

Posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Jany Brejchové s názvem:  
**„Úloha membránového cholesterolu v signalizaci  $\delta$ -opioidního receptoru; korelace se  
strukturou plazmatické membrány“**

Mgr. Jana Brejchová předložila doktorskou disertační práci, ve které shrnula výsledky, které získala během svého doktorandského studia v oboru Fyziologie živočichů, kdy se věnovala výzkumu úlohy membránového cholesterolu v signalizaci  $\delta$ -opioidního receptoru. Cílem této disertační práce bylo stanovení vlivu struktury plazmatické membrány na funkci a lokalizaci  $\delta$ -OR.

Zásadní vliv na strukturu a dynamiku (biofyzikální vlastnosti) plazmatické membrány obecně má především cholesterol, který podle dosavadních poznatků tvoří 30-40 % lipidových molekul (lipidů) membránové dvojvrstvy. Distribuce cholesterolu v rámci plazmatické membrány není rovnoměrná. Značné množství cholesterolu je spolu se sfingolipidy soustředěno ve specifických membránových okrscích, souhrnně označovaných jako membránové domény. Membránové domény jsou dynamické struktury, které ovlivňují distribuci a funkci řady membránových proteinů, receptory spřažené s heterotrimerními G proteiny nevyjímaje. Jelikož jsou membránové domény obohaceny cholesterolem, manipulace tohoto membránového lipidu je obvyklým nástrojem používaným ke zjištění vlivu struktury plazmatické membrány na funkci těchto receptorů. Nejsnazším způsobem manipulace obsahu membránového cholesterolu je deplece prostřednictvím  $\beta$ -cyklodextrinu.

Při stanovení vlivu  $\beta$ -cyklodextrinem ( $\beta$ -CDX) navozené deplece cholesterolu na funkci  $\delta$ -OR, Mgr. Brejchová použila plazmatické membrány izolované z buněčné linie HEK293, která stabilně exprimuje fuzní protein mezi  $\delta$ -OR a mutantou  $G_{i1\alpha}$  proteinu, která je rezistentní vůči působení pertussis toxinu,  $G_{i1\alpha}$  (C351I). Pro tento účel použila metodu, jejíž podstatou je vysokoafinní vazba nehydrolyzovatelného analoga GTP, [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S, na  $G\alpha$  podjednotky G proteinů třídy  $G_i/Go$ . Stimulace receptoru agonistou vyvolává aktivaci G proteinu a následné zvýšení vazby [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S. V plazmatických membránách izolovaných z kontrolních buněk a buněk vystavených účinku  $\beta$ -CDX rovněž stanovila počet a afinitu  $\delta$ -OR (**Publikace 1**).

Stanovení vlivu deplece cholesterolu na funkci  $\delta$ -OR předcházela analýza biofyzikálních vlastností plazmatické membrány prostřednictvím metod fluorescenční spektroskopie. Pro detekci změn v rámci hydrofobní zóny plazmatické membrány, byla použita hydrofobní fluorescenční membránová sonda difenylhexatrien. Změny v hydrofilní

oblasti plazmatické membrány, tvořené polárními hlavičkami molekul fosfolipidů, byly analyzovány s pomocí fluorescenční sondy Laurdan (**Publikace 1**). Stanovení vlivu deplece cholesterolu provedené v izolovaných plazmatických membránách bylo rozšířeno o mikroskopickou analýzu plazmatické membrány živých buněk metodou FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*). Změny biofyzikálních vlastností plazmatické membrány živých buněk byly stanoveny s pomocí fluorescenčních analogů cholesterolu, 22- a 25-NBD-cholesterolu (**Publikace 2**).

Stanovení vlivu deplece cholesterolu na buněčnou lokalizaci  $\delta$ -OR bylo provedeno ve fixovaných preparátech buněk linie HEK293, která přechodně exprimuje variantu  $\delta$ -OR nesoucí na N-konci antigenní epitop FLAG. V paralelních pokusech bylo provedeno stanovení vlivu deplece cholesterolu na agonistou (DADLE) indukovanou internalizaci  $\delta$ -OR. Receptory byly vizualizovány metodou nepřímé imunofluorescence. Zhotovené preparáty byly následně analyzovány s pomocí fluorescenčního konfokálního mikroskopu. Varianta receptoru nesoucí FLAG epitop na N-konci byla v tomto případě zvolena záměrně, protože přítomnost tohoto epitopu na extracelulárním konci receptoru umožňuje studovat pouze ty receptory, které byly na počátku experimentu lokalizovány v plazmatické membráně, neboť primární protilátky jichž se v tomto případě k označení receptorů používá, neprocházejí plazmatickou membránou živých buněk. Toto omezení se vztahuje na protilátky obecně, ovšem pro protilátky navázané na receptor již toto omezení neplatí.

Poslední část disertační práce tvoří stručný text, který charakterizuje výsledky které byly získány v rámci dlouholeté spolupráce se skupinou Prof. Hofa z Heyrovského ústavu fyzikální chemie AV aplikací moderních metod konfokální fluorescenční mikroskopie, FRAP a RICS pro vyšetřování mobility membránových receptorů. Vzhledem k nezbytnosti standardizace těchto technik při jejich aplikaci na studium živých buněk, byly použity HEK buňky stabilně exprimující fuzní bílkovinu mezi receptorem pro thyreoliberin (TRH-R) a eGFP.

Jedná se o velmi rozsáhlý a pečlivě připravený česky psaný text (189 stran), který je klasicky dělen na úvod, literární přehled, cíle práce, výsledky a diskusi, závěr, celkové shrnutí a seznam použité literatury. V přílohách jsou připojeny dvě původní práce autorky *in extenso* a ještě další, dosud nepublikované výsledky.

K předkládané disertaci mám tyto dotazy:

- 1) Existuje jiný metodický přístup jak docílit snížení obsahu cholesterolu v plazmatické membráně než vámi použitá extrakce s pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu?
- 2) Jaký vliv má deplece cholesterolu na signalizaci ostatních typů opioidních receptorů?

- 3) Má deplece cholesterolu vliv na dimerizaci opioidních receptorů?
- 4) Fluorescenčních analogů cholesterolu existuje celá řada. Proč jste pro své experimenty zvolili právě 22- a 25-NBD-cholesterol?

Závěrem lze konstatovat, že kvalita předkládaného textu svědčí o hlubokém zájmu autorky o podstatu studovaného problému a celkový rozsah práce svědčí pro píli, technickou zručnost, vytrvalost a zaujetí pro experimentální práci. Šíře literárních údajů, které autorka prostudovala a tvořivým způsobem interpretuje v kontextu s experimentálními výsledky které získala ve své disertaci je velmi rozsáhlá. Studentka zvládla řadu moderních biochemických metod a také pokročilých biofyzikálních metod založených na fluorescenční spektroskopii a konfokální mikroskopii. Předložená disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a udělení titulu PhD.

Dne 20.10. 2014

Ing. Jan Teisinger, CSc  
Fyziologický ústav AV ČR