



**Oponentní posudek k dizertační práci 'Studium buněčné signalizace iniciované TRH receptorem',  
vypracované Mgr. Radkou Trubačovou**

**Oponent:** Josef Lazar, Ph.D., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Předložená práce shrnuje výsledky široké oblasti výzkumu na poli buněčné signalizace prostřednictvím receptoru pro tyreoliberin. Práce svým obsahem a především rozsahem splňuje očekávání kladená na dizertační práce na Univerzitě Karlově. Práce je přehledně uspořádána, je dobře rozčleněna do logických částí, a obsahuje pouze zanedbatelný počet pravopisných chyb. Práce je psána v českém jazyce, což je u výzkumu na mezinárodní úrovni škoda. Do budoucna bych doporučil značení G proteinových podjednotek v pořadí jméno proteinu ('G'), druh podjednotky (' $\alpha$ '), podskupina podjednotky ('q', '11', ap.). Tento způsob dává logický smysl (od obecnějšího k detailnějšímu), je konzistentní s pojmenováním dalších podjednotek (např G $\beta$ 1, nikoliv G1 $\beta$ ), a je v současné literatuře standardem.

Předkládaná práce je konzistentně zaměřena na signalizaci receptorem TRHR, avšak širší jejího záběru je značná. Práce zahrnuje velký počet molekul signalizační kaskády receptoru TRHR: agonisty (TRH, TAL), antagonistu MDL, různé G proteinové podjednotky (G $\alpha$ : G $\alpha$ q, G $\alpha$ 11, G $\alpha$ s, G $\alpha$ i; G $\beta$  a G $\gamma$ ), arrestiny 2 a 3, kinázu GRK2, fosfolipázu PLC $\beta$ , kaveolin, cAMP, vápenaté ionty, a další molekuly (včetně jejich kombinací) účastníci se signalizace receptorem TRHR. Snahou práce evidentně bylo pochopit signalizaci receptoru TRHR v celé její komplexnosti. Tato snaha je jistě chvályhodná avšak dle mého názoru do určité míry omezovala autorku v hloubce zkoumání. Řada pozorovaných jevů by si zasloužila podrobnější studium, které by umožnilo detailnější interpretaci, jež by následně vedla k lepšímu porozumění. Předložená práce se proto do jisté míry jeví jako rozsáhlý seznam výsledků, z nichž však ne vždy vyvstává ucelený obrázek zkoumaného jevu. Poměrně často jsou předkládané výsledky vzájemně nekompatibilní, přičemž příčina nesouladu nebývá experimentálně či přesvědčivě argumentačně identifikována. Přitom se zdá, že lepší analýza by mohla řadu pozorovaných jevů vysvětlit.

Svůj dojem nižší pozornosti věnované porozumění získaným datům bych si dovilil ilustrovat na příkladu obrázku 8 na straně 53, ukazujícího immunoblot detekující úroveň exprese proteinu TRHR v buněčných liniích TRY-1, GH1 a E2M11. Ukázán je pouze výřez v oblasti 45 kDa, tj. očekávané molekulové hmotnosti nemodifikovaného TRHR. Z obrázku se bohužel nedozvídáme nic o koncentraci proteinu TRHR1-YFP (dále extenzivně zkoumaného) v buněčné linii TRY-1, vytvořené autorkou. Zato se, poněkud překvapivě, dozvídáme, že buňky TRY-1 pravděpodobně exprimují nemodifikovaný TRHR v množství několikanásobně převyšujícím expresi v hypofyzární buněčné linii GH1, uváděné jako příklad primárních cílových buněk TRH (endogenního agonisty TRHR). O zdroji linie TRY-1, buňkách HEK293, se přitom píše, že "u nich TRHR pravděpodobně není endogenně vůbec exprimován (Atwood et al., 2011)". Jednou z možných interpretací obr. 8 je, že buňky HEK293 (použité pro přípravu linie TRY-1) endogenně exprimují několikanásobně vyšší množství TRHR než buňky GH1. Pozoruhodné v tomto případě je, že buňky HEK293 nereagují (obr. 10) na stimulaci prostřednictvím TRH zvýšením koncentrace vápníku. Otázkou pak je, proč buňky HEK293 přes vysokou endogenní přítomnost TRHR nereagují na TRH, a zda jsou vůbec vhodným systémem pro studium signalizace TRHR. Další možnou interpretací obr. 8 je, že pro přípravu buněk TRY-1 byla nedopatřením použita jiná buněčná linie než HEK293. Konečně, možné je i, že použité protilátky nedetekovaly TRHR, nýbrž jiný protein. Ani jedna z těchto interpretací bohužel nebudí důvěru ve výsledky získané s buňkami TRY-1. Pozoruhodnost a důležitost výsledku z obr. 8 zůstala v záplavě dalších výsledků bez povšimnutí autorkou. Úroveň exprese proteinu TRHR1-YFP, klíčová pro interpretaci veškerých dat získaných s buňkami TRY-1, zůstala nezjištěná či neuvedená.

