Oponentský posudek na diplomovou práci

Jméno oponenta: doc. RNDr. Jan Brábek, PhD.

Datum: 6. 5. 2019

Autor: Bc. Šárka Boháčová

Název práce: **Proximitní proteom intramembránové serinové proteázy RHBDL4**

Cílem hodnocené práce bylo pokusit se blíže objasnit fyziologickou úlohu proteázy RHBDL4 s využitím metody proximitní proteomiky.

Práce je přehledně členěna na předepsané části. Po abstraktu v anglickém a českém jazyce, podrobném seznamu zkratek a úvodu s cíli práce následuje literární přehled. V literárním přehledu autorka čtenáře nejprve seznamuje se integrálními membránovými proteázami obecně a jejich úlohou v imunitním systému. Následuje kapitola o rodině rhomboidových proteinů bez proteázové aktivity a rhomboidových proteáz, se zvláštním důrazem na protein RHBDL4. Závěrečná kapitola literárního přehledu je věnována proximitní proteomice s návazností na cíle práce. Přehled je čtivý a je z něj patrné, že se autorka důkladně seznámila s relevantní literaturou. V kapitole Materiál a Metody jsou na devíti stranách ve stručné až kondenzované, ale přehledné podobě popsány nejdůležitější metody, použité v diplomové práci.

Kapitola Výsledky začíná popisem tvorby fúzních proteinů pro proximitní proteomiku. Následují podkapitoly o lokalizaci zvoleného fúzního proteinu a jeho stabilní expresi na úrovni endogenního proteinu. Dále je popisována biotinylace proteinů v intaktních živých buňkách a získání proximitního proteomu proteinu RHBDL4. Diskuse výsledků v následující kapitole je zdařilá, svědčí o schopnosti autorky promýšlet výsledky experimentů i konfrontovat své poznatky s aktuální literaturou. Diskuse zahrnuje i problémy, se kterými se autorka potýkala a výhledy do budoucna.

Závěry přehledně shrnují výsledky práce. Autorce se podařilo zavést a následně aplikovat metodu proximitní proteomiky označovanou APEX2. Tato metoda je založena na značení proteinů v blízkosti vybraného cíle biotinem, a to ve fyziologickém prostředí živých neporušených buněk. Značené proteiny byly následně izolovány a detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Analýzou proximitního proteomu proteázy v rámci tří nezávislých experimentů v buněčné linii HCT116 byly zjištěny tři proteiny opakovaně se nacházející v blízkosti RHBDL4: ANXA7, ITGB1 a PLIN3, což naznačuje potenciální úlohu RHBDL4 v buněčném transportu a metabolismu lipidů. Práce je uzavřena obsáhlým Seznamem použité literatury.

Ve své práci autorka využila velké množství metod molekulární a buněčné biologie. Prokázala schopnost provádět komplexní experimenty, kriticky je hodnotit a výsledky uvádět do širších souvislostí. **Práce podle mě splňuje požadavky na diplomovou práci a navrhuji její přijetí.**

Práce je psána dobrou angličtinou, má hezkou grafickou úpravu i obrazovou dokumentaci. K práci nemám formální připomínky.

Mám následující otázky:

Zjistili jste u myší s deficiencí v proteáze RHBDL4 i jiný vliv na imunitní systém, než rozdílné zastoupení B a T lymfocytů?

Jakým způsobem byste analyzovala vliv RHBDL4 na recyklaci integrinů?

Podpis oponenta:

Jan Brábek