

OPONENTSKÝ POSUDEK

Na dizertační práci Mgr. Jany KRTKOVÉ:

„Hledání mechanismů a funkce interakce mikrotubulárního cytoskeletu s dalšími složkami v rostlinné buňce“

Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D., Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

Struktura, dynamické uspořádání a biologické role cytoskeletu v rostlinných buňkách jsou neustále studovány, protože jakékoli poznatky v této oblasti jsou klíčové k pochopení mnoha zásadních souvislostí v buněčné a vývojové biologii rostlin. Předložena dizertační práce je příkladem cíleného studia cytoskeletu rostlinných buněk moderními metodickými postupy, se záměrem identifikovat především ty proteiny se schopností interagovat s mikrotubuly u rostlin, které mohou modulovat chování mikrotubulárního cytoskeletu při dělení buněk, jejich diferenciaci, či v odpovědích na abiotické stresové faktory.

Literární přehled je napsán velice přehledně s vysokou mírou informativnosti. Detailně je popsána celá komplexní problematika vztahů mikrotubulárního cytoskeletu s jinými proteiny a buněčnými strukturami prostřednictvím klasických a neklasických MAP. Přístupnou a srozumitelnou formou autorka přibližuje problematiku tzv. neklasických MAP, včetně metod jejich identifikace a klasifikace. V hojné míře jsou v přehledu kromě obsáhlých dat z rostlinné říše uváděna i důležitá a recentní komparativní data z nerostlinných modelů, což je pro oblast studia cytoskeletu typické a žádoucí. Pozornost je věnována i mikrotubulárnímu cytoskeletu v souvislosti se signalizací abiotických stresů, především toxicity hlinitých iontů v rostlinách. Je zde poskytnut všeobecný přehled současných názorů o vlivu Al iontů na signální a strukturální komponenty buněk, studium kterých by mohlo osvětlit především rané fáze inhibice růstu kořenů na buněčné a molekulární úrovni. Doktorandka projevila také schopnost extrahovat z literárních zdrojů informace o fylogenetických vztazích mezi různými skupinami organismů z pohledu výskytu a struktury vybraných studovaných proteinů. Celkově tato část práce dokumentuje schopnost doktorandky nejenom po formální, ale i po obsahové stránce střízlivě a racionálně množství dostupných informací tříditi, hodnotit a adekvátně čtenáři předat.

Cíle práce jsou rozděleny do tří samostatných témat, které měli vést k identifikaci nových MAP, zprostředkujících interakce mikrotubulárního cytoskeletu s dalšími buněčnými proteiny a strukturami. Součástí cílů byla snaha určit rané fáze toxicity hlinitých iontů. Metodami identifikace, purifikace a klonování specifické formy Hsp90_{MT}, jako i kosedimentačními analýzami rekombinantních proteinů s mikrotubuly bylo dokázáno, že vazba mezi Hsp90 a mikrotubuly je přímá, nikoli zprostředkovaná. Úspěch doktorandky a celého kolektivu při identifikaci, izolaci a klonování specifické izoformy vázané na mikrotubuly je pozoruhodný a dává výsledkům práce velice originální charakter. Ve výsledkové části a v diskuzi jsou všechny možné alternativy asociace Hsp90 a mikrotubulů s jinými potencionálními interakčními partnery adekvátně prezentovány, na základě známých faktů, i když u rostlin zdaleka ne tak četných jako tomu je u nerostlinných organismů. Sérií elegantních experimentů bylo dokázáno, že ATP vazební doména na Hsp90 se neúčastní vazby Hsp90 na mikrotubuly. Vzhledem k autory navržené možnosti, že specifická vazba Hsp90 na mikrotubuly je zprostředkována částí proteinu bohaté na K-E sekvence, ATP vazební oblast tím může zůstat přístupna vazbě jiných specifických proteinů. Tím by mohla být zajištěna interakce mikrotubulů s jinými funkčními proteiny, proteinovými komplexy a interagujícími buněčnými strukturami právě přes Hsp90, což ovšem vyžaduje experimentální ověření. Autorka se ve všeobecnosti snaží vyvozovat správné závěry jak při pozitivních, tak

při negativních výsledcích, jako je tomu například u nemožnosti purifikace rekombinantních forem proteinu CLASP pro testy *in vitro*.

