

## Posudek na doktorandskou disertační práci Mgr. Kataríny Lichnerové nazvanou REGULACE TRANSPORTU NMDA RECEPTORŮ V SAVČÍCH NEURONECH

Předložená disertační práce Mgr. Lichnerové zaměřená na studium transportu NMDA receptorů v savčích neuronech byla vypracována na základě výsledků získaných v průběhu jejího doktorandského studia a experimentální práce na Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze. Vlastní disertační práce vychází z výsledků publikovaných ve třech prestižních mezinárodních časopisech s vysokým impakt faktorem (Front. Cell. Neurosci. – IF 4.3, J. Biol. Chem. – IF 4.3 a J. Neurochem. – IF 4.0). Kopie všech těchto článků jsou in extenso přiloženy k disertační práci. Kromě uvedených prací je Mgr. Lichnerová spoluautorkou dalších pěti publikací ve významných mezinárodních časopisech.

Přestože studiu NMDA receptorů je vzhledem k jejich zásadnímu významu v synaptickém přenosu a synaptické plasticitě CNS dlouhodobě věnována velká pozornost, mechanismy regulace povrchové exprese těchto receptorů a také regulace jejich funkčních vlastností byly dosud zkoumány jen v omezené míře. Téma disertační práce zaměřené právě na tyto aspekty fyziologie NMDA receptorů lze tedy považovat za velmi dobře zvolené a aktuální. Poznatky v této oblasti jsou zajímavé nejen z pohledu základního poznání vlastností NMDA receptorů, ale mohou být potenciálně užitečné pro budoucí vývoj látek s vhodnými modulačními účinky na tyto receptory.

Vlastní disertační práce je zpracována standardním způsobem a je přehledně rozčleněna do několika hlavních kapitol a podkapitol. Úvodní část (literární přehled) poskytuje přehledný souhrn aktuálních informací týkající se NMDA receptorů, včetně popisu jejich struktury a funkce, intracelulárního transportu jejich podjednotek a také *N*-glykosylace, která je nezbytná pro správnou funkci těchto receptorů. Literární přehled je vhodně doplněn čtyřmi ilustračními obrázky. Jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují a obsahují veškeré klíčové relevantní informace související s daným tématem.

Specifické cíle disertační práce byly jasně formulovány. V metodické části autorka srozumitelně a poměrně detailně popsala všechny klíčové metodické postupy použité v práci, včetně složení roztoků a medií, i dalších důležitých podrobností. Získané výsledky jsou popsány na 30 stranách, včetně 25 složených obrázků a jedné tabulky. V následující diskuzi (9 stran) autorka tyto výsledky řádně a dostatečně podrobně rozebrala v kontextu současného poznání. Následující samostatný souhrn poskytuje přehled hlavních výsledků a ve stručném závěru je naznačen potenciální význam získaných poznatků. V textu lze najít pouze několik drobných překlepů, které nijak nesnižují celkově vysokou kvalitu předložené práce.

S pomocí vhodně navržených modelů a experimentů využívajících cílené mutagenese se autorce podařilo získat řadu cenných nových výsledků a splnit prakticky všechny hlavní záměry práce. Ukázalo se, že různé kombinace různých typů GluN1 a GluN2 podjednotek receptorů se liší mírou povrchové exprese v heterologních buněčných liniích i neuronech. V molekulách zkoumaných podjednotek NMDA receptorů byly identifikovány domény, které mají zásadní vliv v regulaci transportu těchto podjednotek k buněčnému povrchu. Pomocí molekulárně-biologických, biochemických a mikroskopických technik se podařilo identifikovat *N*-glykosylované asparaginové zbytky v GluN1 podjednotce potřebné pro

transport NMDA receptorů z endoplazmatického retikula na buněčný povrch. Výsledky elektrofyziologických měření prokázaly, že komplexní *N*-glykanové struktury mají vliv na funkční vlastnosti nativních NMDA receptorů. Nové poznatky získané v této práci přispívají k objasnění molekulárních mechanismů regulace povrchové exprese a funkčních vlastností různých podtypů NMDA receptorů a mohou napomoci k lepšímu porozumění etiologie některých neurologických onemocnění spojených s abnormální regulací NMDA receptorů.

#### Otázky do diskuse:

1. Na str. 11 se uvádí, že NMDA receptory složené z GluN1 a GluN3 podjednotek se aktivují pouze pomocí glycinu. Znamená to, že funkce těchto receptorů není vůbec ovlivněna glutamátem? Vzhledem k relativně vysoké koncentraci glycinu přítomného v extracelulárním prostředí CNS jsou tyto receptory patrně stále v aktivovaném stavu. Jaké to může mít fyziologické důsledky?
2. Velmi zajímavá je problematika desensitizace/inaktivace NMDA receptorů. Na str. 12 je uvedeno: „Při fyziologické nebo zvýšené koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů dochází u NMDA receptorů během aplikace glutamátu k postupnému snížení proudových odpovědí. Je tedy zřejmé, že zvýšením intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů dochází k inaktivaci NMDA receptorů.“ Bylo nějak prokázáno, že se  $Ca^{2+}$  ionty váží přímo na NMDA receptory v oblasti vnitřní strany membrány a tak ovlivňují jejich aktivitu, nebo se jedná o nějaký jiný mechanismus?
3. Jakým způsobem se liší synaptická a extrasynaptická exprese NMDA receptorů složených z různých podjednotek? Je něco známo o možných odlišnostech mechanismu regulace transportu podjednotek NMDA receptorů do synaptické a extrasynaptické membrány neuronu?
4. Proč byla analýza *N*-glykanového složení NMDA receptorů prováděna na mozečkových lyzátech právě 5-8 denních potkanů? Je nějaký speciální důvod pro použití tkáně mozečku pro tento účel? Nemohly být získané výsledky poněkud zkresleny přítomností gliových buněk, které také exprimují NMDA receptory? Domníváte se, že se míra *N*-glykosylace NMDA receptorů v neuronech mění v průběhu vývoje?

Závěrem lze konstatovat, že nadprůměrně vysoká úroveň předložené disertační práce (po formální i obsahové stránce) jednoznačně dosvědčuje, že Mgr. Lichnerová je nadanou mladou vědeckou pracovnící, která se výborně orientuje ve studované problematice a je schopna nejen prakticky provádět technicky náročné vědecké experimenty, ale výsledky svých experimentů také náležitým způsobem vyhodnotit a zpracovat. Je evidentní, že autorka během své práce získala mnohé praktické zkušenosti s aplikací moderních molekulárně-biologických, biochemických a fyzikálně-chemických technik ve fyziologicky orientovaném výzkumu. Závěrem je třeba uvést, že disertační práce svojí kvalitou zcela splňuje veškeré požadavky kladené na tento typ práce a proto doporučuji, aby Mgr. Lichnerové byl po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D.

V Praze 28.8.2018

Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.  
Katedra fyziologie  
Přírodovědecká fakulta UK