

Posudek disertační práce

Mgr. Petra Klímy

Mechanism of cytokinin transport across plasma membrane and their metabolism in tobacco BY-2 cultured cells

Charles University in Prague

Faculty of Science

Department of Experimental Plant Biology

2011

Cytokinininy náležejí mezi fytohormony ovlivňující růstové a vývojové procesy v rostlinách. Podporují dělení buněk, růst a diferenciaci, příjem živin, transport a distribuci asimilátů a jsou významnou součástí signálních drah u rostlin. Jejich regulační účinky se projevují na úrovni buněčné, pletivové i na úrovni celistvých rostlin a jsou výsledkem syntézy, metabolismu a transportu.

Cílem této disertační práce je přispět k objasnění příjmu a transportu cytokininů na buněčné úrovni při použití buněčné tabákové kultury BY-2, sledovat kinetiku krátkodobého příjmu cytokininů a jeho energetické závislosti, otestovat existenci selektivních transportních systémů pro cytokininové báze a ribosidy a popsat případnou intracelulární metabolickou přeměnu přijatých cytokininů. Z tohoto hlediska je disertační práce Mgr. Petra Klímy velmi aktuální, neboť rozšiřuje poznání v oblasti transportu, metabolismu a regulačních účinků cytokininů.

Doktorská disertační práce v rozsahu 90 stran včetně literatury a publikačních příloh je členěna do standardních kapitol, tj. Literárního přehledu (12 str.), Materiálu a metodiky (3 str.), Výsledků (17 str.), Diskuse (6 str.), Závěru a Příloh.

Úvod a literární přehled doktorské disertační práce vycházejí z historického objevu cytokininů, jejich chemické podstaty a metabolismu. Dále jsou popsány cytokinininy jako součást signálních drah u rostlin a buněčné kultury, jako vhodný model pro studium regulačních účinků cytokininů.

Kapitola Materiál a metody krátce a výstižně popisuje použité chemikálie (včetně radioaktivně značených), tabákovou buněčnou suspenzi BY-2, stanovení její akumulární kapacity pro cytokinininy a metabolity cytokininů technikou HPLC včetně vyhodnocení aktivity cytokinin oxigenázy/dehydrogenázy. Jde o tradiční metody a postupy používané na školícím pracovišti, tj. ÚEB v Praze.

Z předložených výsledků vyplývá, že se buněčná suspenze BY-2 jeví vhodným modelovým systémem pro studium příjmu, transportu a metabolismu [³H] cytokininů při použití jejich fyziologických koncentrací.

Při sledování dynamiky příjmu buňkami BY-2 s bioaktivními cytokininovými bázemi [³H]*tZ*, [³H]*iP* a [³H]*BA* a jejich ribosidy [³H]*tZR*, [³H]*iPR* a [³H]*BAR* bylo zjištěno, že báze a ribosidy cytokininů jsou v tabákové suspenzní kultuře BY-2 rychle absorbovány. Akumulace ribosidů cytokininů je podobná akumulaci bází cytokininů. Nebyl zjištěn významný rozdíl v příjmu *cis*-zeatinu a *trans*-zeatinu.

K ověření možné účasti aktivního transportu byla srovnávána kompetice [³H] cytokininů ([³H]*tZ*, [³H]*tZR*, [³H]*iP* a [³H]*iPR*) a neznačených cytokininů (*tZ*, *ZR*, *iP* a *iPR*) o transportní dráhy. Kompetice byla prokázána mezi jednotlivými druhy cytokininových bází i v případě jednotlivých ribosidů cytokininů. Zajímavým zjištěním je, že některé ribosidy cytokininů a báze cytokininů si vzájemně konkurují. Dále se ukázalo, že adenin a adenosin interferují s příjmem bází cytokininů a nikoli ribosidů cytokininů. Tato zjištění podporují hypotézu o existenci dosud neznámých přenašečů s překrývající se specifitou pro cytokininové báze, tj. adenin a adenosin, případně přenašeče specifického pro ribosidy cytokininů.

K ověření, zda transmembránový přenos cytokininů je energeticky závislý bylo použito protonoforu CCCP. Tak se ukázalo, že příjem bází a ribosidů cytokininů je ovlivněn sekundárním aktivním transportem, závislým na gradientu protonů na buněčné membráně.

Analýza [³H] cytokininů HPLC ukázala, že cytokininy po vstupu do buněk BY-2 jsou intenzivně metabolizovány na biologicky neaktivní formy, resp. degradovány. S výjimkou *iP*, který byl přednostně degradován na adenin, podléhaly všechny ostatní testované cytokininy metabolické přeměně na odpovídající nukleotidmonofosfát. Na této první homeostatické reakci na zvýšený obsah cytokininů se podílely cytokininoxidáza/dehydrogenáza, adenosinkináza a fosforibosyltransferáza.

Analýza celkové enzymatické aktivity cytokininoxidázy/dehydrogenázy izolované z buněk BY-2 potvrdila vysokou afinitu *iP* a závislost míry aktivity na koncentraci externě dodaného biologicky aktivního cytokininu.

Získané výsledky jsou pak souhrnně diskutovány s ohledem na schopnost buněčné suspenze BY-2 akumulovat cytokininy, kinetiku příjmu, metabolismus, transport cytokininů a jejich fyziologické poslání v rámci celistvé rostliny. To nabízí následující otázku: existuje reálná představa, že cytokininy transportované z kořenů do stonku hrají významnou roli při iniciaci růstu axilárních pupenů, např. při porušení apikální dominance. Kromě toho dochází pravděpodobně i k biosyntéze cytokininů ve stonku, ne však v samotných axilárech, do nichž by měly být cytokininy následně translokovány. Jakým způsobem lze uplatnit výsledky experimentů na buněčné suspenzi BY-2 na sled událostí, které provázejí aktivaci růstu axilárních pupenů?

Předložená disertační práce obsahuje soubor výsledků publikovaných v prestižních vědeckých časopisech (např. *Journal of Experimental Botany*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*), na vědeckých setkáních a konferencích, což dokazuje její vysokou kvalitu. I nepublikované části disertační práce byly pečlivě zpracovány v anglickém jazyce. Celkově práce vykazuje všechny známky kvalitního vedení, čerpá z bohatého vědeckého zázemí školícího pracoviště.

Závěr:

Předložená práce Mgr. Petra Klímy odpovídá všem nárokům kladeným na doktorské disertační práce. Práce obsahuje výsledky mající značný význam v oblasti transportu, metabolismu a regulačních účinků cytokininů. Sepsáním práce autor prokázal velkou míru teoretických znalostí i praktických dovedností. Z uvedených důvodů proto doporučuji práci k obhajobě (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.) a po jejím úspěšném obhájení udělení vědecké hodnosti PhD.

V Brně, dne 15. září 2011

Prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc.

Ústav biologie rostlin

Mendelova univerzita v Brně