

## **Spontánní vápníková propustnost iontového kanálu P2X receptoru po záměně konzervovaného tyrozinu v 1. transmembránové doméně**

Posudek školitele na diplomovou práci Mariana Ruperta

Marian Rupert k obhajobě předkládá svoji diplomovou práci nazvanou „Spontánní vápníková propustnost iontového kanálu P2X receptoru po záměně konzervovaného tyrozinu v 1. transmembránové doméně“, kterou vypracoval na Fyziologickém ústavě AVČR, v Laboratoři buněčné a molekulární neuroendokrinologie pod mým vedením.

Diplomová práce Mariana Ruperta se zabývá studiem vztahu mezi strukturou a funkcí rekombinantních P2X receptorů, které se vyskytují především v nociceptorech, nervových buňkách, hladkých svalech a v buňkách imunitního systému. P2X receptory jsou ATP-aktivované iontové kanály propustné pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{++}$  ionty. Při opakované nebo dlouhodobé stimulaci vyššími koncentracemi agonisty některé P2X receptory desensitizují a uzavírají poru iontového kanálu, a jiné se naopak stávají propustné pro větší organické molekuly, což je provázeno sensitizací receptoru. Není dosud přesně známo, jakým mechanismem dlouhodobá přítomnost ATP vede k zavírání nebo naopak dilataci iontového kanálu, a jak transmembránové domény ovlivňují tyto dva stavy. Cílem práce bylo zjistit, zda u mutantních P2X receptorů, které vznikly záměnou jediného konzervovaného rezidua v první transmembránové doméně, a které mají výrazně zvýšenou citlivost k agonistům a sníženou rychlost desensitizace, nedochází ke spontánnímu otevírání poru iontového kanálu. Studentovi se podařilo prokázat, že u dvou ze čtyř studovaných typů P2X receptorů záměna konzervovaného tyrozinu v první transmembránové doméně vede ke spontánnímu vstupu  $\text{Ca}^{++}$  do buňky v nepřítomnosti agonisty, což lze interpretovat jako spontánní otevírání iontového kanálu. Jeho práce naznačuje důležitou úlohu této aminokyseliny v procesu dilatace a vlivu na stabilizaci uzavřeného stavu iontového kanálu, především u P2X2 a P2X4 receptoru. Student ke studiu potkaních P2X2, P2X3, P2X4 a P2X7 receptorových kanálů použil metody molekulární biologie a vápníkového imagingu. Divoký typ a mutace P2X receptorů studoval v transfekovaných immortalizovaných GnRH neuronech, které nemají exprimované endogenní purinergní P2 receptory. Pracoval samostatně, během svého studia provedl a dokončil řadu měření, které vyhodnotil a práci sám sepsal. Při finálním zpracování práce spěchal a v práci se vyskytly některé drobné formální chyby, které však kvalitu práce nikterak neovlivnily.

Považuji Mariana Ruperta za nadaného, pracovitého a především motivovaného studenta, který má skutečný zájem o experimentální práci. Během studia se naučil kromě mikrofluorimetrické metody také techniku patch clamp. Je sečtělý v oblasti odborné literatury, rychle se učí nové metody, a je také trpělivý a při práci mimořádně zručný. Domnívám se, že splnil všechny požadavky, aby mohl svoji diplomovou práci obhájit. Práci navrhuji klasifikovat známkou „velmi dobře“.

RNDr. Hana Zemková, CSc.  
školitelka, Praha,

16.9. 2013