Prosím proto Mgr. Trubačovou, aby během obhajoby ukázala celý blot z obr. 8 (nejen oblast okolo 45 kDa), ideálně všechna 3 jeho opakování (zmiňená v popisu obrázku), a interpretovala výsledky získané s buňkami TRY-1 na základě informací o relativních koncentracích nemodifikovaného TRHR a fluorescentně značeného TRHR-YFP. V souvislosti s kvantitativní interpretací immunoblotů pak upozorňuji na možné problémy vyplývající ze saturace použitého filmu, a na to, že vztah mezi intenzitou bandy na filmu a koncentrací detekovaného proteinu lze aproximovat jako lineární pouze pro bandy o nízké intenzitě (což se jeví problematické nejen u obr. 8, ale též u obr. 35, 36 a 38).

Určité nedostatky v interpretaci získaných dat jsou přítomné i v jiných částech práce. Jako podceněné a téměř nediskutované se mi jeví efekty poměrů koncentrací endogenně a exogenně exprimovaných komponent studovaných signálních kaskád (v buňkách TRY-1, E2). Např. porovnání obrázků 23 a 24 ukazuje, že stimulace buněk E2, overexprimujících TRHR, vede téměř k desetinásobně vyšší koncentraci IP3 než u buněk GH1. Výsledky pokusů na buňkách E2 je proto nutno interpretovat v kontextu nefyziologického přebytku TRHR. Během obhajoby bych prosil o podrobnější diskusi.

Bez povšimnutí zůstal i fakt, že aktivace TRHR v buňkách TRY-1 vede ke snížení rychlosti difuze TRHR-YFP přibližně na polovinu oproti kontrole před aktivací, a to bez ohledu na přítomnost či absenci dalších signálních molekul. Tento fakt vyzývá k podrobnější experimentální investigaci (nativní elektroforéza, homo-FRET, ap.), nebo přinejmenším k diskusi zda, a za jakých okolností TRHR vytváří po aktivaci dimer.

Pochvalně je třeba zmínit úsilí o studium buněčného systému co nejbližšího přirozenému, tj. buněčné linie GH1. I zde by však byla žádoucí lepší interpretace výsledků, kterou by bývalo mohlo umožnit např. srovnání fosfoproteomických dat získaných s TRHR s daty získanými po aktivaci jiných G proteinových receptorů. Srovnání s jinými receptory o známé specificitě (Gq, G11, Gs, Gi/o) by též bývalo uvedlo do kontextu předkládaná pozorování schopností TRHR signalizovat prostřednictvím různých G proteinů.

Po formální stránce práce bezpochyby splňuje požadavky kladené na dizertační práci. Úvodní část (ale i diskuse) však poněkud zanedbává existenci velkého množství informací o struktuře zkoumaných proteinů. Tyto informace jsou relevantní, neboť napovídají např. o možnostech interakcí TRHR s různými podjednotkami G $\alpha$ , arrestiny, či dalšími signálními molekulami. Jsem překvapen tím, že sekce 2.4.3 (Struktura TRH-R) neobsahuje ilustraci ukazující známou, experimentálně určenou detailní strukturu některého z příbuzných receptorů, nebo přímo strukturu TRHR, detailně predikovanou mj. softwarem AlphaFold a dostupnou např. na <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q32MS1>. Vyobrazení známých či predikovaných proteinových struktur by bývalo umožnilo lépe ukázat pozice a role významných aminokyselinových zbytků zmiňovaných v textu. Vhodné by bývalo bylo též porovnání sekvencí a struktur TRHR a dalších příbuzných receptorů. Ilustrovány nejsou ani chemické struktury agonistů a antagonistů TRHR. V případě přirozeného agonisty, TRH, toto opomenutí vedlo dokonce k tomu, že TRH je nepřesně uveden jako tripeptid Glu-His-Pro, zatímco obrázek struktury TRH by vyjevil, že ve skutečnosti je tento tripeptid modifikován. Přesněji a detailněji by měly být popsány i evoluční vztahy mezi TRHR1 a TRHR2, rozdíly v jejich sekvencích, v tkáňové a časové lokalizaci jejich exprese, a ve známých i očekávaných (na základě sekvencí a struktur) molekulárních specificitách. Uvítal bych doplnění těchto informací při obhajobě.

Díky rozsahu práce i existujícím relevantním publikacím (jedné prvoautorské, jedné druhoautorské) předloženou práci bez váhání doporučuji ke schválení. Vzhledem k výše uvedeným nedostatkům ji hodnotím jako velmi dobrou.

V Praze, 30.8. 2022

Josef Lazar, Ph.D.