

Oponentský posudek diplomové práce Michal Kněžů (2023): „Úloha jednotlivých aminokyselinových zbytků první transmembránové domény v deaktivaci P2X7 receptoru“

Předložená diplomová práce Bc. Michala Kněžů byla vypracována v oddělení výzkumu bolesti Fyziologického ústavu AV ČR pod vedením RNDr. Hany Zemkové, CSc. Práce se zabývá určením funkční a strukturální úlohy prvního transmembránového segmentu v procesu deaktivace purinergního receptoru P2X7.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu, splnění cílů práce

Studium molekulárních mechanismů modulace aktivity P2X receptorů představuje jeden z aktuálních směrů výzkumu iontových kanálů. Využití biochemických a biofyzikálních přístupů v tomto studiu je nezbytným krokem k identifikaci funkčně významných domén, které mohou nabýt potenciálně důležitý význam při hledání míst, jejichž prostřednictvím lze aktivitu těchto receptorů účinně farmakologicky regulovat. Není proto pochyby, že zvolené téma diplomové práce je aktuální a závažné a předložená práce přináší nové poznatky. Zejména bych chtěla ocenit skutečnost, že práce obsahuje originální výsledky, které jsou součástí vědecké publikace předložené k recenznímu řízení v impaktovaném mezinárodním časopise. Výsledková část proto bezesporu svědčí o vědecké kvalitě a aktuálnosti řešené problematiky a z uvedených výsledků je zřejmé, že autor v průběhu studia získal bohaté zkušenosti samostatné a tvůrčí vědecké práce. Vysoce hodnotím systematickosti autora, pečlivost a nezbytnou trpělivost při řešení experimentálních úkolů.

Struktura a formální úroveň předložené práce

Práce je přehledně uspořádaná, relevantně graficky dokumentovaná, logicky promyšlená, psaná v anglickém jazyce, stylisticky přesným a přímočarým stylem. Úvodních 24 stran shrnuje základní údaje o současných poznatcích týkajících se purinergní signalizace, základní informace o P2X receptorech a specifických charakteristikách receptoru P2X7, uvedených v hlavních souvislostech a v kontextu se současnou literaturou. Cíle práce jsou formulovány na str. 25 v pěti bodech zahrnujících kultivaci a transfekci buněk, snímání proudů elektrofyziologickou technikou patch-clamp, analýzu deaktivační kinetiky proudových odpovědí, fluorescenční měření aktivity a diskusi výsledků za využití molekulární struktury receptoru. Experimentální část (str.30-39) obsahuje popis aktivačního protokolu, definici studovaných parametrů deaktivační fáze, reprezentativní příklady elektrofyziologických záznamů a statistický popis získaných hodnot parametrů prezentovaný formou jedné tabulky a 3 komponovaných obrázků. V diskusi (str. 40-51) autor vyslovuje hypotézy o možné funkční úloze jednotlivých reziduí s důkladným zdůvodněním založeným na podrobné analýze publikovaných struktur receptoru.

Struktura i formální úroveň textu podle mého názoru jednoznačně splňují požadavky kladené na magisterskou práci. Při čtení některých částí jen poněkud rušivě působí drobné překlepy, chybějící písmena, gramatické nepřesnosti a neobratné formulace, což mohlo být autorem pečlivěji zkontrolováno.

Hodnocení částí předkládaného spisu

1 Literární přehled

Úvodní část shrnující základní údaje o současných poznatcích týkajících se obecně purinergních receptorů a specifických vlastností P2X7 je velmi dobře zpracovaná, literární zdroje jsou aktuální a správně citované, objem informací nezbytných pro seznámení čtenáře se studovanou problematikou je správně vyvážený.

2 Materiál a metody

Výsledky jsou na vynikající metodické úrovni. Autor při práci využil pokročilé elektrofyziologické a mikrofluorimetrické techniky, které jsou v laboratoři, kde byla diplomová práce vypracována, dobře zavedené. Popis použitých metod a potřebného materiálu je úplný a správný a odpovídá standardu v daném oboru.

3 Výsledky

Vzhledem k velkému objemu dat, který vyplývá z podstaty studovaného počtu parametrů porovnávaných u celkově 23 různých konstruktů receptoru, je výsledková část komprimovaným souborem statistických dat, která jsou minimalisticky popsána v textu a přehledně prezentována formou jedné tabulky a tří obrázků zahrnujících 14 sloupcových grafů. Po technické stránce jsou data získána správně a ke způsobu jejich interpretace nemám žádné zásadní připomínky. Naproti tomu podle mého názoru:

- Grafické zpracování obrázků ve výsledkové části mohlo být lépe promyšlené tak, aby velikost písmen v popisech obou os byla u všech grafů čitelná. Stávající velikost písma odhaduji kolem 1 mm.
- V tabulce 1 (Table 1; str. 32-33) jsou formálně nesprávně uvedeny hodnoty „0,00“ u parametrů, které nebyly stanoveny u „nefunkčních“ mutantů. Tyto hodnoty by bylo spíše vhodné nahradit zkratkou „ND“, podobně jako v grafické části.
- Popis výsledků v části 4.2 (str. 38) na mě působí trochu méně propracovaně než první kapitola výsledkové části. Není uveden důvod, proč byla aktivita konstruktů testována kromě elektrofyziologických technik také mikrofluorimetrickou metodou (jen implicitně to vyplývá z kapitoly 1.4.9). Opakují se informace o protokolu uvedené již v metodické části, není však přesto zřejmé, zda jsou prezentované hodnoty absorpce uvedeny pro 40. sekundu po aplikaci směsi BzATP s ethidium bromidem (jak je uvedeno v textu), nebo spíše pro 40. sekundu po začátku aplikace směsi? Tato nejednoznačnost by mohla být odstraněna grafickým vyznačením okamžiku odečtu hodnoty parametru kvantifikovaného v grafech obr. 4.6 na ukázkce reprezentativního záznamu.
- Výhrady mám k formulaci, která je uvedena na dvou místech v textu (str. 31 a 40) a týká se konstruktů, které vykazovaly jen velmi malé odpovědi na aplikaci agonisty. Autor uvádí, že amplituda odpovědi u těchto mutantů dosahovala jen desítky pA, a proudy tak nebylo možné odlišit od elektrického šumu. Z hodnot uvedených v tabulce na str. 32-33 je však patrné, že amplituda odpovědí dosahovala 140-430 pA, a byla tak od elektrického šumu aparatury odlišena. Stačilo by možná konstatovat, že amplituda proudových odpovědí byla malá a nebylo proto možné stanovit hodnoty časových konstant deaktivční fáze a jejich proporčního zastoupení.

