

Oponentský posudek doktorské práce Mgr. Veroniky Doubnerové:

Studium regulace NADP – malátdehydrogenasy (dekarboxylační) a vliv stresu na tento enzym

Doktorská práce byla prováděna na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením dr. Heleny Ryšlavé CSc, konzultantkou byla dr. Noemi Čeřovská z ÚEB AV ČR vvi. Téma disertace využívá zaměření obou uvedených laboratoří k propojení studia enzymů při biotickém stresu.

Práce je předkládána jako soubor pěti publikací, jednak tři již publikovaných v r. 2007 a dvou ve formě rukopisů zaslaných do impaktovaných časopisů. U každé je vyjádřen podíl autorky na získaných výsledcích. Disertace je vypracována čtivě v českém jazyce. Je uspořádána do několika částí: začíná Úvodem, který je svým rozsahem téměř na úrovni klasické disertace. Jsou zde předkládána všechna podstatná fakta související se studovanou problematikou od enzymologie po virologii. Obsahuje charakteristiku, kinetiku, regulaci a funkci známých isoenzymů NADP-ME v různých organismech. Další část se týká stresové problematiky se zřetelem na viry a nedostatek vody. Rovněž jsou popsány mechanismy resistance a obranné reakce rostlin.

Po jasně formulovaných Cílech disertace následuje v tomto uspořádání poněkud netradičně kapitola Materiál a metody. V souvislosti se značným množstvím využívaných metodických postupů však velice přispívá k přehlednosti, i když sestává především z odkazů ke článkům. Tato pasáž je důležitá i vzhledem k tomu, že autorka používala také poměrně velké množství biologického materiálu, včetně transgenních rostlin. Tento rozsah shledávám spíš jako nevýhodný, např. některé odpovědi na infekci se liší u *N. tabacum* a *bethamiana*.

Sekce Výsledky a diskuze shrnuje přehledně získané výsledky včetně poměrně stručné diskuse. Kapitola je rozčleněna do sedmi částí, které nejsou zcela totožné s jednotlivými příloženými publikacemi, ale jejich výsledky jsou seřazeny podle zkoumaných oblastí: 1. purifikace a charakterizace NADP-ME 2. regulace NADP-ME, 3. Vliv biotického stresu na aktivitu, expresi a transkripci NADP-ME, 4. Vliv infekce potyvirem na aktivitu NADP-ME v transgenních rostlinách s vneseným genem pro protein P3, 5. Vliv infekce potyvirem na aktivitu NADP-ME v transgenních rostlinách s vneseným genem pro protein HC-pro, 6. Aktivita NADP-ME v rostlinách in vitro, v 7. podkapitole pak autorka vyvozuje na základě předložených výsledků hypotézu o možné funkci NADP-ME v rostlinách za nefyziologických podmínkách.

Práce je zakončena koncisním Závěrem reflektujícím cíle práce.

NAD(P)-ME enzym je všudypřítomný, tedy v prokaryontech, živočiších a v rostlinách. Jeho funkce závisí na typu isoenzymu a lokalizaci. Na rozdíl od podstatně více studovaného isoenzymu v C4 a CAM rostlinách účastnícího se fotosyntézy, v této práci se autorka zabývala méně charakterizovanou nefotosyntetickou formou přítomnou v C3 rostlinách. Autorka spolu s kolegy získala velké množství zajímavých, zcela původních výsledků týkajících charakterizace enzymu po jeho purifikaci z tabáku. Přínosné bylo stanovení kinetických vlastností i mechanismu katalýzy. Předložené studie přispěly k rozšíření našich znalostí ohledně chování NADP-ME ve stresu a autorka navrhla jeho možnou funkci jako zdroje potřebného NADPH v nepříznivých podmínkách. V souvislosti se studiem vlivu stresu na aktivitu studovaného enzymu bych ráda věděla, co vedlo autory k použití transgenních rostlin s vneseným genem pro protein P3, když jeho funkce není známa? V pokusech sledujících vliv infekce potyvirem na aktivitu NADP-ME byla měření prováděna v době maximálních příznaků. V případě nekrotizujícího viru NTN tedy jde o výskyt lezí na listech. Jak toto bylo zohledněno při odběru vzorků a extrakci enzymu? Jak staré kontrolní rostliny byly použity v případě pokusů s *in vitro* tabáky? Budou tyto výsledky spolu s vodním stresem připraveny jako rukopis? V příloze 4 u měření enzymových aktivit, tak jak vyplývá z článku, byla provedena pouze 1 série v triplicátech, pak by mělo být místo standardní chyby S.E. st. odchylka (S. D.).

Závěrem lze říci, že předložená disertace má po stránce obsahové i formální vysokou úroveň a nelze než ji doporučit k obhajobě. Jelikož Mgr. Doubnerová splňuje všechny předpoklady doporučuji dále, aby po úspěšném obhájení byla její autorce udělena doktorská vědecká hodnost.

RNDr. Nad'a Wilhelmová CSc.
ÚEB v.v.i. AV ČR
Na Karlovce 1
160 00 Praha 6

Praha 21.8.2008