

### Posudek školitele na diplomovou práci Veroniky Špulákové

„Ovlivnění buněčné signalizace v eukaryotních buňkách pomocí adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis*.“

Téma práce Veroniky Špulákové patří do okruhu „Adenylátcyklázový toxin *Bordetella pertussis*“. Před několika provedl Radovan Fišer z naší skupiny pokusy, které ukázaly, že AC toxin indukuje v hostitelských buňkách vstup vápníku. Bylo nutno zjistit, jaký má tento fenomén význam pro ovlivnění hostitelské buňky, případně pro její smrt. Veronice připadla úloha nepříliš vděčná – na základě účinku inhibitorů vápníkových kanálů zjistit mechanismus vstupu, tedy zda vápník proudí do buňky samotným toxinem nebo buněčnými vápníkovými kanály. Kromě toho měla zjistit, zda jak se toxin chová na buňkách exprimujících integrinový receptor ve srovnání s buňkami, které receptor neexprimují. Tuto úlohu řešila ve spolupráci se skupinou ing. Petra Šeba z MBÚ AV ČR, se kterou v této oblasti dlouhodobě spolupracujeme.

Její práce má 81 stran, má obvyklé členění, experimentální část zahrnuje 31 obrázků, 61 citovaných odkazů. Úvod se soustředí kromě obvyklého popisu toxinu a jeho vlastností na transportní mechanismy vstupu vápníku do eukaryotní živočišné buňky, což je téma, které bylo pro nás nové a souviselo se zaměřením její práce.

Výsledková část je pro nás velmi cenná a je součástí připraveného článku, který teď budeme posílat do tisku. Diplomantka dokázala na buňkách myších makrofágů, že po indukcii vstupu vápníku do buňky pomocí ACT proudí vápník samotným toxinem a ověřila zároveň, že mutace v AC doméně dokážou ovlivnit vstup vápníku, což doplňuje náš nálezný, že za samotný vstup vápníku do buňky odpovídá translokace AC domény. Zajímavý je také nálezný, že při delecii této domény je možný transport póry tvořenými toxinem u tzv. hyperhemolytických mutantů. U křeččích CHO buněk dokázala autorka, že přítomnost integrinového receptoru je pro indukcii transportu vápníku zásadní.

Na práci autorka pracovala asi dva roky bez výkyvů, dostávala úkoly, které plnila. Vzhledem k charakteru její práce šlo o opakovaná fluorescenční měření, kde bylo někdy dost těžké standardizovat výchozí podmínky, na některých inhibitech bylo nutno pracovat opakovaně a měnit podmínky inkubace. Práce, která vypadá ve Výsledcích monotónně, leckdy představovala několikanásobný návrat k jednomu tématu, potvrzování mechanismu účinku inhibitorů z literatury, a výsledkem je jediný graf v práci nebo čtvrtina grafového „slepence“ v publikaci. V pracovním kolektivu bylo postavení Veroniky bez problémů, bylo na ni spolehnutí a o její výsledky se můžeme opřít bez pochybností. Toto konstatování není triviální, měření s živými buňkami nebyla jednoduchá.

Autorce bych přesto vyčetl několik věcí. Sepisování práce nebylo jednoduché, v zájmu dosažení standardní úrovně textu bylo vyváženo značným vkladem energie ze strany školitele. Pokulhávala schopnost vyjádřit podstatné věci, jazyková úroveň nebyla dobrá, což se projevovalo hlavně „neliterárním“ stylem blízkým spíš slovnímu vyjádření. Řekl bych, že pokulhávala i schopnost myšlenkově obsáhnout širokou problematiku, což bylo nutné ke zpracování výsledků, závěrům a diskusi. Vyčetl bych ještě něco, co jsem nenašel v oponentském posudku, a sice nedůsledný formát citací v Seznamu citované literatury. Měl jsem za to, že autorka používala bibliografický software a Seznam jsem neprohlížel, což bylo mé opomenutí.

Práce má nicméně vysokou úroveň a rozhodně ji doporučuji k obhajobě jako diplomovou práci.

V Praze dne 28.5.2006

doc.RNDr. Ivo Konopásek, CSc.