

## **Vyjádření k disertační práci Mgr. Johany Trojanové : Imunohistochemická analýza vlastností inhibičních glycinových a GABA B receptorů v MNTB.**

Disertační práce Mgr. Trojanové má 138 stran a je doprovázená 47 obrázky (převážně grafy, mikrofotografie a elektronogramy). K práci je přiloženo 5 publikací (jedna práce připravena k tisku).

Práce je členěna do 6ti kapitol. 1. kapitola – Úvod je velmi zdařilým přehledem současných znalostí o glycinovém a GABA B receptorech, o jejich struktuře, agonistech, antagonistech, o jejich expresi, lokalizaci a funkčním významu. Součástí úvodu je i přehled dosavadních poznatků o struktuře a synaptologii MNTB, jádra na které je disertace zaměřena. Dále je podán přehled současných názorů na strukturu Heldova kalichu, který představuje hlavní excitační vstup do MNTB. Heldův kalich je obrovské excitační, glutamátoregní presynaptické zakončení kontralaterální projekce z globulárních (bushy cells) buněk uložených v AVCN. V MNTB končí dále inhibiční vlákna GABAergní a glycinergní.

Druhá kapitola obsahuje cíle práce a hypotézy. Třetí kapitola je metodická a jsou v ní detailně popsány všechny metodické postupy použité v publikacích a v disertaci samotné (příprava materiálu pro optickou a elektronovou mikroskopii, pro fluorescenční mikroskopii, Western blot, analýza trojrozměrně rekonstruovaných neuronálních výběžků, statistické zpracování).

Ve 4. kapitole jsou shrnuty výsledky, 5. kapitola obsahuje diskusi k dosaženým výsledkům a začlenění výsledků do literárního kontextu. 6. kapitola obsahuje shrnutí výsledků.

Seznam použité literatury má téměř 200 položek.

Předkládané výsledky byly získány metodicky náročnými postupy, jejichž hodnocení vyžaduje značnou zkušenost s použitou metodikou a s hodnocením imunohistochemického barvení na úrovni světelného a elektronového mikroskopu.

Cílem práce je studium lokalizace a podjednotkového složení glycinového receptoru (GlyR) v Heldově presynaptickém zakončení v MNTB. Byla studována morfologie Heldova zakončení (kalichu) a distribuce GlyR na kalichu....Presynaptické a postsynaptické GlyR na hlavních neuronech MNTB se liší svojí podjednotkovou výbavou a funkcí. Presynaptické receptory na Heldových kališích jsou tvořeny  $\alpha$ -1 homomery a umožňují pomalou facilitaci, zatímco postsynaptické receptory jsou tvořeny  $\alpha$ -1- $\beta$  heteromery a zajišťují rychlou postsynaptickou inhibici.  $\beta$  podjednotka postsynaptických receptorů vytváří vazbu s postsynaptickým proteinem gerfyrinem. Gerfyrin dále zajišťuje interakce receptorů s motorickými proteiny postsynaptického neuronu a umožňuje tvorbu shluků GlyR. V experimentální části studie byl studován GlyR v MNTB po ablacii hlemýždě. Mezi významné výsledky uvedené v disertaci patří popis detailní

distribuce GlyR v jednotlivých segmentech Heldova kalichu. Zduřeniny Heldova kalichu vykazují vyšší (dvojnásobnou) povrchovou hustotu GlyR než stonky, ale nejsou přednostně umístěny v blízkosti AZ (aktivní zony).

GlyR jsou v presynaptické membráně preferenčně lokalizovány v místech přístupných pro jejich endogenní agonisty ( a tedy i pro glycin).

Další část výsledků je zaměřena na studium distribuce GABA B receptorů v MNTB a na studium lokalizace podjednotky KCTD 12 v témže jádře. Presynaptické i postsynaptické neurony v MNTB obsahují GABA B receptory, které se však liší svými funkcemi. Presynaptické GABA B receptory regulují uvolňování glutamátu, zatímco postsynaptické GABA B receptory zvyšují spolehlivost přenosu na excitačních synapsích. Pomocná podjednotka KCDT 12 ovlivňuje vlastnosti GABA B receptorů.

### **Chtěl bych upozornit na některé terminologické nepřesnosti a nejasnosti v textu :**

Str. 58. Kapitola 4.1.2 Presynaptické GlyR. Presynaptickou lokalizací receptoru se zpravidla myslí jeho lokalizace na presynaptickém zakončení (butonu). V tomto případě je termín „presynaptický „ použit pro studium GlyR na tělech globulárních neuronů v AVCN.

Str. 63 : GlyR receptory jsou na povrchu Heldova kalichu rozptýlené, bez zjevné akumulace do synaptických (aktivních) zon. Naproti tomu tyto receptory vytvářejí shluky na postsynaptické membráně. Bilaterální ablace kochley svědčí pro dynamiku a reversibilitu reorganizace postsynaptických GlyR.

Na proti tomu na str. 75 – 76 je uvedeno, že rozložení GlyR na povrchu Heldova kalichu je nehomogenní a naznačuje existenci míst s jejich vyšší hustotou. Která z těchto formulací je pravdivá ?

### **Otázky :**

Na jaký vesikulární pool se váží =partikule zlata ?

Autorka popisuje v MNTB přítomnost GlyR. Ze kterých presynaptických zakončení je v MNTB glycin uvolňován.? V řadě studií je popisována kotransmise glycinu a GABA, je možná podobná kotransmise i v MNTB ?.

Je možné srovnat účinnost a funkce Glycinového a GABAergního inhibičního systému ? Bylo by možné rozdíly ve funkcích a v účinnosti těchto inhibičních systémů vysvětlit jejich lokalizací ? GABAergní systém převažuje v rostrální části CNS (kortexy, bazální ganglia), zatímco glycinergní

system v mozkovém kmeni a v míše.

V předložené disertaci autorka prokázala schopnost pracovat s komplikovanými a náročnými imunocytochemickými metodikami na úrovni světelného i elektronového mikroskopu a vyčerpávajícím způsobem interpretovat dosažené výsledky a zařadit je do literárního kontextu. Disertace obsahuje řadu prioritních výsledků, které významně doplňují naše vědomosti o glycinovém receptoru jeho struktuře a distribuci v MNTB. Tyto výsledky se v publikovaných studiích již staly součástí literárních databází. Získané výsledky mají charakter základního výzkumu, významně rozšiřují naše znalosti v oblasti inhibičního systému mozku a konkrétně sluchové dráhy. Je třeba si uvědomit, že inhibiční systém CNS je oblastí mnoha terapeutických intervencí a studie tohoto typu jsou velmi často a rychle využívány v aplikovaném a klinickém výzkumu. Rozhodně to platí pro disertaci Mgr. Trojanové.

Předložený text disertační práce je psán velmi přehledně a srozumitelně, autorka přesně a výstižně formuluje. Obrazová dokumentace je integrální součástí textu a má vysokou informační úroveň.

Předložený text a připojené publikace prokazují, že autorka zvládla metodicky náročné experimenty, dosáhla řady prioritních výsledků a splnila všechny podmínky pro udělení titulu PhD. Doporučuji proto, aby po zodpovězení otázek a vysvětlení některých formulačních nejasností byla její práce pozitivně hodnocena a aby jí byl udělen titul PhD.

V Praze 6. června 2014.

Prof. MUDr. R. Druga, DrSc  
anatomický ústav 2. LF