

Posudek k disertační práci uchazečky Ing. Olgy Součkové

„Study of de novo purine synthesis in model systems of *Caenorhabditis elegans* and HeLa cell lines“

Formální hledisko

Práce je psaná v anglickém jazyce, je členěna klasicky na rešeršní část, metodickou a experimentální část a diskuzi. Rešeršní část se zaměřuje na popis metabolismu purinových bazí, tedy jak metabolitů, tak i enzymů účastných jejich přeměny. Dále se autorka věnuje popisu chorob spojených s deficitem jednotlivých enzymů této dráhy. Je obsažena též část se stanoveným účelem a hypotézami, které si autorka klade, jmenovitě 1) Patofyziologie DNPS v buněčném modelu a v transgenním modelu nematod, 2) Studium cytotoxicity DNPS metabolitů na buněčné linie a 3) Charakterizace fibroblastů z lidských pacientů.

Experimentální část poté detailně popisuje metody, které byly použity pro dosažení daných hypotéz - tedy buněčných kultivací, analýzy genových mutací, analýzy proteinů a mRNA produktů, konfokální mikroskopii, extrakci metabolitů a jejich analýzu pomocí techniky LC-MS a práci s transgenním modelem háďátek.

Práce je dále doprovázena seznamem použité literatury a 5 publikovaných vědeckých prací autorky, které prošly recenzním řízením a byly publikovány v impaktovaných časopisech a z nichž jeden je prvoautorský. Jmenovitě jsou to *“CRISPR-Cas9 induced mutations along de novo purine synthesis in HeLa cells result in accumulation of individual enzyme substrates and affect purinosome formation”*, *“Study of purinosome assembly in cell-based model systems with de novo purine synthesis and salvage pathway deficiencies”*, *“Metabolic tools for identification of new mutations of enzymes engaged in purin synthesis leading to neurological impairment”*, *“PAICS deficiency, a new defect of de novo purine synthesis resulting in multiple congenital anomalies and fatal outcome”* a *“Metabolites of de novo purine synthesis: Metabolic regulators and cytotoxic compounds”*.

Odborné hledisko

Práce Ing. Olgy Součkové se zaměřuje na metabolismus a poruchy dráhy syntézy purinových bazí ústící do onemocnění, které se může manifestovat mírnou ale i závažnou až fatální formou. Ačkoliv četnost těchto onemocnění není vysoká, autorka sleduje moderní trend studia vzácných onemocnění. Úvodní část je popsána srozumitelně a dostatečně.

Autorka použila širokou škálu laboratorních metod ke komplexnímu studiu dané problematiky, od buněčných kultivací, cytotoxických studií, analýze genů, proteinů i metabolitů, přípravu transgenních modelů i sledování proteinů pomocí konfokální mikroskopie. Experimenty byly plánovány a popsány srozumitelně.

Sekce s výsledky adekvátně popisuje získaná zjištění a je doprovázena přiměřeným množstvím schémat, grafů a obrázků, na které se text odkazuje a které potvrzují dané výsledky. Autorce se podařilo dosáhnout stanovených hypotéz a nadto v rámci výzkumu odhalit dvě dosud nepopsaná onemocnění – deficit enzymů PAICS a PFAS.

Diskuze k výsledkům je věcná a ukazuje autorčin přehled v současné odborné literatuře.

Připomínky oponenta k práci

- Kapitola 1.1.3.1.6.
V obrázku 3 je použito dvakrát písmeno E, chybí písmeno F.
- Kapitola 3.2.3.
Je uvedeno, že k detekci chemiluminiscence bylo použito rentgenových paprsků. Domnívám se, že má být, že byla použita detekce za pomoci filmu používaného k detekci rentgenových paprsků.
- Kapitola 3.3.1.
Zkratka PR není uvedena v přehledu.
- Kapitola 4.1.3.1.
Obrázek 11 – obrázky zachycující kolokalizaci proteinů jsou velmi malé a tudíž málo zřetelné. Pro lepší vizualizaci bych doporučil větší velikost (alespoň jako je v příslušném článku) nebo i současné uvedení číselného koeficientu kolokalizace.
- Kapitola 4.1.3.2.
Obrázky 12 – 20. U některých obrázků jsou zobrazeny kolokalizace signálu a u některých nikoliv.
- Kapitola 6.
Chybí údaj pro zkratku WES v přehledu.

Dotazy na uchazečku

- Při extrakci metabolitů z HeLa buněk (kapitola 3.3.2.) byl po vysušení extrakčního činidla přidán isotopicky značený interní standard. Proč nebyl přidán interní standard již do buněčného lyzátu?
- Při měření míry absorpce purinových metabolitů do buněk (kapitola 3.5.3.) byly tyto přidány do kultivačního média v různých koncentracích. Má toto svůj důvod?
- Při analýze profilu RNA a proteinů (kapitola 4.1.2.) na obrázku 10 je patrné, že v médiu s obsahem purinů u buněk s knock-outem proteinu HPRT je nenulová exprese proteinu HGPRT. V podmínkách s médiem, ze kterého byly puriny uměle odstraněny, tato exprese není. Máte pro to vysvětlení?

Závěr

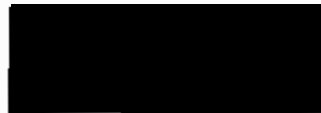
Uchazečka ve své práci prokázala schopnost plánovat, provádět a vyhodnocovat experimenty za použití adekvátních metod.

Studium metabolismu purinových bazí je stále aktuální vědecké téma a publikování výsledků v impaktovaných časopisech toto potvrzuje.

Uchazečka dále splnila cíle vytyčené v práci.

Uchazečka svou disertační prací prokázala předpoklady kladená na autora pro samostatnou tvořivou vědeckou práci a k udělení titulu Ph.D. za jménem. Po prostudování této práce ji doporučuji k obhajobě.

Ve Vestci, dne 27.11.2023



Mgr. Lukáš Kučera, Ph.D.

Czech Centre for Phenogenomics

Ústav molekulární genetiky, AV ČR, v.v.i.

Průmyslová 595

Vestec, 252 50