

Posudek na dizertační práci Mgr. Michala Daňka: „Charakterizace FLOTILLINŮ a HYPERSENSITIVE INDUCED RESPONSE proteinů u *Arabidopsis thaliana* – dynamika, interakce a funkce“

prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D., Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Česká Republika

Flotilliny a „hypersensitive induced reaction“ (HIR) proteiny tvoří důležitou skupinu, patří do superrodiny stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C (SPFH) domain proteinů. Předložená dizertační práce se zaměřila na charakterizaci flotillinů (*AtFLOT1*, *AtFLOT2*, *AtFLOT3*) a HIR proteinů (*AtHIR1*, *AtHIR2*, *AtHIR3*, *AtHIR4*) u *Arabidopsis thaliana*. Flotilliny plní významnou úlohu v tzv. endocytóze nezávislé od klatrinu, která se výrazně uplatňuje především při internalizaci transportérů, enzymů a receptorových kináz lokalizovaných v plazmatické membráně. HIR proteiny sehrávají zase důležitou roli při interakci s ligandovými proteiny po ataku patogenů, jako i při dalších biotických stresech. Vzhledem k tak významným biologickým funkcím pro buňku je atraktivita této skupiny proteinů pro vědecký výzkum navíc výrazně umocněna jejich lokalizací na povrchu buněk, kde dochází k zásadním krokům v procesu rozpoznávání vnějších stimulů a k nastartování dalšího postupu při generování adekvátní odpovědi buněk prostřednictvím signalizace. V tomto ohledu je třeba zdůraznit i fakt, že na rozdíl od relativně širokého spektra faktů a procesů, u kterých byly funkce těchto proteinů definovány v živočišných buňkách, funkce jejich rostlinných izoform jsou podstatně méně probádány. Zvolené téma a zadání dizertační práce je proto vysoce aktuální a plně reflektuje současné trendy v buněčné a molekulární biologii rostlin.

Cíle dizertační práce jsou jasně stanoveny a formulovány. V rámci celé problematiky FLOT a HIR proteinů byl selektován a stanoven záměr fenotypicky analyzovat jednotlivé mutanty zbavené funkce FLOT proteinů v podmínkách abiotických a biotických stresů, hledat interakční partnery FLOT2 proteinu, a charakterizovat lokalizaci a dynamiku FLOT a HIR proteinů v buňkách. Již zde je možné konstatovat, že práce tím získala ucelený koncept, s jasně definovanými záměry, k dosažení kterých byly vybrány adekvátní metodické postupy.

Dizertační práce má standartní rozsah, formu a členění. Plní tím všechny předepsané předpoklady na tento typ prací kladené. Úvodní teoretická část práce obsahuje kromě všeobecného představení problematiky přehlednou autorskou publikaci č. 1. Výsledková část práce je vytvořena syntézou dvou publikovaných a jedné k publikování připravované původní vědecké publikace. Následují obecná diskuze a shrnutí, které stručně, ovšem obsažně sumarizují a hodnotí dosažené výsledky.

V teoretickém úvodu autor komplexním způsobem zhodnotil současný stav poznání o flotillinech, erlinech a HIR proteinech z dostupných zdrojů, a to na základě jejich lokalizace, funkce, známých interakcí s receptorovými kinázami, jako i na základě úloh, které mohou hrát v imunitních odpovědích. Autor shrnul známé data i obecně, ale zaměřil se především na rostliny. Jak vyplývá z publikace č. 1, speciální pozornost věnovali autoři transkripčním profilům v kontextu ontogenetického vývoje a daných environmentálních podmínek, dále zhodnotily přítomnost charakteristických domén a motivů v jejich aminokyselinové sekvenci, načež nastínily i potenciální interakce s jinými proteiny. Výsledkem je velice komplexní a

obsáhlý úvod, který dostatečně obeznámí s danou problematikou i nezainteresovaného čitatele. Navíc shrnuté informace v přehledné publikaci jsou doplněny i o nejnovější data, které se dosud objevily po její publikování. Tato část je dále doplněna sumarizací dostupných informací o struktuře a dynamice plazmatické membrány, jako i o struktuře membránových mikro/nanodomén u rostlin.

První část výsledků představuje publikace č. 2, ve které autoři provedli transkripční analýzu *AtFLOT* genů po různých stimulech, jako i analýzu fenotypů mutantů jednotlivých *AtFLOT* genů, znova po aplikaci různých biotických a abiotických stresů. Tato práce je významná z toho důvodu, že analyzuje podíl flotillinů při reakci rostlin na abiotické stresy, což dosud cíleně studováno nebylo, a dále získaná data o transkripční aktivitě koreluje s fenotypovými projevy na úrovni celých rostlin u jednotlivých mutantů. Bylo zjištěno, že na rozdíl od detekovaných změn v transkripční aktivitě, mutace jednotlivých *AtFLOT* genů nevedly k výrazným změnám v odpovědi mutovaných rostlin na testované stresy. I když autoři správně vysvětlují tento stav vzájemnou redundancí všech *AtFLOT* genů v případě využití jednoduchých mutantů, oceňuji i to, že se autoři seriózně zabývaly i posouzením a hodnocením jiných možných rizik, které by mohli vést k získaným výsledkům. Rozhodně oceňuji i to, že bylo detailně prověřeno genetické pozadí použitých mutantů, aby bylo možno vyloučit reziduální funkce případných nekompletních genových produktů.

