

## Posudek školitele na diplomovou práci Zdeny Drastichové s názvem „Analýza proteinové kompozice buněčných membrán s pomocí 2D elektroforesy“

Zdena Drastichová vypracovala svoji diplomovou práci v Laboratoři molekulární farmakologie na Katedře fyziologie a vývojové biologie, PřF UK.

Cílem diplomové práce sl. Drastichové bylo využít techniku 2D elektroforesy a imunoblot (western blot) pro identifikaci změn v proteinovém složení buněčné linie e2m11 - HEK293 po dlouhodobé hormonální stimulaci. Techniku imunoblot použila pro ověření, že v této linii dochází k poklesu alfa podjednotek G proteinů třídy Gq/G11. Jedná se o linii připravenou dvojnásobnou transfekcí – nejprve cDNA obsahující gen receptoru pro thyreoliberin, TRH; v dalším stupni byly tyto buňky transfekovány cDNA nesoucí gen pro G11 alfa protein. Dlouhodobá stimulace TRH vede k poklesu nejen exogenní G11 alfa, ale i endogenních proteinů Gq alfa a G11 alfa - jedná se o specifickou změnu – jiné G proteiny se nemění. Vlastním preparátem který studentka používala pro elektroforetickou separaci byl *post-nukleární supernatant*, který byl připraven centrifugací 3 min při 3000xg z buněčného homogenátu. Gely byly barveny nejprve stříbrem, později fluorescenčními sondami Sypro Ruby (celkové bílkoviny) a Pro Q Diamond (fosforylované bílkoviny). Pro vyvolání imunoblotů použila specifické protilátky připravené proti C-koncovému dekapaptidu, který je identický u G11 a Gq alfa.

### *Za nejlepší výsledky experimentální práce považují:*

- seriozní ověření, že s pomocí 2D elektroforesy je možné reprodukovatelně rozlišit pět membránově vázaných alfa podjednotek třídy Gq/G11 (výsledek imunoblotů v membránovém sedimentu),
- hormonální stimulace vede k poklesu či vymizení všech isoform,
- reprodukovatelné rozlišení 200-250 bílkovin při barvení stříbrem,
- reprodukovatelné srovnání kontrolních hormonem-ovlivněných vzorků,
- hormonální stimulace nemění kompozici bílkovin při rozlišení 200-250 bílkovin při barvení stříbrem.

Výsledky získané s pomocí fluorescenčních sond Sypro Ruby a Pro Q Diamond bude třeba ještě ověřit s pomocí hmotnostní spektrografie při aplikaci většího množství celkové bílkoviny na gel.

Diplomovou práci považují za kvalitní jak z hlediska výsledků, tak z hlediska formy jakou je připravena. Literární úvod je psán stylem, ze kterého je zřejmé, že studentka problematice skutečně rozumí. Vyjadřuje se čtivě i přesně, což je u dnešních studentů (bohužel) spíše výjimkou než pravidlem. Epicky nadaný student zahltí školitele množstvím nepřesného textu; student bez schopnosti vyjádřit co dělal produkuje metodické návody. Otázka „proč jste to dělal“ budí u studenta překvapení se spontánní odpovědí – „no přece – řekl mně to školitel“. Bylo proto pro mne úlevou i potěšením číst text této práce. Za nepřesnosti, drobné chyby a slangové výrazy je třeba kárat školitele, který nenašel dostatek času aby na ně studenta upozornil.

Závěrem bych chtěl poděkovat panu profesorovi G. Entlicherovi a Katedře biochemie PřF za to, že mně bylo umožněno spolupracovat se sl. Drastichovou. Studenti biochemie jsou velmi kvalitně připraveni pro experimentální vědeckou práci jak po stránce teoretické tak praktické. Uvědomují si, že základem vědecké práce je experiment a jeho kritické hodnocení.

Doc. RNDr Petr Svoboda, DrSc