

## Oponentský posudek diplomové práce Bc. Květy Trávníčkové „Mechanismus regulace aktivace ligandů EGF receptoru prostřednictvím intramembránové pseudoproteasy iRhom a metaloproteasy ADAM17“.

---

Diplomová práce Bc. Květy Trávníčkové byla vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR pod odborným vedením Ing. Kvida Stříšovského, PhD. V diplomové práci se Květa Trávníčková zabývala intramembránovými proteázami z rodiny rhomboidů, zejména pak enzymově deficientní pseudoproteázou iRhom2. Autorka se soustředila na určení vlivu iRhom2 na množství prekurzorů ligandů pro receptor vázající EGF. Pomocí experimentů s tranzientně exprimovanými proteiny autorka ukázala, že iRhom2 snižuje produkci EGF aTGF $\alpha$ . Použití aktivních i neaktivních forem příbuzných proteáz RHBDL2 a RHBDL4 ukázalo, že sledovaný jev zprostředkovávají pouze enzymově neaktivní formy proteáz. Velmi zajímavým a nečekaným se pak jeví zjištění, že iRhom2 může ovlivňovat nejen ligandy pro EGFR, ale i některé další transmembránové proteiny.

Předkládaná diplomová práce je psána v anglickém jazyce a drží se zavedeného členění na kapitoly *Abstract/Abstrakt, Introduction, Aims of the thesis, Material and Methods, Results, Discussion* a *Conclusion*. Závěrečná část pak obsahuje přehled literatury.

Kapitola *Introduction* je přehledná, dostatečně detailní a pokud mohu soudit, tak informace jsou aktuální. Kapitola pokrývá velmi širokou oblast, od mechanismů podílejících se na produkci ligandů pro receptor pro epidermální růstový faktor, přes funkci ADAM proteáz v tomto procesu až po evoluční a funkční vzhled do pseudoproteáz iRhom. Autorka prokazuje široký rozhled, zpracovala značné množství literatury (~160 citací) a na základě těchto informací pak jasně definuje cíle práce (*Aims of the thesis*).

Kapitola *Materials and Methods* obsahuje seznam reagentů a popisy metodických postupů používaných v práci.

V kapitole *Results* autorka prezentuje 14 obrázků, z nichž každý ukazuje výsledky imunoblotů (pravděpodobně ze dvou nezávislých experimentů, s výjimkou Obr. 4.11 a 4.14) a jejich kvantifikaci. Prezentace dosažených výsledků je přehledná a srozumitelná, i když poměrně strohá. Z mého pohledu je nezvyklé, že v této kapitole je nejprve uveden text popisující výsledky a obrázky jsou poté *en bloc* vloženy za text, což nutí čtenáře více listovat diplomovou prací.

V kapitole *Discussion* autorka nejen shrnuje dosažené výsledky, ale také předkládá alternativní metodické postupy a pracovní hypotézy, které pomáhají vysvětlit nesnadno interpretovatelné výsledky. Tato část je zpracována velmi dobře a její závěry jsou logické a podpořené poznatky z literatury. Domnívám se ale, že by textu však prospělo rozdělení na více podkapitol a vložení závěrečného obrázku, který by sumarizoval regulační vlastnosti pseudoproteáz iRhom.

Po jazykové stránce je disertační práce jako celek perfektně zpracována, je bez překlepů a bez stylistických neobratností. Kromě formální stránky je práce pečlivě zpracována i z hlediska srozumitelnosti textu a čtivosti, čemuž pomáhá i vhodné doplnění schematickými obrázky, které umožňují snadnou orientaci v textu. Díky pečlivému zpracování je diplomová práce čtivá a na mnoha místech i poučná. Ojediněle jsou opomenuty některé informace, např. v textu není zmíněna předpovězená molekulová hmotnost iRhom2, pouze na str. 32 autorka uvádí, že exprimovaný iRhom2 vykazuje „different molecular weights than expected“. Druhá připomínka se týká použitého názvosloví. V textu jsou často zmiňovány proteiny rhomboid2 a rhomboid4.

Domnívám se, že pro přesnost by bylo vhodné tyto protein také zmínit v kontextu systematického názvosloví (RHBDL2, popř. RHBDD1/ RHBDL4).

