

Posudek na doktorandskou disertační práci Mgr. Lenky Maršákové nazvanou MODULAČNÍ MECHANISMY NOCICEPTIVNÍCH TRP KANÁLŮ

Předložená disertační práce Mgr. Maršákové zaměřená na studium nociceptivních TRP kanálů byla vypracována na základě výsledků získaných v průběhu jejího doktorandského studia a experimentální práce na Fyziologickém ústavu AV ČR v Praze. Vlastní disertační práce vychází z výsledků publikovaných ve čtyřech prestižních mezinárodních časopisech s vysokým impakt faktorem (Anesthesiology, IF 5.359; 2x J. Biol. Chem., IF ~ 5; Curr. Pharm. Biotechnol., IF 2.805). Kopie všech těchto článků jsou in extenso přiloženy k disertační práci. Kromě uvedených prací je Mgr. Maršáková spoluautorkou publikace v mezinárodním časopise Pancreas (IF 2.733) a jednoho článku v časopise Bolest.

Bolest je jedním z velmi důležitých a zajímavých fenoménů pozorovaných a zkoumaných na různých druzích živých organismů. Zvolené téma disertační práce týkající se výzkumu vlastností vybraných TRP kanálů, které představují klíčovou složku při rozpoznávání bolestivých podnětů, je významné z hlediska potenciálního využití získaných poznatků v léčbě nežádoucích patologických bolestivých stavů. Farmaka používaná v současné době jako inhibitory těchto receptorů nejsou dostatečně selektivní a mají nežádoucí vedlejší účinky. Detailnější poznání vlastností TRP kanálů na molekulární úrovni může proto usnadnit rozvoj nových látek s vhodnými modulačními účinky na funkci těchto bílkovin.

Vlastní disertační práce je členěna klasickým způsobem a je zpracována velmi přehledně. Úvodní část je koncipována především jako obsáhlý přehled současných poznatků o struktuře TRP kanálů a mechanismech modulace jejich aktivity. Autorka se zde zaměřila zejména na polymodální TRPV1 a TRPA1 receptory, které se staly předmětem jejího experimentálního výzkumu. Jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují a obsahují nejnovější relevantní informace publikované v této oblasti vědeckého bádání. Kromě podrobné charakterizace vlastností uvedených dvou typů TRP kanálů autorka na začátku úvodní kapitoly názorně popsala známé fyziologické funkce těchto typů receptorů.

Specifické cíle disertační práce byly jasně vymezeny a zmíněny jsou i předcházející hypotézy, na základě kterých byly tyto cíle formulovány. V metodické části autorka popsala všechny klíčové metodické přístupy použité v práci, a to včetně detailního složení roztoků a medií, ale i dalších důležitých podrobností. Přehledný popis získaných výsledků čítá celkem 25 stran a v následující diskuzi (13 stran) autorka tyto výsledky řádně diskutovala v odpovídajícím kontextu současného poznání. Následující samostatný souhrn poskytuje přehled hlavních získaných výsledků a v závěrečné kapitole je zdůrazněn význam těchto pozorování. Text disertační práce je vhodně doplněn 22 obrázky a 4 tabulkami.

Autorce se pomocí pečlivě navržených modelů a cílených experimentů podařilo získat řadu zajímavých výsledků a prakticky splnit všechny hlavní záměry práce. Byla potvrzena hypotéza, že kafir je částečným agonistou TRPC1 kanálu a byl navržen mechanismus aktivace tohoto kanálu kafrem, který je zprostředkován rychlou konformační změnou extracelulárního pórového helixu. Zajímavé bylo také zjištění kafrem vyvolané redistribuce (zvýšení dostupnosti) PIP₂ na intracelulární straně plazmatické membrány, která se může významně podílet na modulaci odpovědi TRPV1 receptoru. Pomocí řízené mutagenese a funkčního

testování vybraných aminokyselin S4-S5 oblasti TRPV kanálu byly identifikovány čtyři nabité aminokyseliny, které hrají důležitou roli v procesu napěťové, chemické a teplotní aktivace tohoto kanálu. Kromě toho bylo pozorováno, že přítomnost lysinu 571 v této oblasti má klíčový význam pro chemickou citlivost TRPV1 kanálu k 2-aminoetoxydifenylborátu. Experimenty založené na funkčním testování TRPA1 konstruktů se zkrácenými C-konci a následná aplikace homologního modelování a molekulárně dynamické simulace, které byly zaměřeny na zkoumání úlohy distální části karboxylového konce TRPA1 kanálu potvrdily zásadní význam této části molekuly pro její interakci s Ca^{2+} ionty a modulaci aktivace a inaktivace tohoto receptoru.

Otázky do diskuse:

1. Na str. 70 se uvádí, že optickým pozorováním HEK293T buněk byly nalezeny morfologické změny jako důsledek působení kafru ve fyziologicky účinných koncentracích a je zde uveden odkaz na obr. 4.5 (str. 72). Výsledky na tomto obrázku se však týkají měření změn ve FRET signálu mezi CFP a YFP fluorescenčními proteiny navázanými na PH doménu PLC δ , které jsou odrazem interakce mezi příslušnými studovanými proteiny. Bylo by možné blíže vysvětlit, jakých „morfologických“ změn se uvedená poznámka týká?
2. Velmi zajímavý je výsledek uvedený na str. 76 (obr. 4.9), který popisuje zvýšenou citlivost ke kafru u mutantů TRPV1 receptoru s poškozenými místy pro fosforylaci. Co je známo obecně o úloze fosforylace v aktivaci nebo deaktivaci TRPV1 kanálu?
3. Vlastnosti vybraných TRP kanálů v této práci byly studovány na modelu buněčné linie HEK293T. Domnívá se autorka, že se charakteristiky těchto kanálů (kinetika aktivace a deaktivace, alosterické modulace) mohou významně lišit v závislosti na typu buněk, ve kterých jsou exprimovány?

Celkově velmi vysoká úroveň předložené disertační práce, a to jak po formální tak i obsahové stránce, jednoznačně dosvědčuje, že Mgr. Maršáková je nadanou a zdatnou mladou vědeckou pracovnící, která se výborně orientuje ve studované problematice a je schopna nejen provádět technicky náročné vědecké experimenty, ale výsledky těchto experimentů také náležitým způsobem vyhodnotit a zpracovat. Je zřejmé, že autorka během své práce získala cenné praktické zkušenosti s aplikací moderních molekulárně-biologických, biochemických a fyzikálně-chemických technik ve fyziologicky orientovaném výzkumu. Závěrem je třeba uvést, že disertační práce svojí kvalitou zcela splňuje všechny požadavky kladené na tento typ práce a proto doporučuji, aby Mgr. Maršákové byl po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D.

V Praze 11.2.2013

RNDr. Jiří Novotný, DSc.
Katedra fyziologie
Přírodovědecká fakulta UK v Praze