

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Michal Šmahel, Ph.D.

Datum: 22.5.2018

Autor: **Bc. Vratislav Eliáš**

Název práce: **Role kapsidového proteinu virové hepatitidy B v hostitelském ubikvitin-proteazomovém systému**

### Cíle práce

1. Identifikace proteinů ubikvitin-proteazomového systému interagujících s proteinem HBc.
2. Potvrzení specifické vazby proteinu HBc s ligázami FBXO3 a UBE2O.
3. Analýza vlivu ligáz FBXO3 a UBE2O na HBc.
4. Analýza vlivu ligáz FBXO3 a UBE2O na replikaci HBV.

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

Rozsah práce (počet stran): 67

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO,  
ale některé zkratky v seznamu chybí (např. CDC, SUMO, HECT, RING, PTM); u BAP1 není vysvětlena zkratka, ale uvedena funkce proteinu

### 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, se dvěma výjimkami:

1. U popisu domén proteinu HBc postrádám citaci článku Li et al. 2010, PLoS Pathogens 6 (10): e1001162 (přitom podle tohoto článku byl nejspíš vytvořen Fig. 4 a citace byla použita v diskusi).
2. Na straně 21 je uvedena citace Hubner and Peter 2012, u které není zcela zřejmé, k čemu patří. Domnívám se, že by zde měla být citace Su et al. 2013, PNAS USA 110 (43):17516-21, protože předpokládám, že v diplomové práci jsou chybně uvedeny údaje o ubikvitinaci proteinu M2 viru chřipky A (asi má jít o protein M1).

Navíc řazení vícenásobných citací ne vždy dodržuje předepsaná pravidla.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? cca 20

Jsou metody srozumitelně popsány?

Většinou ANO, ale vzhledem k požadavkům na diplomovou práci je popis metod často nedostatečný, např.:

1. U buněčných linií by mohla být doplněna citace a zdroj linií.
2. Není jasné, k čemu byly použity dva uvedené kmeny bakterií a k čemu inhibitory proteáz.

3. Plazmidy nejsou popsány dostatečně. U plazmidů s označením Core-HA, Core-FLAG, Core-V5/AP a GST-HBc je stejná věta o jejich vzniku bez uvedení rozdílu mezi plazmidy nebo odkazu, kde je možné nalézt bližší popis plazmidů. Názvy plazmidů jsou vlastně zaměněny za názvy zájmových genů, které tyto plazmidy nesou. Takže u plazmidů od OriGene jsou uvedeny jen názvy ligáz FBXO3 a UBE2O, přičemž OriGene prodává řadu různých plazmidů s těmito geny (částečné upřesnění je až v kapitole *Results* na str. 44-45). Navíc to vede k tomu, že by si čtenář mohl myslet, že byly transfekovány proteiny (např. popis . 12).
4. Není popsán zdroj primerů pro  $\beta$ -aktin.
5. Použité siRNA nebyly specifikovány (není jasné, co je míněno pojmem „set“).
6. Někde nejsou dostatečně popsány použité roztoky a reakční směsi (složky a jejich koncentrace, výrobci významnějších chemikálií).
7. Při použití kitů je většinou jen odkaz na metodiku výrobce. Často by ale bylo vhodné doplnit alespoň některé další informace, např. množství výchozích buněk při izolaci RNA, množství RNA použité na inkubaci s DNázou a množství buněk, DNA/siRNA a transfekčních činidel při transfekci.
8. U PCR není uvedena příprava reakční směsi.
9. U popisu SDS-PAGE je uvedeno, že gely byly připravovány podle standardního protokolu. Není ale uveden žádný odkaz na tento protokol.
10. Není popsán zdroj nebo příprava rekombinantních proteinů GST a GST-HBc a plazmidu s genem pro Ub-Myc.

#### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? NE

V práci nejsou doloženy výsledky plnění 1. cíle práce, tj. „Identifikace proteinů ubikvitin-proteazomového systému interagujících s proteinem HBc“ pomocí hmotnostní spektrometrie.

Dále mohl být zařazen alespoň ukázkový obrázek elektroforézy plazmidů.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

#### Diskuze:

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

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

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

#### Závěry (Souhrn):

Jsou výstižné? ANO, ale závěrečné shrnutí o polyubikvitinaci a monoubikvitinaci je až moc zjednodušující.

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

Práce je celkově na dobré formální úrovni, ale některé nedostatky obsahuje, např.: odkazy na obrázky nejsou v jednotném formátu (Fig. 1 vs. fig.2 vs. fig. 4), mezery před jednotkami a procenty nejsou vždy správně a popis *Fig. 16* je zbytečně na 2 stranách.

Práce je napsána anglicky. Celkově není jazyková úroveň špatná, ale některá slova nebo obraty nejsou vhodně zvoleny a občas se vyskytují i pravopisné chyby.

#### Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. V. Eliáš přitom získal originální výsledky, které rozšiřují poznatky o interakci HBV s ubikvitin-proteazomovým systémem. Tyto výsledky tvoří důležitou část

projektu řešeného v laboratoři školitele a po dalším doplnění mají šanci na publikování v impaktovaném časopise. Bohužel tato diplomová práce je negativně poznamenána zejm. úrovní popisu použitého materiálu a metodik, kterým autor nevěnoval dostatek pozornosti. Zdokonalit by šla i kapitola popisující a dokumentující výsledky. Celkový dojem vylepšuje diskuze, ve které jsou získané výsledky dány do kontextu s publikovanými údaji a autor se také zamýšlí na dalším směřování pokusů.

### **Otázky a připomínky oponenta:**

#### ***K práci mám ještě tyto připomínky:***

1. V bibliografii jsou práce autorů s počátečními písmeny příjmení „Ch“ uvedeny až za pracemi autorů s počátečním písmenem „H“.
2. Odkaz na zdroj *Fig. 1* je nedostatečný (uvedeno pouze „CDC 2017“), na *Fig. 8* jsou u proteinů zkratky, jejichž význam nebyl nikde vysvětlen (CC1, CC2, UCH), na *Fig. 9* není v textu odkaz, na *Fig. 11* je chybný popis některých drah (místo Core-HA má být Core-V5/AP, u obrázků *Fig. 10, 11* a *12* není uveden proteinový marker.
3. Údaje o vlivu proteinu TRIM22 na viry HIV-1 a IVA by měly být uvedeny v kapitole 2.5 (ne v kapitole 2.4 věnované HBV).
4. V kapitole *Material* byla popsána buněčná linie HEK 293, ale podle popisu metod byly používány spíše buňky HEK 293T.
5. U popisu miniprepů plazmidů je odkaz na neexistující kapitolu 5.3.3.1. Není vlastně ani jasné, k čemu byly miniprepy používány.
6. Pro specifikaci rychlosti centrifugace byly použity otáčky bez uvedení rotoru.
7. Místo Neutravidin-HRP je opakovaně použito antiNeutravidin-HRP (přičemž nikde není uvedeno použité ředění).
8. Horní výřez membrány na *Fig. 10* není dostatečný na to, aby dokumentoval, že nebyla zjištěna vazba Hbc a FBXO3 (protože velikost proteinů FBXO3 a UBE2O je značně rozdílná).
9. U kvantifikace výsledků na *Fig. 13b* a *14b* by bylo vhodné provést statistické vyhodnocení.

#### ***Upřesňující otázky:***

1. Minichromozom HBV jste si připravovali sami nebo vám ho dodal dr. Guo?
2. Dělal jste kontrolní elektroforézu po izolaci RNA a kontrolní štěpení plazmidů po jejich izolaci? Měřil jste DNA i při vlnové délce 280 nm?
3. Proč musela být každá miska/lahev/destička zkontrolována pod mikroskopem před otevřením v laminárním boxu?
4. Nešlo by kvantifikovat i polyubikvitinaci?
5. Jaký byl odstup mezi transfekcí plazmidů Hbc a FBXO3/UBE2O? Proč je tento postup lepší než kotransfekce?
6. Co znamená „AP“ ve zkratce V5/AP (proč „conjugated with AP“ viz *Fig. 11*)?
7. Proč byla protilátka proti  $\beta$ -aktinu použita pouze u *Fig. 14*?
8. Jaké jsou jednotky osy Y na *Fig. 15a,b*? Z čeho na těchto obrázcích pocházejí chybové úsečky a co vyjadřují?
9. Proč je na *Fig. 15c* jen křivka tání pro referenční gen pro  $\beta$ -aktin? Co vyjadřuje?
10. Proč byla u testu replikace HBV prováděna normalizace s testem XTT? Způsobuje replikace HBV smrt buněk? Nebyla by lepší normalizace k účinnosti transfekce?

**Otázky do diskuze:**

1. Jaký je relativní výskyt proteinů FBXO3 a UBE2O v jaterních buňkách (vzhledem k jiným typům buněk) a co je známo o jejich regulaci?
2. Neuvažovali jste vedle využití siRNA i o opačném přístupu, tj. zvýšení exprese transfekcí plazmidem nesoucím příslušný gen?
3. Jakým způsobem by šlo využít FBXO3 k vývoji antivirotika, jak je navrženo v diplomové práci? Nebylo by vhodnější vyvíjet inhibitor UBE2O?
4. Proč roste produkce proteinu TRIM22 po infekci viry?
5. V diskuzi je navrženo, že by monoubikvitinace proteinu HBc mohla způsobovat přenos HBc do jádra a tím zvyšovat replikaci HBV. U proteinu BAP1 vede monoubikvitinace k přenosu z jádra. Můžete to komentovat?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně    velmi dobře    dobře    nevyhověl(a)

Podpis oponenta: