

Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta
Fyzikální ústav UK
Ke Karlovu 5, CZ-121 16 Praha 2
Tel.: (+420 2) 21 91 13 48 Fax: (+420 2) 24 92 27 97
E-mail: gaskova@karlov.mff.cuni.cz

Posudek školitele na disertační práci **Mgr. Jakuba Zahumenského** ***Charakterizace vlastností nativních a heterologně exprimovaných membránových transportérů u kvasinek pomocí fluorescenčních sond***

Disertační práce je zaměřená na studium vlastností membránových transportérů u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou používány jako modelový jednobuněčný organismus eukaryontní buňky. Tato problematika je i po mnoha letech výzkumu stále velmi aktuální, neboť život buněk je neodmyslitelně spojen s jejich výjimečnou schopností selektivně transportovat celou řadu relevantních látek přes membránu.

Hlavním cílem disertační práce bylo studium činnosti membránových transportérů, které se podílejí jak na mnohočetné lékové rezistenci (MDR) u kvasinek, tak na budování a udržování jejich membránového potenciálu. Pro posouzení vlastností těchto proteinů byla jejich aktivita cíleně modulována celou řadou chemických stresorů (různé inhibitory, alkoholy, povrchově aktivní látky, atd.). Vzhledem k zajímavým a důležitým výsledkům získaným v souvislosti s činností studovaných nativních transportérů již v počátečních fázích práce, je celá disertační práce zaměřena pouze na tyto buňce vlastní transportéry.

Pro studium této problematiky byla jako klíčová zvolena fluorescenční metoda, tzv. „DiS-C₃(3) assay“, vyvinutá v oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu UK. Tato metoda, která je založená na použití potenciometrické redistribuční fluorescenční sondy diS-C₃(3), umožňuje současné měření změn membránového potenciálu kvasinkových buněk v suspenzi a aktivity jejich dvou hlavních MDR pump, Pdr5p a Snq2p.

Pro získání komplexní informace o účinku chemických stresorů na aktivitu transportérů byla v práci použita celá řada vzájemně se doplňujících fyzikálních a biologických metod: (1) měření extracelulárního a cytosolického pH odrážející aktivitu hlavního membránového transportéru, tzv. H⁺-ATPázy, která aktivně transportuje protony z buněk na úkor hydrolýzy ATP, (2) výsevový test, který poskytuje informace o životaschopnosti buněk vystavených účinku stresorů, (3) zónový test, pomocí kterého lze určit, zda je daná látka substrátem MDR pump, (4) UV absorpční test pro stanovení výtoku intracelulárních molekul z buněk v důsledku porušení integrity plazmatické membrány, (5) stanovení permeabilizace buněk pomocí jejich barvení propidium jodidem a (6) stanovení lokalizace pHluorinu a poškození buněčné stěny kvasinek pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu.

Kromě řady původních zjištění týkajících se vlivu chemických stresorů na aktivitu vybraných membránových transportérů, které se staly součástí řešení několika projektů (GAČR P205/10/1121, GAUK 456213, GAUK 1072313 a grantový projekt UK SVV 260 323), přináší disertační práce i celou řadu dalších výsledků, které mají potenciální praktický dopad. Přestože nebyly dosud všechny výsledky práce publikovány, svědčí 2 články v odborných časopisech a 5 konferenčních příspěvků o jejich značném rozsahu.

Při řešení úkolů doktorandského studia pracoval Mgr. Jakub Zahumenský aktivně a cílevědomě. Díky svému vysokému pracovnímu nasazení dokázal zvládnout i celou řadu dalších aktivit, které bezprostředně nesouvisely s jeho vlastní vědeckou prací. Podstatnou měrou se zasloužil o hladký chod biologické a fluorescenční laboratoře. Významným způsobem se zapojil rovněž do pedagogického procesu (konzultant bakalářské práce Tomáše Bartla a vedoucí úlohy „Izolace bílkovin z přírodních zdrojů“ v Praktiku z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky I.). V neposlední řadě je potřeba rovněž vyzvednout úspěšně dokončený grantový projekt GAUK 456213, kterého byl hlavní řešitelem. Je hlavním autorem jedné z přiložených publikací

týkající se důležité úlohy draselného kanálu Tok1p v udržování membránového potenciálu při depolarizačním účinku stresorů. Tato studie poprvé dokumentuje významnou fyziologickou úlohu kanálu při chemickém stresu a ukazuje jeho schopnost kompenzovat rozsah depolarizace až ze 75%. Je spoluautorem zcela nových výsledků o inhibičním účinku alkoholů (od etanolu po hexanol) na MDR pumpy, Pdr5p a Snq2p.

Samotná disertační práce, která je napsána velmi dobrou angličtinou, představuje kompaktní a logicky sestavený celek.

Vzhledem k celkové vynikající úrovni práce, rozsahu a významu dosažených výsledků publikovaných ve významných recenzovaných časopisech doporučuji její přijetí k obhajobě.

V Praze, dne 31. července 2017

Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.
Školitelka