



ÚOCHB ^{AV}
^{ČR}
IOCB PRAGUE

Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v. v. i.
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

zakova@uochb.cas.cz

Tel. +420 220 183 441

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Aleny Karnošové

„Lipidované analogy peptidu uvolňujícího prolaktin jako potenciální antiobezitika: zkoumání mechanismu účinku“

Práce Aleny Karnošové je rozdělena na dvě části. V první části se věnuje analogům PrRP31, jejich přípravě a *in vitro* biologické charakterizaci a druhá část je zaměřena na *in vivo* experimenty zahrnující metabolickou fenotypizaci myši s vyřazenými geny *npffr2* a *gpr10/npffr2*. PrRP31 a NPFF peptidy patří mezi RF-neuropeptidy a bylo prokázáno, že se oba dokáží vázat na stejné receptory a způsobují podobné fyziologické funkce.

Alena ve své práci nejprve srovnávala různé lipidizované analogy PrRP31 analogy s přírodním PrRP31 na buňkách transfekovanými receptory GPR10 a NPFFR2, což jsou receptory, na které se váže nativní PrRP31. Dále pak zjišťovala, jaká je schopnost těchto analogů spouštět různé signální dráhy a naposledy chtěla zjistit jiné potenciální receptory pro tyto analogy. V této práci bylo připraveno 16 různých analogů PrRP31 lipidizovaných buď na NH₂- konci nebo na lysinu v pozici 11. Z těchto analogů bylo později vybráno několik nejlepších, u kterých byly dále zjišťovány další *in vitro* vlastnosti. Jedná se o hezkou komplexní práci, která vede k zajímavým výsledkům. Tato práce je podpořena publikací v časopise *Neuropeptides* a navazuje na prvoautorskou publikaci v *International Journal of Molecular Sciences*. Některé analogy z této práce se ukázaly jako velmi efektivní ve snižování hmotnosti těla a snižování množství bílého tuku u myši a určitě by mohly být zajímavé pro další úpravy, které by vedly k následnému *in vivo* testování.

Druhá část práce se týkala *in vivo* experimentů zahrnujících metabolickou fenotypizaci myši s vyřazenými geny *npffr2* a *gpr10/npffr2* krměných buď standardní nebo vysokotukovou dietou. Tato část práce není zatím podpořena žádnou výslou publikací, ale jedna publikace je revizích v časopise

Clinical Science a druhá publikace je v přípravě. Tato část práce je velmi zajímavá a obsahuje důležité výsledky o podílu těchto dvou receptorů na vzniku a vývoji obezity, glukosovém metabolismu a insulinové resistenci, a navíc také v možném vzniku úzkostných stavů.

Práce je psána v anglickém jazyce, má standardní členění. V teoretickém úvodu se autorka věnuje úvodu do problematiky, jednotlivým peptidům, jejich receptorům a jejich roli a výskytu v organismu. Následují cíle disertační práce a kapitola Experimentálních metod, která by z mého pohledu mohla být podrobnější zvláště v částech, které nebyly publikované. Výsledková část zahrnuje výsledky z vazebných studií, veškerých imunoblotů a také *in vivo* experimentů. Následuje Diskuse a Závěr. O autorčině dobrém přehledu v problematice svědčí velké množství citované literatury. Práce zahrnuje dvě publikace v recenzovaných vědeckých impaktovaných časopisech, prvoautorská publikace Interantional Journal of Molecular Sciences (IF 6.208) a druhoautorská publikace v časopise Neuropeptides (IF 3.152). Vyšlé práce jsou uvedeny v příloze, ale zde bych také uvítala manuskript první *in vivo* publikace. Alena je dále spoluautorkou dalších tří publikací, které nejsou relevantní pro její disertační práci. Práce obsahuje malé množství překlepů, zejména v metodické a výsledkové části, nicméně z formálního hlediska je v pořádku. Předložená disertační práce jasně ukazuje, že Ing. Alena Karnošová získala značné zkušenosti a plně se orientuje ve svém oboru.

K práci mám následující otázky:

1. Saturační experimenty na jednotlivé receptory jste dělali buď s přirozeným ligandem nebo s jeho stabilním analogem. Mohla byste ukázat saturační křivky ^{125}I -PrRP31 na GPR10 a ^{125}I -DMe na NPFFR1 a NPFFR2? Proč v tabulce s afinitami jednotlivých analogů procentuálně vztahujete všechny analogy k PrRP31 i v případě obou receptorů NPFFR? Navrhovala bych zde uvést dva sloupečky, jeden vztažený k 1DMe a jeden PrRP31 pro lepší obrázek o afinitách jednotlivých analogů. Zkoušeli jste saturační experimenty, tzn. ^{125}I -PrRP31 na oba NPFF receptory?
2. Zkoušeli jste podobné lipidizované analogy dělat s PrRP20?
3. Imunobloty jste dělali v mikromolárních koncentracích (10^{-6}). Zkoušeli jste i nižší koncentrace, které by byli více fyziologické (standardně 10 nM)? A případně s jakými výsledky?
4. Nedělali jste někdy, případně neuvažovali jste dělat nějaké strukturní studie (CD, NMR, krystalografii) vašich peptidů nebo jejich analogů?
5. Jak si vysvětlujete, že NPFFR2 KO myši mají sníženou váhu i množství bílého tuku, přičemž u dKO myší je efekt opačný a u množství bílého tuku dokonce velmi výrazně.
6. Myši s deletovaným genem (KO) jste si připravovali samy? Nenašla jsem zdroj nebo odkaz.

7. Zaujal mě Open Field test. Mohla byste prosím popsat, jak se vyhodnocuje a jaké parametry hrají ve vyhodnocení roli?
8. Zmiňujete dvě připravované publikace na *in vivo* experimenty s KO myši. Jaký je jejich současný stav v jejich publikování?

Předkládaná disertační práce **splňuje** požadavky na disertační práci. Autorka prokázala vědeckou erudici, tvůrčí potenciál a je schopna samostatné výzkumné činnosti a práce představuje cenný přínos k problematice výzkumu antiobezitních peptidů.

Jelikož předložená práce Ing. Aleny Karnošové vyhovuje všem požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci, plně **doporučuji** její přijetí k obhajobě a udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

V Praze 23. května 2023

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.