

**Oponentský posudek diplomové práce Jany Trefancové:
Studium β -N-acetylhexosamididasy rostlin tabáku (*Nicotiana
tabacum* L.)**

Autorka předkládané diplomové práce, Jana Trefancová se zabývala izolací a charakterisací β -N-acetylhexosamididasy z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) a dále pak sledováním aktivity různých glykosidas v rostlinách tabáku za stresových podmínek.

Autorka vypracovala postup izolace studované glykosidasy zahrnující extrakci enzymu z rostlinného materiálu, dále pak chromatografii na DEAE-celulose a Sephacrylu S-300 a afinitní chromatografii na ConA-Sepharose. Získaný preparát enzymu autorka charakterisovala pomocí jak nativní elektroforesy tak SDS-elektroforesy a určila jeho rel. mol. hmotnost pomocí gelové chromatografie. Velkou pozornost autorka věnovala studiu kinetických vlastností β -N-acetylhexosamididasy.): byly stanoveny kinetické parametry pro dva substráty (p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc), byl určen typ inhibice a stanoveny inhibiční konstanty pro dva inhibitory (GlcNAc a GalNAc), dále byl studován vliv pH a teploty na studovanou enzymovou aktivitu. Při studiu vlivu stresu na aktivitu různých exoglykosidas autorka použila jednak kontrolní rostliny tabáku, dále pak transgenní rostliny se zvýšenou hladinou endogenních cytokininů a obě dvě skupiny rostlin infikované virem. Byly získány velmi zajímavé výsledky. Infikované rostliny jak transgenní tak kontrolní byly charakterisovány zvýšenou aktivitou některých glykosidas; nejvíce patrný rozdíl byl pozorován v případě β -N-acetylhexosamididasy.

Předkládaná diplomová práce je členěna klasickým způsobem (Úvod, Methodická část, Výsledky, Diskuse, Závěr). Literární část byla zpracována velmi detailně a představuje přehledné a informativní shrnutí literárních údajů o studovaném enzymu. Ke zpracování dalších částí bych měla několik připomínek, které však nemají snižovat hodnotu získaných výsledků: methodické části presentovaných výsledků představují jejich důležitou součást a proto by měly být

detailně zpracovány. Stejně tak i názvy a legendy obrázků. Konkrétní případy byly podrobně prodiskutovány s autorkou.

Podle mého názoru předkládaná práce Jany Trefancové splňuje všechny požadavky kladené na práci diplomovou, a proto ji doporučuji k dalšímu řízení.

Na závěr bych měla několik věcných dotazů a připomínek:

- a) bylo zkoušeno nespecifické barvení preparátu enzymu získaného elucí z Con A-Sepharosy roztokem methyl-alpha-D-glukosidu po nativní elektroforese?
- b) který enzymový preparát používán pro kinetická měření?
- c) chybí Seznam zkratk;
- d) existuje představa o povaze endogenního substrátu β -N-acetylhexosamididasy v rostlinách?

Praha, 10.9.2009.



Dr. M. Tichá