



Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze

Prof. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.
Hlavova 2030
127 43 Praha 2

Tel +420 220183 218

31.5. 2021

Oponentský posudek na práci

“Molecular mechanism of Cannabinoid receptor 1 regulation by SGIP1”

(disertační práce)

Mgr. Michaela Dvořáková

Paní Mgr. Michaela Dvořáková předkládá disertační práci, vypracovanou na Ústavu molekulární genetiky AV ČR pod vedením Doc. Jaroslava Blahoše. Práce je předkládána jako plná disertační práce o 104 stranách s rozsáhlými přílohami, což je pro mne příjemná změna. K práci jsou vedle experimentální přílohy rovněž přičleněny dvě publikované práce, z jejichž výsledků disertace vychází.

Práce začíná velmi přehledně zpracovaným úvodem, stručným shrnutím použitých metodik a reagentů, shrnutím výsledků a závěrečnou velmi pěkně a srozumitelně zpracovanou diskusní částí.

V úvodu autorka shrnuje současný stav informací o receptorech spojených s G-proteinem. Vzhledem k obrovské šíři problematiky se velmi rozumně rozhodla (po stručném úvodním přehledu typu receptorů) věnovat se proteinům, které jsou hlavním předmětem jejího studia, a to kanabinoidnímu receptoru 1 a jeho poměrně nedávno objeveným interakčním partneru, proteinu s názvem SGIP1, jehož název se sama autorka moudře rozhodla nepřekládat, a proto to nebudu zkoušet ani já. (Případá mi symptomatické, že

k pojmenování nového proteinu jsou zapotřebí neméně enigmatické názvy tří dalších proteinů).

Kanabinoidní receptor 1 je mimořádně významný zástupce receptorů z rodiny GPCR, který hraje více či méně popsanou roli v ovlivňování tak důležitých dějů, jako je regulace pohybové aktivity, vnímání strachu, přijímání potravy, prožívání emocí, kognitivní funkce, paměť nebo vnímání bolesti. Není divu, že takto významný receptor se stal objektem intenzivního studia, přesto se mi (nejen z předloženého přehledu v úvodu disertační práce) zdá, že CB1R patří mezi mnohem méně prozkoumané zástupci GPCR než například GABA_R nebo mGluR. Docela by mne zajímalo, kdyby disertantka při obhajobě vysvětlila, jestli jsou k tomu hlubší funkční nebo strukturní důvody.

V laboratoři školitele byl před několika lety identifikován protein SGIP1 jako interakční partner CB1R. Stalo se to pomocí metody dvou hybridů v kvasinkách (yeast two hybrid system) a koimunoprecipitací; příslušná publikace, na níž se disertantka významně podílela, je přílohou předkládané disertační práce. Autoři prokázali, že koexprese SGIP1 ovlivňuje signální vlastnosti receptoru, brání jeho internalisaci, stabilisuje asociaci beta-arrestinu s aktivovaným receptorem a inhibuje signální dráhu ERK1/2.

Hlavní částí předkládané disertační práce je však popis a analýza vlastností delečního mutantu SGIP1, a to jak v myší buněčné linii, tak i na myším modelu. Disertantka připravila v laboratoři školitele na UMG AV ČR a ve spolupráci se skupinou Radka Sedláčka v Biocevu myší linii s vyřazeným genem pro SGIP1 a studovala fyziologii myši s touto genovou delecí. Spolu se svými spolupracovnicemi zjistila, že delece SGIP1 nezměnila u experimentálních zvířat pracovní paměť a senzomorické učení, ale omezila úzkost a depresi v experimentálních modelech, stejně jako vnímání bolesti. Další vlivy na chování myši byly závislé na pohlaví: samice vykazovaly zrychlenou extinkci averzivní vzpomínky a samci vykazovali abnormální příznaky závislosti na kanabinoidech. Určitým překvapením je skutečnost, že delece SGIP1 nevedla ke změně hmotnosti experimentálních myši; předpokládám, že pracovní hypotéza byla, že delece SGIP1 ovlivní příjem potravy a tím i tělesnou hmotnost myši. Autorka uzavírá, že myší model s vyřazeným genem prokazuje významnou roli SGIP1 jako interakčního partnera CB1R při regulaci jeho aktivity.

Disertantka je autorkou dvou prací bezprostředně spjatých s výsledky, které v disertaci představuje (obě ve velmi dobrých, respektovaných oborových časopisech s náročným recenzním řízením) a dalších dvou prací, s tématem disertace spjatých volněji.

Na Web of Science jsem ke včerejšku našel celkem 51 citací na tyto práce, což považuji za velmi dobré.

Z formálního hlediska je práce velmi pečlivě zpracovaná: má slušný obrázkový aparát, minimum překlepů a pokud mohu soudit, angličtina je velmi dobrá.

Metodické přístupy shrnuté stručně v disertaci jsou zajímavé a pro mne často nové: vedle standardních molekulárně biologických metod jsou to zajímavé behaviorální testy u genově modifikovaných myší včetně metod statistické analýsy, které u těchto komplexních jevů jsou kriticky důležité pro interpretaci výsledků.

K této práci mám jen několik dotazů:

1/ Základním zjištěním, ze které disertace vychází a které je podstatou práce Hájkové et al. z r. 2016, je identifikace SGIP1 jako interakčního partnera CB1R. Byly vedle kvasinkového dvojhybridního systému a koimunoprecipitace provedeny další studie (plasmonová resonance, interferometrie, zhášení fluorescence...), které by umožnily vazbu obou proteinů přesněji kvantifikovat?

2/ Disertace nese název „molekulární mechanismus regulace CB1R proteinem SGIP1“. Jaký je tedy onen mechanismus interakce? Uvědomuju si, že mluvíme o membránově vázaném proteinu se 7 transmembránovými úseky, ale v dnešní době exploze cryoelektronové mikroskopie by nemělo být nemožné strukturu získat. Ví disertantka o takových pokusech o určení struktury kanabinooidního receptoru?

3/ Našel jsem několik PDB záznamů o popisujících 3D struktury SGIP1. Jedná se o jednotlivé domény toho proteinu (Shimada et al., 2016, Sci Rep 6: 19565-19565). Dají se tyto (nebo jiné) struktury využít k identifikaci strukturních rysů nezbytných pro interakci obou proteinů? Pracuje disertantka nebo její spolupracovníci na přesnějším zmapování této interakce?

5/ Jak si disertantka vysvětluje skutečnost, že delece SGIP1 nemění hmotnost experimentálních myší? Co to znamená pro potenciální využití SGIP1 jako cíle terapeutického zásahu pro terapii obesity?

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Michaely Dvořákové zcela naplňuje i velmi náročné požadavky na tento typ práce, a plně ji proto doporučuji k obhajobě.