

Posudek na dizertační práci

Mgr. Vojtěcha Vávry

Funkční úloha P2X receptorů v supraoptických jádrech hypotalamu potkana a strukturně-funkční vlastnosti rekombinantních P2X receptorů.

Disertační práce Vojtěcha Vávry byla vypracována v rámci programu postgraduálního studia Fyziologie živočichů na PřF UK na oddělení buněčné a molekulární neuroendokrinologie ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky pod vedením RNDr. Hany Zemkové CSc. Disertace prezentuje čtyři původní práce a jeden přehledný článek v relevantních impaktovaných časopisech. Konkrétní podíl práce Vojtěcha Vávry na jednotlivých autorských publikacích je uveden na str. 8.

V doprovodném textu na 33 stranách, uvádí autor čtenáře do současného stavu problematiky purinergní signalizace a podrobně popisuje strukturu a funkci receptorů P2X ve vybraných částech nervového systému. V závěru textu formuluje hlavní úkoly své dizertační práce a v kapitole výsledky seznamuje o výsledcích jednotlivých originálních článků.

Tyto práce se zabývají funkční úlohou neuronálních receptorů P2X v supraoptických jádrech hypotalamu potkana. Autoři potvrdili přítomnost podtypů receptorů P2X v supraoptických neuronech, jejich význam pro elektrickou aktivitu neuronů a synaptický přenos. Podrobně byla řešena otázka funkčnosti vazebného místa receptoru P2X4 pro agonistu a pro alosterický modulátor ivermektin a význam přítomnosti konzervovaných aromatických aminokyselin v první transmembránové doméně receptorů P2X a úloha pěti konzervovaných cysteinových párů v ektodoméně receptoru P2X4.

Článek v Neuroscience řeší přítomnost jednotlivých podtypů purinergních receptorů P2X v neuronech supraoptického jádra. Studie prokázala pre-synaptické a extra-synaptické receptory P2X2 a P2X4, které modulují uvolňování glutamátu a GABA a kontrolují elektrickou dráždivost těchto neuronů.

V dalším článku je studována úloha konzervovaných cysteinů v ektodoméně receptoru P2X4, které tvoří disulfidické můstky SS1 - SS5, prostřednictvím záměny za threonin nebo arginin. Bylo zjištěno, že přítomnost SS1, SS2 a SS4 je významná pro strukturu vazebného místa pro ligand, zatímco SS5 je lokalizována blíže k transmembránovým doménám a je důležitá pro otevírání kanálu P2X4.

V článku v J. Neurochem. byl studován funkční význam některých konzervovaných

aromatických aminokyselin v první transmembránové doméně receptorů P2X. Práce ukázala, že aromatické zbytky v horní části transmembránové domény receptorů P2X jsou důležité pro funkční konformaci struktury receptorů. Nejvýznamnější z nich je konzervovaný tyrosin, který ovlivňuje otevírání/zavírání iontového kanálu a současně i specifitu vazby agonisty.

Studie vazebných podmínek selektivního modulátoru ivermektinu na receptor P2X4 se soustředila na záměnu aminokyselin v první a druhé transmembránové doméně rekombinantního krysího receptoru P2X4 za alaniny a cysteiny. Elektrofyzilogická data byla získána na buněčné linii HEK293 po expresi mutantních receptorů.

Výsledky disertační práce plně odpovídají vytčeným cílům. Grafické zpracování předložené práce je na velmi dobré úrovni a odpovídá požadavkům na obsahovou a formální stránku.

Otázky oponenta:

1. V rodině savčích receptorů P2X vykazuje značnou senzitivitu k ivermektinu pouze receptor P2X4. Autor zároveň cituje práce, které ukazují, že se ivermektin používá jako lék při parazitických onemocněních, kdy moduluje také glutamátém otevíraný chloridový kanál, a některé další ligandy otevírané kanály. Vyskytuje se na těchto kanálech obdobná sekvence aminokyselin, jako je na vazebném místě pro tuto lipofilní látku u P2X4 receptoru?
2. Jsou známy genetické poruchy v zastoupení aminokyselin ve struktuře purinergních receptorů, klíčových pro jejich funkci?

Závěrem konstatuji, že Mgr. Vojtěch Vávra prokázal schopnosti pro vědeckou práci. Předložil kvalitní disertační práci, ve které řešil aktuální téma týkající se struktury a funkce purinergních receptorů. Doporučuji, aby mu v případě kladného hodnocení v oponentním řízení byl udělen titul PhD.

V Praze 19. 8. 2011

Doc. RNDr. František Novák, CSc.
Universita Karlova,
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie