

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Zuzana Žvátorová

Název práce: Úloha S-nitrosoglutathionreduktasy ve vývoji a obranné reakci rajčete *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Oponent práce: Mgr. David Kopečný Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost rešeršní části práce	4
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	3
3	Naplnění cílů práce	5
4	Logika postupu při vlastní rešeršní nebo experimentální práci	3
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	4
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	3
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	2
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	4
9	Grafická úprava textu a obrázků	3
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	3
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	4
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	5
<b>Celkem bodů</b>		<b>43</b>

max  
60

### Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Diplomová práce, psaná na 88 stranách, byla zaměřena na posttranslační modifikace proteinových cysteinů u S-nitrosoglutathionreduktasy reaktivními formami kyslíku a dusíku. Práce shrnuje velké množství výsledků, obsahuje 44 obrázků a grafů, 12 tabulek a 218 citací. Studentka si osvojila několik biochemických metod – měření enzymové kinetiky, měření genové exprese a blotování.

Poznámky a otázky k teoretické části:

- Vytknul množství komplikovaných a nejasných formulací nebo skloňování. Za všechny např.: „*inverzní korekce* mezi GSNOR aktivitou a *distribucí hladiny* GSNO“ (str. 15, místo „nepřímá úměra“ a „koncentrací“) atd. Dále jsou nesprávně pojmenovány mutantní isoformy jako například *At C284S*. Správnou možností je *AtGSNOR-C284S* nebo jednoduše jen *C284S*.
- Považuji za nedostačující absenci chemických vzorců a reakčních schémat. V kapitole 2.3 je detailně rozepsáno 7 enzymů, které kontrolují hladiny S-nitrosothiolů, ale jen u dvou jsou reakce znázorněny. Prosím o doplnění během prezentace při obhajobě, co vstupuje do reakce a co má vzniknout, hlavně z pohledu GSNO nebo Cys-NO. Například u xanthinoxidasy (XO) je uvedeno, že: „*Cys-NO a GSNO jsou pomocí XO rozkládány za přítomnosti purinového substrátu. Za aerobních podmínek používá XO jako donory elektronů Cys-NO, nebo v případě jeho snížení GSNO a kyslík. Touto reakcí by mohl vzniknout peroxynitrit....*“
- Prosím objasněte vaši větu ze str. 19: „*Mutace D genu obsahuje změnu báze 39 AG v konsenzuální oblasti intronu 8, která vede k nesprávnému sestřihu a produkci transkriptů o 8 a 14 bází kratších než*

*původní wild typ. Tyto transkripty mají předčasné stop kodony. Ty mohou produkovat peptidy, které mají o 23 a 26 méně aminokyselin než wild typ.*“ Myslíte záměnu A za G v pozici 39 na intronu 8? Jak může záměna na intronu vést k jinému sestřihu? Jak může transkript kratší o 8 a 14 bází vést ke kratším proteinům až o 26 AMK, když tři báze = 1 AMK?

4. U Biotin-Switch metody prosím vysvětlíte, proč se přidává kys. askorbová? Kdy se používá HENT nebo TEGN pufr? Jaký je rozdíl mezi neocuprinem a neocuproinem (str.32)? Je to překlep?

Poznámky a otázky k výsledkové části a diskuzi:

5. V materiálové části v kapitole 3.3.1. je menší chyba – jsou prohozeny eluční a ekvilibrační pufrы na str. 27. V tabulce 8 (str. 39) je chyba pro C10S isoformu, specifická aktivita nekoreluje se stupněm přečištění. Celková aktivita má být jen v nkat.

6. U stanovení  $K_m$  a  $V_{lim}$  v tabulce 10 není uvedeno, jak byla data vyhodnocena, v jakém programu a jaké byly chyby měření. Jsou pozorované rozdíly mezi WT a mutantní isoformami opravdu v důsledku bodové mutace nebo v rámci chyby měření?

7. S bodem 6 souvisí diskuze v části 5.2. Ta by měla být až první odstavec uvedena již v úvodu. V diskuzi chybí, kde se studovaná residua nachází, jak daleko jsou od vazebného místa pro substrát, pro koenzym nebo zda jsou blízko rozhraní obou monomerních podjednotek tvořících výsledný dimer. Obdobná varianta AtGSNOR-C10A (Guerra et al., 2016) vykazovala pouze nepatrný pokles aktivity, zatímco v tomto případě u C10S je aktivita téměř nulová. Jak si tento rozdíl vysvětlujete, když serin je navíc mnohem podobnější cysteinu než alanin? Naopak vaše data pro C271S jsou podobná těm pro publikovanou variantu C271A. Toto není diskutováno.

8. U reakcí s  $H_2O_2$  byl sledován pokles aktivit u AtGSNOR a tří variant s časem a rostoucí koncentrací  $H_2O_2$ . Za kontroly jsou ale nesprávně označena měření bez přídavku  $H_2O_2$  a nebo 0 minut. Skutečná kontrola chybí. Například NADH je znám citlivostí k oxidaci v závislosti na složení pufru a ionty kovů jsou známy, že katalyzují rozpad peroxidu na vodu a kyslík. V GSNOR jsou  $Zn^{2+}$  ionty, v pufru stopy dalších také. Není pokles aktivit jednoduše spojen s oxidací NADH v závislosti na zvyšující se koncentrací peroxidu a časem? Stejně tak můžete z vašich měření nebo literatury potvrdit, že peroxid neoxiduje či nerozkládá substráty GSNO nebo HMGSH? Stejný problém je u použití redukčních činidel a jejich reakce s kofaktory a substráty. Druhý problém je, že se neuvádí množství nebo koncentrace proteinu AtGSNOR a tří variant, které inkubujete s  $H_2O_2$ . Předpokládám, že díky zanedbatelné aktivitě varianty C10S, je inkubováno řádově mnohem větší množství proteinu vůči  $H_2O_2$  než u zbylých isoform, aby se dal následný pokles aktivity měřit. To může být důvodem vysoké residuální aktivity v obr. 17 a 18.

9. Diskuze (kapitola 5.6) k vlivu stresu na aktivitu GSNOR v cv. Micro-Tom není diskuze k získaným výsledkům. Až na jeden odstavec by celá část měla být v teorii. Nejsou diskutovány výsledky S-nitrosylovaných proteinů v rajčeti cv. MikroTom (poslední kapitola 4.6). Co tedy vyplývá z vašich výsledků, že je více nitrosylovaných proteinů v nahG rostlinách než ve WT-Micro-Tom kultivaru?

10. Co bude důsledkem nižší exprese a aktivity GSNOR po tepelném stresu v nahG rostlinách oproti ve WT-Micro-Tom kultivaru? Co tedy plyne z vašich měření, že GSH po tepelném stresu prakticky absentuje v nahG rostlinách a je ve formě GSSG, zatímco u WT-Micro-Tom kultivaru je tomu naopak? Která rostlina tedy tepelnému stresu čelí lépe - nahG nebo WT-Micro-Tom?

### **Chyby, které je nutno opravit**

**Závěr: práci doporučuji /nedoporučuji-k obhajobě.**

V Olomouci dne: 12.5.2016

Podpis: Mgr. David Kopečný Ph.D.

Hodnocení:

- A- 56-60
- B- 51-55
- C- 46-50
- D- 41-45
- E- 36 -40
- F- 35 a méně