



OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce: „**Mechanism of cytokinin transport across plasma membrane and their metabolism in tobacco BY-2 cultured cells**“

Autor: **Mgr. Petr Klíma**

Předložená disertační práce se zabývá studiem transportu rostlinných hormonů - cytokininů přes cytoplasmatickou membránu u odvozené submersní linie tabákových buněk BY-2. Hlavní část práce tvoří ucelený rukopis v rozsahu 56 stran doplněný o tři vědecké články v mezinárodních impaktivních časopisech, na kterých se student podílel jako spoluautor. Práce je psaná s výjimkou českého souhrnu anglicky, dle mého názoru velmi dobrou angličtinou, a je jen minimálně zatížena překlepy a typografickými chybami. Práce je zpracována formálně i fakticky velmi pečlivě.

Z formálních chyb bych vytkl pouze nejednotné vyjadřování jednotek u koncentrace. Ve většině textu se používá vyjádření μM či nM , dále pak $20 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ (str. 30), nebo $50 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ (str. 37).

Ne všude jsou citovány původní práce. U výčtu rýžových CKX genů má být citována práce Ashikariho et al., Science 2005, kde jsou poprvé anotovány a ne přehledný článek Wernera et al., Plant Biol. 2006. Na téže straně autor píše, že aktivita CKX enzymů je aktivována i endogenně zvýšenou hladinou cytokininů vyvolanou nadexpresí *IPT* genu a cituje práci Wernera et al., PNAS 2001. V této práci se však nic podobného neřeší, co měl autor konkrétně namysli? Byl tento fenomén někdy studován?

Na stejné straně je pak uvedeno, že CK 9-glukosidy, cZ ribosid a BA nejsou substráty cytokinin oxidasy/dehydrogenasy. Aromatické cytokininy jsou také odbourávány CKX enzymy, tato reakce však není aktivována přítomností elektronových akceptorů jiných od kyslíku, a oproti dehydrogenasové reakci probíhá nízkou rychlostí, podrobné vysvětlení v práci

Podtisk: Krystalová struktura rekombinantní kukuřičné cytokininoxidasy / dehydrogenasy.

Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice

Tel.: 585 634 921
Fax: 585 634 933
<http://www.biochemie.upol.cz>

IČO: 61989592
DIČ: CZ61989592
KB Olomouc, č.ú. 191096330227/0100



Malito et al., J. Mol. Biol 2004. Některé CKX izozymy z Arabidopsis preferují CK 9-glukosidy před volnými bázemi (Galuszka et al., JPGR 2007; Kowalska et al., Phytochemistry 2010).

K předložené práci mám několik dotazů a připomínek:

- 1) V kapitole 6.1.1. se uvádí, že akumulace studovaných cytokininů je nelineární jak v krátkém intervalu (do 15 minut) tak při delší inkubaci kromě akumulace BA a odkazuje se k obrázku 10, kde však BA není sledován.
- 2) Nemůže být nelineární nárůst cytokininů uvnitř buňky u iP a tZ způsoben pouze jejich postupným vyčerpáním z média při velmi nízké použité koncentraci (2 nM) a u BA a tZR není sledován, protože jsou transportovány pomaleji? Za 10 minut je akumulováno přibližně 10 pmol BA a tZR, kdežto u iP, tZ a BAR jde o 30-40 pmol (obr. 6). Dá se říct, že BA a tZR jsou transportovány zhruba 3-4 -krát pomaleji?
- 3) V pracích ze kterých autor při svých experimentech vychází Cedzich et al., 2008 a Bürkle et al., 2003 se používají pro měření rychlosti transportu cytokininů přes membránu daleko vyšší koncentrace (200 nM a výše). Co Vás vedlo k tomu, že používáte pouze 2 nM koncentraci? Sám ve svých kompetičních testech radioaktivní/studený cytokinin zjišťujete, že k nasycení předpokládaných transportérů je třeba až cca o dva řády vyšší koncentrace (Obrázek 8)?
- 4) Podobně je u měření CKX aktivity používán substrát pouze ve 2 μ M koncentraci. Sám uvádíte, že K_m hodnoty CKX enzymů jsou srovnatelné či vyšší (str. 47, Bilyeu et al., 2001). Pro srovnávací měření je vždy lepší, aby byl substrát v nasycení (ideálně alespoň 10 - krát nad hodnotou K_m). Nemohou být proto získané hodnoty pro různé substráty (Tabulka 2), především pak pro iP, podhodnoceny?
- 5) V Tabulce 3 je sledována změna CKX aktivity v BY-2 buňkách během prvních 20 minut po přidavku cytokininu. Autor překvapivě popisuje až dvojnásobné snížení specifické aktivity již v 10 minutě po přidavku. Je někde v literatuře popsána tak

Podtisk: Krystalová struktura rekombinantní kukuřičné cytokininoxidasy / dehydrogenasy.

Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice

Tel.: 585 634 921
Fax: 585 634 933
<http://www.biochemie.upol.cz>

IČO: 61989592
DIČ: CZ61989592
KB Olomouc, č.ú. 191096330227/0100



rychlá změna enzymové aktivity vyvolána přidavkem substrátu? Nesledoval jste náhodou změny CKX aktivity i v dlouhodobějším horizontu? Dokázal byste říct, za jak dlouho po přidavku cytokininu dochází ke standardně pozorovanému prudkému zvýšení CKX aktivity?

- 6) Při metabolických studiích pozorujete po aplikaci volné cytokininové báze či ribosidu rychlou většinou konverzi na 5'-monofosfát. Zjištění je překvapivé z pohledu toho, že při dlouhodobých metabolických studiích exogenně aplikovaných cytokininů v různých rostlinných druzích dochází především ke kumulaci 9- či 7-glukosidů. Měl byste pro to nějaké vysvětlení? Dá se např. předpokládat, že BY-2 linie vzhledem ke svému původu má pouze omezenou baterii exprimovaných enzymů podílejících se na metabolismu cytokininů na rozdíl od kompaktní rostliny?
- 7) Na základě dosažených výsledků předpokládáte, že transport volných bází a ribosidů probíhá z části stejným mechanismem (str. 48). Nemůže být pozorovaná kompetice v akumulaci mezi značenou volnou bází a vyššími koncentracemi ribosidů (Obrázek 10) dána pouze extracelulární hydrolýzou vysokých koncentrací ribosidů na volné báze a jejich následným transportem?
- 8) V diskuzi na straně 48 píšete, že pro iP zřejmě existují dvě cesty transportu přes cytoplasmatickou membránu, jedna společná pro všechny typy cytokininů a adenin a jedna unikátní pouze pro iP. Myslel jste tím například to, že by byly v BY-2 buňkách exprimovány dvě purinové permeasy, z toho jedna se širším spektrem afinity na všechny cytokininy a jedna s vysokou specifitou pouze pro iP?
- 9) Uvažoval jste někdy o možnosti měřit rychlost a specifitu transportu cytokininů i ven z buňky? Předpokládá se participace stejných transporterů (PUP, ENT)? Mohl byste se zamyslet nad možným experimentálním uspořádáním takového experimentu.

Podtisk: Krystalová struktura rekombinantní kukuřičné cytokininoxidasy / dehydrogenasy.

Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice

Tel.: 585 634 921
Fax: 585 634 933
<http://www.biochemie.upol.cz>

IČO: 61989592
DIČ: CZ61989592
KB Olomouc, č.ú. 191096330227/0100



- 10) Aktivní transport cytokininů je bez pochyby jedna z kauzalit výzkumu cytokininů, která má vysokou prioritu a měla by být v nejbližší době objasněna. Budete se ve své budoucí kariéře věnovat dále této problematice? Daly by se do budoucího výzkumu zapojit knock-outované linie rostlin *Arabidopsis* pro jednotlivé *PUP* či *ENT* geny, případně jejich násobné knock-outy a od nich odvozené buněčné linie pak využít pro další experimenty? Máte přehled čím se v poslední době zabývají skupiny studující úlohu *PUP* a *ENT* při transportu cytokininů? Skupiny kolem prof. Frommera a prof. Sakakibary.

Závěr: Přes uvedené připomínky, předložená práce prokazuje, že je Mgr. Petr Klíma schopen vědecky pracovat, svá data zpracovat do formy vědecké publikace a patřičně diskutovat, proto doporučuji, aby mu byl po úspěšné obhajobě a zvážení komise udělen titul Ph.D.

V Olomouci, 11. září 2011



Doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.