



INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Radka Bezvody
„Funkce fosfolipázy D a lipid fosfát fosfatázy v regulaci buněčné morfogeneze rostlin“

Hlavním tématem předložené disertační práce Mgr. Radka Bezvody je analýza funkce nejjednoduššího membránového fosfolipidu (kyseliny fosfatidové) v pylové láčce tabáku, zejména ve vztahu k morfogenezi rostlin. Přestože je tato problematika řešena již poměrně dlouhou dobu, téma je stále aktuální a jeho řešení přináší cenné poznatky v oblasti studia vnitrobuněčné signalizace. Disertace vznikala pod vedením Dr. Viktora Žárského za spolupráce s Dr. Cvrčkovou a Dr. Potockým na Katedře fyziologie rostlin PŘF UK. Disertace má formu souboru prací, který zahrnuje celkem sedm prací, z nichž na jedné práci je Mgr. Radek Bezvoda prvním autorem.

Disertace je psaná v angličtině a je uvedena českým souhrnem. Po desetistránkovém úvodu následuje definice čtyř hlavních cílů disertační práce a přehledný výčet konkrétního podílu disertanta na sedmi zahrnutých publikacích. Nechybí ani kapitola, která se týká popisu použitého materiálu a nejdůležitější metod. Kromě výsledků zveřejněných v zahrnutých publikacích disertační práce obsahuje i kapitolu dosud nepublikovaných výsledků. Práce je ukončena pětistránkovou diskusí výsledků a závěrem.

Mgr. Radek Bezvoda se v průběhu svého PhD studia naučil a nadále využíval různé techniky, od bioinformatiky, přes klonování a jiné metody molekulární biologie až po mikroskopii a fyziologické studie na buněčné úrovni. Za nejvýznamnější metodický přínos této disertace pokládám podíl Radka Bezvody na zavedení techniky potlačení funkce určitého rostlinného genu pomocí transfekce specifickými oligoribonukleotidy. Podrobný popis této metody byl zveřejněn v první zahrnuté publikaci, jíž je Radek Bezvoda prvním autorem. Tato metoda byla také využita v další zahrnuté publikaci věnované analýze efektu potlačení genové exprese izoformou PLD tabáku. Je zřejmé, že právě možnost rutinního využití této techniky v laboratoři školitele výrazně pomohla i při řešení dalších projektů.

Dalším cílem disertace byla analýza funkce NADPH oxidáz ve vztahu k PLD/PA signalizaci. V zahrnuté publikaci bylo prokázáno, že PLD/PA signalizace kontroluje aktivitu NADPH oxidázy. Autoři ukázali, že vztah PLD a NADPH oxidázy funguje nejen ve stresové signalizaci, tak i v morfogenezi.

Třetím cílem disertace byla analýza možná úlohy degradačních enzymů kyseliny fosfatidové (PA), tzv. lipid fosfát fosfatáz (LPP), v rostlinné morfogenezi. Při práci byly použity inhibitory PA degradace známé z oblasti živočichů a kvasinek. Tyto inhibitory stimulovaly růstovou rychlost pylových láček, což je v souladu se známou pozitivní rolí PA na sekreční dráhu pylových láček. Považuji za velmi důležité, že zahrnutá publikace o PA fosfatázách, jíž je Mgr. Bezvoda důležitým spoluautorem, patří mezi první publikace s touto tematikou týkající se rostlin.

Posledním úkolem řešeným v disertaci bylo srovnání virtuálního proteomu Arabidopsis s experimentálním proteomem sóji. Mgr. Radek Bezvoda se do tohoto projektu zapojil konstrukcí virtuálního proteomu. Srovnání obou proteomů odhalilo existenci podobných genových sekvencí, které by byly vhodné pro další experimentální práci v oblasti kontroly vrcholového růstu.

Kromě zahrnutých publikací disertační práce obsahuje také řadu dosud nezveřejněných výsledků, které mají vztah k řešeným tématům. Radek Bezvoda např. zjistil, že PLD β 1

zapojena v klíčení a mutant *Arabidopsis AtPLDβ1* je méně citlivý ke kyselině abscisové (ABA). Dále přepracoval programy pro automatický sběr genových sekvencí a jejich porovnání. Byly také analyzovány expresní profily genů lipid fosfát fosfatázy (LPP) *At*. Výsledky porovnání exprese vedly k výběru takového genu tabáku pro další experimenty, který je paralogem *AtLPP4*. Testování exprese *NtLPP4* naznačilo jeho konzervovanou úlohu LPP u různých druhů rostlinné buňky. *NtLPP4* byl označen fluorescenčním proteinem a lokalizován v láčkách tabáku. V rámci disertace byl také testován vliv propranololu na semena *Arabidopsis*. Výsledky ukázaly, že tento beta blokátor, inhibitor lipid fosfát fosfatázy (LPP), způsobuje narušení gravitropického směru růstu kořenů.

Vzhledem k tomu, že většina výsledků disertace již úspěšně prošla recenzním řízením před zveřejněním, lze konstatovat, že podobně jako použitý experimentální přístup jsou na vynikající úrovni. Zadané dílčí cíle disertace byly splněny. Konkrétní podíl Mgr. Radka Bezvody na získání prezentovaných výsledků byl podstatný.

Drobné chyby:

lipid phosphate inhibitor správně lipid phosphate phosphatase inhibitor
překlepy str.42/ř.2 – in místo is

Otázky:

- 1) Ukázali jste, že NADPH oxidáza je „downstream“ cílem PA. Vysvětlete prosím větu z diskuse: „PLD/PA signaling is both upstream and downstream of NADPH oxidase-mediated ROS production“.
- 2) Jaký je osud dosud nepublikovaných výsledků, které se objevily v disertaci? Je připravován další rukopis, jehož budou součástí?
- 3) V práci o NADPH oxidáze jste zjistili, že ROS jsou akumulovány ve vrcholu rostoucí pylové láčky. Dále jste ukázali, že přidavek CaCl_2 zřejmě zvyšuje aktivitu NOX *in vivo*, což by naznačovalo, že influx Ca^{2+} ve vrcholu ovlivňuje aktivitu NOX. Co je známo o ovlivnění akumulace ROS či aktivitě NADPH po působení inhibitorů Ca^{2+} influxu, např. verapamilu? Co si myslíte o možnosti potlačení vlivu blokátorů Ca^{2+} influxu přidavkem peroxidu?
- 4) Jaká je účinnost metody transfekce s antisense oligonukleotidy? Lze hovořit o synchronně ovlivněné populaci láček, kterou by bylo možno analyzovat i biochemicky? Kolik genu může být takto vyblokováno najednou? Jaké jste měli kontroly, že se daný protein netvoří?

Závěr: Disertační práce Mgr. Radka Bezvody má výbornou úroveň. Většina výsledků je velmi kvalitní a lze je přiřadit ke špičkovým poznatkům současné biologie rostlinné buňky. O jejich kvalitě svědčí zejména vysoká citovanost práce o rostlinné NADPH oxidáze již v průběhu spoluautorova PhD studia. Autor prokázal schopnost práce s odbornou literaturou, spolupráce ve vědeckém týmu i schopnost sepsat vědeckou publikaci. Předložená práce má dle mého názoru všechny potřebné formální náležitosti a zcela vyhovuje kritériím, která jsou kladena na doktorskou disertační práci. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu doporučuji udělit autorovi titul PhD.

V Praze dne 28.7.2014

Ing. Jiří Hašek, CSc.