Diplomová práce Bc. Trávníčkové reflektuje snahu porozumět funkci poměrně málo pochopených pseudoproteáz iRhom v rámci tak složitého fenoménu, jakým je produkce ligandů pro EGF receptor. V tomto směru přináší práce nové poznatky, které rozvíjejí řešenou problematiku. Zjištění, že iRhom2 a proteolyticky inaktivní rhomboid proteázy negativně ovlivňují produkci ligandů EGFR a že iRhom2 může ovlivňovat množství i jiných proteinů, než jen ligandů pro EGFR jsou pak nová a nečekaná. V důsledku tedy diplomová práce přináší více otázek, než na kolik jich odpovídá a otevírá tak pole působnosti pro další výzkum.

**Přes výše uvedené připomínky týkající se nedostatků formálního charakteru se domnívám, že předložená práce Bc. Květy Trávníčkové bezezbytku splňuje všechna kritéria kladená na diplomové práce.**

#### **Otázky do diskuse:**

1. Z výsledkové části se zdá, že se autorka potýkala s problémem kvantifikace studovaných proteinů. Což asi není překvapivé, protože ko-transfekce dvou a někdy i tří plazmidů, následný fluorescenční imunoblot a jeho kvantifikace vnáší řadu proměnných, které mohou ovlivnit konečné výsledky. Vliv může mít i buněčný model HEK293ET exprimující SV40 T-antigen a vnesené plazmidy s počátkem replikace SV40 ori.

K tomuto tématu bych měl tři otázky:

- (i) Mohla by autorka navrhnout systém, kde by se množství studovaných proteinů měřilo bez nutnosti western blotu? Například pomocí metody „dot blot“, nebo ideálně přímo v buněčných lyzátech, např. pomocí exprese studovaného proteinu fúzovaného s luciferázou?
  - (ii) Buňky HEK293 je možno transfekovat s vysokou účinností. Je možné sledovat účinek ektopicky exprimovaného iRhom2 na studované proteiny na endogenní úrovni?
  - (iii) Hladiny exprese studovaných proteinů jsou vztahovány k intenzitě celkového buněčného lyzátu. Nebylo by vhodnější normalizovat fluorescenční signál vůči inertnímu proteinu (loading control) a také analyzovat vzorky v technických duplikátech?
2. V této práci byl použit iRhom2 a jako modelové ligandy EGF a TGF $\alpha$ . Chtěl bych se zeptat, proč byla použita tato kombinace? Proč nebyl použit iRhom1, který je exprimován v mnoha tkáních? Také mi není jasné, proč byly použity výhradně EGF a TGF $\alpha$ . EGF není produkováno iRhom-partnerskou proteázou ADAM17 a TGF $\alpha$  byl popsán jako „iRhom2-independent substrate“. Očekával bych tedy zahrnutí i ligandu, na jehož produkci se podílí jak iRhom2 tak i ADAM17, např. Amphiregulin.

Související otázka: Není možné, že snížení hladiny EGFR ligandů pomocí iRhom2 může být způsobeno zvýšeným transportem na plazmatickou membránu a uvolněním do media? Bylo testováno, zdali ke zvýšenému „sheddingu“ studovaných ligandů dochází?

3. Jedním z limitujících faktorů ve studiu proteinů iRhom, a rhomboid-like proteinů obecně, se zdá být špatná dostupnost a kvalita reagensů, zejména pak protilátek. To se projevuje i na nejasnostech týkající se velikosti endogenního i overexprimovaného iRhom2, která v SDS-PAGE neodpovídá předpovězené molekulové hmotnosti. V diplomové práci je používán iRhom2 s HA epitopem, na C-terminu. Bylo by možné vložit jiný epitop na N-konec či v jeho blízkosti, čímž by se umožnilo sledovat změny v iRhom2 indukované proteolýzou a post-translačními modifikacemi?

Z obrázku 14. B je patrné, že ektopická exprese iRhom2-HA indukuje protein o molekulové hmotnosti cca. 130 kDa, který je detekovatelný iRhom2 protilátkou. Je tento protein také detekovatelný protilátkou proti HA epitopu?

V Praze 10. 9. 2019

Tomáš Vomastek

Mikrobiologický ústav AV ČR  
Videňská 1083  
Praha-4