

ZÁPIS Z PRŮBĚHU OBHAJOBY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení studenta:

Jana Václavková

Název práce:

**Histochemická detekce aktivity
S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách**

Předseda komise:

Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

Výsledná známka z obhajoby práce:

výborně

Průběh obhajoby:

V úvodu obhajoby diplomové práce studentka Jana Václavková seznámila všechny zúčastněné s cílem práce a hlavními metodami využitými při zpracování práce.

Cíle diplomové práce byly definovány následovně:

I. Teoretická část

Vypracovat literární rešerši shrnující význam enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy v regulaci S-nitrosace a S-nitrosothiolů v rámci mechanismů účinku oxidu dusnatého v buňkách a vypracovat přehled publikovaných histochemických metod detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy.

II. Experimentální část

Zavést protokoly histochemické detekce aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách a optimalizovat metodu na vybraných modelových rostlinách.

Odpovědi na otázky oponenta:

Název práce: Histochemická detekce S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách

Dotazy k teoretické části:

1. Byla prokázána existence receptoru pro NO? Jakým mechanismem se NO podílí na tvorbě cGMP a cADPR? (str. 9)

U živočichů se NO váže na hemovou prostetickou skupinu guanylátcyklasy. Dochází ke konformační změně její struktury a aktivita guanylátcyklasy se zvyšuje. Rozpustná guanylátcyklasa (soluble guanylyl cyclase, sGC) katalyzuje syntézu cGMP a funguje jako fyziologický receptor pro oxid dusnatý. U rostlin nebyla existence guanylátcyklasy potvrzena, ale byla jednoznačně prokázána signální funkce cGMP. Mechanismus syntézy cGMP v rostlinách nebyl objasněn. Syntéza cADPR je katalyzována ADP-ribosylcyklasou, NO inhibuje ADP-ribosylcyklastu.

2. Prosím o vysvětlení informace uváděné ve větě na str. 10 v teoretické části. „SNOs vznikají v důsledku aktivace některé ze tří isoform enzymu NO synthasy (NOS), přesněji v důsledku vytvoření NO- aniontu NO synthasou, nebo po současném vzniku NO a superoxidu NO synthasou za přítomnosti glutathionu (Gaston et al., 2003).“ (str. 10)

Aktivuje se některá ze tří isoform NOS, která syntetizuje NO. NO a superoxid za přítomnosti glutathionu tvoří S-nitrosothioly. S-nitrosothioly mohou také vzniknout z thiolů po vytvoření nitroxylového (NO-) aniontu NO synthasou. Nitroxylový aniont je dalším možným produktem NO synthasové reakce, za daných podmínek je místo NO tvořen anion NO-.

3. Jak probíhá reakce katalyzovaná GSNOR pokud je substrátem 12-hydroxydodekanová kyselina nebo S-nitrosoglutathion? (str. 18)

Pokud je substrátem 12-hydroxydodekanová kyselina, dochází k její oxidaci mechanismem, který je podobný mechanismu alkoholdehydrogenasy třídy I.

Pokud je substrátem S-nitrosoglutathion (GSNO) dochází k jeho redukci. Meziproduktem

ZÁPIS Z PRŮBĚHU OBHAJOBY DIPLOMOVÉ PRÁCE

reakce je glutathion-N-hydroxysulfenamid (S-hydroxylamino-glutathion, GSNHOH), který reaguje s glutathionem (GSH) za vzniku oxidované formy glutathionu (glutathiondisulfidu, GSSG) a hydroxylaminu (NH₂OH). Část GSNO je pomalou neenzymatickou reakcí rozkládána na GSSG a reaktivní formy dusíku. Míra této neenzymatické reakce závisí na lokální koncentraci kyslíku v buňce. Pokud je v buňce vyčerpána zásoba GSH, enzymatická redukce GSNO je rychlá a intermediát GSNHOH se spontánně přesmykuje na glutathionsulfenamid (GSONH₂). GSONH₂ je hydrolyzován na kyselinu glutathionsulfonovou (GSO₂H), která může být při oxidativním stresu oxidována na kyselinu glutathionsulfonovou (GSO₃H). NADH pro redukci GSNO je zajišťováno oxidativními drahami ADH3, například oxidací S-hydroxymethylglutathionu (HMGSH).

4. Jaký český název se nejčastěji používá pro *Arabidopsis thaliana*? (str. 20)
Používá se název huseníček rolní. Používané české synonymum je také huseníček Thalův.

5. Na str. 17 uvádíte značení genu pro GSNOR –ADH3, na str. 23 se opakovaně uvádí ADH2. Co je správné?

ADH2 je starší označení tohoto genu, které je však v některých člancích stále používáno. V práci jsem zachovávala označení genu použité v citovaném článku.

6. Jaké je EC číslo bakteriální nitroreduktasy (NtrA) uvedené na str. 25?

Enzym pravděpodobně ještě nebyl do EC katalogu zařazen, EC číslo nebylo uvedeno na stránkách NC-IUBMB ani Protein Data Bank.

7. Může být aktivita enzymu detekována metodou Western blot? (str. 28)

Metodou Western blot nelze stanovit aktivitu enzymu přímo. Stanovuje se množství enzymu a na základě tohoto stanovení je možné aktivitu enzymu předpovědět. Množství enzymu je obvykle přímo úměrné jeho aktivitě.

Dotazy k experimentální části:

1. Může způsobit použitá inkubační teplota 42°C teplotní stres, a tak ovlivnit intenzitu zbarvení? Testovaly se i jiné teploty?

Byla použita metoda již publikovaná v článku Díaz et al., 2004. Nebylo zde zmíněno, že by mohlo docházet ke změně intenzity zbarvení. V původním provedení metody byly vzorky inkubovány 3 h při 23°C. Po úpravě metody (podle Díaz et al., 2004) byla použita pouze inkubační teplota 42°C.

2. Můžete ve stručnosti shrnout, v čem spočívala úprava použité metody pro histochemickou detekci?

Byla snížena koncentrace většiny složek inkubační směsi, byl přidán Triton X-100 pro zlepšení rozpustnosti NBT, byl přidán pyruvátu sodného jako inhibitor laktátdehydrogenasy. GSH a formaldehyd byly do roztoku přidány postupně. Byl upraven postup inkubace.

Připomínky a dotazy v rámci diskuse:

Jak je v organismu udržována hladina redukováného glutathionu?

O: Působením redukujících faktorů jako NADPH původem zejména z pentosa-fosfátového cyklu.

Na všechny dotazy položené členy komise uspokojivě odpověděla. Práce i obhajoba byly hodnoceny jako vynikající.

Celkové hodnocení oponované práce: výborně

ZÁPIS Z PRŮBĚHU OBHAJOBY DIPLOMOVÉ PRÁCE