

Oponentský posudek na diplomovou práci Heleny Smyčkové: Cholinergní transmise na muskarinických receptorech: vliv β -amyloidu a role jednotlivých G-proteinů.

Předkládaná práce se zabývá studiem interakce muskarinových receptorů typu M2 s G-proteiny. Jednotlivé G-proteiny byly selektivně odstraňovány (nebo alespoň snižována jejich koncentrace) prostřednictvím působení specifických protilátek proti jednotlivým podtypům a exprese preferenčního typu G_i byla potlačována prostřednictvím RNA interference. Cílem práce bylo zjistit, jak spřahování muskarinových receptorů s jednotlivými G-proteiny ovlivňuje afinitu receptorů k agonistům a parciálním agonistům.

Druhým úkolem práce bylo prostudovat akutní a chronický vliv β amyloidu na vazebné vlastnosti všech podtypů muskarinických receptorů.

Práce má 64 stran a má standardní členění. Je napsána srozumitelně a velmi pečlivě.

Teoretická část obsahuje přehledně základní informace o struktuře a vlastnostech různých typů muskarinických receptorů, jejich funkci a mechanismu přenosu signálu prostřednictvím G-proteinů. Samostatná kapitola je věnována cholinergnímu mechanismu Alzheimerovy nemoci. Část Metody obsahuje popis kultivace buněk, izolace membrán, provádění vazebných experimentů a kvantitativního zpracování dosažených výsledků.

Výsledky ukazují, že M2 typ muskarinického receptoru se spřahuje především s G_i proteinem, což se projevuje významným poklesem frakce vysokoafinitních receptorů při vyřazení G_i proteinu. Ostatní G proteiny nemají žádný prokazatelný vliv. Ani při potlačení exprese G_i proteinů pomocí RNA interference se vliv vyřazení ostatních G-proteinů pomocí specifických protilátek neprojevil. Přetrvávající vliv protilátek proti G_i proteinu ukazuje, že působení RNA interference není úplné a alespoň malá část G_i proteinů je stále přítomna.

Akutní působení β -amyloidu nezpůsobilo u žádného z podtypů muskarinického receptoru žádné změny. Chronické působení β -amyloidu slabě ale statisticky významně snížilo afinitu a zvýšilo zastoupení vysokoafinitní formy M1a M3 receptorů. Mechanismus tohoto působení není znám.

Téma práce je velmi aktuální, určené cíle byly splněny, a uchazečka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Celkově hodnotím práci jako velmi kvalitní a doporučuji, aby byla hodnocena nejvyšším stupněm.

V Praze 14.9. 2009

RNDr. Jan Krůšek, CSc.



Poznámky a otázky:

Proč se při určování nespecifické vazby H^3 NMS používalo v některých experimentech nadbytek neznačeného NMS ($100\mu M$) a v některých experimentech atropin ($10\mu M$)? Jsou výsledky plně ekvivalentní?

Bylo by možné ovlivnit výsledky vazebných studií nejen přidavkem nadbytku GTP ale i přidavkem GDP?

Mechanismus dlouhodobého působení β -amyloidu na muskarinické receptory je nejasný, ale protože v akutních pokusech je bez účinku, pravděpodobně neprobíhá prostřednictvím muskarinických receptorů. Existují nějaké informace o tom, jak amyloid na CHO buňky působí?