

Školitelský posudek

Student: Matouš Palek

Školitel: MUDr. Libor Macůrek, PhD

Téma diplomové práce: Funkce RAD18 v ubikvitinaci na místech dvouřetězcových DNA zlomů

Studijní program: Biologie – Buněčná a vývojová biologie

Cílem předkládané diplomové práce bylo vyhodnotit význam zárodečných mutací genu *RAD18* nalezených u českých nádorových pacientů a zároveň přispět k porozumění funkce RAD18 v opravě dvouřetězcových zlomů DNA. Pomocí komplementačních esejů v buňkách postrádajících endogenní RAD18 byly popsány dva nové typy mutací vykazující narušenou schopnost proteinu lokalizovat do buněčného jádra nebo přímo do míst opravy DNA. Proti našemu původnímu očekávání byla frekvence mutací *RAD18* v české populaci poměrně nízká a nebylo možné spolehlivě vyhodnotit míru rizika rozvoje nádorů u nosičů mutací *RAD18*. Větší část diplomové práce se proto věnuje problematice zapojení RAD18 do opravy dvouřetězcových zlomů DNA. Zde se studentovi podařilo prokázat, že přítomnost RAD18 negativně ovlivňuje schopnost vazby jiných proteinů vč. 53BP1 v místech poškození DNA. Tato vlastnost souvisí se schopností RAD18 vázat ubiquitin konjugovaný na histony a další komponenty chromatinu.

V průběhu vypracování diplomové práce se student seznámil s komplexní problematikou opravy DNA a osvojil si řadu experimentálních postupů. Kromě běžných buněčně a molekulárně-biologických technik úspěšně purifikoval RNF168 protein z bakterií a optimalizoval náročnou *in vitro* ubiquitinační esej. Nejdůležitější technikou, kterou student rutinně využíval je bezesporu získání a vyhodnocení obrazu pomocí mikroskopu s vysokou propustností. Tyto analýzy prokázaly, že kompetice v lokalizaci RAD18 a 53BP1 proteinů do subnukleárních struktur je největší v průběhu replikace. Na základě dostupné literatury a získaných experimentálních dat byla formulována hypotéza, že RAD18 spolu se svým interakčním partnerem SLF1 snižuje vazbu 53BP1 na postreplikační chromatin, čímž může potlačit opravu prostřednictvím NHEJ dráhy ve prospěch homologní rekombinace. Tato atraktivní hypotéza bude předmětem našeho dalšího studia. Za využití experimentálních postupů osvojených při vypracování této práce student přispěl k dokončení tří tematicky odlišných publikací.

Experimentální práci student vykonával s příkladným nadšením, aktivně se podílel na plánování pokusů a získaná data samostatně vyhodnocoval. Kladně hodnotím jeho schopnost hledat alternativní řešení v případě technických problémů i vytrvalost při optimalizaci náročných experimentálních postupů. Dle mého názoru je úroveň Matoušových teoretických znalostí i experimentálních dovedností vynikající a laťka, kterou touto prací nasadil, je výzvou pro moje budoucí studenty. Závěrem bych rád shrnul, že předkládaná práce splňuje veškeré požadavky na magisterskou práci a vřele ji doporučuji k obhajobě s hodnocením výborně.

V Praze 25.8.2021

MUDr. Libor Macůrek, PhD