

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce:

„Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants during potyviral infection“

Autor: **Ing. Karel Müller**

Disertační práce Ing. Karla Müllera je věnována izolaci fosfoenolpyruvát karboxylázy z listů tabáku a její biochemické charakterizaci, včetně porovnání vlivů inhibitorů a stimulatorů na fosforylovanou a defosforylovanou formu enzymu. Těžištěm práce je vyhodnocení úlohy fosfoenolpyruvát karboxylázy a metabolicky souvisejících enzymů: NADP malátdehydrogenázy a pyruvát, fosfát dikinázy v průběhu virové infekce PVA a PVY^{NTN}. Doktorand zjistil, že zvýšení aktivity fosfoenolpyruvát karboxylázy během virové infekce souvisí s její posttranslační modifikací, konkrétně fosforylací. Vzhledem k tomu, že zvýšení hladiny rostlinných hormonů cytokininů může mít pozitivní vliv na odolnost rostlin vůči virové infekci, byla dynamika aktivity fosfoenolpyruvát karboxylázy sledována rovněž v rostlinách se zvýšenou hladinou cytokininů.

Obsáhlý a velmi pěkně zpracovaný úvod (více než 150 citací) jasně prokazuje, že se doktorand výborně orientuje ve sledované oblasti. Metodická část je popsána přehledně a dostatečně podrobně. Výsledky jsou formulovány logicky, jejich grafické zpracování je na dobré úrovni. V diskusi doktorand kriticky zhodnotil dosažené výsledky, zejména zvýšení aktivity fosfoenolpyruvát karboxylázy v průběhu infekce, a zasadil je do širšího rámce poznání. Dosažené výsledky se staly součástí pěti publikací v impaktovaných časopisech.

K předložené práci mám několik dotazů:

1) Na str. 58 uvádíte, že defosforylací fosfoenolpyruvát karboxylázy došlo ke snížení její aktivity o 40 %, přitom se její afinita vůči substrátu prakticky nezměnila (při pH 8,1: 0,25 mM vs. 0,21 mM, při pH 7,3: 0,45 mM vs. 0,47 mM). Mohl byste krátce shrnout, jaká je úloha fosforylace PEPC a jakým mechanismem ovlivňuje její působení?

2) pH optimum fosfoenolpyruvát karboxylázy je poměrně vysoké. Předpokládáte, že souvisí s její lokalizací – vnitrobuněčnou, případně v rámci rostliny? Kolik je známo genů

kódujících fosfoenolpyruvát karboxylázy v tabáku? Stejný počet jako v Arabidopsis? Můžete je případně rozlišit pomocí qRT PCR?

3) Pomocí ELISA testu jste našel maximální infekci PVY virem po 6 dnech, pak docházelo k jejímu poklesu (viz. Obr. 28); pomocí qRT PCR nebyla po 6 dnech nalezena měřitelná hladina virové RNA, její výrazné zvýšení bylo pozorováno až po 10 dnech a zejména pak po 17 dnech (viz Obr. 29). Mohl byste porovnat obě použité techniky?

4) Na Obr. 43, 44 a 45 je porovnán nárůst aktivity fosfoenolpyruvát karboxylázy, NADP malátdehydrogenázy a pyruvát, fosfát dikinázy v průběhu virové infekce u kontrolních rostlin tabáku a rostlin se zvýšenou hladinou cytokininů. U transgenů bylo pozorováno snížení nebo spíše opoždění nárůstu aktivity enzymů. Je škoda, že experiment nebyl prováděn v delším časovém intervalu, aby bylo možné vyhodnotit, zda zvýšená hladina cytokininů způsobí pouze zpomalení nástupu infekce nebo jestli vskutku omezí její rozvinutí. Mohl byste krátce spekulovat, kterou z těchto možností pokládáte za pravděpodobnější? Mohl byste porovnat výsledné chování obou typů rostlin? Byl signifikantní rozdíl v počtu rostlin, které přežily?

Závěr: Přes uvedené připomínky pokládám předloženou práci za velmi dobrou, splňující všechny požadavky na ni kladené a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.

13. 7. 2008

RNDr. Radomíra Vaňková, CSc.