

7. SHRnutí

Tato diplomová práce byla zpracována pod záštitou programu SOCRATES/ ERASMUS na Welsh School of Pharmacy v Cardiffu.

Cílem mé práce bylo modifikovat již vyvinutou metodu (Wessling-Resnick M. *et al.*, January 1990) a přizpůsobit ji podmínkám tamní laboratoře. Předmětem studia byla subpopulace tzv. časných endosomů, které vznikají těsně při povrchu plasmatické membrány po rozpadu klatrinového pláště. Jednou z jejich vlastností je schopnost spojovat se, fúzovat, čímž vzniká nadbytečná membrána potřebná pro další osud těchto organel.

Ve svých experimentech jsem pracovala se dvěma komplementárními markery. Jedním z nich byl avidin navázaný na enzym β -galaktosidasu, která štěpí kromě laktosy také syntetické substráty za vzniku příslušných produktů. V této studii byl produktem specifické hydrolyzy methylumbelifyl galaktosidu intenzivně fluoreskující methylumbeliferon. Druhým markerem byl biotinylovaný transferin. Podstatou komplementarity markerů je vysoká afinita avidinu k biotinu. Dvě skupiny buněk byly inkubovány se zmíněnými markery a po jejich akumulaci v endosomech následovala mechanická destrukce buněk za uvolnění organel. Oba typy endosomů byly smíchány v prostředí podporujícím jejich fúzi. Spojením dvou endosomů nesoucích různé markery došlo k jejich rychlé kombinaci za vzniku komplexu β -galaktosidasa – avidin – biotin – transferin. Přidáním detergentu se rozpadla membrána spojené organely a uvolnil se její obsah. Ke kvantifikaci komplexu byl použit ELISA test. Celý komplex byl prostřednictvím transferinu zachycen na povrchu jamky s navázanou protilátkou proti transferinu a po přidání substrátu pro β -galaktosidasu byla změřena fluorescence vzorku.

Ačkoli přípravné experimenty poskytovaly optimistické výsledky, samotná fúze neprobíhala reprodukovatelně jako proces závislý na teplotě a energii. Z časových důvodů se mi nepodařilo přizpůsobit podmínky pro optimální průběh metody. V současné době na ní pracuje zbytek týmu. Po úspěšném zavedení metody fúze časných endosomů *in vitro* budou vytvořeny podmínky pro testování nejrůznějších léčiv, i těch potenciálních, a jejich vlivu na tento krok endocytosy. Cílem je najít selektivní inhibitory fúze s potenciálem rozštěpit endosomální membránu. Tím by byla otevřena cesta široké škále léčiv, která jsou za normálních okolností zachycena v endosomálním kompartmentu a následně hydrolysována v lysosomech.