

**Oponentský posudek k disertační práci Mgr. Zdenky Drastichové "Cell signalling and molecular complexes of the TRH receptor".**

Disertace je psána anglicky, což je třeba hodnotit jako výrazný klad; gramaticky je jazyk zvládnut na výborné úrovni.

Po jednostránkovém "Introduction" a půlstránkové "Aim of the thesis" následuje rozsáhlý přehled literatury o receptorech spřažených s G-proteiny (cca 40 stran), popis metodiky (7 stran), výsledková část (36 stran), Diskuse na 13 stranách a asi dvoustránkové "Conclusions". V disertaci je také strukturovaný obsah a seznam zkratk. Soupis literatury zahrnuje něco přes 250 citací. V disertaci jsou svázány také jako "Supplement" tři "full-length" časopisecké práce Mgr. Drastichové (dvě publikované: "Journal of Cellular Biochemistry" a "Cell Structure and Function" a jedna přijatá k publikaci do Acta Biochimica et Biophysica Sinica). V samostatných brožurkách je přiložen krátký autoreferát (23 stran formátu A5) v české i anglické verzi.

Práce řeší problematiku exprese proteinů a jejich redistribuce proteinů v plasmatických membránách po dlouhodobé stimulaci TRH receptoru a tvorby/stability komplexu receptor/G-protein na modelu transfekované buněčné linie HEK293 (THR-R1 a G<sub>q/11</sub>). Redistribuce byla sledována pomocí subcelulární frakcionace gradientovou centrifugací a analýzy získaných frakcí pomocí 2D elektroforézy, imunoblotingu a hmotnostní spektrometrie. Byla také měřena vazba ligandu ([<sup>3</sup>H]TRH) na membrány a míra stimulace receptoru pomocí vazby [<sup>35</sup>S]GTP-γ.

Mgr. Drastichová zjistila, že po dlouhodobé stimulaci TRH-R dochází ke redistribuci řady proteinů; našla 42 takových případů, identifikovaných pomocí elektroforézy a MALDI TOF/TOF analýzy. Značná část změny lokalizace probíhá v mitochondriální membráně, což ukazuje na úzkou vazbu mezi stimulací GPCR a mitochondriální funkcí, především zřejmě v návaznosti na metabolismus vápníku. Je naznačeno také důležité spojení některých takto identifikovaných proteinů s apoptózou. Jednoznačnou identifikaci těchto proteinů, díky sofistikované instrumentální analýze a pravděpodobně značnému pracovnímu nasazení, považují za jeden z nejvýznamnějších přínosů předkládané disertace.

V další části se autorka věnovala analýze komplexů TRH-R/G-protein v závislosti na aktivaci a desenzitizaci. Kvantifikaci komplexů prováděla především pomocí separace nově zavedenou metodou nativní elektroforézy, blotingu a následné denzitometrie. Tento postup je inovativní – jeho úspěšná aplikace autorkou totiž dovoluje frakcionovat a charakterizovat proteinové komplexy za šetrných podmínek, zachovávajících jejich nativní konformace. Bylo tím potvrzeno, že TRH-T a G<sub>q/11</sub>, podobně jako některé jiné GPCR, mohou existovat v pre-asociované formě a že stabilita tohoto komplexu je významně ovlivněna vazbou TRH.

Autorka v předkládané disertaci předkládá extenzivní penzum dobře zvládnuté experimentální práce, provedené na základě adekvátní moderní technologie a s výsledky z velké části prověřenými publikací v recenzovaných časopisech. Značnou rezervu cítím k příliš rozsáhlému úvodu, který podrobně mapuje takřka všechny aspekty GPCR, ale v disertaci použitý a relevantní receptor/G-protein je odbytý ve dvou odstavcích. Použitý přehled by si zasluhoval publikovat v některém českém časopise (třeba i bez IF), volajícím po kvalitních příspěvcích.

Mé konkrétní připomínky:

Kromě několika banálních překlepů a poněkud závažnějšího přestupku na str. 15: latinské názvy kmenů (phyla) by měla být s velkým písmenem; sponges je anglický termín pro Porifera (když ostatní jsou latinsky, proč to plést dohromady s angličtinou?) je v metodice na řadě míst zřetelně zaměněno ve specifikaci objemu řecké mí ( $\mu$ ) za m, což může mít zásadní význam.

Str. 52: zkratky pro inositol trifosfát jsou uvedeny nesprávně.

Tyto chyby ukazují na politováníhodné podcenění redakce výsledného textu.

Str. 55: poněkud nejasný popis uspořádání experimentu; nejsou uvedeny objemy, ve kterých vazebné pokusy probíhaly, není uvedena koncentrace membránových proteinů.

Str. 61, 62; fig. 5.1 B; fig. 5.2: je nejasné, zda výsledky jsou vztaženy na jednotku objemu, nebo na množství proteinu (není výslovně uvedeno).

V textu disertace (resp. v grafech nebo tabulkách) není v některých případech uvedena kvantifikace denzitometrie (ačkoliv např. v Supplement – ve článku předloženém k publikaci některé příslušné grafy nechybí).

Po formální stránce obsahuje práce všechny všechny náležitosti, autorka rozvinula naše poznatky o biochemii receptorů asociovaných s G-proteiny a na základě této disertace doporučuji udělení titulu PhD.

RNDr. Jan Říčný, CSc.

Psychiatrické centrum Praha

Ústavní 91

181 03 Praha 8