Uvedené drobné nedostatky nijak nesnižují vlastní význam originálních výsledků a nejsou zásadního charakteru. Považuji je spíše za formální a přičítám je nižší zkušenosti autora. Podle mého názoru práce splňuje všechny formální i věcné požadavky. Autor prokázal schopnost pokročilými experimentálními technikami získat originální výsledky, porozumět jejich významu a zdůvodnit hypotézy o mechanismu, kterým se uplatňují studovaná rezidua při aktivaci iontového kanálu.

4 Diskuse

Tato část práce je psána pečlivě, přehledně, srozumitelně, se zjevně promyšlenou snahou udržet přehled současných poznatků v bezprostředním kontextu s vlastními výsledky. Pro vyslovení hypotéz o funkčních důsledcích jednotlivých mutací autor důsledně využívá poznatky získané z nejnovějších dostupných struktur P2X7 receptoru v otevřeném a zavřeném stavu. Tato část diplomové práce jednoznačně potvrzuje, že autor výborně zvládl podstatu studované problematiky a že umí na základě získaných dat formulovat originální hypotézy, jež lze dalším studiem ověřit.

Závěr:

V souhrnu konstatuji, že předložená práce Bc. Michala Kněžů splňuje obsahové i formální náležitosti magisterské práce. Autor práce prokázal schopnost samostatné a tvůrčí vědecké práce, zvládnutí odborné tematiky, osvojil si náročné elektrofyziologické a mikrofluorimetrické techniky, včetně schopnosti získat kvalitní experimentální data, kriticky je analyzovat a formulovat originální hypotézy na základě získaných vynikajících výsledků. Výsledky diplomové práce jsou součástí aktuálního a velmi důležitého směru fyziologického výzkumu.

Dílčí připomínky k práci, otázky do diskuse, náměty pro rozpravu:

1. Na str. 39 (obr. 4.6) autor prezentuje data z absorpčních experimentů, ve kterých byla vždy v jediném experimentu porovnána aktivita konstruktů s přirozeným typem receptoru. V případě mutantu G27A byly odpovědi přirozeného typu výrazně nižší než v ostatních experimentech, přičemž senzitivace byla výrazně vyšší. Mohl by autor komentovat, zda u přirozeného typu receptoru existuje závislost míry senzitivace na počáteční hodnotě naivní odpovědi? Proč byla hodnota absorpce odečítána právě ve 40. sekundě? Do jaké míry korelovaly tyto hodnoty s naměřenou váženou hodnotou časové konstanty deaktivace u jednotlivých konstruktů?

2. Pro měření membránových proudů používal autor roztoky obsahující vápenaté ionty ve vnějším prostředí (2 mM), zatímco nitrobuněčné prostředí obsahovalo chelatační činidlo EGTA v koncentraci 11 mM. Jaký vliv mají vápenaté ionty na proces aktivace a senzitivace P2X7 receptoru? Proč byla použita právě uvedená koncentrace chelatačního činidla?

3. Na str. 31 a 40 je uvedeno, že některé konstrukty vykazovaly jen velmi malé proudové odpovědi, které nebylo možné odlišit od elektrického šumu. Jakou charakteristiku měl elektrický šum aparatury v elektrofyziologických experimentech? Jak byly signály filtrovány (při snímání či analýze)? Případně jakým typem filtru byl signál upraven a proč? Jak by mohl autor přibližně odhadnout hodnotu časové konstanty mono-exponenciálního průběhu určitého děje, aniž by bylo zapotřebí jej numericky aproximovat exponenciální funkcí?

4. Autor na str. 29 uvádí, že ke statistickému porovnání hodnot prezentovaných v obr. 4.4 – 4.6 byl použit nepárový (Studentův) t-test. Vykazovaly všechny hodnoty prezentované v těchto grafech normální rozdělení?

5. Na straně 48 autor zmiňuje, že změny v deaktivaci mutantu Phe38Ala byly podobné jako u konstruktů Thr36Ala.

Lze předpokládat, že v procesu aktivace a následné deaktivace mohou mít důležitou úlohu rezidua, jejichž konformace je při otevření kanálu agonistou změněna. Z publikovaných 3D struktur rP2X7 je patrné, že v zavřeném stavu vytváří Thr36 celkem 25-26 intramolekulárních kontaktů v rámci TM1, přičemž interaguje s Phe38. Otevřený stav mění orientaci postranního řetězce Thr36 a kontakt s Phe38 není pozorován. Threonin je reziduem, které podobně jako valin a izoleucin je C-beta větvený. Znamená to, že tato aminokyselina je více omezena v konformacích a v důsledku ovlivňuje alfa-helikální konformaci. Mohl by se v tomto kontextu autor pokusit interpretovat své výsledky?

RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

V Praze, 16. ledna 2023

Fyziologický ústav AV ČR
Vítězská 1083
Praha 4