

## Posudek doktorské disertační práce

Mgr. Daniely Seifertové

### AUXIN TRANSPORT in *Arabidopsis thaliana* : From the whole plant to suspension-cultured cells

Ústav experimentální botaniky AV ČR Praha  
Katedra experimentální biologie rostlin PřFUK v Praze  
Česká republika  
2010

Disertační spis Mgr. Seifertové formálně odpovídá požadavkům oborové rady AFR UKPrF na práci „klasická forma, typ II“. Má doporučené členění na kapitoly typu „Úvod, Materiál + Metodika, Cíle, Výsledky, Diskuse, Závěry“. Konservativní oponent však začne mít určité problémy s vypracováním posudku již na počátku kapitoly zvané v obsahu anglického originálu „Results summary“. Ve vlastním textu je tento název již delší – a také přesněji zobrazující realitu : „Results- various approaches to an understanding the role of auxin carriers in plant development“. Je totiž poskládána z přepisů dílčích výsledkových pasáží přiložených publikací. Tedy publikací, které sice jednoznačně propojují téma „auxinu“ či „auxinového transportu“, ale svým dílčím zaměřením přece jen různorodých. Zcela logicky pak určité rozpaky provázejí oponenta i kapitolami „Results“ a „Conclusion and Prospects“.

Příčina tohoto problému je zřejmá a možno říci dost obecná v současném výzkumu. Jeho týmový charakter je pro doktorandy na jedné straně nesmírnou výhodou, ve finální části doktorandského studia však evidentním problémem. Disertační práce Mgr. Seifertové je postavena na souboru šesti odborných sdělení, z nichž pět již bylo publikováno a šesté zasláno vědeckému časopisu. Publikace mají vesměs mimořádně vysokou úroveň a odpovídající impakt (2x časopis Science, 1 x Cell, PNAS, Nature). Pokud by byla Mgr. Seifertová prvoautorkou resp. minimálně dvou těchto publikací, mohla podat disertaci formy „soubor vědeckých prací“ ...a oponent by téměř neměl o čem psát. A s úctou by jí pogrataloval k úspěšnému zakončení postgraduálního studia. Většina oněch sdělení má však deset až dvacet spoluautorů. A doktorandka je mezi nimi zařazena někde uprostřed. Není sporu o tom, že k jejich realizaci různým způsobem výrazně přispěla, v příslušné části úvodního, více než čtyřicetistránkového textu disertace to velmi názorně dokládá. Prvoautorství ji nicméně zdobí pouze v případě onoho „submitovaného“ rukopisu.

V souladu s pravidly schválenými OR tedy Mgr. Seifertová mohla podat pouze práci klasického typu. A v ní využít širokého spektra dosavadních výsledků. Uspořila si jistě mnoho času a úsilí tím, že nevypracovávala „monografický text“ (typu I), ale stvořila vlastně „autocitační mozaiku“ (typu II). V níž ovšem nutně snižuje pocit autenticity jejího vlastního, autorského textu .Nejsem touto alternativou nadšen, ale formálně jí nemohu nic vytknout.

V posudku nicméně záměrně nehodnotím její podíl na biochemických resp. imunologických analýzách v přiložených publikacích. Za velmi cenné, originální – a nesporně „autorsky autentické“ – však považuji výsledky přípravy a fenotypového hodnocení modelových „suspensních kultur“ tabáku a *Arabidopsis*, z nichž mj vyplývá, že:

...model Ath (možná brasič obecně ?) vykazuje oproti tabáku vyšší poměr aktivního transportu „přes membránu“ . A to vyššího vstupu/influxu u NAA a naopak vyššího výstupu /effluxu u 2,4D

...liší se metabolismus NAA v buňkách Ath a BY-2

Výše zmíněné publikace se vesměs týkají problematiky transportu auxinu – studované na různých modelech, rostlinných, kvasinkových, živočišných. Tématickou prioritou resp. specifitou této disertace však je – či zřejmě mělo být – využití specifických pokusných objektů, tedy rostlinných buněčných resp. suspensních kultur. Včetně jejich základní charakteristiky – a přípravy modelů dosud unikátních, tedy suspensních kultur *Arabidopsis thaliana*.

Připouštím, že zpracováním této problematiky jsem byl uspokojen jen zčásti. V samotném úvodu jí autorka věnuje pouze kapitulu „*Cell suspension cultures as models for auxin transport*“. Rozsahem jeden a půl stránky. Není divu, publikací tak úzkého zaměření je jako šafránu. Kdyby však rozšířila svůj zájem na publikace týkající se nejen samotného „auxinového transportu“, ale také auxinového metabolismu resp. „vazebných míst pro auxin“, mohla citovat mj. průkopnické práce vlastního řešitelského týmu již z pozdních osmdesátých let. A získat z nich i poučení o souvislostech kupř. mezi „hormonálním chováním“ buněčných linií a jejich aktuální ontogenezi (viz dále).

