponenta

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

