

Oponentský posudek

Cílem disertační práce RNDr. Vladimíra Rudajeva „Receptory spřažené s trimérodními G proteiny v membránových doménách“, bylo nalézt vhodné podmínky pro izolaci membránových raftů ve vztahu s mírou zachování funkce v nich lokalizovaných trimérodních G proteinů. Dalším úkolem bylo stanovit jaký podíl různých typů G proteinů a s nimi spřažených receptorů je lokalizován v raftech a ukázat případné změny po dlouhodobém hormonálním působení. Studie byly provedeny na buněčné linii HEK293 exprimující lidský prostacyklinový receptor a na potkaní buněčné linii VTGP exprimující thyreotropin releasing hormon. Dále bylo cílem zjistit, zda s rafty asociují také GABA_B receptor spolu s β -adrenergními receptory na kortexu telencefalonu potkana. Studie ukázala, že rafty, izolované jako detergent rezistentní domény lze izolovat pouze pomocí tritonu X-100, ostatní použité metody byly z tohoto hlediska neúčinné, i když šetrnější pro zachování funkčních vlastností sledovaných proteinů, které detergent prakticky potlačil. Dále se ukázalo, že sledované receptory se v doménách vyskytují jen ve stopových množstvích kromě GABA_B receptoru, který na kortexu telencefalonu exprimován v raftech je. Naopak byla v raftech potvrzena podstatná přítomnost G-proteinu spřažených se sledovanými receptory, které po stimulaci hormonem ubývaly, zatímco celková koncentrace příslušných receptorů se neměnila.

Výsledky jsou prezentovány v obsáhlém textu disertační práce. Z literárního úvodu, který je dokumentován velkým počtem citovaných prací vyplývá, že autor důkladně pronikl do sledované problematiky a svoje výsledky se snažil zapojit do kontextu s dosavadními znalostmi týkajícími se velmi slibné a zajímavé problematiky v oblasti výzkumu membrán v souvislosti s funkcí a komunikací jednotlivých proteinů v signálních kaskádách, ve kterých se uplatňují trimérodní G proteiny. V práci byla vhodně použita celá řada náročných a aktuálních metodik, což svědčí o velmi dobré úrovni školícího pracoviště. Výsledky byly zatím publikovány ve čtyřech publikacích, pátá je odeslána do tisku. U dvou publikací je dr. Rudajev prvním autorem.

Přes důkladnost předkládané práce je nesporné, že několikaleté úsilí a pracovní nasazení zatím nepřineslo vhodný metodický postup, pomocí kterého by bylo možné izolovat membránové domény s funkčními G proteiny, a tak sledovat jejich interakce s ostatními komponentami signální kaskády. Splnění tohoto požadavku, a tak hlavní zúročení celé práce lze očekávat po dalších experimentech.

Mám několik formálních připomínek a dotazů:

1. Fig. 15 v manuskriptu zaslaném do tisku je vložen obráceně.
2. Jak v autoreferátu, tak v textu disertace autor píše zásadně prosthacyklin, prosthanoidy, i přesto, že názvy jsou odvozené od kyseliny prostanové a v příložených publikacích je píše správně.
3. U manuskriptu, kde je deklarováno, že je poslán do tisku by mělo být napsáno do kterého časopisu
4. Jediný izolační způsob, kterým se podařilo získat rafty oddělené od okolních membrán byla extrakce pomocí tritonu X-100, v tomto případě však nebyly získány funkční G proteiny. Chci se proto zeptat, co autor považuje za hlavní příčinu poškození? Jde o vliv tritonu, nebo o neblahé důsledky izolace od okolní membrány, existuje představa další strategie, např. rekonstituce v umělé membráně?
5. Z toho vyplývá další otázka. Z Fig. 3-6 a tab.2 je vidět, že 0,1% triton X-100 je k detergent rezistentním doménám šetrnější a výtěžek proteinů typických pro detergent rezistentní domény je větší. Proč byl používán pro další studie 1% triton X-100?

Přes drobné připomínky splňuje předkládaná práce požadavky kladené na práci disertační, považuji ji za velmi kvalitní.

V Praze dne 12. 3. 2007

Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.