

Oponentský posudek na diplomovou práci Dávida Džamby : Membrane potential measurements in *Saccharomyces cerevisiae* mutant strains deficient in various membrane transporters.

Předkládaná práce je založena na výsledcích získaných kombinací molekulárně biologického přístupu, studia růstových křivek a spektroskopických měření barvicích křivek popisujících membránový potenciál a aktivitu pump různých geneticky definovaných kmenů kvasinek.

Práce je napsána v anglickém jazyce a má standardní členění. Úvod shrnuje informace o kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, jejich růstu, membránovém potenciálu a různých membránových transportních systémech. Zvláštní pozornost je věnována transportním systémům pro odstraňování cizorodých látek (ABC pumpy) a systémům transportujícím draselné kationty. Samostatná kapitola je věnována metodám měření membránového potenciálu. V metodické části je nejvíce prostoru věnováno technikám kultivace kvasinek, izolování DNA a molekulárně-biologickým postupům přípravy nových kmenů kvasinek. Popis vlastní experimentální metody získávání barvicích křivek je poměrně stručný a jen doplňuje podrobnější pasáž o měření membránového potenciálu v úvodu.

Jedním z úkolů práce byla příprava nových kmenů kvasinek s definovanou expresí draslíkových kanálů TOK a Kir. Metodami molekulární biologie byly získány 3 nové kmény a byly ověřeny jejich vlastnosti. Za zvláště zajímavé a potenciálně důležité považují zvládnutí funkční exprese myšičího draslíkového kanálu Kir 2.1 v buňkách kvasinky. Měření růstu a membránového transportu pak byla prováděna na mnohem širším spektru kmenů kvasinek, které poskytla spolupracující laboratoř na universitě v Bonnu. Výběr modelů byl zaměřen na kmény s dobře definovanými rozdíly v expresi ABC pump a systémů transportu draselných iontů. Z naměřených barvicích křivek tak bylo možno identifikovat, zda jde o změnu membránového potenciálu, nebo změnu v činnosti pump a který systém je za změnu zodpovědný. Velmi důležitým faktorem se ukázala být růstová fáze kvasinek, která velmi silně ovlivňovala intenzitu transportu.

Výsledky experimentů ukázaly, že exprese transportních systémů pro draslík v kvasinkách výrazně ovlivňuje membránový potenciál kvasinek tak, že je depolarizuje. Výsledky také naznačují, že na vypuzování sondy z buněk se mohou za určitých okolností podílet i jiné pumpy než Snq2p, Yor1p a Pdr5p. Také se ukázalo, že potlačení exprese pump prostřednictvím zásahu do regulačních faktorů je méně účinné než přímé vyřazení příslušného genu.

Uchazeč zvládl řadu experimentálních metod od kultivace kvasinek, metody molekulární biologie jako je homologní rekombinace a spektroskopické techniky. Zadané cíle práce byly splněny a byly získány originální a velmi hodnotné výsledky.

K práci mám několik otázek a formálních připomínek, které nesnižují vysokou hodnotu předkládané práce.

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

RNDr. Jan Krůšek, C.Sc.

Praha 12. 5. 2009

Připomínky a otázky:

Měření barvicích křivek bylo prováděno v C-P pufru, která neobsahuje žádné draselné ionty. Jaký důvod mělo použití takového pufru? Nemůže to zkreslit získané výsledky?

Str. 28 Odstavec 3.2.3. Důvodem pro měření růstových křivek ve dvou paralelních etapách byly časové důvody, nebo to má ještě jiný účel?

V Úvodu nebo Metodách jsem postrádal vysvětlení rozdílu mezi kultivačními médii YPD a YNB a vysvětlení důvodu jejich použití. Domnívám se že pro čtenáře, který není odborníkem na kultivaci kvasinek by to mělo být vysvětleno.

Str. 50. nahoře Vysvětlení, že zabráněním výtoku draslíku z buněk se buňky hyperpolarizují je nejasné, můžete to lépe specifikovat?