

Doktorské disertační práce **Ing. Milady Čovanové**
„**AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1)**
and its role in the auxin management in plant cells“

pro studijní obor **Anatomie a fyziologie rostlin**, studijního programu **Botanika**

školitel: **Doc. RNDr. Eva Zažímalová, CSc.**

Oponent:

Mgr. Vilém Reinöhl, CSc.

Ústav biologie rostlin, Mendelova univerzita v Brně

Studium role ABP1 je významným přínosem pro poznání mechanismů, kterými jsou zprostředkovány mnohostranné účinky rostlinného hormonu auxinu. Přesto, že první studie vazby auxinů na tento protein byly publikovány již počátkem 70-tých let minulého století, není jejich role dodnes zcela vyjasněná. Cíl práce je tedy vzhledem k významu auxinu v regulaci růstu a vývoje rostlin vysoce aktuální.

Disertační práce je sepsána v anglickém jazyce na velmi solidní úrovni. Jako oponent, jehož rodným jazykem není angličtina, těžko posoudím jemné jazykové nuance, přesto jsem v textu vyznačil některé opravy. Jedná se především o používání členů v Souhrnu a kapitolách 1 a 3; v dalším textu jsem pak nalézal chyb stále méně.

Literární přehled je logicky rozčleněn a postihuje na 15 stranách studovanou problematiku v celé šíři. Je bohatě doložen ca. 150 relevantními citacemi publikací, jejichž větší část je z tohoto století, včetně prací z roku 2010. Rozsah stránek odpovídá velmi věcnému a hutnému stylu projevu doktorandky. Pouze 8 stran je věnováno Materiálu a metodám, které jsou popsány stručně s případnými odkazy na literaturu, odkud byly metodiky převzaty.

Na 19 stranách jsou shrnuty výsledky práce a jejich popis odpovídá zřejmě textu, který byl odeslán do tisku do časopisu *Plant Cell*. Experimenty byly prováděny na tabákové buněčné suspenzi BY-2, která byla modifikována transformací pro vyvolání konstitutivní a indukovatelné nadexprese ABP1 a k utišení jeho exprese pomocí protismyslné DNA.

Otázka 1: Obrázek 5.1A v popisu uvádí PCR důkaz přítomnosti *NtABP1-AS*, text na straně 35 pak tvrdí, že v obrázku 5.1A je důkaz exprese tohoto vneseného transgenu pomocí PCR. V případě, že je správný popis obrázku, jaká byla úroveň exprese (utišení) nativního *NtABP1*? Každopádně by bylo vhodné vysvětlit rozdíly v intenzitě proužků 700 a 250 bp a i když je to nasnadě uvést příčinu rozdílu velikosti amplikonů, získaných stejnými primery.

Funkčnost všech tří transgenních linií je velmi dobře potvrzena fenotypy a reakcí buněk na přidané auxiny, resp. inhibitory transportu auxinu a dalších látek. Jedním z účinných nástrojů studia změn, které vyvolává nadprodukce nebo utišení produkce ABP1, bylo sledování akumulace radioaktivně značených auxinů v buňkách.

Otázka 2: Proč v obrázcích 5.7, 5.11, 5.12 a 5.15 není použit jednotně buď sloupcový diagram akumulace auxinu po 20 min (navíc jako % kontroly), nebo časový průběh akumulace (např. 5.7A)? Jsou v obrázku 5.12 všechny chyby tak malé, že jsou skryty za experimentálními body?

Protože auxin a jak je v práci prokazováno právě prostřednictvím ABP1 výrazně ovlivňuje prodlužování buněk a buněčné dělení, bylo měření rozměrových parametrů buněk a stanovení počtu buněk v řetězcích logickým dalším nástrojem.

Otázka 3: Na základě popsané metodiky jsem usoudil, že výsledky byly získány měřením stovek buněk téhož vzorku, případně z více optických polí. Protože v grafech není uvedena statistika, byla tedy stanovení provedena v jediném biologickém opakování?

Otázka 4: Proč je v Obr. 5.8 použit jiný typ závislosti pro vliv PBA na rozměry buňky (délka x průměr) a ne distribuce délek, jako v Obr. 5.6, se kterým je vliv porovnáván? Tento typ grafu má své opodstatnění v Obr. 5.19B, ze kterého lze usoudit na izodiametrické prodlužování, ale délková distribuce by ve všech případech asi byla názornější.

V další práci pak důmyslnými kombinacemi výše uvedených tří ABP1 transgenů s indukovatelnými geny rodiny *PIN*, resp. s jejich fúzí s GFP, bylo možné studovat interakci ABP1 s polárním transportem auxinu. V textu na straně 40 je chybně označen *PIN1::PIN1-GFP* jak konstitutivní konstrukt – podle mého názoru se jedná o nativní promotor, který nemá konstitutivní expresi.

Otázka 5: Je slabý proužek v Obr. 5.9B u neindukované GVG-AtABP1 způsoben slabou expresí transgenů i v nepřítomnosti DEX, nebo je to signál exprese homologního *NtABP1*? Obdobná situace je i v případě Obr. 5.17A – existuje homologní *NtPIN5* (v popisu chybně *PIN5* místo *PIN5*)?

Dosažené kvalitní a přesvědčivé výsledky jsou velmi dobře a ve srovnání se stávajícím stavem poznání popsány v diskusi. Jedním z největších přínosů celé práce je komplexní soubor experimentů, které v některých případech sice pouze potvrzují již známá fragmentární data, která ale doposud nebyla dána do patřičných souvislostí. To platí především v prohloubení poznatků o diferenciálním vlivu různých auxinů na dělení a prodlužování buněk a s tím související různou lokalizací ABP1. V diskusi o roli ABP1 v transportu auxinu jsou chybně interpretovány výsledky Nick et al., 2009. Zvýšení množství auxinu způsobuje

přesný opak – tedy ne tvorbu aktiniových svazků a nezvyšuje tedy akumulaci auxinu v buňce. Již název práce říká pravý opak! Na straně 55 se pak opět opakuje konstitutivní nadexprese PIN1-GFP i když tento konstrukt je pod nativním promotorem PIN1 (o nadexpresi je snad možno hovořit, neboť BY-2 nemá knockoutovaný NtPIN1, ale není to exprese konstitutivní). Přes uvedené nedostatky je diskuse velmi cennou součástí předložené práce a ve svém závěru staví konstruktivní otázky pro budoucí práci.

Obsáhlý literární přehled svědčí o dobrém přehledu o recentních publikacích v oboru, má však určité formální nedostatky. Většinou je uváděn úplný název časopisu, ale není tomu tak ve všech případech. Asi desítkou odkazů není úplná – chybí svazek nebo stránky. Uvedené nedostatky jsou vyznačeny v práci.

Závěr: Předložená práce ing. Milady Čovanové odpovídá nárokům kladeným na doktorské disertační práce oboru Anatomie a fyziologie rostlin. Práce obsahuje výsledky mající značný význam v objasnění role ABP1 v rychlé odpovědi na auxinový signál. Sepsáním disertační práce a publikací výsledků autorka prokázala velkou míru teoretických znalostí i praktických tvůrčích dovedností. Práci proto doporučuji přijmout k obhajobě v oboru Anatomie a fyziologie rostlin.

V Brně dne 6. 8. 2010


Mgr. Vilém Reinöhl, CSc.