Oponentský posudek na disertační práci

Autor: Ing. Tomáš Műller

Název práce: Regulation of phospho*enol*pyruvate carboxylase in tobacco plants during potyviral infection

Oponent: Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D., Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci

Předložená disertační práce je sepsána v klasickém stylu sestávajícím z úvodní rešeršní části, kapitol shrnujících použité metody a výsledky, následuje diskuse a stručný závěr. Práce je zaměřena na studium enzymu s fosfoenolpyruvátkarboxylasovou aktivitou (PEPC) a jeho regulaci v průběhu virové infekce. Téma práce je aktuální a získané poznatky rozšiřují informace o reakci rostliny vystavené působení biotického stresu způsobeného virovou infekcí. Pochopení mechanismů obranných reakcí rostlin, může vést k aplikačním výstupům využitelným v zemědělství.

Teoretická část práce je napsaná přehledně, výstižně a srozumitelně a v podstatě bez překlepů. Pouze nebyla dodržena jednotnost v psaní názvu studovaného enzymu (část „enol“ – psaná kurzivou). Autor čerpal informace z více než 150 prací, jejichž seznam je uveden na konci předložené práce. Je zřejmé, že je doktorand velmi dobře seznámen s řešenou problematikou.

Metody použité v rámci experimentální práce jsou v disertační práci srozumitelně a dostatečně popsány. V textu je pouze několik drobných formálních chyb: koenzymy NAD a NADP se uvádí s indexem +; záměna názvu použité směsi inhibitorů proteas „Protease Inhibitor Cocktail“ za „Proteinase Inhibitor Cocktail“.

Výsledky jsou zpracovány přehledně formou řady grafů, tabulek a obrázků s vysvětlujícím textem. K výsledkové části mám následující dotazy a připomínky:

1. V kapitole 3.1.3.1. nejsou uvedeny stanovené hodnoty $I_{0,5}$, pouze jejich vzájemné porovnání. Bylo by vhodné Obr. 14 doplnit přehlednou tabulkou s vypočítanými hodnotami $I_{0,5}$.
2. Jedná se v případě L- malátu o směsnou inhibici nebo inhibici kompetitivní? Jaká je váha jednotlivých naměřených bodů v Obr. 16, zejména při koncentraci PEP 0,05 mM (kolikrát bylo měření opakováno)? Jak vypadá sekundární graf v případě Dixonova vyhodnocení? V případě výsledků na Obr. 23 lze předpokládat, že se jedná spíše o kompetitivní inhibici, ale tvrzení musí být podpořeno opět vynesením sekundárního

grafu, případně jiným typem vyhodnocení (př. skripta Macholán: Enzymologie; Kodíček: Studijní materiály z enzymologie; Segel: Enzyme kinetics).

3. V případě inhibiční studie interakce L-aspartátu s PEPC, by bylo vhodné považovat stanovené hodnoty jako orientační z důvodů realizace experimentu pouze při dvou koncentracích fosfoenolpyruvátu.
4. Proč byla pro realizaci inhibičních studií zvolena sub-optimální hodnota pH 7,3?
5. Byla ověřena aktivita proteinkinasy A s využitím vhodného substrátu pro vyloučení možnosti ztráty aktivity použitého enzymu? Jedná se o enzym použitý v experimentu zaměřeném na fosforylaci nativního enzymu a enzymu po defosforylaci.
6. V části 3.1.4.5. se uvádí v textu 40% nárust PEPC aktivity v přítomnosti D-glukosa-6-fosfátu. Z Obr. 25 je ale patrná nižší hodnota.
7. Byl purifikovaný enzym dostatečně čistý před použitím pro imunizaci? Na SDS elektroforéze Obr. 26 jsou v linii 8 vidět další minoritní proteiny. Jak dopadlo ověření specifity získaných protilátek (ve výsledcích je uveden jen nepříliš kvalitní výřez po Western blotu)?
8. Byla imunochemická detekce fosfoproteinů realizována v několika opakování? Pro větší váhu uvedeného tvrzení by jistě bylo vhodné realizovat densitomerické vyhodnocení (Obr. 40).
9. Jakým způsobem byla realizována inokulace rostlin? Je možný vliv i mechanického poškození, ke kterému dochází při inokulaci?
10. Lze vysvětlit rozdílné interakce použitého genotypu tabáku s viry PVA a PVY^{NTN} na základě rozdílné citlivosti daného genotypu k příslušnému viru? Mohl se projevit vliv rozdílné koncentrace virů použité při inokulaci rostliny?
11. Byly metody použité pro detekci přítomnosti viru opakovány v nezávislých experimentech pro potvrzení rozdílu v časových změnách detekovaných RT –PCR metodou a Elisa metodou?
12. Je možné vysvětlit rozdílnou reakci detekovanou na úrovni změn enzymových aktivit (PEPC, NADP ME a PPDK) (Obr. 30 a 31) v průběhu infekce PVY a PVA rozdílnou intenzitou rozvoje virové infekce (viz Obr. 28)?

Předložená disertační práce splnila sledované cíle. Doktorand se v průběhu studia seznámil s řadou metodických přístupů od purifikačních metod, metod studia enzymové kinetiky, imunochemických metod, práce s nukleovými kyselinami, tak rovněž s prácí s viry a

rostlinným materiálem. Získané výsledky rozšiřují poznatky o možnosti zapojení studovaných enzymů v reakci rostlin na biotický stres a budou publikovány v impaktovaném časopise.

Lze konstatovat, že ing. Ing. Tomáš Műller prokázal v průběhu studia dobrou orientaci v řešené problematice a schopnost vědecké práce, včetně publikování získaných výsledků v impaktovaných časopisech (je spoluautorem 5 publikací a 15 příspěvků formou přednášek nebo posterů na konferencích). Předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci. Doporučuji udělit akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne 31.7.2008 Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.