

Posudek vedoucího na diplomovou práci **Dávida Džamby** "Měření membránového potenciálu u mutantních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* deficientních v různých membránových transportérech"

Diplomová práce Dávida Džamby byla zadána v kontextu problematiky dlouhodobě řešené v oddělení biofyziky, která se zabývá činností různých membránových transportérů kvasinek *S. cerevisiae*, jejich úlohou při budování a udržování membránového potenciálu i při odstraňování cizorodých látek z cytosolu.

Hlavní náplní diplomové práce, sestávající ze dvou částí, byla jednak příprava mutantních kmenů kvasinek *S. cerevisiae* deficientních v různých transportérech draslíku pomocí molekulárně biologických metod, jednak podrobná charakterizace vlivu těchto mutací na růst buněk za různých kultivačních podmínek a zejména jejich příspěvek k velikosti membránového potenciálu. V rámci diplomové práce byla rovněž studována aktivita pump zodpovědných za mnohočetnou lékovou rezistenci.

Pro studium vlivu mutací na velikost membránového potenciálu byla zvolena fluorescenční metoda vyvinutá v oddělení biofyziky FÚ UK, založená na použití redistribuční potenciometrické fluorescenční sondy diS-C₃(3). Vzhledem k tomu, že sonda je substrátem dvou hlavních MDR pump u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* - Pdr5p a Snq2p, lze metodu současně použít i pro sledování aktivity těchto pump a jejich změn, např. při působení exogenních stresorů - inhibitorů.

Kmeny použité pro posouzení vlivu mutací na velikost membránového potenciálu kvasinek zahrnovaly 2 sady isogenních kmenů s různým zastoupením draselných transportérů: první odvozený od kmene PLY232 Δ pdr1, Δ pdr3 - deletovaný v transkripčních faktorech, druhý od kmene PLY232 Δ pdr5, Δ snq2, Δ yor1 - deletovaný v genech kódujících tři hlavní MDR pumpy Pdr5p, Snq2p a Yor1p.

Výsledky získané v diplomové práci ukázaly na řadu zajímavých skutečností, mimo jiné, že nepřítomnost transportérů draslíku vedla k **podstatnému posunu** polohy fluorescenčního maxima do červené oblasti spektra indikující hyperpolarizaci, což bylo patrné zejména u setu kmenů odvozených od referenčního kmene PLY232 Δ pdr1, Δ pdr3. A dále studie vlivu růstové fáze na úroveň intracelulární koncentrace sondy a použití řady různých inhibitorů pump Pdr5 a Snq2 ukázaly, že kromě těchto hlavních MDR pump odstraňují fluorescenční sondu z cytosolu i další pumpy přítomné v buněčné membráně (pravděpodobně pumpy Pdr15 a Pdr10).

Druhé zjištění je důležité pro budoucí využití této metody, neboť umožňuje hlubší studium aktivity těchto dvou dosud málo prozkoumaných pump, které mohou mít podstatný vliv na životní pochody v buňkách.

Výsledky dosažené v této diplomové práci 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 experimentální programy na obou pracovištích a dokázal průběžně navrhovat další postupy. Práce je sepsána přehledně a má velmi dobrou grafickou úpravu.

Diplomovou práci **Dávida Džamby** doporučuji k obhajobě a navrhuji klasifikovat ji stupněm *výborně*.

V Praze dne 30. 4. 2009

DOC. INŽEN. JAROSLAV ŠTĚPÁNEK