



**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Venduly Nagy Markové:  
„Role of  $\beta$ -arrestin in  $\mu$ -opioid and TRPV1 receptor signalling“**

Disertační práce v oboru Fyziologie živočichů byla vypracována na Katedře fyziologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Mgr. Vendula Nagy Marková se ve své práci zabývá studiem úlohy  $\beta$ -arrestinu v signální dráze  $\mu$ -opioidních a TRPV1 receptorů, které jsou významně zapojeny v mechanismu přenosu bolesti. Byl zde sledován rozdílný vliv izoform  $\beta$ -arrestinu na laterální mobilitu a internalizaci  $\mu$ -opioidních receptorů a vliv na inhibici adenylyl cyklázy. Dále byla zkoumána úloha  $\beta$ -arrestinu2 v komunikaci a vzájemném ovlivňování mezi  $\mu$ -opioidním a TRPV1 receptorem a možná interakce a spolupráce mezi TRPV1 a TLR4 receptory. Jako modelový organismus byla použita buněčná linie HEK293 stabilně exprimující označený  $\mu$ -opioidní receptor, případně byla provedena transienční transfekce TRPV1 receptorem.

Předkládaná práce je zpracována na 80 stranách textu uspořádaných klasickým způsobem a zahrnuje teoretický literární úvod, cíle práce, přehled všech publikovaných prací autorky, metodickou část, výsledky, diskusi a závěrečné shrnutí. Následuje seznam použité literatury obsahující cca 160 citovaných prací. Jako příloha jsou uvedeny 2 původní publikace (s vysokým IF) v plném rozsahu, na nichž je založena předložená práce, u jedné z těchto publikací je Mgr. Nagy Marková první autorkou. Celková formální úprava práce je poměrně dobrá, práce je psána standardní odbornou angličtinou.

V teoretické části autorka shrnuje současné znalosti o  $\beta$ -arrestinu, jeho izoformách a úloze při desenzitizaci a internalizaci GPCR, zapojení do MAPK kinázové signální dráhy a objasňuje pojem „biased agonist“ – preferující či usměrňovací agonista. Dále je popsána struktura a funkce  $\mu$ -opioidního a vaniloidního (TRPV1) receptoru, regulace jejich signálních drah  $\beta$ -arrestiny a dosavadní znalosti o jejich crosstalku, vše v souvislosti zejména s mechanismem přenosu bolesti.

Cíle práce jsou formulovány stručně a konkrétně rozepsány pro jednotlivé záměry výzkumu. V metodické části jsou podrobně popsány použité metody, výsledky jsou uvedeny v členění podle cílů práce. Na cca 10 stranách diskuze autorka poměrně podrobně rozebírá dosažené výsledky provedených experimentů, srovnává je s daty dostupnými v literatuře, formuluje možné vysvětlující hypotézy a naznačuje další možné směry výzkumu v souvislosti s hledáním nových látek pro léčbu chronické bolesti a bez vedlejších negativních účinků. Rozsah diskuze svědčí o dobré orientaci ve studované problematice. Je třeba také ocenit široké spektrum experimentálních metodických přístupů, které autorka v rámci své disertační práce zvládla.

Několik připomínek k formální a obsahové stránce:

Úvod a diskuze obsahují minimum překlepů, popisu výsledků však mohla autorka věnovat poněkud větší péči – občas zde chybí ve větě slovo či se naopak vyskytuje 2x za sebou, obrázky jsou překopírované beze změny z publikovaných článků, obr. 9 je špatně oříznut – chybí zde legenda, obrázek 15B je chybně citován v textu jako 7B (str.59) . Tabulka 1 je také překopírována jako obrázek a je poměrně špatně čitelná. Statistickému zpracování a vyhodnocení výsledků

jednotlivých experimentů je věnován pouze krátký odstavec, bylo by vhodné podrobněji zdůvodnit použitý typ statistického testování. Pro lepší přehlednost a orientaci čtenáře by bylo také vhodné rozčlenit celistvý text diskuze do jednotlivých kapitol, např. dle dosažených výsledků práce.

Posuzovaná práce přes uvedené drobné nedostatky splňuje zadané cíle a požadavky na disertační práci. Získané výsledky významně rozšiřují poznání v oblasti výzkumu role izoform  $\beta$ -arrestinu v signalizaci  $\mu$ -opioidních receptorů, vlivu na funkci adenylyl cyklázy a výzkumu role  $\beta$ -arrestinu v komunikaci a spolupráci mezi  $\mu$ -opioidním a vaniloidním TRPV1 receptorem.

Mgr. Nagy Marková je spoluautorkou celkem 5 odborných publikací v kvalitních impaktovaných zahraničních časopisech a má velmi dobré předpoklady pro samostatnou vědeckou práci. Předkládanou disertační práci proto plně doporučuji k obhajobě.

Dotazy:

- 1) Jakým způsobem jste stanovili koncentraci  $\mu$ -opioidních agonistů na 1  $\mu$ M při sledování inhibice adenylyl cyklázy?
- 2) Které membránové izoformy adenylyl cyklázy jsou exprimovány v buněčné linii HEK293?
- 3) V kapitole 2.1.7 hovoříte o superkomplexech G proteinu,  $\beta$ -arrestinu a  $\beta$ -adrenergního receptoru. Co soudíte o možnosti, že by  $\beta$ -arrestin tvořil podobný preasociovaný komplex s  $\mu$ -opioidním receptorem a potažmo s G-proteinem?
- 4) Jak si vysvětlujete, že se nemění mobilní frakce  $\mu$ -opioidních receptorů po knockdownu obou  $\beta$ -arrestinů u HMY-1 buněk, zatímco v případě buněk exprimujících k tomu i TRPV1 mobilní frakce  $\mu$ -opioidních receptorů i bez aktivace vzrostla po knockdownu  $\beta$ -arrestinu2 ve srovnání s kontrolami?

V Praze 19.8. 2023

RNDr. Lenka Roubalová, Ph.D.  
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.