

Shrnutí disertační práce

Buněčné dělení je jednou z elementárních vlastností všech živých organismů. Základní mechanismy regulující proces buněčné proliferace na molekulární úrovni jsou evolučně konzervovány napříč eukaryotickou říší. Buněčný cyklus se standardně dělí na čtyři následné fáze, přičemž hlavní regulační kroky se soustřeďují do dvou kontrolních bodů, na přechodu G_1/S a G_2/M fáze.

Klíčové regulační proteiny, cyklin-dependentní kinázy (CDK), řídí postup celým buněčným cyklem. Jejich funkce je striktně závislá na katalytické cyklinové podjednotce. Odpovídající cyklinový partner interagující s CDK totiž určuje dobu aktivity konkrétního CDK/cyklinového komplexu v jednotlivých fázích cyklu. Pro získání úplné aktivity vyžaduje komplex další posttranslační modifikace, mezi které patří i aktivační fosforylace a defosforylace CDK na specifických aminokyselinových reziduiích.

Rostlinný buněčný cyklus disponuje vedle evolučně konzervovaných mechanismů i dalšími regulačními procesy, které souvisejí s odlišnou životní strategií rostlin. Průchod G_1/S kontrolním bodem je silně závislý na signálech z vnějšího a vnitřního prostředí, především fytohormonech a metabolitech, buňka tak monitoruje příznivost podmínek pro dokončení celého buněčného cyklu. Limitujícím faktorem pro průchod G_1/S fází je D cyklin, jehož exprese je pod kontrolou cytokininů a sacharidů (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Regulace G_2/M přechodu rostlinného buněčného cyklu však zůstává nadále poněkud nejasná. Buňka v tomto kontrolním bodě primárně monitoruje, zda byla zcela dokončena replikace DNA. U ostatních eukaryot následně dochází k aktivaci CDK fosfatázy Cdc25, jež slouží jako definitivní signál stimulující zahájení mitózy (např. Moreno *et al.*, 1990; O'Farrell, 2001). Přes velkou snahu identifikovat rostlinný homolog Cdc25 fosfatázy, bylo pátrání po proteinu zodpovědném za aktivační defosforylacii rostlinné CDK v G_2/M fázi zatím neúspěšné. Přesto však bylo opakovaně prokázáno, že tato regulace u rostlin probíhá a je pod pozitivní kontrolou cytokininů (Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2005). V nedávné době se při prohledávání genomových sekvencí *Arabidopsis* a rýže podařilo objevit malý gen kódující katalytickou podjednotku Cdc25 fosfatázy, jež však není schopna komplementovat kvasinkové CDC25 mutantní kmeny (Landrieu *et al.*, 2004). Nadexprese tohoto genu v rostlinách navíc nevyvolává fenotypické změny (Sorrell *et al.*, 2005). Na základě těchto výsledků prezentovali Boudolf a kol. (2006) novou originální představu o mechanismu regulace

G₂/M fáze rostlinného buněčného cyklu, kde nastínili možnost, že rostliny postrádají Cdc25 fosfatázu a že její role by mohla být evolučně nahrazena regulační drahou řízenou CDKB kinázou. Tato představa však opomíjí důležitý fakt, že pro průchod G₂/M fází je nutná defosforylace CDK a že inhibice tohoto kroku (např. aplikací lovastatinu - inhibitoru syntézy izoprenoidních cytokininů) vede k zastavení buněk v G₂ fázi (Laureys *et al.*, 1998). Je také nutno připomenout, že G₂/M specifická CDKB velmi pravděpodobně podstupuje (de)fosforylaci na evolučně konzervovaných aminokyselinových reziduích podobně jako CDKA (Sorrell *et al.*, 2002; Orchard *et al.*, 2005). Všechny tyto skutečnosti spolu s faktem, že u vyšších rostlin byla opakovaně prokázána existence inaktivační Wee1 kinázy fosforylující stejná aminokyselinová místa na molekule CDK (Sun *et al.*, 1999; Sorrell *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2004), podporují rozhodující úlohu aktivační defosforylace CDK u rostlin při vstupu do mitózy. Jelikož se dosud nepodařilo identifikovat rostlinný homolog tohoto proteinu, je studium rostlin s introdukovaným cizorodým *cdc25* genem stále opodstatněné a aktuální a skýtá možnost studovat vliv tohoto regulačního kroku na růst a vývoj rostlin. Výsledky získané pomocí rostlin s vneseným *cdc25* genem z poltivé kvasinky (modelový organismus pro studium regulace buněčného cyklu) (*Spcdc25*) potvrdily, že kvasinková fosfatáza je funkční v rostlinných buňkách a plní stejnou regulační roli jako v donorovém organismu (Bell *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2005).

Vycházíme-li z poznatků, že nadexprese *Spcdc25* fosfatázy u rostlin ovlivňuje délku G₂ fáze a urychluje vstup do mitózy, lze předpokládat, že budou ovlivněny jakékoli procesy závislé na regulaci buněčného dělení. Bell *et al.* (1993) transformovali tabák *Spcdc25* cDNA z poltivé kvasinky a v orientačních experimentech zaznamenali významné změny rostlinného habitu a vývojové posuny vyvolané nadexpresí *Spcdc25*. Tato zjištění vedla naši pracovní skupinu k myšlence testovat ovlivnění dalších vývojových procesů spojených se změnou intenzity buněčného dělení, doplnit tak mozaiku vývojových, morfologických a biochemických změn vyvolaných expresí mitotického aktivátoru a na základě těchto dat vytvořit návrh možných interakcí s rostlinnými regulačními drahami.

Experimenty uvedené v předložené práci byly zaměřené na zhodnocení vlivu exprese *Spcdc25* na vybrané růstové a vývojové procesy v podmínkách *in vitro*, a to na odlišných úrovních organizovanosti kultury, tj. zakládání orgánů *de novo* (publikace 1), regulaci nástupu kvetení (publikace 3) a charakteristiky buněčných kultur (publikace 4, 5). Do uvedené práce byl zařazen i článek týkající se nového metodického přístupu využitého při detekci *Spcdc25* transkriptu (publikace 2).

Hlavní závěry vyplývající z disertační práce

- ❖ Změny v *de novo* organogenezi vyvolané expresí *Spcdc25* simulují vliv cytokininů; exprese *Spcdc25* podporuje zakládání prýtlů a potlačuje rhizogenezi.
 - ❖ *Spcdc25* a sacharóza působí synergicky na květní indukci, a potvrzují tak rozhodující úlohu buněčného dělení a sacharidů v přepnutí vývojového programu.
 - ❖ Urychlení nástupu mitózy významně ovlivňuje orientaci buněčného dělení a buňky s expresí *Spcdc25* se stávají při průchodu G₂/M fází nezávislé na cytokininu.
 - ❖ Exprese *Spcdc25* vedle změn v rychlosti a orientaci buněčného dělení vyvolatelných cytokininem mění i sacharidový status buňky, což nasvědčuje komplexním interakcím buněčného cyklu s rostlinným metabolismem.
- **V souhrnu výsledky přinášejí další důkaz pro existenci a významnost aktivační defosforylace CDK v G₂/M fázi rostlinného buněčného cyklu a podporují i model regulace tohoto kroku cytokininem. Zároveň naznačují i možnost, že rozhodnutí o vstupu do mitózy generuje signál vysílaný směrem do metabolismu buňky.**