

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Ivy Jančíkové „Studium transportních mechanismů mikroorganismů.“

Disertační práce Mgr. Ivy Jančíkové je napsána česky v plné formě, má 133 stran a je doplněna kopiemi tří článků autorky a abstrakty konferenčních příspěvků. Práce má standardní členění, je napsána přehledně bez formálních nedostatků. Obrázky a grafy mají odpovídající grafickou úroveň. Práce se zabývá srovnáním vlastností membránových transportů MDR u tří druhů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida albicans*.

Teoretická část pojednává z různých hledisek o všech třech druzích kvasinek, jejich membránovém potenciálu a zejména o mechanismech, kterými kvasinky odstraňují z cytosolu cizorodé látky. Podrobně jsou rozebrány jednotlivé mechanismy membránového transportu u všech tří druhů kvasinek a zvláštní pozornost je věnována mechanismům, které podmiňují obranu patogenních mikroorganismů proti lékům. Tento aspekt přispívá k aktuálnosti a praktické aplikovatelnosti tématu, protože potenciálně patogenní kvasinka *Candida albicans* představuje vážný medicínský problém a potlačení její odolnosti k antimykotikům je i předmětem lékařského výzkumu. Dále jsou rozebrány různé varianty farmakologického působení proti kvasinkám a jejich mechanismy. Zvláštní kapitola je věnována využití fluorescenčních sond ke studiu vlastností MDR pump.

Část Materiál a metody obsahuje standardní seznam použitých látek, postupy přípravy roztoků, kultivace a uchovávání kvasinkových kmenů. Podrobně jsou popsány experimentální techniky měření růstových křivek, zónový a kapkový test k přímému sledování inhibice růstu kvasinek a fluorescenční techniky ke sledování akumulace fluorescenčních sond v buňkách.

Cíle práce jsou stanoveny jasně. Výsledky práce je možno rozdělit do tří částí.

V první části jsou porovnávány vlastnosti MDR pumpy Pdr5 u kvasinek *S.cerevisiae* a *K. lactis*. Vlastnosti vazebné kapsy u obou forem pumpy Pdr5 jsou studovány za pomoci skupiny azolových antimykotik a skupiny látek s již dříve popsanými vazebnými místy u *S. cerevisiae*. Zajímavým výsledkem práce je, zatímco vazebná kapsa pumpy Pdr5 u *S. cerevisiae* obsahuje 3 odlišná vazebná místa, u *K. lactis* je kapsa menší a obsahuje jen jedno vazebné místo o které látky kompetují.

Druhá část práce se zabývá vlivem delece dvou genů zapojených v metabolismu membránových komponent *K. lactis*. Bylo zjištěno, že vlivem delece dochází k hyperpolarizaci buněk.

Třetí část práce se zabývá metodami vyhledávání inhibitorů MDR pump u potenciálně patogenní kvasinky *C. albicans*. Cílem bylo ověřit, zda by bylo možné použít model kvasinky *S. cerevisiae* k vyhledávání inhibitorů MDR pump kvasinky *C. albicans*. Na nejvýznamnějších MDR pumpách *C. albicans* Cdr1p a Cdr2p to bylo ověřeno pro známé inhibitory farnesol, enniatin B a beauvericin. Postup pak byl využit pro testování vlastností derivátů 1,4 dihydropyridinu a jeden byl vytipován jako účinný inhibitor pumpy Cdr1p.

Diskuse výsledků je rozdělena u jednotlivých kapitol a je přiměřená. Závěr přehledně shrnuje dosažené výsledky. Seznam literatury obsahuje 146 položek. Práce je ukončena seznamem zkratk a seznamem publikací autorky, které jsou i přiloženy. Cíle práce byly splněny a byla získána řada nových poznatků. Aktuálnost a kvalitu výsledků dokazuje i to, že výsledky práce úspěšně prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech. K práci mám několik otázek, které nijak nesnižují vysokou úroveň předkládané práce. Autorka prokázala schopnost samostatné tvůrčí vědecké práce a splnila podmínky pro udělení titulu PhD.

V Praze dne 2. 8. 2018

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Otázky:

Používali jste 2-deoxy-D-glukosu k tomu, abyste vyřadili z činnosti MDR pumpy prostřednictvím vyčerpání ATP. Není možné, aby deplece ATP ovlivnila přímo i hodnotu membránového potenciálu inhibicí H^+ -ATPasy?

Na obrázku 3-23 ukazujete inhibiční zóny vyvolané působením sondy diS-C₃(3). Nemůže tento fakt ovlivnit použití této sondy k měření barvicích křivek?

Je překvapivé, že ionofory enniatin B a beauvericin neovlivňují membránový potenciál kvasinek. Můžete to nějak vysvětlit?

Při analýze vlastností klinického izolátu *Candidy albicans* CY 1123 se ukázalo, že nadprodukce pumpy CaCdr1p je jednou z příčin rezistence tohoto kmene kvasinek k azolům. Bylo by možné, že by se na zvláště výkonném mechanismu odstraňování