

Oponentský posudek na diplomovou práci Veroniky Špulákové na téma:

Ovlivnění buněčné signalizace v eukaryotních buňkách pomocí adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertusis*.

Předložená diplomová práce byla vypracovaná z části na naší katedře pod vedením Doc. Konopáskova a z části v Mikrobiologickém ústavu v laboratoři Ing. Šeba, kde se touto problematikou zabývají intenzivně řadu let a k studiu úlohy ACT toxinu ve virulenci *Bordetella pertusis* je přístupováno mnoha experimentálními metodami.

Ve své práci autorka navázala na dřívější studia laboratoře, metodou fluorescenční spektroskopie změřila a prokázala některé aspekty funkce ACT toxinu, a to jeho schopnost transportovat vápenaté ionty.

Autorka provedla řadu měření intracelulárních koncentrací vápníku v eukaryotních buňkách myši v závislosti na přítomnosti ACT toxinu. Potvrdila, že za nárůst vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů je zodpovědný pouze ACT toxin, že sám, inkorporovaný do membrány, funguje jako transportér a neovlivňuje ostatní iontové kanály. Dále, že inkorporace je závislá na přítomnosti a koncentraci receptorů CD11b/CD18 v napadených buňkách. Zároveň provedla, při použití mutantních toxinů, jeho částečnou strukturní analýzu.

Po formální stránce práce nemá závažných nedostatků, má 81 stran, všechny předepsané kapitoly a formální náležitosti. Pouze cíle práce jsou obsaženy v úvodu a ne v samostatné kapitole. V kapitole seznam zkratk jsou uvedeny též typy mutantních ACT toxinů, ty by však měly být uvedeny v metodách v samostatné kapitole.

V úvodu autorka popisuje obecně přehled virulentních toxinů u bakterií a soustředí se hlavně na detailní popis dosavadních poznatků o studovaném ACT toxinu *Bordetella pertusis*, který je popsán přehledně a detailně včetně vývoje názorů na jeho funkci. Dále též podrobně popisuje příznaky onemocnění toxinem vyvolané. Tento popis mi možná s ohledem na experimentální charakter práce připadá neúměrně detailní a navíc v něm autorka trochu nedůsledně argumentuje o jednotlivých stádiích nemoci a o negativním vlivu doposud používané vakcinace.

viz. str. 11, kde je detailní popis průběhu stádií nemoci, ale chybí příčiny úmrtí a místo toho je pouze informace, že v poslední fázi nemoci bakterie z plic mizí.

Kapitola materiál a metody obsahuje popis snad všech použitých kmenů bakterií a buněk, chybí však popis mutantních ACT toxinů, seznam jejich zkratk a popis je uveden pouze v seznamu zkratk, což považuji za nedostačující. Navíc by k zvýšení přehlednosti a lepší orientaci v textu bylo užitečné uvést schéma s vyznačenými mutacemi jednotlivých mutantních toxinů. Je popsána izolace toxinu po nadprodukci v rekombinantních plasmidech v *E. coli* a detailně příprava vzorků tkáňových buněk a samotné měření vnitrobuněčné koncentrace vápníku pomocí fluorescenčních sond. Vzhledem k tomu, že příprava mutantních toxinů je odkázána citací, vyplývá, že autorka je sama nepřipravovala.

K této kapitole mám několik dalších formálních připomínek.

str. 30. v popisu genotypu XL1 buněk je snad překlep místo Th10 má být Tn10

str. 31 u TE pufru chybí popis způsobu sterilizace roztoku

str. 34.: u složení akrylamidových gelů není přesně uvedena použitá koncentrace a složení zásobního roztoku akrylamidu.

str. 37. transformace buněk byla opravdu prováděna při 37°C normálně se provádí při 42 °C.

Chybí popis přípravy kompetentních buněk nebo alespoň citace nebo zdroj.

str. 38.: použila jste neionizovanou vodu nebo jde o překlep z deionizované vody

str. 39: obr.39 v dráze pro EX je vysoké pozadí, čím je způsobeno?

v prvním odstavci je špatně odkaz na stanovení proteinů, uvedený odkaz 4.2.6. vede k purifikaci toxinu, stanovení proteinu je v kapitole 4.2.7.
str. 40: znovu špatně uveden odkaz na stanovení proteinu, kapitolu 4.2.1.6. jsem vůbec nenašla.

Výsledky jsou popsány na dvaceti stranách a jsou napsány přehledně a ve sledu jak byla jednotlivá měření prováděna, včetně uvedení důvodu provedení jednotlivých pokusů. V případě použití mutantních ACT toxinů je popsána mutace a předpokládáný či experimentálně doložený vliv na jeho funkci. Výsledky jednotlivých experimentů jsou dokumentovány grafy, komentovány a hodnoceny.

K experimentální části mám jen jednu připomínku.

na str. 52 u legendy k obrázku č. 17 chybí citace u informace převzaté od Radovana Fišera.

Diskuse má pět stránek a je zde podrobně diskutován vliv inhibitorů vápníkových kanálů, a je doloženo, že vstup vápníku v přítomnosti ACT toxinu se děje bez účasti vápníkových kanálů. Dále jsou rozebrány výsledky při použití mutantních toxinů, které jsou v dobré korelaci s dalšími výsledky laboratoře a předpokládanými účinky mutací na funkci toxinu. Vzhledem k použití pěti různých mutant je i tato část diskuse celkem přehledná a na různě funkčně defektních toxinech jsou demonstrovány závěry. Větší přehlednosti by prospělo uvedení již výše zmíněného schématu použitých mutovaných toxinů.

Práce je napsána dobrou češtinou, i když někdy příliš strohou a s neobratnými spojeními. Nezaznamenala jsem výrazné používání anglismů a laboratorního slangu. Překlepy se vyskytují v práci minimálně i když v některých případech pozměňují význam slov (viz. výše str. 38 a str. 30) a měly by být dodatečně opraveny

I přes uvedené připomínky jde o práci kvalitní a několik nedostatků lze připsat na úkor rozsáhlosti zpracovávaných dat. Autorka jednoznačně prokázala schopnost k experimentální i teoretické vědecké práci a předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

K uvedeným připomínkám v textu mám na autorku ještě dvě otázky.

1. Při všech proměřováních vstupu vápníku porovnáváte výsledky s divokým kmenem, který uvádíte na obr. 15. Jsou zde vyznačeny poměrně vysoké směrodatné odchylky. Z kolika měření jsou udělány průměry u prezentovaných grafů jak u měření divokého kmene, tak u všech dalších uvedených měření?

2. Z Vašich výsledků vyplývá, že vytvoření póru je závislé na přítomnosti specifických receptorů (CD11b/CD18), které jsou přirozeně přítomny ve Vámi používaných myších buňkách, jaká je využitelnost těchto poznatků u lidských buněk a naopak znamená Váš výsledek to, že *Bordetella pertusis* může infikovat myši?

V Praze 23. 5. 2006

RNDr. Irena Lichá
Katedra genetiky a mikrobiologie
Přírodovědecká fakulta UK
Viničná 5, Praha 2