

Posudek na doktorskou disertační práci pana Miloše Rokiće

**Název: Funkční úloha disulfidických můstků a extracelulárního vestibulu P2X4 receptoru potkana**

Disertační práce se na 81 stranách zabývá studiem funkčních vlastností modelů rekombinantního purinergního P2X 4 receptoru. Technikou bodové mutagenese byly vytvořeny mutace pěti konzervovaných cysteinových párů v ektodoméně receptoru, která tvoří vazebné místo pro ATP a mutace pěti aminokyselinových zbytků které tvoří extracelulární vestibul P2X4 iontového kanálu. Základem práce jsou záznamy ATP-stimulovaných proudů snímaných metodou patch clamp jednotlivých mutovaných receptorů exprimovaných v buněčné linii HEK293. Byl tak ověřován význam jednotlivých cysteinových zbytků, jejich párů a jednotlivých aminokyselin pro funkceschopnost receptoru. Autor dopěl k závěru, že 4. a 5. disulfidický můstek má zásadní úlohu ve funkci receptoru, 1. a 2. má význam pouze částečný a 3. pravděpodobně žádný. Autor také identifikoval pět aminokyselinových zbytků, které mají význam pro funkci iontového kanálu, a každému z nich přiřadil vlastní roli.

Úvodní část práce předkládá na 27 stranách velice přehledně základní informace o purinergní signalizaci, systematickém rozdělení jednotlivých receptorů, jejich elektrofyziologických vlastnostech, morfologii a autor popisuje i farmakologické přístupy k jejich studiu. Jasně také definuje pojmy, se kterými dál pracuje v textu. Detailní popis vazebných struktur receptoru a jejich vztahu k aktivaci celého P2X receptoru je doprovázen 15 obrázky a dvěma tabulkami. Ačkoliv autor prokázal značné znalosti detailní struktury purinergních receptorů a jejich molekulárně-farmakologických vlastností, úvodní část postrádá pojednání o širším významu purinergní signalizace v rámci buňky i celého organismu. Distribuce jednotlivých typů receptorů v rámci organismu je shrnuta do tabulky 1.1 a určitý pleiotropní význam purinergních receptorů v buněčné signalizaci ve spinální míše je naznačen na obrázku 1.1. Tabulka ani obrázek nejsou doprovázeny žádným komentářem v textu a legenda k obrázku rozhodně není vyčerpávající. Z úvodu ani vypsání cílů práce také vůbec nevyplývá, proč si autor vybral ze široké škály purinergních receptorů ke studiu právě P2X4 receptor. Je význam stejně umístěných aminokyselin pro funkci ostatních purinergních receptorů již popsány? Má P2X4 receptor zvláštní význam pro fyziologii některého orgánu či mozkové struktury, která je v centru zájmu laboratoře?

Kapitola Metodika o 10 stranách popisuje experimentální přístup, přípravu jednotlivých mutací, kontrolních postupů, fluorescenční analýzu exprese P2X na membráně buněk a detailní popis elektrofyziologického měření včetně všech chemikálií, použitých roztoků a způsobu analýzy získaných dat. Popis celé metodiky je zcela vyčerpávající a zahrnuje i názvy dodavatelů jednotlivých chemikálií.

Výsledky jsou shrnuty do 18 stran textu včetně obrázků. Jednotlivé kapitoly systematicky a přehledně popisují dílčí experimenty a každá kapitola je ukončena jasným shrnutím.

Formální výtky – na stránce 55 je nesprávný odkaz na obrázek 1 a tabulku 2, ze smyslu ale vyplývá, že se mluví o obrázku 4.5 a tabulce 4.3. Dále, v metodice se uvádí, počet buněk měřených v jednotlivých experimentech je 5-35. To je značné rozpětí „n“ a u každého jednotlivého výsledku by mělo být uvedeno, z jak velkého vzorku buněk se odvozuje.

Z diskuse rozepsané na 7 stranách je zjevné, že autor má značný přehled o literatuře v daném oboru, dobře tématu rozumí a je schopen systematicky a kriticky zhodnotit jednotlivé nálezy a porovnat je s dostupnou literaturou. Je to však kapitola, která je místy napsaná poněkud neobratně. Například na stránce 66 v posledním odstavci se autor bez bližší souvislosti odvolává na zvláštnosti expresního systém. Píše:” ...in contrast to results presented in this thesis, each of ten P2X4 receptor mutants expressed in oocytes generated a robust inward current and EC50 values of the C135A and C217A mutants were comparable to P2X4 receptor-WT (Yi and Liu, 2009)...” další věta stručně bez hlubší analýzy popisuje jiný velmi zásadní rozdíl ve výsledcích získaných z HEK293T a z oocytů. Je to opravdu tak, že význam identických mutací pro funkci receptoru tak zásadně závisí na expresním systému? Tato poznámka otevírá otázku, proč autor zvolil HEK293T jako expresní systém a proč nezvolil oocyty? Proč nezvolil buněčnou linii co nejvíce podobnou přirozeným orgánovým buňkám exprimujícím tento receptor a zda-li může v tom případě kategoricky prohlásit na příklad, že narušená SS3 vazba nemá vliv na funkci receptoru.

Jedna strana závěrů shrnuje zásadní nálezy do pěti bodů a celou práci uzavírá 9 stran seznamu použité literatury

Závěr: předkládaná doktorská dizertační práce obsahuje velké množství původních dat získaných řadou náročných technik a prokazuje autorovy detailní znalosti problematiky. Několik výše uvedených výhrad se týká pouze formálního zpracování dizertační práce. Spolu s četnými stylistickými nesrovnalostmi a několika překlepy svědčí o ukvapenosti její přípravy nikoliv o nedostatcích experimentálních. Předkládanou disertační práci proto vřele doporučuji k obhajobě.

21.2.13

Zdeňka Bendová

