

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Lukáš Čermák
	Datum: 2/7/2020
Autor: Bc. Eliška Füst	
Název práce: Ubikvitin-proteazomální systém ve studiích jeho inhibice a jeho využití v buněčné eseji měřící aktivitu virové proteázy	
Cíle práce (práce je psaná anglicky – uvádím tedy cíle v originálním znění)	
<p>1) Finding a target of a novel UPS inhibitor and analysing its cytotoxicity. The UPS inhibitor CBU79 appeared as a primary hit from the high-throughput screening of a small molecule compound library searching for the UPS inhibitors as a potential alternative for cancer treatment. Libraries have been used both in the way of finding an inhibitor of the UPS in library of chemical compounds and in the way of finding a potential target of the inhibitor with CRISPR/Cas9 genome-wide screen.</p> <p>Autorka plánovala ověřit vliv CBU79 na proteinovou translaci a optimalizovat metodiku jejího měření. Dále pomocí genetických a farmakologických inaktivací identifikovat biochemické dráhy ovlivněné CBU79.</p> <p>2) Utilizing ubiquitin-dependent degradation process as a tool to study activation and inhibition of viral proteases, specifically from Zika and Dengue. These are viral models used in our laboratory at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry in Prague. This assay could be further used in screening for Zika protease modulators in chemical compound libraries.</p> <p>V této metodické části projektu si autorka vytyčila za cíl vytvoření reportérů virálních proteáz.</p>	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 118 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO (Ocenil bych větší literární přehled biologických aktivit virálních proteáz) 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:	

<p>Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO</p> <p>Kolik metod bylo použito? Těžko odhadnout (spočítat) – jedná se o metodicky bohatou práci a pro účely magisterského studia a diplomové práce se jedná o nadprůměrný počet.</p> <p>Jsou metody srozumitelně popsány? ANO</p>
<p>Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO</p> <p>Je dokumentace výsledků dostačující? ANO</p> <p>Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO</p> <p>Pozn. je zřejmé že se jedná o cíle komplikované a že v rámci diplomové práce nelze očekávat komplexní odpovědi – považuji předložené výsledky a experimenty vedoucí k nim za dostatečné k budoucí, více rigorózní, analýze těchto otázek.</p>
<p>Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Pozn. zejména v části zabývající se reportéry (a nefunkčností inhibitorů) bych očekával hlubší diskusi s větším zapojením literatury.</p> <p>Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO</p> <p>Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO</p>
<p>Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO</p>
<p>Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):</p> <p>Formálně bych práci charakterizoval jako standardní až nadprůměrnou. Úroveň jazyka je na gramatické rovině průměrná a vyskytují se v ní drobné chyby a to jak v textu (extent/d; ubiquitin(-)dependent; analyse/analyze; multipleubiquitin - polyubiquitin; linkages serve(s); ligases contain(s); perfo(r)med; completely death (dead?) protease a další. Dále lze identifikovat drobné chyby v popisu obrázků (Fig 17 – “-DMSO” mělo být pravděpodobně „-HPG“). Tyto chyby jsou marginální a nemají na kvalitu práce velký dopad. Kvalita obrázků je dostatečná. U obrázku 39 by bylo optimální i samostatné DAPI barvení – vzhledem k různé intenzitě a překryvu barev není jednoznačná lokalizace jader.</p>
<p>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</p> <p>Diplomová práce je rozdělena do dvou oddílů, které spolu komunikují skrze téma inhibice proteáz. Aim 1: To inspect, whether the decrease in protein translation is the cause or the consequence of CBU79 treatment.</p> <p>Autorka potvrdila translačně inhibiční potenciál CBU79 inhibitoru. V další fázi se soustředí na vliv CBU79 na UPR odpověď. Lze důvodně pochybovat o inhibičním vlivu CBU79 na</p>

UPR. Výsledky viability (obr. 18) mají díky rozptylu hodnot nízkou signifikanci. Navíc u hodnot, které autorka používá v předešlých výsledcích (10 μ M) je rozdíl mezi CHOP^{-/-} a CHOP^{+/+} buňkami zanedbatelný.

Aim 2: Identification of CBU79 target/s.

Výsledky naznačují potenciální cíle CBU79. Autorka se podílela na přípravě „screenu“. Většina genů se váže k translační dráze a jejich identifikace není překvapivá. Autorka diskutuje zejména RPN10 – součást 19S proteazomové podjednotky. Výsledku se týká otázka v následujícím oddíle.

Aim3: To design and optimize the non-infectious cell-based assay exploiting the UPS for monitoring activity of Zika and Dengue proteases.

Autorka připravila sérii reportérových vektorů určených k detekci aktivity virálních proteáz. Bohužel byly tyto vektory na současné inhibitory těchto proteáz nefunkční. Autorka vytvořila během optimalizace celkem 18 reportérových vektorů. Výsledků se týká otázka v následujícím oddíle.

Celkové hodnocení:

Ubikvitin proteazomová dráha (UPS) je cílem mnoha farmak, které jsou v současnosti testovány u infekčních, autoimunitních i nádorových onemocnění. Autorka se ve své práci zabývá důležitými tématy, která s touto dráhou souvisejí a snažila se najít odpovědi pomocí relevantních metod. Práce je odvedena pečlivě a obsahuje všechny nezbytné části včetně rozsáhlého literárního přehledu týkajícího se UPS.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázka 1: Jakým způsobem bylo normalizováno množství materiálu analyzované pomocí Click-metodologie. Jedná se mi o to, že na vizualizaci gelu chybí kontrola, která by naznačovala celkové množství proteinu - nově i “dříve” syntetizovaného?

Otázka 2: Jakým způsobem lze vysvětlit obohacení Rpn10 sgRNA? Jestli správně chápu princip testování sgRNA knihovny měli by být obohaceny cíle, které leží ve stejné dráze jako CBU79. Rpn10 inaktivace – alespoň dle diskuze v diplomové práci – má na buňky podobný efekt jako CBU79 – z toho mi vychází, že by se jejich efekty měly potencovat a ne inhibovat. Možná jsem pouze špatně text pochopil.

Otázka 3: Relativně malý rozdíl, který vznikl po ovlivnění EPX naznačuje, že jeden ubikvitin je nedostatečný degradační signál. Uvažovali jste o odlišných degradačních systémech, a jestli ano o jakých?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

