

Posudek na doktorandskou disertační práci Mgr. Jany Brejchové nazvanou  
ÚLOHA MEMBRÁNOVÉHO CHOLESTEROLU V SIGNALIZACI  $\delta$ -OPIOIDNÍHO  
RECEPTORU: KORELACE SE STRUKTUROU PLAZMATICKÉ MEMBRÁNY

Disertační práce Mgr. Jany Brejchové zabývající se zkoumáním role cholesterolu v signalizaci  $\delta$ -opioidního receptoru byla vypracována na základě experimentální práce prováděné na Fyziologickém ústavu AV ČR během jejího doktorandského studia na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Vlastní disertační práce je založena na výsledcích publikovaných ve dvou mezinárodních časopisech s relativně vysokým impakt faktorem (Biochim. Biophys. Acta - IF 3.990 a Chem. Phys. Lipids. - IF 2.595) a rukopisu připraveného k publikaci. Kopie všech těchto textů jsou in extenso přiloženy k disertační práci. Jana Brejchová je kromě toho také spoluautorkou dalších dvou článků publikovaných v impaktovaném časopise Physiol. Res. (IF 1.487).

Téma disertační práce týkající se signalizace prostřednictvím receptorů spřažených s G proteiny (GPCRs) vychází s dlouhodobě studované problematiky v Oddělení biochemie membránových receptorů doc. RNDr. Petra Svobody, DrSc., který byl vedoucím této práce. Vzhledem k jejich klíčovému významu v regulaci nejrůznějších fyziologických procesů patří GPCRs a jejich signální systémy k široce studovaným molekulám s vysokým potenciálem pro farmakoterapeutické intervence. Díky rozvoji nových technologií pokračují výzkumy v této oblasti velmi rychlým tempem, avšak stále zůstává mnoho neobjasněných souvislostí. Jednou z ne zcela probádaných oblastí je vliv struktury plazmatické membrány na modulaci přenosu informace prostřednictvím GPCRs. Předložená práce zaměřená na studium vlivu deplece cholesterolu z plazmatické membrány na funkci signalizace  $\delta$ -opioidního receptoru přináší nové důležité poznatky právě v této oblasti.

Vlastní práce je členěna klasickým způsobem a je zpracována velmi přehledně a pečlivě. Po formální stránce mám k předložené práci jen následující drobné připomínky. V textu se opakovaně (str. 3, 8, 14, 21) objevuje nesprávný způsob psaní enzymu adenylylcyklázy („adenylyl cykláza“) – názvy enzymů jsou zpravidla jednoslovné, na str. 13 je uveden poněkud nepřesný překlad zkratky GIP („polypeptid inhibující žaludek“) – správněji má být gastrointestinální inhibiční peptid nebo gastroinhibiční peptid a v odstavci týkajícím se charakterizace třídy Gs proteinů (str. 21) chybí odkaz na nějaký relevantní zdroj odborné literatury.

V obsáhlém literárním přehledu (celkem 52 stran) autorka poskytuje aktuální informace týkající se nejen struktury a vlastností GPCRs, trimerních G proteinů a buněčných membrán, ale také principů relevantních biofyzikálních metod (jmenovitě fluorescenční spektroskopie) používaných k charakterizaci membránové dvojvrstvy. Následuje výčet cílů práce a přehledný popis metodických přístupů použitých k jejich dosažení. Výsledková část práce (celkem 34 stran) přehledně dokumentuje získaná experimentální data a je doplněna 21 názornými grafy a obrázky. V rámci diskuse autorka adekvátním způsobem konfrontuje vlastní výsledky s dosud známými poznatky v této oblasti výzkumu a v následné závěrečné části stručně shrnuje nejdůležitější výsledky své práce.

Lze konstatovat, že cíle práce byly velmi dobře naplněny a autorce se podařilo získat řadu nových zajímavých informací o významu struktury plazmatické membrány pro signalizaci prostřednictvím  $\delta$ -opioidního receptoru. Podstatné je zejména zjištění, že deplece cholesterolu výrazně snižuje funkční spřažení tohoto receptoru s příslušnými G proteiny. Pozoruhodné je, že k tomu dochází i v případě použití společného konstruktů  $\delta$ -opioidního receptoru s  $G_{i1\alpha}$  proteinem, ve kterém jsou receptor a G protein spojeny do jedné hybridní molekuly. Příčinou je zřejmě signifikantní vzrůst fluidity plazmatické membrány, který byl monitorován pomocí fluorescenčních sond, a který může být spojen se zvýšením míry neuspořádanosti a zvýšením mobility komponent membránové dvojvrstvy.

#### Otázky do diskuse:

1. Jak je možné vysvětlit poměrně významné rozdíly v hodnotách rovnovážné anizotropie DPH mezi membránovými preparáty odvozenými z HEK293 a VTGP buněk (obr. 19)? Výrazně odlišný průběh křivek závislosti rovnovážné anizotropie DPH na depleci cholesterolu se objevil také ve vzorcích připravených z kontrolních buněk a z buněk ovlivněných pertusis toxinem (obr. 25B)? Je možné to nějak komentovat?
2. V tabulce 1 přiloženého manuskriptu se uvádějí hodnoty difúzního koeficientu (D) získané pomocí FRAP analýzy VTGP buněk s použitím různé velikých měřených oblastí (ROI). Jak je možné vysvětlit zdvojnásobení hodnoty D v případě ROI 6  $\mu\text{m}$  oproti ROI 2  $\mu\text{m}$  nebo 3  $\mu\text{m}$ ?
3. Pomocí metody RICS bylo zjištěno (údaje v přiloženém manuskriptu), že deplece cholesterolu pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu, která zvyšuje fluiditu membrány, neměla vliv na laterální pohyblivost TRH-R-GFP v plazmatické membráně VTGP buněk. Jedná se zřejmě o poměrně nečekaný výsledek. Existují v literatuře nějaké informace o jiných GPCRs a vlivu struktury plazmatické membrány na jejich pohyblivost a účinnost signalizace?

Závěrem je možné konstatovat, že Mgr. Brejchová vypracováním své disertační práce prokázala nejen výbornou teoretickou orientaci v problematice transmembránové signalizace zprostředkované GPCRs, ale osvědčila také praktické schopnosti v provádění experimentů založených na použití moderních biochemických a biofyzikálních přístupů. Vysoká úroveň zpracování předložené disertační práce, která splňuje veškeré požadavky kladené na tento typ práce, dokazuje schopnost autorky samostatné vědecké činnosti. Proto doporučuji, aby Mgr. Brejchové byl po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D.

V Praze 24.10.2014

Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.  
Katedra fyziologie  
Přírodovědecká fakulta UK v Praze