

Posudek vedoucího na diplomovou práci **Jakuba Zahumenského**

**“Studium exprese MDR-pump u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* za různých růstových podmínek: metoda s fluorescenční sondou diS-C<sub>3</sub>(3)“**

Diplomová práce Jakuba Zahumenského byla zadána v kontextu problematiky dlouhodobě řešené v oddělení biofyziky, která se zabývá činností různých transportérů z rodiny ABC u kvasinek *S. cerevisiae*. Některé z těchto transportérů hrají významnou úlohu při budování a udržování membránového potenciálu (zejména H<sup>+</sup>-ATPáza), jiné se podílejí na odstraňování cizorodých látek z cytosolu (např. Pdr5p, Snq2p a Yor1p), a jsou tak zodpovědné za fenotyp mnohočetné lékové rezistence u kvasinek.

Hlavní náplní diplomové práce, sestávající ze dvou částí, byla jednak příprava mutantních kmenů kvasinek *S. cerevisiae* deficientních v ABC transportérech **Pdr10p** a **Pdr15p**, jednak podrobná charakterizace vlivu těchto mutací na růst kvasinkové kultury a **zejména** na barvení buněk redistribuční potenciometrickou fluorescenční sondou diS-C<sub>3</sub>(3) v různých fázích jejich růstu. Intracelulární koncentrace fluorescenční sondy, která je řízena velikostí membránového potenciálu, může být totiž výrazně redukována činností MDR pump, které ji aktivně odstraňují z cytosolu.

Již dříve bylo v oddělení biofyziky zjištěno, že sonda je substrátem dvou hlavních MDR pump u kvasinek *S. cerevisiae* - Pdr5p a Snq2p, což umožnilo použít fluorescenční metodu pro současné sledování změn membránového potenciálu a aktivity těchto pump při působení různých exogenních stresorů. Vzhledem k vysoké homologii transportérů **Pdr10p** a **Pdr15p** s Pdr5p jsme se domnívali, že fluorescenční sonda by mohla být rovněž jejich substrátem. Tato skutečnost by umožnila získat nové informace o těchto dvou transportérech, které nejsou zdaleka tak dobře charakterizované jako Pdr5p.

V rámci diplomové práce byly připraveny dva sety isogenních kmenů s různým zastoupením transportérů Pdr10p a Pdr15p: první odvozený od kmene PLY232, druhý od kmene PLY643 (PLY232  $\Delta pdr5$ ,  $\Delta snq2$ ,  $\Delta yor1$ ) s deletovanými geny kódujícími tři hlavní MDR pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p.

Ačkoliv se v rámci diplomové práce nepodařilo jednoznačně prokázat účast studovaných transportérů na aktivním odstraňování fluorescenční sondy z buněk, z výsledků diplomové práce jasně vyplynulo, že nepřítomnost alespoň jednoho ze studovaných ABC transportérů silně ovlivňuje aktivitu i aktivaci H<sup>+</sup>-ATPázy. Význam tohoto zjištění je obrovský, ukazující na zatím neznámý způsob regulace tohoto nejrozšířenějšího a esenciálního enzymu plazmatické membrány, který řídí důležité fyziologické procesy v buňce. Ačkoliv bude zapotřebí provést mnoho dalších doplňujících měření, již teď je zřejmý význam dosažených výsledků. Výsledky této diplomové práce tak představují odrazový můstek pro další směry výzkumu oddělení biofyziky FÚ UK.

Diplomant úspěšně zvládl jak předepsanou literaturu, tak potřebné experimentální metody. Po velmi krátké době byl schopen provádět náročné experimenty, průběžně navrhovat další postupy a analyzovat výsledky. Práce, která je napsána v anglickém jazyce, je dobře a přehledně zpracovaná a má velmi dobrou grafickou úpravu.

Vzhledem k vysoké úrovni diplomové práce **Jakuba Zahumenského** doporučuji její přijetí k obhajobě a navrhuji klasifikovat ji stupněm **v ý b o r n ě**.

V Praze dne 18. 4. 2011

Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.