

Oponentský posudek na diplomovou práci Jakuba Záhumenského: Study of the expression on MDR pumps in cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under different growth conditions: diS-C₃(3) assay.

Předkládaná práce je napsána anglicky bez zjevných nedostatků a je členěna přehledně. Cílem práce bylo prostudování vlastností dvou méně známých transportních proteinů kvasinky Pdr10p a Pdr15p, které z hlediska genetické příbuznosti patří do skupiny transportérů, zprostředkovávajících mnohačetnou lékovou rezistenci tím, že z cytoplasmy odstraňují cizorodé látky – například antibiotika. Vlastní transportní vlastnosti proteinů Pdr10p a Pdr15p, jsou ale zatím prozkoumány jen nedostatečně a jejich přesná fyziologická role je dosud neznámá.

Literární přehled rozebírá v návaznosti na sebe čtyři témata:

- biologické vlastnosti modelového organismu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a fáze růstu kultury kvasinek
- struktura a funkce plasmatické membrány kvasinky zejména z hlediska transportních proteinů
- tvorbu membránového potenciálu a metody jeho měření
- jev mnohačetné lékové rezistence u kvasinek, vlastnosti jednotlivých transportérů, včetně regulace jejich genové exprese.

Popis použitých experimentálních technik začíná metodou přípravy 6 nových kmenů kvasinek, které byly v rámci diplomové práce připraveny. Kmeny byly odvozeny ze dvou již známých kmenů a vznikly odstraněním genů kódujících oba studované transportní proteiny jednotlivě a v kombinaci. Dále následují popisy nejdůležitějších použitých experimentálních technik. Hlavní část práce spočívala v měření růstových křivek různých kmenů kvasinek a zejména „barvicích křivek“, získaných v různé růstové fázi kultivace kvasinek. Tato metoda byla adaptována z metod měření membránového potenciálu na zjišťování činnosti membránových pump, schopných transportovat fluorescenční sondu z cytoplasmy. Metoda umožňuje porovnáním barvicích křivek zjistit, zda studovaná látka je substrátem membránových přenašečů i zda ovlivňuje membránový potenciál. Důležitou roli má právě výběr vhodných kmenů kvasinek, které se liší definovaným způsobem v expresi jednotlivých typů membránových pump.

Poněkud netypické je uspořádání, kdy diskuse je rozdělena na dílčí části, které následují bezprostředně za jednotlivými kapitoly výsledků, ale toto uspořádání přispělo k lepší srozumitelnosti práce. Porovnání kmenů, které se liší právě v expresi transportérů Pdr10p a Pdr15p ukázaly řadu zajímavých výsledků, které není snadné interpretovat. Barvicí křivky mají netypický dvoufázový charakter, buňky s odstraněnými pumpami rostou rychleji a jejich barvení vypovídá o vyšším membránovém potenciálu. To naznačuje, že studované proteiny ovlivňují růstové vlastnosti buněk, chování buněk za nerůstových podmínek a jejich membránový potenciál. Navrhovaným mechanismem působení na membránový potenciál

je prostřednictvím působení na enzym H^+ -ATPasu. Nepřímé doklady naznačují, že by mohlo být ovlivněno membránového mikrookolí H^+ -ATPasy a tím i její funkce.

Závěry práce ukazují, že zadané cíle se podařilo splnit. Byly připraveny nové kmeny kvasinek a byly prostudovány jejich vlastnosti. Autor práce pečlivě provedl velké množství experimentů a získal cenné originální výsledky, které jistě budou publikovány.

K práci mám ještě několik otázek které nesnižují vysokou hodnotu předkládané práce.

Celkově práci považuji za velmi kvalitní a doporučuji, aby byla hodnocena stupněm výborně.

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Praha 16. 5. 2011

Otázky:

- 1) na str. 6 uvádíte, že zdrojem dusíku pro kvasinky byl inositol, to je asi omyl, protože inositol dusík neobsahuje.
- 2) na str. 10 uvádíte mezi ionofory i gramicidin s tím, že tvoří iontové kanály. Správněji by tedy měl být řazen mezi membránové kanály a ne mezi pravé ionofory, jako je valinomycin nebo CCCP.
- 3) Na str. 25 v návodech na přípravu pūd je u YNB agarů uveden seznam neobsahující agar. Je agar součástí směsi YNB?
- 4) V obrázku 3.11 je uvedeno, že křivky v obou grafech se liší přítomností koktejlu C-D, ale z legendy k obrázku a tvaru křivek vyplývá, že se křivky pravděpodobně liší přítomností látky FK506.
- 5) Je možno nějak zhodnotit jakou roli na pozorovaných změnách membránového potenciálu má přímo změna v aktivitě H^+ -ATPasy a jakou roli má draslíková vodivost membrány?
- 6) Je možné odhadnout, zda aktivace H^+ -ATPasy vlivem CCCP, která podle experimentů může trvat i déle než 2 hodiny nepřesahuje energetické zásoby buněk uchovávaných v C-P pufru?