

## **OPONENTSKÝ POSUDEK**

Disertační práce:

**„Regulace buněčného cyklu u rostlin: úloha aktivační defosforylace CDK při vstupu do mitózy“**

Autor: **Mgr. Petra Mašková**

Disertační práce Mgr. Petry Maškové je věnována studiu signální dráhy cytokininů, konkrétně derepresi CDK při přechodu G<sub>2</sub>/M buněčného cyklu. Vzhledem k tomu, že dosud nebyl nalezen rostlinný homolog fosfátazy *Cdc25*, ale odpovídající enzymová aktivita byla v rostlinách pozorována, byl s výhodou použit kvasinkový gen. Jako modelový materiál doktorandka použila rostliny a buněčné suspence tabáku transformované fosfatázou *Cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe*.

Obsáhlý a velmi pěkně zpracovaný úvod (téměř 200 citací) jasně prokazuje, že se doktorandka výborně orientuje v oblasti regulace buněčného cyklu. V diskusi, která netradičně předchází vlastní publikace, doktorandka shrnula výsledky 5 publikací a zasadila je do rámce současného stavu poznání v této oblasti. První publikace popisuje morfogenní efekt exprese *Spcdc25*, který odpovídá vlivu zvýšené hladiny cytokininů. Vzhledem k nutnosti prokázat přítomnost transgenů ve sledovaných liniích, se doktorandka zapojila i do vývoje metodiky RNA elektroforézy. Těžištěm druhé práce je optimalizace denaturace RNA pomocí formamidu. V rukopise třetí publikace je popsán synergický pozitivní vliv sacharózy a *cdc25* fosfátazy na kvetení neutrálního tabáku. Čtvrtá publikace velmi jasně prokazuje, že aktivační defosforylace CDK leží v signální dráze cytokininů. Zvýšená exprese *Spcdc25* umožnila překonat snížení hladiny endogenních cytokininů způsobené inhibicí jejich biosyntézy lovastatinem. V rukopise páté práce doktorandka popsala vliv exprese *Spcdc25* na zvýšení hladiny škrobu a sacharózy, podobné jako po aplikaci exogenního cytokininu. Tyto výsledky naznačují, že interakce mezi hladinou cukrů a buněčným cyklem může být obousměrná. Tedy že kromě známého pozitivního efektu cukrů na přechod G<sub>1</sub>/S, může zvýšení aktivity CDK při přechodu G<sub>2</sub>/M indukovat změny metabolismu cukrů, s cílem zajistit dostatek energie pro nadcházející buněčné dělení.

Předkládaná disertační práce obsahuje zajímavé výsledky, ale poněkud větší pozornost mohla být věnována formální, jazykové úpravě, zejména odlišnému slovosledu mezi angličtinou a češtinou. Např. na str. 4, ř. 11 zdola: „G<sub>2</sub>/M kontrolním bodem“ nebo na str. 7, ř. 2 zdola „...jsou podobné lidské s galaktosyltransferázou asociované proteinkináze p58 interagující s cyklinem D3.“ Místo termínu „validizovat“ (str. 39, 5. 15) by bylo vhodnější použít „validovat“. Počet překlepů je minimální (např. na str. 10, ř. 7 má být „kontrolle buněčného cyklu“, nikoliv „cyklinu“, v publikaci 5 se střídavě používá „eucaryots“ a „eukaryots“, druhá verze je správná).

Práce obsahuje několik nepřesností:

str. 19, ř. 6 zdola – brasinosteroidy i kyselina jasmonová jsou již považovány za rostlinné hormony.

Str. 21, ř. 6 zdola – „glykosylované konjugáty...jsou...transportní formy“ – neplatí v případě N-glukosidů (kterých je zpravidla více než O-glukosidů).

Str. 30, ř. 14 – bylo již prokázáno, že CKI není cytokininový receptor

Str. 20, ř. 19 – „Pokud dojde ke změně hladiny jednoho hormonu (cytokininu nebo auxinu) dochází ke kompenzačnímu posunu v hladině druhého hormonu.“ - Tato formulace

je zavádějící. Např. v nadzemní části (ve stonku) auxin inhibuje expresi genů pro biosyntézu cytokininů (*IPT*), zatímco v kořenech expresi *IPT* stimuluje. Nepochybně existuje významný „cross-talk“ mezi cytokininy a auxinem, ovšem interakce těchto hormonů při regulaci různých procesů jsou odlišné (synergické x antagonistické).

K předložené práci mám několik dotazů:

- 1) Na str. 22, ř. 2 uvádíte, že „B-tyr ARR není citlivý na cytokininy“. Ovšem vzhledem k tomu, že se jedná o „response regulátor“ v signální dráze cytokininů, tyto regulátory nutně musí reagovat na přítomnost cytokininů. Měla jste na mysli, že se nezvyšuje jejich exprese?
- 2) Vaše výsledky (publikace 3) ukazují, že zvýšení hladiny sacharózy v mediu pozitivně ovlivňuje kvetení. Máte představu, jak se mění hladina cukrů v apexu a v listech během ontogenetického vývoje? Dochází u foto-neutrálních rostlin k indukci kvetení po dosažení určité „prahové“ hodnoty?
- 3) U transformantů s *Cdc25* došlo po 5 hodinách aplikace lovastatinu k nárůstu bioaktivních cytokininů (publikace 4). Čím si to vysvětlujete?
- 4) V abstraktu publikace 5 uvádíte, že buněčné linie transformované *Cdc25* měly vyšší akumulaci sušiny (ve srovnání s netransformovanou linií). Nejednalo se ale spíše o rychlejší nárůst? Na str. 6 ř. 11 -12 píšete, že původní linie (WT) dosahovala přibližně stejné biomasy jako transgenní, ale v delším časovém intervalu.

Závěr: Přes uvedené připomínky pokládám předloženou práci za velmi dobrou, splňující všechny požadavky na ni kladené a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.

1. 6. 2007

RNDr. Radomíra Vaňková, CSc.