

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jitky Škrabalové:  
Vliv chronického působení morfinu na funkci signálních systémů řízených trimerními G-  
proteiny v srdci potkana

Diplomová práce Bc. Jitky Škrabalové si klade za cíl zjistit případné změny v hladinách a aktivitách signálních proteinů související s působením morfinu v membránách myokardu. Práce je klasicky členěna do kapitol Úvod, Literární přehled, Cíle, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze a Závěr.

V úvodní části jsou shrnuty dosavadní poznatky v problematice opioidní signalizace s důrazem na působení morfinu. Přehledně je zpracována signalizace přes GPCR, trimerní G proteiny a jejich efektorové molekuly. Z hlediska širšího významu sledované problematiky je popsáno i kardioprotektivní působení opioidů, především morfinu, včetně předpokládaných molekulárních mechanismů.

Kapitola Metody je vcelku pečlivě zpracována, stejně jako Výsledky, kde řazení a logika prováděných pokusů jasně sleduje cestu ke splnění stanovených cílů. V Diskuzi jsou pak dosažené výsledky, případně dílčí neúspěchy diskutovány s literaturou a výsledky jiných badatelských skupin.

Na práci lze především ocenit samotný výběr tématu, které je veskrze velice aktuální jak z hlediska výzkumu aplikovaného (působení opioidů, signalizace v srdeční tkáni), tak i základního – práce se dotýká podstaty významných regulačních procesů v signálních cestách trimerních G proteinů. Stanovené cíle jsou hledáním odpovědí na jasně formulované otázky: - jak dlouhodobé podávání morfinu ovlivňuje expresi a aktivitu hlavního efektoru opioidních receptorů – adenylylcyklázy - a jak se mění exprese OR a s opioidní signalizací souvisejících  $\beta$ -adrenergických receptorů.

Autorka očividně úspěšně zvládla zmiňované metody, ať už se jedná o separaci membránových frakcí, stanovení proteinů, SDS-PAGE, western blot, stanovení aktivity AC či vazebné studie receptorů, včetně následného zpracování získaných údajů. Z celého textu vyplývá, že dobře rozumí danému tématu a snadno dokáže porovnávat vlastní výsledky s literárními údaji a interpretovat je v rámci širšího kontextu dané problematiky. Navíc získané výsledky jsou jednoznačně přínosné a především pozorované zvýšení aktivity a množství AC či navýšení množství  $\beta$ -AR po dlouhodobém podávání morfinu interpretované jako upregulace stimulačních a downregulace inhibičních drah si budou žádat dalšího doplnění a vynaložení experimentálního úsilí, které však výrazně přesahuje rámec jedné diplomové práce.

Přes velice příznivý dojem z celé práce mám několik připomínek a doplňujících otázek:

Připomínky:

- Obr. 1 – v popisu uvedeno, že se morfin skládá z benzenového jádra, ale – jedná se o fenanthrenovou kostru doplněnou o další dva cykly
- Popis obr. 2 – chybí upřesnění citace (chybí rok vydání citované práce)
- V celém textu je poměrně málo citací, množství je sice dostačující, ale uvedení více zdrojů by celkovému dojmu pomohlo – např. odstavec na str. 14 o rozčlenění GPCR do jednotlivých podskupin je zcela bez citace
- Citace téměř zcela chybí u uvedených metod. Působí to, jako byste si veškeré metody sami vyvinuli.

- Co znamená formulace (str.15), že : „ .. tyto proteiny (RGS) mají na své RGS doméně protein aktivující GTPázu, ten po interakci s aktivovaným  $G\alpha$  hydrolyzuje GTP na GDP..“? Jaký je vztah mezi RGS proteinem a RGS doménou, jak vypadají?
- U popisu Laemmliho vzorkového pufru chybí hodnota pH
- Někdy ve výsledcích chybí konkrétní hodnoty změn sledovaných parametrů (např. snížení množství  $\kappa$ -OR, uveden je pouze graf a ilustrační imunoblot).

Otázky:

Při popisu desensitizace zmiňujete vazbu arrestinů na GPCR. Mají arrestiny i přímou úlohu v signalizaci přes GPCR směrem k aktivaci jiných signálních drah?

V literárním přehledu uvádíte, že v myokardu se nachází jen AC IV-VII, ale jiní autoři (např. Ostrom 2003) zmiňují i AC II a III. Proč jste se zabývali pouze dominantními isoformami AC V a VI?

Uvádíte, že frakci hrubých membrán jste mimo jiné izolovali hodinovou centrifugací při 300 000 g. To jsou hodnoty, při kterých si sedají i multiproteinové nemembránové komplexy, jako polyribosomy i samotné ribosomy. Nestačily by na izolaci membránové frakce mnohem mírnější podmínky s tím, že membrány vámi získané by byly čistší?

Píšete, že jste při imunoblotu nepoužívali u protilátek proti  $\delta$  a  $\kappa$ -OR na blokování mléko, a tato úprava vám umožnila detekci receptorů. Neměli jste potom problém se zčernáním či „zašpiněním“ blotů?

Proč jste vazebné pokusy pro zjištění množství receptorů ve tkáni používali jen pro  $\beta$ -adrenergní receptory, a ne pro OR?

V Diskuzi tvrdíte, že jste nepozorovali internalizaci receptoru. Z výsledků ale nikterak nevyplývá, že byste internalizaci pozorovat mohli – nikde od sebe neoddělujete frakce plazmatických a intracelulárních membrán, kromě mitochondrií. Máte důkaz, že vámi na Percollu izolovaná frakce plazmatických membrán neobsahuje i membrány endozomální (případně jiné – ER, GA, lysozomy,..)?

Přes uvedené připomínky předloženou práci považuji za velice kvalitní a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě s navrženým hodnocením výborně.

V Praze dne 13.9.2011

RNDr. Vladimír Rudajev, PhD