Odkazy na význam vhodného a možno říci unikátního modelu „suspension-cultured cells“ pro studium problematiky fytohormonů lze nalézt na různých místech úvodního textu. Jsou však také zmíněny trvalé obtíže se založením takových rostlinných buněčných linií, jež by svými růstovými a cytologickými charakteristikami co možná nejvíce odpovídaly vlastnostem prozatím jediných „rostlinných „HeLa buněk“ – tedy tabákových linií BY-2 příp. VBI-0.

V závěrech shrnujících přínos doktorandky k rozvoji tohoto vědního odvětví je mj. několikrát zmíněno i odvození a využití vlastních suspensních kultur/buněčných linií *A.t.*, pro společné pokusy různého typu. Vědom si mimořádné pracnosti zadání „připravit buněčnou linii *A.t.* s vysokou rozpadavostí, fenotypovou stabilitou, růstovou rychlostí atd „ by oponent uvítal, kdyby autorka věnovala této jen zdánlivě technické práci daleko více pozornosti. A právě vzhledem k tomu, že v řadě oněch dalších publikací byla nezřídka v roli „kolečka ve vědeckém stroji“, kdyby zdůraznila v této části svoji individualitu a odbornou zkušenost. A v neposlední řadě přidala i odborně velmi cenný názor na to, jak takovou linii co nejlépe odvodit.

V tomto kontextu mám následující obecnější dotazy:

- soudí autorka, že odvození takové „HeLa-like linie“ je jen věcí náhody nebo cílené metodiky?
- hraje klíčovou roli výchozí materiál (bob, tabák, oseníček, javor), typ explantátu (kořen, list....), složení kultivačního media, kultivační režim ...?
- jaký vliv má zejména hormonální složení media – a různé fytohormony ?
- kdy jsme oprávněni použít termín „cell line“ případně „cell strain“ ?

Důležitou část přílohy publikací tvoří rukopis „*Auxin transport in Arabidopsis suspension-cultured cells*“, zaslaný vysoce kvalitnímu časopisu *Planta*. Rukopis velmi zajímavý, s jistě originálními výsledky (viz výše)

Být redakčním recensentem, měl bych však k němu přinejmenším následující připomínky:

V práci byly využity různé „suspensní kultury“ – jedna tabáková (klasická buněčná linie BY-2), dvě „arabiskové“. Z nich jedna (linie Ath) odvozená již před sedmnácti lety (May and Leaver 1993), druhá nově autorkou či někým z jejího týmu .

Jak „stará“ je ona *A.t.* linie „aux1-7 (NASC3074)? Je trvale pěstovaná v tekutém mediu ? Co to znamená „established from mixture of cotyledons, hypocotyls and leaves“? Jak dlouho byla pěstována coby „kalus“ ?

Linie Ath vykazuje výborné růstové parametry (growth value) , srovnatelné s BY-2. Zřejmě daleko lepší, než kultura původní. Je to výsledkem určité dlouhodobé selekční strategie – či pouhá náhoda ? Dle obrázků i textu se její buňky nedělí „polárně“, netvoří tedy řetízky, ale „3D“ agregáty. Nadto – zřejmě – ani polárně nerostou. Procházejí během subkultivačního intervalu nějakým pravidelným „fenotypovým cyklem“ (kupř míra vakuolizace, množství cytoplasmy + organel, celková velikost, změny v poměru délka/šířka)? Lze tedy , analogicky BY-2 (či jí podobné tabákové linii VBI-0) podle této fenotypové charakteristiky přesně časovat biochemické analýzy transportu resp. specifického obsahu auxinů ?

Aktuální „cytoplasmaticko-vakuolová kapacita“ – a nejen sama kapacita „buněčných povrchů“ (povrchu plasmalemy) – zřejmě může mít dopad i na takové procesy jako je auxin influx/efflux . Či na „relative amount of radiolabel“ a možná i další parametry . Nemohou pak některé referované rozdíly mezi *At.* linií a BY-2 být *de facto* dány nikoliv odlišností arabisky a tabáku, ale kupř. různými relacemi starší /mladší – hodně/málo vakuolisované buněčné subpopulace obou linií ?

A ještě otázka zcela odjinud: byl sledován dlouhodobější účinek at' NPA či NOA na fenotyp (dělení, růst) *At.* linie – v porovnání s BY-2 ?

Pokud ano – s jakým výsledkem ?

**Závěr:**

Navzdory výše uvedeným kritickým komentářům a připomínkám považuji předloženou disertační práci Mgr. Seifertové za solidní vědecké dílo, plně prokazující její schopnost samostatně a invenčně získávat a dále zpracovávat originální informace o biologických mechanismech života rostlin.

Doktorandtka také prokázala schopnost připravit na základě těchto dat i studia odborné literatury kvalitní vědecké sdělení.

Ze všech těchto důvodů a v souladu s příslušnými vnitřními legislativními předpisy a zákonem o Vysokých školách č. 111/1998 Sb

doporučuji udělit Mgr. Daniele Seifertové vědeckou hodnost PhD.

v Praze, dne 1.července 2010

Prof. RNDr. Zdeněk Opatrný CSc.