V rámci toxických efektů hliníku byl stanoven jako hlavní cíl charakterizace raných fází negativního působení Al iontů na růst kořene. Tato část práce je podložena kvalitní analýzou, na základě které bylo možné prokázat, že k inhibici růstu dochází již v intervalu 2 minut. Prezentovaná data dokumentují, že ionty Al způsobili ztrátu fluidity plazmatické membrány, vyvolali inhibici endocytózy v pokožkových buňkách kořene a indukovali změny v organizaci mikrotubulů v laterálních buňkách kořenové čepičky a v pokožkových buňkách kořenů *Arabidopsis* v rozsahu minut. Plazmatická membrána byla jasně definována jako objekt inhibice, protože ztráta fluidity membrány a inhibice vezikulárního transportu, ne však stabilizace kortikálních mikrotubulů, se podíleli na rychlé inhibici růstu kořenů. Diferenciální efekt nízkého pH a Al iontů na některé fyziologické funkce rostlinných buněk byly již známy z předešlých publikací. Efekty nízkého pH a Al iontů na kortikální mikrotubuly zdokumentovány v této práci patří do této kategorie a jsou proto potvrzením těchto předešlých pozorování. V souhrnu a ve výsledkové části jsou rozebrány data o indukci rigidifikace membrán a o efektu působení Al iontů na endocytózu. Oba procesy byly identifikovány jako zodpovědné za inhibici růstu kořenů. Časová škála je tu ale definována v rozsahu do 10 – 30 minut, což ovšem úplně nekoresponduje s limitem na projev intenzivní inhibice růstu kořene, stanoveným na 2 minuty. Přesnější informace jsou uvedeny až v diskuzi na str. 132, kde se můžeme dočíst, že rigidifikace membrán proběhla „okamžitě po přidání Al“. K tomuto efektu docházelo také *in vitro*, protože přidání benzyl alkoholu vedlo k okamžité obnově růstu ovlivněných kořenů. Při mikroskopickém sledování depolarizace membrán, vyvolané Al ionty byl výsledek registrován po 5 minutách. Myslím, že tímhle způsobem by měli být prezentována autorkou získaná originální data i v jiných důležitých částech práce, jako v abstraktu, v části 5.3.6 (Závěr kapitoly o toxickém působení hliníkových iontů), nebo v závěrech. Nutno ale říci, že i přesto všechna východiska z těchto experimentů vlivu Al iontů na plazmatickou membránu jsou v práci adekvátně a dobře vysvětlena a interpretována.

Po formální stránce, rád bych ocenil práci doktorandky při sepisování, protože dizertační práce je napsána stylem, který je velice dobře čitelný. Napsat tak odborný text plynule a přirozeně v českém jazyce bez přemíry anglikanismů není lehké, je to spíše vzácností. Myslím, že autorce se to v této práci vsutku podařilo. V textu je jen několik málo anachronizmů, způsobených pravděpodobně překladem z angličtiny (například na str. 33: „PA aktivuje ... aktivity iontových kanálů“ ...), je jich ale poměrně málo a jenom minimálně narušují celkový dojem, nebo jasné pochopení textu. Poměrně často se vyskytují tiskací vady, především při užití speciálních znaků, komentovat je ovšem nutné jenom několik málo nepřesností, které budou asi souviset se stresem a krátkostí času při sepisování a dokončování práce. Tyto malé nepozornosti v některých případech nutí čitatele význam daných vět hledat. Namátkou:

- str. 11, konec prvního odstavce: „poznání specifických funkcí některých proteinů ...by mohlo vést přímo ke specifickému fyziologickému projevu v rostlinných buňkách“ – jakékoli poznání ke specifickému projevu v buňkách nepovede
- str. 17, první věta: „Mikrotubuly jsou ovlivňovány proteiny asociovanými s mikrotubuly, dynamika např. nedávno objevenými +TIP proteiny“
- str. 23, název subkapitoly 2.2.4.1: „Kandidátní MAP na zprostředkovávání interakcí s dalšími buněšnými strukturami: HSP90 a +TIP“
- str. 108, název subkapitoly 4.4.3: „Endocytóza v epidermálních buňkách kořene je inhibována během 10 po vystavení Al“
- ve Výsledcích (na více místech): „Imunofluorescenční vizualizace mikrotubulárního cytoskeletu laterálních buněk kořenové čepičky a pokožkových buněk kořenové čepičky“ (uvedeno již správně jako buňky kořenové čepičky a kořenové špičky v diskuzi a v závěrech)

