

## Posudek vedoucího na diplomovou práci **Andrey Drietomské** “**Studium činnosti kvasinkových MDR-pump pomocí fluorescenčních sond: účinek potenciálních inhibitorů**“

Diplomová práce Andrey Drietomské byla zadána v kontextu řešení projektu v oddělení biofyziky, který se týká vysoce aktuální problematiky - cíleného ovlivnění činnosti membránových proteinů patřících do skupiny transportérů, zajišťujících mnohočetnou lékovou rezistenci. Tyto pumpy jsou zodpovědné mj. za odolnost rakovinných buněk k cytostatikům a rezistenci mikrobiálních buněk k antibiotikům, atd.

Hlavní náplní diplomové práce bylo studium vlivu série 12 strukturně podobných lyzozomotropních látek na aktivitu dvou hlavních MDR pump u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* - Pdr5p a Snq2p, s cílem nalézt látky, které by účinně činnost těchto pump inhibovaly. Pro studium interakce těchto stresorů s buněčnými komponentami kvasinek byla zvolena fluorescenční metoda vyvinutá v oddělení biofyziky FÚ UK. Tato metoda umožňuje současné sledování změn membránového potenciálu buněk a aktivity pump vyvolaných působením testovaných látek na základě změn schopnosti těchto pump odstraňovat sondu z buněk. Pro posouzení jejich vlivu na velikost membránového potenciálu kvasinek byly použity buňky mutantních kmenů AD1-3 a AD23, které mají deletovány geny kódující pumpy Pdr5p a Snq2p. Rozdíl v úrovni obarvení buněk bezpumpových kmenů a kmenů s aktivními pumpami vypovídá o změnách v aktivitě pump.

Z principu, na kterém je použita metoda založena, vyplývá, že nalezení látek, které činnost studovaných pump inhibují, vyžaduje práci za podmínek, kdy nedochází k permeabilizaci buněk. Pro nalezení optimálních koncentrací stresorů byl použit výsevový test umožňující stanovení procenta přežívajících buněk vystavených působení testovaných látek. Aby bylo možné určit, zda případná inhibice transportu sondy pumpami Pdr5p a Snq2p je důsledkem kompetitivní inhibice, či inaktivace dané pumpy, byly rovněž pro všechny látky provedeny zónové testy, pomocí kterých bylo možné zjistit, zda je daný stresor substrátem studované pumpy (pump).

Výsledky získané v diplomové práci ukázaly, že pouze 3 ze studovaných látek PYG-14, DMAL-12 a MRG-12 významnějším způsobem interagují s pumpou Pdr5p. Tato interakce však vede jen k částečné inhibici transportu sondy pumpou Pdr5p v důsledku kompetitivní inhibice dvou substrátů (testované látky a sondy). Toto zjištění významným způsobem přispělo ke zdokonalení vyvíjené diagnostické fluorescenční metody pro vyhledávání účinných inhibitorů pump, neboť byly poprvé testovány látky, vůči kterým vykazují pumpy podstatně nižší afinitu než k fluorescenční sondě. Analýza výsledků získaných pomocí těchto látek, které jsou "slabými" substráty pump jasně prokázala unikátnost vyvíjené diagnostické metody. Již samotné použití této metody bez doplňujících biologických testů umožňuje vyloučit z kategorie potenciálních inhibitorů látky, které, ačkoliv jsou substráty těchto pump, nesplňují potřebné kritérium, tj. musí již ve velmi nízkých koncentracích účinně inhibovat transport sondy z buněk. Výsledky dosažené v této diplomové práci byly již prezentovány ve formě posteru na konferenci o kvasinkách ve Smolenicích.

Diplomantka úspěšně zvládla jak předepsanou literaturu, tak potřebné experimentální metody. Po velmi krátké době byla schopna provádět náročné experimentální programy a dokázala průběžně navrhnout další postupy. Práce je sepsána přehledně a má velmi dobrou grafickou úpravu.

Diplomovou práci **Andrey Drietomské** doporučuji k obhajobě a navrhuji klasifikovat ji stupněm **VÝBORNĚ**.

V Praze dne 15. 5. 2007

Doc. RNDr. Dana Gášková, CSc.