

**Externí posudek dizertační práce Mgr. Evy Dolejší:
“Mechanismy přenosu signálu muskarinovými receptory”**

Téma dizertační práce Mgr. Evy Dolejší je zaměřeno na charakterizaci rozdílů v účincích xanomelinu, funkčně selektivního agonisty specifických podtypů muskarinových acetylcholinových receptorů.

Výsledky prezentované v dizertační práci přináší řadu nových poznatků v aktuální oblasti výzkumu a jsou podkladem dvou primárních publikací v respektovaných mezinárodních časopisech (PlosOne, IF 3.5 (2014) a J. Neurochemistry, IF 3.97 (2012)) a jednoho přehledného článku ve Physiological Research, IF 1.5 (2013).

Struktura a formální úroveň práce

Předložená práce má bez příloh 94 strany. Úvodní část spisu tvoří 35 stran literárního přehledu se základními údaji o klasifikaci muskarinových receptorů, molekulární struktuře a vazebných místech. Popis lokalizace v periferním a centrálním nervovém systému je následovaný přehlednou charakteristikou obecných mechanismů spřáhování a signalizace.

Cíle práce jsou formulovány na str. 44 ve třech specifických bodech zahrnujících určení rozdílů v okamžitých a déletrvajících účincích xanomelinu na jednotlivé podtypy mAChR a popis interakce této látky s ortosterickým antagonistou. Výsledková část v rozsahu 16 stran, v níž autorka využívá mikrofluorimetrická měření, heterologní expresi a vazebné pokusy a jež obsahuje 6 tabulek a 6 obrázků, podle mého názoru jednoznačně prokazuje splnění cílů.

Experimentální část dizertace je součástí primárních publikací, výsledky byly podrobeny odbornému recenznímu řízení a po technické stránce k nim nemám kromě dotazu č. 2 (níže v textu) žádné zásadní připomínky. Měla jsem příležitost přečíst a oponovat první verzi této dizertace v rámci interního oponentního řízení ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Všechny mé připomínky a náměty k vylepšení formální i obsahové stránky práce autorka velmi pozorně zapracovala ve stávající předložené verzi dizertace. Práce je přehledně uspořádaná, logicky promyšlená, psána přesným a stylisticky přímočarým stylem a relevantně dokumentována obrázky.

Vlastní vědecký přínos práce

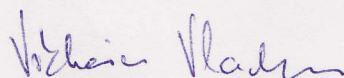
Vysoký stupeň homologie ortosterického vazebného místa mezi jednotlivými podtypy muskarinových receptorů je stále významnou překážkou při hledání selektivních a účinných ligandů. Výsledky dizertační práce jsou proto v tomto kontextu významným přínosem pro pochopení specifických aktivačních a modulačních vlastností muskarinových ACh receptorů a přispívají k poznání farmakologického profilu jednotlivých podtypů.

Předložená dizertační práce přináší originální výsledky publikované v impaktovaných mezinárodních časopisech. Autorka v průběhu postgraduálního studia získala bohaté zkušenosti samostatné a tvůrčí vědecké práce.

Závěr:

V souhrnu konstatuji, že předložená práce Mgr. Eva Dolejší prokazuje zvládnutí náročné odborné tematiky a splňuje jak formální, tak obsahové náležitosti doktorské dizertační práce. Zvolené téma práce je aktuální a závažné. Autorka prokázala odbornou kvalifikaci a zvládnutí náročných mikrofluorimetrických, farmakologických a biochemických technik, schopnost samostatné vědecké práce, kritického posouzení výsledků a formulace hypotéz. Za předpokladu, že bude práce upravena podle výše uvedených komentářů, dizertační práci doporučuji k předložení externí obhajobě.

Praha, 20.2.2015



RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.
Fyziologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4 – Krč

Námět pro rozpravu a otázky:

1. M2 a M4 podtypy mAChR se preferenčně spřahují s Gi/o G-proteiny a neaktivují dráhu PLC. Autorka proto použila ve svých pokusech přechodnou transfekci s (dosti promiskuitní a speciální) Galpha16 podjednotkou. Nemůže vazba tohoto proteinu změnit selektivitu pro ligand a změnit tak pozorované funkční vlastnosti receptorů? Je něco známo o účincích xanomelinu na hladinu cAMP?
2. V tabulce 4.1 mě překvapila zcela identická hodnota potence xanomelinu pEC50 pro všechny podtypy receptorů. Vypadá to spíše na limitaci numerické metody aproximace poloviční účinné koncentrace teoretickou křivkou. Může to autorka nějak komentovat ?