V metodické části dizertační práce, v subkapitole 3.1.16 Mikroskopie (str. 47), jako i v metodické části Přílohy 3, publikace o Hsp90, jsou nesprávně uvedeny některé technické detaily. Pro pozorování barviva Bisbenzimidie Hoechst 33342 je uváděna emise v nesmyslné škále 470-470 nm. Pro pozorování GFP s excitací 488 nm je uváděn He/Ne laser a pro pozorování excitace při 543 nm je uváděn Ar/Kr laser. Konfokální systémy firmy Leica jsou standardně vybavovány plynovými lasery Ar/Kr, které jsou dostupné ve vlnových délkách 458, 476, 488, 496 a 514 nm, zatímco He-Ne lasery jsou k dispozici ve vlnových délkách 543, 594 a 633 nm. Pokud tedy tomu není jinak v této konkrétní sestavě konfokálního mikroskopu, pak data v práci uvedena nejsou v pořádku.

K předložené práci mám několik otázek, na které bych rád znal názor doktorandky.

- Ze živočišných modelů je zřejmé, že Hsp90 může interagovat kromě polymerizovaných mikrotubulů také s tubulinovými dimery. Tuto teorii ověřovala doktorandka i v předložené práci. Jak veliký pool volných tubulinových dimerů v buňce může být s Hsp90 asociován vzhledem k jejich krátké životnosti, a jak může tento fakt ovlivnit proces polymerizace mikrotubulů?
- Doktorandka na základě experimentálních výsledků konstatuje, že CLASP kolokalizoval s kortikálními mikrotubuly. Jak je v práci konstatováno, nadbyteční exprese CLASP v buňce a jeho lokalizace v tečkách podél celých mikrotubulů může explicitně ovlivnit dynamiku a stabilitu mikrotubulů. Jde ale přece jen o +TIP protein, tedy označující nejdynamičtější konec mikrotubulů. Je známo, že kortikální mikrotubuly v rostlinných buňkách vykazují relativně vysokou dávku dynamiky v reálném čase. BY2 buňky v práci vykazují všechny znaky strukturně a fyziologicky kontrolního stavu. Byl tedy vzor statického stavu CLASP-pozitivních kortikálních mikrotubulů skutečně konzistentní? Fakt, že dekorací +konce mikrotubulů se nepovedlo zaznamenat jejich dynamiku v tabákových buňkách, jako je tomu například při expresi EB1 fúzních proteinů, bude nutné uspokojivě objasnit.
- Jedním z typických umístění CLASP proteinů v buňkách je lokalizace v „ostrých rozích“ mezibuněčných kontaktů. To je koneckonců dokázáno i v předložené práci. Jaký je ale vzor lokalizace CLASP proteinů v jednotlivých izolovaných BY2 buňkách?
- Jaký je důvod tak vysokého fluorescenčního signálu plastidů v zeleném kanálu v buňkách s expresí GFP-β-tubulinu (Obr. 4-20) a GFP-CLASP (Obr. 4-24D)?
- Na str. 99 se píše, že CLASP nefunguje jako molekulární značka pro mikrotubuly fragmoplastu k připojení buněčné desky a k napojení plazmatických membrán nově vzniklých dceřiných buněk. Jako jeden z argumentů je uváděn Obrázek 4-27C, ten se ovšem v předložené práci nenachází. Přiložené video 3 „CLASP fragmoplast xyt“ sice lokalizaci GFP-CLASP v rostoucí buněčné desce při cytokineze neukazuje, nicméně Obr. 4-24E lokalizaci GFP signálu v rostoucí buněčné desce rozhodně dokumentuje. Jak doktorandka tento paradox vysvětluje?
- Aplikace FM4-64 na tabákové buňky vedla k značení plazmatické membrány a endozomů. Následná aplikace Al způsobila ztrátu značení plazmatické membrány při zachování značení endozomů. Testovala doktorandka, zda funguje recyklace za přítomnosti Al (zpětná relokace FM barviva z recyklačních endocytotických kompartmentů do plazmatické membrány)?

Po celkovém posouzení je možné konstatovat, že jde o kvalitní práci s dobře navrhnutými záměry, kde všechny vytyčené cíle byly splněny. Předložená práce tím představuje významný příspěvek ke studiu mikrotubulárního cytoskeletu u rostlin. Důkazem kvality jsou přiložené publikace v karentových časopisech. Doktorandka prokázala schopnost multi-disciplinárního přístupu k vědecké práci. Proto doporučuji, aby byla práce přijata k obhajobě, a po úspěšném obhájení navrhuji, aby byla Mgr. Janě Krtkové udělena vědecko-akademická hodnost „philosophiae doctor“.