



## Posudek disertační práce

### *„Studium aktivace a modulace svalových nikotinických acetylcholinových receptorů pomocí bodových mutací“*

**Autor: Mgr. Lucie Svobodová**

Předložená disertační práce se zabývá studiem svalových nikotinických acetylcholinových receptorů (nAChR) pomocí patch-clampu, metody umožňující měření elektrických proudů tekoucích přes biologické membrány a využívané pro studium transportních proteinů. Studovaný protein, nAChR, patří mezi třídu ligandem otevíraných iontových kanálů těšících se dlouholetému zájmu vědců<sup>1</sup> i lékařů - řada léčiv a jedů působí právě přes acetylcholinové receptory.

Práce je srozumitelně napsána, téměř bez překlepů, grafická kvalita obrázků i grafů je výborná. Dělení je klasické - po úvodu shrnujícím současný stav poznání nAChR a vysvětlujícím modely popisu kinetiky aktivace receptoru ligandem následují výsledky (rozdělené do dvou větších celků) a jejich diskuse.

Co bylo vlastním obsahem experimentální práce: Dvě varianty svalového nAChR (embryonální a dospělá) a některé jejich bodové mutace byly studovány v transfekovaných COS buňkách. Měření byla prováděna pomocí patch-clampu v konfiguraci snímání z celé buňky. Během experimentu byly aplikovány látky ((+)-tubokurarin, physostigmin, galanthamin), jejichž účinek na nAChR byl studován pomocí aplikačního systému vyvinutého přímo v laboratoři buněčné neurofyzologie FgÚ. Byly sledovány dva děje (aktivace acetylcholinem a následující desenzitizace) a jejich ovlivnění jak typem exprimovaného receptoru, tak přidávanými modulátory. Inhibiční křivky byly analyzovány dvěma metodami, Cheng-Prusoffovou analýzou a Schildovou regresí, jejichž výsledky byly srovnány a diskutovány.

Mezi získané nové výsledky patří srovnání kooperativity dospělého a embryonálního nAChR, pozorování smíšené inhibice (+)-tubokurarinem, vliv neutralizace dvou záporně nabitých aminokyselinových reziduí (D<sup>180</sup>, E<sup>189</sup>) na receptor a charakterizace mechanismu inhibice physostigminem a galanthaminem.

Během obhajoby bych chtěla položit několik otázek:

- Proč se v roztoku mimikujícím intracelulární prostředí používá cesium fluorid (chlorid)?
- Na mnoha místech (např. obr. 21) ukazujete aktivační křivky receptorů. Předpokládám, že zobrazené křivky představují fit měření. Pro kolik hodnot koncentrace ACh bylo měření prováděno? Jedná se o průměry z několika buněk, nebo o měření na vybrané buňce?
- S tím souvisí i další otázka - jak jsou absolutní hodnoty proudové odpovědi na ACh reprodukovatelné pro různé buňky? Je exprese receptoru po transfekci vždy srovnatelná, nebo se buňku od buňky liší?

<sup>1</sup> o aktuálnosti tohoto tématu svědčí 422 článků zmiňujících nikotinický acetylcholinový receptor publikovaných od roku 2008 včetně - PubMed, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 12.5.2009

- Ovlivňoval nějak (+)-tubokurarin průběh desenzitizace receptoru?

Uvedené otázky považuji jen jako doplňující a rozvíjející diskuzi při obhajobě. Nezpochybňuji nijak získané výsledky a závěry práce.

Výsledky získané během doktorského studia byly publikovány ve 4 původních pracích v mezinárodních recenzovaných časopisech, do současnosti byly 11x citovány. To bezpochyby stačí k úspěšnému dokončení doktorského studia.

Na závěr lze konstatovat, že předložená disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji proto Mgr. L. Svobodové udělit titul „**Ph.D.**“



V Praze, dne 14.5.2009

RNDr. Eva Urbánková, Ph.D.

Fyzikální ústav UK  
Matematicko-fyzikální fakulta  
Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2  
Telefon: +420 221 911 339  
e-mail: Eva.Urbankova@mff.cuni.cz