

Studijní oddělení – doktorandské studium
Matematicko-fyzikální fakulta
Univerzity Karlovy
Ke Karlovu 3
121 16 Praha 2
Tschechische Republik

Prof. Dr. Milan Höfer

AG Molekulare Bioenergetik

Kirschallee 1
53115 Bonn
Germany
Tel.: +49(0)228/73-5545
Fax: +49(0)228/73-5504
unb121@uni-bonn.de

www.izmb.de/hoefer/

22.01.2010

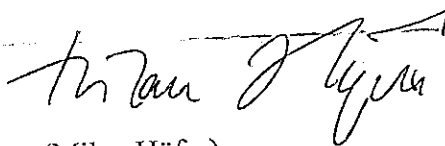
Ohodnocení disertační práce Mgr. Tomáše Hendrycha na téma „Ovlivnění činnosti membránových transportních systémů kvasinek stresovými faktory“.

Mgr. Tomáš Hendrych vypracoval svoji disertační práci v oboru biofyziky na Fyzikálním ústavu Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy pod odborným vedením docentky RNDr Dany Gáškové. Hlavním cílem jeho disertační práce bylo, pomocí redistribuční potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3) studovat vliv různých chemických látek, tzv. xenobiotik, na činnost membránových transportních proteinů typu MDR pump v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. MDR pumpy jsou zodpovědné za tzv. mnohočetnou lékovou rezistenci (multidrug resistance, MDR) a to jak v prokaryotických tak i v eukaryotických mikroorganismech, včetně patogenních druhů. Sledování vstupu fluorescenční sondy diS-C₃(3) do buněk v závislosti na membránovém potenciálu se ukázalo v dřívějších pracích na oddělení biofyziky vhodnou metodou sledování funkční aktivity těchto MDR pump. Výsledky pokusů v předložené disertaci s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*, sloužící jako modelový systém pro eukaryotické buňky i vyšších organismů, by se tak mohly osvědčit při vyhledávání nových antimikrobiálních látek či účinných inhibitorů MDR pump, což by zřetelně přispělo k úspěchu v zápase s infekčními nákazami v klinické praxi. Metoda redistribuce potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3) byla vypracována na školícím pracovišti a prokázala se být vhodným nástrojem ke studiu nejen membránového potenciálu buněk ale také a zejména aktivity jednotlivých MDR pump v modelovém systému *S. cerevisiae*. V předložené práci se kandidátu podařilo metodický protokol dále zdokonalit, takže je nyní možné touto metodou citlivě diagnostikovat účinek různých xenobiotik, biocidů a jiných inhibitorů, na modelový systém, jmenovitě rozlišovat mezi inhibicí pump, depolarizací buněčné membrány či permeabilizací buněk). V kombinaci s výsevovými testy kandidát v první části práce prokázal, že popsanou fluorescenční metodou lze spolehlivě sledovat krátkodobý vliv biocidů na buněčnou membranu a tak ji použít jako diagnostický nástroj k posouzení jejich mikrobicidní účinnosti.

V druhé, obsáhlejší části práce se kandidát věnoval studiu současného vlivu xenobiotik na membránový potenciál a na aktivitu dvou stěžejních MDR pump modelového systému, Pdr5p a Snq2p. K tomu účelu použil sadu izogenních *S. cerevisiae* kmenů, exprimujících různé kombinace MDR pump. Použitím již dříve popsaného inhibitoru FK506 (pumpy Pdr5p) prokázal, že je metoda vhodná pro stanovení minimální koncentrace xenobiotik s okamžitým inhibičním účinkem. Další, z klinického hlediska významné, využití fluorescenční metody spočívá v možnosti porovnání míry účinnosti jednotlivých xenobiotik (léků a biocidů). V kombinace popsané metody se zónovými testy kandidát dále prokázal, že lyzozomotropní látka DM-11, která inhibuje plazmatickou H^+ -ATPázu, není substrátem ani jedné ze studovaných MDR pump. Jiná lyzozomotropní látka taktéž inhibující plazmatickou H^+ -ATPázu, MRG-12, naproti tomu je z buněk vypuzována oběma pumpami, Pdr5p a Snq2p. Velmi významné je také pozorování interakce protonoforu CCCP s jednotlivými izogenními mutantními kmeny *S. cerevisiae*. Přidání CCCP k ranně exponenciálním buňkám způsobuje okamžitou aktivaci plazmatické H^+ -ATPázy. Teprve přidání inhibitoru této ATPázy vede k depolarizaci buněčné membrány. Dále se ukázalo, že CCCP je substrátem obou studovaných pump. Studium ovlivnění transportu sondy diS-C₃(3) pumpou Snq2p vedlo k zajímavému závěru, že tato pumpa může transportovat současně dva substráty nezávisle na sobě. Tim by bylo teoreticky možné, použitím různých chemicky modifikovaných substrátů, přispět k objasnění struktury vazebných míst této pumpy.

O kvalitě a významnosti výsledků předložené dizertace svědčí skutečnost, že byly publikovány ve dvou *peer-reviewed* odborných časopisech (v BBA publikaci prvním autorem, ve *Fol. Microbiol.* druhým autorem) a prezentovány na řadě mezinárodních vědeckých kongresech. Jejich formální zpracování v předložení dizertaci je příkladné. Až na několik málo tiskových chyb, pokud se však vyskytly v legendách k obrázkům (např. k obr. 5.19B, správně AD13 namísto AD12 a obr. 5.19C, správně US50-18C namísto AD12) nebo na str. 72 nesprávný poukaz na výsevový test ovšem závažných, lze vyjádřit jen chválu a uznání. K písemné práci samotné nemám žádných dotazů.

Závěrem s přesvědčením prohlašuji, že dizertační práce Mgr. Tomáše Hendrycha významně přispěla k rozšíření a dalšímu vývoji vědního oboru a tím přesvědčivě prokázala jeho schopnost k samostatné vědecké práci. Doporučuji matematicko-fyzikální fakultě předloženou dizertační práci přijmout jako podklad pro udělení vědeckého titulu.



(Milan Höfer)