

Posudek oponentky na disertační práci Jana Škerleho

Substrate specificity, mechanism and activity regulation of the rhomboid family intramembrane proteases

Jan Škerle se ve své práci věnoval strukturně-funkčním vztahům v molekulách intramembránových proteáz z rodiny rhomboidů. Vybral si dva modelové proteiny, jeden z prokaryotického, jeden z eukaryotického organismu: GlpG z *Escherichia coli* a lidský RHBDL2.

Práce v rozsahu přibližně 140 stran je psaná anglicky a je koncipována jako komentovaný soubor čtyř publikací, které vyšly v prestižních mezinárodních časopisech s vysokým impaktním faktorem. Takto shrnutým výsledkům předchází přehled současného stavu poznání v oblasti intramembránové proteolýzy a rhomboidů (zhruba 20 stran). Disertační práce je zakončena Diskuzí a Závěrem, v nichž jsou výsledky zasazeny do kontextu a shrnuty.

Práce je psaná čtivým stylem, přehledně a pečlivě. Po formální stránce nemám, co bych jí vytkla.

Všechny předkládané publikace jsou komplexní a metodicky bohaté, a proto vyžadovaly spolupráci většího týmu. Jan Škerle u každé publikace uvádí, za kterou část experimentů byl zodpovědný. Je škoda, že nevyužil disertační práci k tomu, aby svůj experimentální podíl komentoval širěji, zejména vezmeme-li v úvahu že tytéž publikace jsou podkladem disertačních prací dalších členů týmu, kteří přispěli do publikací jinými experimenty. V případě první publikace disertant uvádí, že analyzoval interakci proteinu TatA z *Pseudomonas stuartii* s proteázou GlpG z *E. coli*, přičemž připravil řadu mutantních variant TatA. Jedná se tedy o poměrně velký objem experimentální práce, ale její podrobnosti jsou uvedeny zejména v Supplementu první publikace. V disertační práci tedy nejsou vidět a čtenář si musí Supplement sám dohledat.

U druhé publikace disertant deklaruje, že testoval použití fluorogenních substrátů v liposomech a také že klonoval a purifikoval některé proteiny (“some proteins”). Bylo by dobré uvést, které konkrétně.

Největší podíl má Jan Škerle na čtvrté publikaci, která se zabývá modelovým lidským rhomboidem RHBDL2. Podle mého názoru se jedná o průlomovou práci, která vyvrací hypotézu o možné dimerizaci RHBDL2 a zároveň rozvíjí nové metody analýzy interakcí proteinů v membráně.

K práci mám následující dotazy:

1. Předpokládalo se, že dimerizace RHBDL2 se podílí na regulaci jeho aktivity. Pokud RHBDL2 nedimerizuje (a pokud by se tak nedělo ani v membránách jiného lipidového složení), může se na jeho regulaci podílet interakce s jiným membránovým proteinem?
2. Bylo by možné analyzovat dimerizaci RHBDL2 i jinak než s využitím fluorescenčních proteinů?
3. Je legitimní považovat RHBDL2 za model do té míry, aby se dalo předpokládat, že ani jiné eukaryotické rhomboidy nedimerizují?

4. V literárním přehledu uvádíte, že rostliny mají více rhomboidů než živočichové, avšak jejich role většinou není známá. Máte soukromou hypotézu, proč mají rostliny rhomboidů více?

Moje výhrady k disertační práci Jana Škerleho nejsou nijak zásadní. Oceňuji metodickou šíři sahající od enzymologie a proteinové chemie k buněčné biologii. Je zjevné, že disertant si osvojil celou řadu metod, a co je důležitější, na vývoji metod se také podílel. Příspěvek k designu nových, obecně použitelných fluorescenčních substrátů pro intramembránové proteázy považuji za neméně důležitý, než naplnění badatelských cílů - charakterizace substrátové specifity GlpG a nová zjištění ohledně dimerizace RHBDL2. V neposlední řadě disertant prokázal schopnost napsat vědecký text.

Disertační práci Jana Škerleho proto doporučuji k obhajobě.

V Praze, 18.9.2020

Doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.