Posudek oponenta na kandidátskou práci Ing. Ireny Jelínkové: Studie o účinku ivermektinu na purinergní $P2X_4$ receptor.

Předkládaná práce má standardní členění na Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Závěr a Literaturu a má 86 stran. Literární přehled se velmi podrobně zabývá rodinou P2X kanálů napřed obecně a pak speciálně podtypem $P2X_4$. Jednotlivé podtypy receptorů jsou porovnány jak z hlediska struktury, tak z hlediska odlišností ve farmakologii, funkci a vztahu struktura-funkce. Dále jsou v úvodu rozebrány vlastnosti ivermektinu a jeho účinky na různé receptory se zaměřením $P2X_4$ receptory. Metody jsou standardní a specifikují jak použité molekulárně biologické, tak elektrofyziologické a mikroskopické techniky, které jsou všechny na velmi vysoké úrovni. Cíle práce jsou stanoveny jasně a konkrétně.

Cílem práce bylo identifikovat aminokyseliny, které se podílejí na účinku ivermektinu na $P2X_4$ receptor pomocí cílené mutageneze a postupné záměny aminokyselin. Napřed byl podrobně proměřen a analyzován účinek ivermektinu na aktivaci a deaktivaci přirozeného $P2X_4$ receptoru. Jako vodítko pro vyhledávání oblastí, důležitých pro modulace ivermektinem bylo použito porovnání s receptorem $P2X_{2A}$ a $P2X_{2B}$, které jsou nejsou ivermektinem ovlivněny. Byly prostudovány vlastnosti chimerických receptorů, kombinujících části receptorů $P2X_2$ a $P2X_4$, aby byly identifikovány části řetězce důležité pro citlivost k ivermektinu. Cílenou mutagenezí byly pak postupně nahrazeny všechny aminokyseliny obou transmembránových domén a vybrané aminokyseliny extracelulární domény. U každé varianty receptoru byla sledována jeho aktivace účinkem ATP, deaktivace a modulace účinkem ivermektinu a výsledky byly porovnávány s původním receptorem. Byla identifikována řada aminokyselin, které jsou nutné buď k aktivaci receptoru vlivem ATP nebo k modulaci ivermektinem. Zajímavým výsledkem je porovnání lokalizace aminokyselin, důležitých pro aktivaci kanálu vlivem ATP a pro modulaci kanálu vlivem ivermektinu, na kruhové helikální projekci transmembránových oblastí. Shlukování podobně citlivých aminokyselin na opačných stranách struktury podporuje představu o helikálním uspořádání řetězce a současně naznačuje i jeho orientaci v celém receptoru. Dále to naznačuje, že vazebné místo pro ivermektin je lokalizováno buď přímo v membráně, nebo v její bezprostřední blízkosti.

Práce je celkově pečlivě napsána, dosažené výsledky jsou velmi hodnotné a diskuse výsledků je velmi podrobná. Práce je založena na velkém množství experimentálních dat získaných na rozsáhlém souboru chimérických a mutovaných receptorů a její dílčí výsledky již byly publikovány v mezinárodních časopisech. To samo ukazuje na kvalitu práce a aktuálnost studované problematiky.

Připomínky:

V práci se používá označení „receptory citlivé ( necitlivé ) k mutagenezi“ toto označení považuji za poněkud nešťastné protože označuje jen vliv na aktivaci receptoru ATP a ne vliv na modulaci vlivem ivermektinu.

Na str. 40 jsou drobné nepřesnosti ve vzorcích - k výpočtům byly použity správné vzorce, ale v textu chybí na ř. 16 závorka a na ř.21-22 chybí v exponentech záporné znaménko.

1) Při porovnávání aktivace receptorů různými látkami jsou rozlišováni úplní (ATP) a částeční agonisté (např. $\alpha\beta$methylenadenosin ATP). Jak je dělení agonistů spolehlivé, když i odpověď úplných agonistů může být do různé míry potencována vlivem ivermektinu?

2) Ve výsledcích se několikrát zmiňuje ovlivnění vazby ivermektinu vlivem mutací. Myslí se tím skutečně ovlivnění kvantitativně zjištěné vazby ivermektinu, nebo ovlivnění modulačních účinků ivermektinu?

Drobné připomínky a otázky na přiloženém listě nijak nesnižují vysokou úroveň práce. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce a splnila požadavky kladené na disertační práci a proto si dovoluji doporučit práci k dalšímu řízení.

RNDr. Jan Krůšek CSc.

V Praze 28.1.2008