



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

doktorandská práce slečny Mgr. Veroniky Doubnerové

V Brně dne 18. srpna 2008

Předkládaná doktorandská práce Mgr. Veroniky Doubnerové je zaměřena na studium regulace NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační), EC 1.1.1.40. Práce je dělena na úvod, kde jsou vysvětleny obecné charakteristiky malátdehydrogenas (dekarboxylačních), popis genové rodiny v rostlinách, struktura, vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti, regulace. Větší pozornost je následně věnována funkci NADP-ME u bakterií, živočichů, ale především u rostlin. Poslední část literárního přehledu práce je soustředěna na popis biotického a abiotického stresu u rostlin. Následuje podle klasického dělení práce vymezení cílů práce, popis materiálů a metod, na něž navazuje část výsledky a diskuse. Nechybí seznam použité literatury a formulace závěrů.

Celkový rozsah díla je 152 stran, z toho je vlastnímu textu práce věnováno 62 stran. Text je napsán srozumitelně a jednoznačně. Získané výsledky zahrnuté do práce byly uveřejněny v letech 2007-2008. Práce obsahuje 3 publikace, které byly uveřejněny v impaktovaných časopisech. Další 2 články jsou nyní v recenzním řízení. Předložený text doktorandské práce po formální stránce splňuje všechny nároky na takovou práci kladené.

Cílem doktorandské práce byl komplexní pohled na enzym NADP-dependentní malátdehydrogenasu (dekarboxylační) z listů tabáku v souvislosti s její regulací s biotickými a abiotickými stresy, na kterých se může významně podílet. Studie byla také doplněna srovnáním vlivu infekce *Y virem bramboru* na NADP-ME v rostlinách tabáku s rostlinami transgenními s vnesenými geny pro potyvirové proteiny. Konkrétní cíle byly: 1. Purifikace a charakterizace NADP-ME z listů tabáku; 2. Studium regulace NADP-ME různými metabolity; 3. Sledování vlivu biotického stresu; 4. Srovnání vlivu *Y viru bramboru* na NADP-ME s využitím rostlin *Nicotiana tabacum* L., s vneseným genem pro protein P3 z *A viru bramboru* a transgenních rostlin *Nicotiana benthamiana* s vneseným genem pro protein HC-pro z *A viru bramboru*; 5. Sledování aktivity NADP-ME a dalších enzymů; 6. Studium stresu suchem v souvislosti s aktivitou NADP-ME.

Aktuálnosti problematiky obsahu práce

Studovaná problematika diskutovaná v předložené doktorandské práci je vysoce aktuální problematikou v oblasti studia stresové reakce u rostlin. Pochopení funkce různých proteinů může přinést informace obecného poznání, ale také mohou být využity jako případné markery stresu.

Zvolené vědecké metody pro zpracování tématu

Všechny zvolené vědecké metody pro zpracování tématu byly adekvátní a pracoviště disponuje nejmodernějším technickým a technologickým zázemím. Představuje jedno z předních světových pracovišť zabývajících se touto problematikou.



K předložené práci nemá oponent faktických ani formálních připomínek. Všechny práce zařazené do doktorandské práce prošly velmi náročným oponentním řízením a schvalovacím procesem redakčních rad časopisů. Tento fakt sám o sobě je kritériem odborné způsobilosti předkladatelky práce.

Přesto bych si dovolil několik obecných otázek:

- a) autorka pro izolaci NADP-ME využívá chromatografických metod. V popisu experimentu jsou popisovány různé separační kroky (ionexová chromatografie, DEAE-celulose, gelová a afinitní chromatografie). Mohla by autorka vysvětlit jednotlivé kroky takto poměrně náročné separace?
- b) V experimentech charakterizujících vlastnosti NADP-ME jsou diskutovány rozdílné hodnoty pI. Existuje nějaké vysvětlení proč jsou tyto hodnoty tak rozdílné? Hodnota pI 5.5 je již poměrně vzdálená od běžně se vyskytujících pI NADP-ME kolem 7.
- c) Bylo by na základě Vámi získaných experimentálních výsledků možné využít aktivitu NADP-ME jako markeru biotického stresu? Bylo by možné aktivitu kvantifikovat bez náročných purifikačních kroků?
- d) Jak probíhala izolace mRNA z rostlin? Plánujete sledovat genovou expresi pomocí array technologií?
- e) Nedochází k nárůstu aktivity NADP-ME také při zvýšené teplotě?

Odborná úroveň předložené doktorandské práce slečny Mgr. Veroniky Doubnerové, je vysoká, získané výsledky jsou v řadě případů unikátní a plně srovnatelné se světovou špičkou. Předloženou doktorandskou práci mohu jednoznačně doporučit k obhajobě. Práci lze hodnotit velmi kladně a autorku doporučit k získání vědecké hodnosti Ph.D.

René Kizek

Ústav chemie a biochemie
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,