

## **Oponentský posudek na diplomovou práci Aleny Randákové : Vliv alkuronia na spřáhování muskarinových receptorů s G-proteiny.**

Předkládaná práce se zabývá alosterickou interakcí mezi vazbou modulátoru alkuronia na muskarinové receptory a agonistou indukovanou aktivací G-proteinů.

Práce má standardní členění a rozsah 60 stran textu. Po krátkém Úvodu, vymezení Cílů práce a Seznamu použitých zkratkách následuje obsáhlá Teoretická část. Začíná obecným tříděním mezibuněčné komunikace a speciálně jsou charakterizovány vlastnosti a struktura receptorů spřažených s G-proteiny. Dále je popsán nejprve obecně průběh signalizace prostřednictvím G-proteinů, třídění G-proteinů a efektorů s nimi spojených. Podrobněji jsou uvedeny různé aspekty struktury a funkce muskarinových receptorů a struktura jejich vazebných míst až na úroveň předpokládané funkce jednotlivých aminokyselin. Dále je rozebráno jak konkrétní podtypy muskarinových receptorů interagují s různými G-proteiny. Modulace činnosti muskarinových receptorů alosterickými mechanismy je vysvětlena v posledním oddílu Teoretické části.

V části Metody jsou přehledně uvedeny všechny použité experimentální postupy a metody měření stejně jako i metody analýzy a zpracování naměřených dat.

Výsledky práce můžeme rozdělit zhruba do tří nestejně dlouhých oddílů. V prvním kratším oddílu se autorka zabývala charakterizací vazby muskarinového antagonisty n-methyl skopolaminu k různým podtypům muskarinových receptorů exprimovaných v CHO buňkách. Tato část slouží ke kvantifikaci exprese jednotlivých receptorů v příslušných liniích buněk a ke stanovení jejich vazebných vlastností. V dalších dvou částech studovala alkuroniem vyvolanou alosterickou inhibici karchacholem navozené aktivace receptorů. Jako míru aktivace jednotlivých podtypů muskarinových receptorů používala měření vazby značeného GTP $\gamma$ S, což je nehydrolyzovatelný analog GTP, který sloužil ke kvantifikaci aktivace G-proteinů. Účinky sledovala napřed v buněčných membránách, které obsahují všechny G-proteiny bez rozlišení. Pak celou sérii měření zopakovala v detailnější podobě, kde rozlišila pomocí protilátek jak jsou aktivovány jednotlivé podtypy G-proteinů. Oběma částem s výsledky měření vždy předchází kapitola popisující optimalizaci experimentu – to je nalezení nejvhodnějších koncentrací složek a podmínek měření, které poskytovaly nejpřesnější výsledky.

V závěrečné tabulce jsou porovnány obojí výsledky mezi sebou i se změnami v navazování karchacholu, které byly publikovány v literatuře.

V Diskusi autorka přiměřeně rozebírá různé aspekty a možné příčiny neúplné shody výsledků získaných na membránách a na identifikovaných G-proteinech. Také se zabývá interpretací odlišného účinku alkuronia na aktivaci G-proteinů a vazbu karchacholu publikovanou v literatuře.

Práci zakončuje stručné Shrnutí a seznam použité literatury o 74 citacích.

Práce je výsledkem dlouhodobé a systematické experimentální činnosti autorky a přináší nové poznatky. Určené cíle byly splněny, celkově práci hodnotím jako velmi kvalitní a doporučuji, aby byla hodnocena nejvyšším stupněm.

RNDr. Jan Krůšek CSc.



Kromě drobných formálních připomínek k textu, které již byly zahrnuty v konečné verzi práce mám dvě otázky, které nijak nesnižují hodnotu práce:

Bazální vazba GTP  $\gamma$ <sup>[35]</sup>S na membrány a jednotlivé podtypy G-proteinů v tabulce na str. 49 je alkaloniem ovlivněna buď málo nebo vůbec ne. Předpokládá se, že je způsobena konstitutivní aktivitou příslušného muskarinového receptoru, nebo aktivitou jiných receptorů spřažených s G-proteiny, které mohou endogenně v buňkách existovat?

V optimalizačních experimentech jste zkoumala, jaká koncentrace GDP je optimální pro měření vazby GTP  $\gamma$ <sup>[35]</sup>S. Všechny grafy ukazují, že pro nižší koncentrace GDP je vazba vyšší. Proč je nutné vůbec GDP přidávat?