

Oponentský posudek disertační práce RNDr. Marie Kodedové
**„Studium činnosti mikrobiálních MDR pump pomocí fluorescenčních sond:
stanovení účinku potenciálních inhibitorů“.**

Předkládaná disertační práce se zabývá vědecky aktuální tematikou, vývojem nových metodických postupů pro rychlé a levné testování chemických látek s potenciálním antifungicidním účinkem. Hlavním záměrem disertace bylo upravit dříve vytvořenou metodu využívající distribuci fluorescenční sondy diS-C₃(3) v buňkách kvasinek tak, aby jí bylo možné použít pro rychlou detekci změn aktivit hlavních pump MDR, změn v relativním membránovém potenciálu a změn vlastností buněčné stěny a plasmatické membrány. Jako modelový organismus byly vybrány kvasinky *S. cerevisiae*, a to série kmenů lišící se expresí různých druhů ATPas typu MDR. V práci byly velmi vhodně kombinovány biofyzikální a mikrobiologické metody a byla získána celá řada zajímavých výsledků, z nichž podstatná část již byla publikována ve dvou článcích v mezinárodních časopisech.

Práce (117 stran, dvě publikace a šest abstraktů jako přílohy) je klasicky členěna do tří hlavních kapitol. Teoretická úvodní část práce podává podrobný a velmi čtivě napsaný přehled o antimykotikách, o jejich účincích a o mechanismech, které buňky používají na obranu proti nim. Tuto kapitolu pokládám za nejlepší z celé práce, svědčí o pilném studiu a širokých znalostech oboru. K této části bych měla tři dotazy:

- *Na straně 3 je zmíněno, že elektrochemický gradient vytvářený činností ATPasy Pma1 houby potřebují pro tvorbu energie. Je možné to blíže objasnit?*

- *Na str. 7 je zmíněna rodina transportérů typu MSF, jejíž členové se podílejí na transportu různých toxických látek, cukrů, fosfátů dalších živin, k čemuž v kvasinkách využívají protonmotorickou sílu. Jaký je základní rozdíl mezi transportéry pro toxické látky a transportéry živin?*

- *Na str. 28 je diskutována úloha lysosomů a vakuol. Jaký je jejich vztah? Jsou to totožné organely? V posledním odstavci na str. 28 by zřejmě mělo být místo „v extracelulární tekutině“ uvedeno „v cytosolu“. Můžete vysvětlit proč?*

Materiál a metody jsou velmi přehledně a podrobně popsány na 20 stranách. K úplnosti snad chybí jen zmínka, kolikrát byly jednotlivé experimenty, ať už s fluorescenční sondou či výsevové a zónové testy opakovány, případně, jestli jsou dále uváděné výsledky průměrnými hodnotami atd.

Kapitola výsledky a diskuse (celkem 46 stran) je členěna do pěti hlavních částí, zaměřujících se na experimentální zodpovězení základních otázek definovaných v úvodu této

kapitoly. V jednotlivých kapitolách je popsáno velké množství získaných výsledků svědčících o mimořádné pili předkladatelky. Údajů je takové množství, že se čtenář v popisu jednotlivých experimentů poněkud ztrácí (např. str. 70-72). Výhodou by zde bylo na konci každé podkapitoly stručně shrnout hlavní výsledky a jejich význam. Např. pro jinak velmi hezky napsanou a zajímavou kapitolu 3.2.4., ve které jsou popsány výsledky testů celé řady látek, by zobecňující souhrn výsledků byl zcela jistě přínosem.

K výsledkům mám jednu výhradu. Velmi často je v textu požíván výraz substrát a inhibitor téměř jako synonymum. Mělo by být jasně odlišeno, kdy se mluví o skutečném inhibitoru aktivity transportéru a kdy o substrátu, jehož přítomnost snižuje transport jiného substrátu, ale neovlivňuje samotou transportní aktivitu proteinu. V důsledku toho je občas velmi složité textu porozumět. Např. v popisu obr. 3-7 je uvedeno, že „enniatin je substrátem Yor1p a kompetitivním inhibitorem pumpy Pdr5“. Tato látka nemůže být kompetitivním inhibitorem proteinu ale pouze kompetitivním inhibitorem transportu jiného substrátu tímto proteinem, a to samozřejmě musí platit i pro transport ostatních substrátů pumpy Yor1. Takže, pokud je látka substrátem, je i kompetitivním inhibitorem transportu dalších substrátů. Pojem kompetitivní inhibice souvisí s kinetikou transportu a nebo enzymové reakce, jedná se o přesně definovaný pojem a tento typ inhibice se prokazuje souborem kinetických měření (změna K_T či K_m), proto není zcela správné k obr. 3-7 uvést, že ukazuje kompetitivní inhibici. Stejně tak není doložen dále zmiňovaný charakter kompetitivní inhibice mezi CCCP a sondou. Podobné efekty mohou nastat i při jiném typu inhibice (i ten může být závislý na koncentraci obou testovaných látek).

- *Na str. 60 v dolním odstavci není zcela jasné, co znamená „určení minimální koncentrace látky, při níž nastává okamžitá a úplná inhibice“. Jedná se o koncentraci inhibitoru, která zcela potlačí aktivitu proteinu nebo o koncentraci substrátu, která zamezí transportu jiného substrátu tímto transportérem, a tedy porovnání afinity pumpy ke dvěma jejím substrátům?*

V kapitole 3.3.3. autorka testovala účinky komerčních biocidů jako je ODDC nebo BAC na kvasinky. Protože jsem před několika lety oponovala disertační práci z této laboratoře, která se věnovala obdobné tematice (tytéž látky, tatáž sonda, tytéž pumpy MDR), chtěla bych se zeptat, zda je možné

- *stručně shrnout získané výsledky a porovnat je s výsledky disertační práce Kamily Moquin. Co nového bylo zjištěno?*

A závěrem bych měla ještě jeden dotaz:

- *Na str. 87 se uvádí, že PYG-14 je zajímavá antifungální látka, nicméně obr. 3-17E tomu příliš nenasvědčuje. Je možné ten závěr blíže vysvětlit?*

Předkládané práci je možné vytknout několik drobných formálních nedostatků - např. nejednotný pravopis (endosom – ribozom), používání anglicismů (např. MDR pumpy, XBD doména apod.), nejednotné názvosloví (proč někdy plasmatická a někdy cytoplasmatická membrána), občas nesprávný pojem (např. plasmatická ATPasa), nicméně těchto formálních nedostatků je v předkládané práci, v porovnání s jinými pracemi, které jsem četla, velmi malé množství.

Mé připomínky a otázky jsou spíše návrhem k diskusi, než aby měly ubírat na celkové kvalitě předkládané práce. Autorka přistupovala k řešenému problému dobře teoreticky vybavena, vyvinula nové aplikace původní metody, které byla schopna cíleně využívat a získat v dané problematice řadu nových poznatků.

Závěrem mohu konstatovat, že podle mého názoru autorka prokázala své schopnosti k samostatné tvořivé vědecké práci, a tudíž doporučuji tuto práci k obhajobě a po jejím provedení udělit autorce vědecko-akademický titul PhD.

V Praze, 9. března 2011

RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.