



Department of Pediatrics
Charles University, 1st Faculty of Medicine

Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic
Tel./ Fax: + 420 224 910 478

Oponentský posudek

ÚLOHA TRANSMEMBRÁNOVÝCH DOMÉN VE STRUKTUŘE A FUNKCI P2X RECEPTORŮ

Disertační práce
Postgraduální doktorský studijní program „Neurovědy“

MUDr. Marie Jindřichová

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Školitel: RNDr. Hana Zemková, CSc

Téma disertační práce

Purinergní P2X receptory jsou aktivovány extracelulárním ATP a představují nový strukturální typ ligandem otevíraných iontových kanálů. Disertační práce MUDr. Marie Jindřichové řeší problematiku na pomezí neurofyzologie, neurofarmakologie a strukturální biologie. Purinergní signalizace hraje důležitou roli v přenosu bolesti, v imunitních procesech i poranění centrální nervové soustavy. Hlavním podtypem P2X v CNS je P2X4 receptor. Předložená práce se převážně věnuje studiu sekundární struktury dvou transmembránových domén tohoto receptoru a receptorům P2X1-3 a P2X7. Problematika je pojata velmi komplexně, řešení vyžadovalo neobyčejnou péči, pracovní nasazení, solidní znalosti, vytrvalost a systematickosti doktorandky a v neposlední řadě velmi kvalitní laboratorní zázemí.

Zpracování disertační práce

Po stránce obsahové i formální má předložená disertační práce MUDr. Marie Jindřichové vynikající úroveň. Práce má celkem 99 stran. Po poděkování, souhrnu, obsahu a seznamu zkratků autorka předkládá úvod, v němž nás velmi přehledným a velmi dobře strukturovaným způsobem na 28 stranách uvádí do komplexní problematiky purinergních P2X receptorů a shrnuje současný stav znalostí. Následně vytyčuje cíle své práce, které obsahují 5 položek. Ve stati „Materiál a metody“ jsme seznámeni zhuštěným, částečně tabelárním, ale velmi srozumitelným způsobem na 9 stranách s použitými metodickými přístupy. Výsledky předkládané disertace jsou uvedeny na 27 stranách a jsou následně diskutovány zasvěceným způsobem na 6 stranách. Výsledky jsou pak shrnuty do pěti odstavců závěru. Literární přehled obsahuje úctyhodných 301 položek.

Cíle práce a jejich splnění, metody zpracování

Cílem práce bylo objasnění vztahu mezi molekulární strukturou a funkcí transmembránových domén purinergních P2X receptorů potkana se speciálním zaměřením na receptor P2X4. Vytčené cíle práce byly jednoznačně splněny ve všech pěti vytčených oblastech. Autorka prokázala hluboký vhled do problematiky soudobých metod molekulárně genetických, elektrofyziologických a metod počítačového molekulárního modelování.

Výsledky práce

Autorka dokumentuje řadu prioritních pozorování, uvádím některá - zaměřila celkem 42 aminokyselin, jednu po druhé za cystein nebo alanin, variantní receptory exprimovala v buňkách HEK293 a následně funkčně hodnotila. Oponent má bohaté zkušenosti s expresí cizorodých proteinů, proto podtrhuje obrovskou náročnost tak rozsáhlých experimentálních studií s následnou funkční charakteristikou. V doménách TM1 a TM2 byly identifikovány aminokyselinové zbytky, které mohou reagovat s molekulou ivermektinu (IVM). Tato residua jsou při otevřené konformaci kanálu orientována k lipidům a tvoří vazebnou kapsu pro lipofilní IVM.

Všechny tři publikace spojené s předkládanou disertační prací byly publikovány v časopisech s impakt faktorem (IF; kumulovaný IF je 9,798), u práce v důležitém periodiku oboru (*Journal of Neurochemistry*, 109 (3): 923-934, May 2009) byla Dr. první autorkou. Řada publikovaných výsledků jsou nálezy prioritními v mezinárodním kontextu.

Komentář:

K předložené práci nemám žádné výtky, je příkladně zpracována a dokumentována, mám dva dotazy:

- A. Konzervovaný Tyr v TM1 doméně P2X4 receptoru je určující pro funkci receptoru. Úloha tohoto konzervovaného zbytku je různá u různých typů receptorů. Je autorce známo, zda v této oblasti genu jsou u lidské varianty v některém z receptorů P2X polymorfizmy v databázi OMIM, pokud ano, jaký by mohl být jejich funkční dopad.
- B. Proč autoři exprimovali proteiny v buňkách HEK293, testovali v pilotní studii i jiné typy expresních systémů?

Závěr:

Disertační práce MUDr. Marie Jindřichové přináší originální a významné poznatky, které mohou mít i terapeutický potenciál a jsou výrazným přínosem pro studium purinergních P2X receptorů na úrovni národní a mezinárodní. V předložené disertační práci MUDr. Marie Jindřichová zcela nepochybně prokázala předpoklad k samostatné tvořivé vědecké práci. Doporučuji práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.

V Praze, dne 4. května 2009


Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc
Klinika dětského a dorostového lékařství
1. lékařská fakulta University Karlovy v Praze