

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Zdeňky Drastichové

CELL SIGNALLING AND MOLECULAR COMPLEXES OF THE TRH RECEPTOR

Předkládaná disertační práce Mgr. Zdeňky Drastichové zabývající se studiem buněčné signalizace a molekulárních komplexů receptoru TRH byla vypracována na základě výsledků práce získaných v průběhu jejího doktorandského studia na Katedře fyziologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v rámci studijního programu fyziologie živočichů Univerzity Karlovy v Praze pod vedením RNDr. Jiřího Novotného, DSc. Buněčná signalizace skrze receptory spřažené s G-proteiny reguluje celou řadu důležitých buněčných a tkáňově specifických funkcí - lidský genom obsahuje přes 1000(!) genů kódujících tyto receptory. Význam této signalizace pro lidskou medicínu podtrhuje skutečnost, že více než polovina v současnosti prodávaných léčiv působí skrze tuto rodinu receptorů. Lze předpokládat, že detailní pochopení tohoto typu buněčné signalizace umožní vývoj nových cílených léčiv použitelných v šitokých oblastech medicíny.

Práce si kladla tyto specifické cíle: a) studovat proteom membránově obohacených frakcí po dlouhodobé stimulaci modelových buněk HEK293-E2M11 s ektopickou expresí receptoru TRH a G-proteinu G_{q11} a b) charakterizovat molekulární komplexy receptoru TRH a proteinu G_{q11} a c) sledovat efekt TRH na stabilitu komplexů vytvářených oběma proteiny. Pro uskutečnění těchto cílů bylo potřeba vypracovat některé nové či adaptovat zaběhlé metody, za zmínku stojí izolace membránových frakcí pomocí perkolového gradientu, která je zcela novým přístupem.

Práce je vypracována v anglickém jazyce a je psána klasickým stylem v obvyklém členění na Úvod, Cíle práce, Literární přehled, Metody, Výsledky, Diskuze, Shrnutí a Seznam literatury. Ke konci textu je přiřazen dodatek obsahující kopie dvou publikací a jeden rukopis v přípravě, které obsahují převážnou část výsledků. Nutno vyzdvihnout, že práce je napsána velmi dobrou angličtinou, s pečlivým grafickým zpracováním, bez formálních nedostatků a téměř bez překlepů.

Literární přehled je velmi rozsáhlý, psaný logickou a velmi čtivou formou, obsahuje velmi podrobné informace týkající se téměř všech aspektů buněčné signalizace skrze receptory spřažené s G-proteiny a svědčí o autorčině detailním vhledu do studované problematiky. Jediným drobným nedostatkem je absence fyziologických funkcí receptoru TRH v poslední kapitole (např. tkáňová exprese, apod.), tyto informace by čtenáři umožnily lepší vhled do experimentálně studované problematiky, především části týkající se interpretace proteomických dat.

Metodická část obsahuje všechny potřebné údaje nutné pro reprodukci experimentů, opět je zpracována velice pečlivě. Lepší orientaci v textu by prospělo grafické znázornění buněčné frakcionace a popis standardizace metod – např. ověření ztrát v jednotlivých krocích během izolace frakcí, které sloužily jako výchozí pro další experimenty. Opět musím zdůraznit, že zvládnutí použitých

metod buněčné frakcionace a separace proteinů a proteinových komplexů (2-D PAGE a CN-PAGE) vyžadovalo značnou technickou zručnost, což autorka ve výsledkové části přesvědčivě prokázala.

Z výsledkové části je zřejmé, že zadané cíle dizertační práce byly splněny. Experimenty odpovídají na kladené otázky a interpretace dosažených výsledků je adekvátní. Podstatná část experimentálních výsledků tohoto výzkumu byla již publikována ve dvou významných mezinárodních impaktovaných časopisech (J. Cell. Biochem. , IF 3.122 a Cell Struct. & Funct., IF 3.265) a tedy prošly nezávislým recenzním řízením. Rovněž rukopis třetí práce proběhl recenzním řízením a je nyní v tisku. Mgr. Drastichová je první autorkou na všech třech publikacích. Za jeden z významných výsledků považují charakterizaci změn exprese a lokalizace membránových proteinů v průběhu dlouhodobé stimulace TRH, kde překvapivým nálezem byla řada mitochondriálních proteinů a proteinů účastnících se regulace apoptózy. Rovněž studium komplexů receptoru TRH a G-proteinu Gq/11 pomocí nenedaturující elektroforézy poskytlo řadu zajímavých dat obtížně získatelných jinými přístupy.

V navazující kapitole jsou získané výsledky adekvátně interpretovány a diskutovány vzhledem k současným poznatkům jiných experimentátorů. Pouze v kapitole 6.1. diskutující alterace membránových proteinů po dlouhodobé expozici TRH postrádám lepší organizaci a pokus o interpretaci získaných dat vzhledem k nestejně dlouhému působení TRH použitého v různých experimentálních modelech při sledování efektů na regulaci apoptózy. Není také diskutována přenositelnost nálezů použitého experimentálního modelu na „fyziologické“ prostředí působení receptoru TRH.

Autoreferát je výstižným shrnutím dizertační práce a po formální stránce bez nedostatků.

Otázky:

1. Jedním z cílů (specifický cíl 2) bylo sledovat změny v 2-D proteinovém profilu po dlouhodobé aktivaci buněk HEK293-E2M11. Vzhledem k tomu, že jde o uměle vytvořený model (ektopické exprese receptoru TRH a podjednotky trimerního G-proteinu G_{q11}), vliv této stimulace na membránové proteiny nemusí být nutně přenositelný na fyziologické podmínky aktivace signální dráhy TRH. Uvažuje autorka o následných experimentech, jak nálezy ověřit na „přirozeném“ modelu signalizace?
2. Během CN-PAGE může nastat situace, kdy dva proteiny jsou součástí komplexů o stejné migraci. Jak lze za použití této metody ověřit, zda komigrující proteiny jsou součástí stejného komplexu?
3. V některých experimentech (5.18, 5.23) byl efekt některých detergentů na stabilitu komplexů receptoru TRH v průběhu dlouhodobé stimulace buněk TRH protichůdný (Brij 56 vs. Triton X-100 či digitonin vs. CHAPS). Jak lze toto vysvětlit a bylo by možné uvedeného jevu experimentálně využít pro získání dalších informací ohledně studovaných komplexů?
4. Zajímavé by bylo studovat dynamiku všech typů (velikostí/migračních rychlostí) komplexů v jediném experimentu (tj. na jednom CN-PAGE gelu/blotu). Ve výsledkové části jsou komplexy různé kategorie velikostí prezentovány zvlášť. Jaký to mělo důvod?

Závěrem shrnuji, že mi bylo velkým potěšením posuzovat předloženou disertační práci pro její vysokou „vzorovou“ kvalitu jak po stránce experimentální, interpretační i formální, kdy dosažené výsledky jsou významným příspěvkem k našemu porozumění molekulární funkce signální dráhy receptoru TRH. Práce dokumentuje autorčinu schopnost vědecké práce, experimentální zručnost, odvahu k metodickým inovacím a vytrvalou cílevědomost.

Podle mého názoru prokazuje předložená práce způsobilost Mgr. Zdeňky Drastichové k tvůrčí vědecké práci a odpovídá požadavkům kladeným na doktorandskou disertační práci. Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako základ pro řízení o udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 4. června 2012

MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Oddělení integrity genomu

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

e-mail: hodny@img.cas.cz