Další část výsledků je shrnuta v originální publikaci č. 3, ve které byly stanoveny interakční proteiny k *AtFLOT2* v plazmatické membráně pomocí co-imunoprecipitační techniky a hmotnostní spektrometrické analýzy, s následnou verifikací přímých interakcí pomocí split-ubiquitinového systému. *AtFLOT2* byl vybrán, protože je dosud nejméně charakterizován. Náročnost této práce předurčuje komplikovaná extrakce a identifikace proteinových komplexů v plazmatické membráně z důvodu jejich nízké abundance a hydrofobního charakteru. Autoři tuto výzvu zvládli, což jim umožnilo identifikovat 19 proteinů, které jako interakční partnery pravděpodobně tvoří funkční komplexy s *AtFLOT2*. Vzhledem k tomu autoři navrhli, že komplexy *AtFLOT2* s nalezenými interakčními partnery mohou vykonávat funkce při napadení rostliny patogeny, při transportu vody a při vnitrobuněčném transportu. Pozitivní dojem vzbuzuje kritické zhodnocení získaných dat a jejich střízlivé porovnání s již zveřejněnými, i když mnohdy kontroverzními daty.

Výsledky práce jsou završeny rukopisem publikace č. 4, která hodnotí lokalizaci a dynamiku celé skupiny flotillinů a HIR proteinů v buňce pomocí fluorescenčně značených verzí a vitální mikroskopie. Principiálně tato práce dokumentuje uspořádání *AtFLOT* a *AtHIR* proteinů do membránových mikrodomén v plazmatické membráně a v tonoplastu, a hodnotí jejich laterální mobilitu v souvislosti s funkční provázaností na komponenty cytoskeletu a buněčných stěn. Bezsporně zajímavý je fakt, že i když tyto proteiny (kromě *AtHIR3*) vytvářejí v plazmatické membráně struktury prostorově uspořádané kolem svazků mikrotubulů, farmakologické narušení funkce a struktury jak aktinové, tak mikrotubulové části cytoskeletu mělo jen minimální vliv na uspořádání *AtFLOT* a *AtHIR* proteinů v mikrodoménách. Farmakologicky indukované změny v syntéze a struktuře buněčných stěn ovšem výrazně ovlivňovali laterální mobilitu *AtFLOT2* a *AtHIR1*. Funkční a/nebo strukturní provázanost

FLOT a HIR proteinů s buněčnou stěnou by tak mohla představovat důležité pojítko v komunikaci plazmatické membrány s prostředím.

Z formálního hlediska je práce pečlivě zpracována a obsahuje jenom minimum nepřesností, chyb a překlepů. Vytkl bych snad používání výrazů jako „*AtFLOTy* a *AtHIRy*“ v českém abstraktu, mělo by se spíš používat „*AtFLOT* proteiny a *AtHIR* proteiny“. Obdobně formulace „na deletantech“ by měla být nahrazena formulací „na mutantech s delecí“.

V seznamu zkratk jsou uvedeny CLC2 - CLATHRIN HEAVY CHAIN 2, mělo by asi být „CLATHRIN LIGHT CHAIN 2“, a stp - single particle tracking, mělo by být „spt“.

Zajímalo by mě, proč byl v obrázku Fig. S8 efekt použitého LatB výrazně silnější na uspořádání mikrotubulů, nežli na strukturu aktinových vláken?

K práci mám následující dotazy:

1. Práce prezentuje model lokalizace flotillinů v plazmatické membráně, jako i regulace jejich laterální mobility na základě stabilizační funkce buněčné stěny. Vzhledem k tomu, že se jedná o periferní membránové proteiny lokalizované na cytoplazmatické straně membrány, tedy bez fyzického kontaktu s buněčnou stěnou, a vzhledem k tomu, že se flotilliny podílejí na aktivní endocytóze, buněčná stěna jako taková tak asi nebude hlavním determinantem, což doktorand v práci zmiňuje. Může být chování flotillinů v plazmatické membráně zprostředkováno komplexem CESA? Podobně jako flotilliny, tyto komplexy svou lokalizací v plazmatické membráně kopírují uspořádání kortikálních mikrotubulů při syntéze mikrofibril celulózy. Mohla by tuto asociaci podporovat zjištěná sekvence pro „membrane binding side“ na N-terminálním konci Flot proteinů, například prostřednictvím vazby na membránové domény bohaté na PI4P? Co je známo o možných interakcích Flot a HIR s CESA?

2. Vzor tzv. „coral-like“ uspořádání Flot proteinů v plazmatické membráně koreluje s distribucí kortikálních mikrotubulů. V průběhu buněčného dělení dochází ovšem k přeskupení mikrotubulů, s čím souvisí vymizení kortikální sítě před a při formování PPB. Je známo, jestli a do jaké míry se mění i vzor lokalizace Flot v plazmatické membráně po vymizení kortikálních mikrotubulů v průběhu buněčného cyklu?

Závěrem můžu konstatovat, že předložená dizertační práce má výbornou kvalitu, vyhovuje všem formálním požadavkům, a řeší aktuální vědeckou problematiku. K řešení a dosažení stanovených cílů byly využité adekvátní metodické postupy. Výsledky práce byly již publikovány a přinesly zajímavé a nové poznatky, které nejen rozšiřují naše znalosti v dané oblasti, ale vytvářejí i potenciál pro další progres. Předkládaná dizertační práce tím pádem splnila svůj cíl. Práci doporučuji k obhajobě a po úspěšném obhájení navrhuju Mgr. Michalovi Daňkovi dle příslušných předpisů udělit **akademický titul „philosophiae doctor“**.