

Univerzita Karlova v Praze, Fyzikální ústav
Oddělení biofyziky
Ke Karlovu 5, CZ-121 16 Praha 2
Tel.: (+420 2) 21 91 13 48 Fax: (+420 2) 24 92 27 97
E-mail: gaskova@karlov.mff.cuni.cz

Posudek školitele na disertační práci **Mgr. Tomáše Hendrycha** ***Ovlivnění činnosti membránových transportních systémů kvasinek stresovými faktory***

Disertační práce je zaměřená na studium vlivu chemických stresorů na činnost membránových transportérů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Plazmatická membrána, včetně jejích proteinů, je primárním místem účinku mnoha exogenních stresových faktorů (teplotní šok, osmotický stres, nízké pH, přítomnost různých chemických látek, atd.). Působení těchto stresorů může vést jak k ovlivnění membránového potenciálu, který je dán činností transmembránových proteinů umožňujících transport malých anorganických iontů, tak ke změně aktivity proteinů zodpovědných za mnohočetnou lékovou rezistenci. Tyto MDR proteiny hrají důležitou úlohu v obraně buněk proti účinku chemických stresorů - xenobiotik tím, že aktivně odstraňují cizorodé látky z buněk a umožňují tak rezistenci buněk vůči širokému spektru různě a funkčně odlišných látek (inhibitorů, léků, atd.).

U kvasinek, které jsou široce používány jako model eukaryotických buněk, je membránový potenciál udržován zejména činností H^+ -ATPázy, která aktivně transportuje protony z buněk; za mnohočetnou lékovou rezistenci jsou zodpovědní zejména tři hlavní MDR pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p.

Pro studium této problematiky byla zvolena fluorescenční metoda, vyvinutá v oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu UK, která umožňuje současné měření změn membránového potenciálu a aktivity pump Pdr5p a Snq2p pomocí potenciometrické redistribuční sondy diS-C₃(3). V průběhu práce se podařilo zdokonalit měřicí protokol do té míry, že v současné době umožňuje s velkou citlivostí diagnostikovat účinek látek na buňky - od inhibice pump přes depolarizaci/hyperpolarizaci až k jejich permeabilizaci. Pomocí analýzy časového vývoje barvení buněk po aplikaci stresorů se známým účinkem na buňky je v práci jasně dokázáno, že fluorescenční metodu lze za definovaných experimentálních podmínek s úspěchem použít jak k rychlému posouzení mikrobicidní/fungicidní účinnosti látek, tak ke stanovení minimální koncentrace léku s okamžitým inhibičním účinkem na MDR pumpy, a dokonce i k porovnání míry účinnosti jednotlivých inhibitorů mezi sebou.

Pro získání komplexní informace o účinku chemických stresorů na buňky byly v práci rovněž použity dvě biologické metody: (1) výsevový test, který poskytuje informace o životaschopnosti buněk vystavených účinku stresorů a (2) zónový test, pomocí kterého lze určit, zda je daná látka substrátem pump.

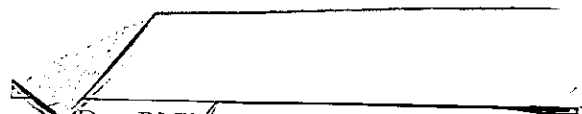
Kromě řady původních zjištění týkajících se vlivu chemických stresorů na buňky, které se staly součástí řešení několika projektů (grantový projekt MŠMT ME-315, projekty mezinárodní spolupráce MŠMT/BMBF TSR 113-97 a MŠMT/BMBF-CZE 01-032, výzkumný záměr MSM 0021620835, Výzkumné centrum 1M0570 MŠMT), přináší disertační práce i celou řadu dalších výsledků, které mají potenciální praktický dopad. Přestože nebyly dosud všechny výsledky práce publikovány, svědčí 2 články v odborných časopisech a 11 konferenčních příspěvků o jejich značném rozsahu.

Při řešení úkolů doktorandského studia pracoval Mgr. Tomáš Hendrych aktivně a cílevědomě. Vytvořením programu HUGO pro automatické vyhodnocování polohy maxima fluorescenčního spektra se výrazně zasloužil o odstranění subjektivní chyby při manuálním odečtu, čímž usnadnil práci i ostatním studentům v oddělení. Je hlavním autorem zcela nových výsledků týkajících se kinetiky a mechanismu inhibičního účinku léků interagujících s MDR pumpami Pdr5p a Snq2p

v jedné z přiložených publikací. Samotná disertační práce představuje kompaktní a logicky postavený text.

Vzhledem k celkové úrovni práce, rozsahu a významu dosažených výsledků a stupně jejich prezentace ve významných recenzovaných časopisech doporučuji její přijetí k obhajobě.

V Praze, dne 16. prosince 2009



Doc.RNDr. Dana Gášková, CSc.
školitelka