



Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lucie Hluskové
Studijní program P1527, obor Botanika

Oponent: Mgr. David Kopečný, PhD, CRH – Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc

Název práce: Study of the ligand specificity of cytokinin receptors

Disertační práce byla vypracována pod vedením Mgr. Lukáše Spíchala a svým obsahem je zaměřena na studium histidinkinaseových receptorů rostlinných hormonů cytokininů. Disertační práce je po stránce obsahové zpracována na standardní úrovni. Práce je členěna obvyklým způsobem. Obsahuje cíle práce, seznam použitých zkratk a úvod, metodickou část, výsledky s diskusí, závěr a přehled použité literatury. Nechybí bibliografická informace v českém a anglickém jazyce ovšem bez abstraktu. Bez příložených příloh má spis celkem 74 stran, 14 obrázků a 3 tabulky. Citováno je 220 původních prací souvisejících s daným tématem.

V úvodní teoretické části se autorka zabývá metabolismem a percepcí cytokininů, mechanismem rekognice cytokininů histidinkinasy skrze CHASE doménu, signální kaskádou a transportem cytokininů. V druhé polovině teoretické části se autorka věnuje cytokininovým bioesajím a komentuje pozitiva a negativa různých metod. V této části pro celkově větší přehled chybí použití chemických vzorců diskutovaných agonistů na antagonistů v části na str. 38-40 nebo častější použití tabulek v části na str. 26, ze které by bylo zřejmé kolik z receptorů z daného organismu bylo studováno, délka sekvence a identita atd. Autorka se snaží v krátkých větách postihnout velké množství faktů, o čemž svědčí velký počet citací, ale často nejsou informace kompletní. Platí, že méně by bylo lépe.

Experimentální část je stručná a je zde podrobně sepsán použitý software, postup pro místně řízenou mutagenезi a několik cytokininových esejí, jež byly v práci použity. Výsledková část je kvalitně zpracovaná a jsou vystihnuty nejdůležitější výstupy práce. Výjimkou je mutagenезe, která nebyla kompletně dokončena. Autorka připravila několik mutantů CHASE domény AHK4 se záměrem napodobit složení místa v AHK3. Tyto mutanty následně analyzovala, co se ligandové specifity týče. Této části lze vytknout to, že nebyl proveden standardní alaninový sken. Vícenásobná mutagenезe za rezidua, která jsou objemnější, totiž většinou vedou ke ztrátě interakce/vazby ze sterických důvodů. Příčinou jsou většinou rozdílná rezidua z tzv. „sekundární

sféry interakcí“, tzn. ta, která nejsou přímo v kontaktu s ligandem, ale s interagujícím residuem. Druhým problémem je absence kvantifikace na proteinové úrovni pomocí nějakého „tagu“. Opět, vícenásobná mutagenese často vede k problému se skládáním proteinu. Můžete na základě velikosti odezvy signálu, ředění buněk a délky inkubace porovnat, zda-li se vícenásobné klony liší v množství aktivního receptoru? Jsou nedetekované interakce v tabulce 3 na str. 52 důsledkem mutace nebo nízkým množstvím aktivního receptoru. Jaká kombinace se skrývá za pojmem „quadruple mutant“? Dovedla byste zhodnotit, jaká mutace by mohla vést ke zlepšení afinity k cZ?

Přílohy tvoří jeden publikovaný článek věnující se charakterizaci cytokininových receptorů z řepky, ve kterém je autorka uvedena jako sdílený hlavní autor (příloha 1); dále jeden manuskript připravený k publikaci, ve které se jako hlavní autorka věnuje studiu aktivního místa AHK4 z *Arabidopsis* pomocí N^9 -deaza derivátů (příloha 2) a také jeden spoluautorský článek, ve kterém se autorka podílela na validaci screeningové metody pro hledání agonistů a antagonistů na AHK4 receptoru z *Arabidopsis* (příloha 3).

K této části mám několik kritických poznámek. V publikaci 2 mluvíte o IC_{50} , zatímco v publikaci 1 je to „apparent K_D “. Jaký je mezi nimi rozdíl, jak je stanovujete? Jakou funkci prokládáte měřenými body? Má koncentrace značeného cytokininu vliv na výslednou hodnotu IC_{50} ?

Dokování do struktury AHK4 po provedení MD považuji za hodně diskutabilní. Například hodnoty IC_{50} pro 6-AP a 9-deaza-6-AP vůbec nekorelují s měřeními cytokininy. Dle hodnot vazebných energií v tabulce 1 manuskriptu 2 by se měl 9-deaza-6-AP vázat nejhůře, ale dle hodnot IC_{50} je tomu naopak. Jelikož nejsou přiloženy doplňující obrázky, lze se k této části těžko vyjadřovat. Můžete diskutovat pozici dokovaných 6-AP a 9-deaza-6-AP, které chybí v obrázku 6, a porovnat je s dokovanými cytokininy?

Sumárně vzato splnila práce vytčené cíle a po věcné stránce obsahuje celou řadu původních velmi cenných poznatků. Z celkového pohledu je práce standardní a proto ji doporučuji k obhajobě. Výše uvedené připomínky mají objasnit nejasnosti, které se během posuzování oponentem objevily a mají přispět k diskusi při obhajobě. Problémem přílohy 2 (manuskriptu) je absence citovaných doplňujících tabulek a obrázků, jež je vhodné doplnit do elektronické verze, jelikož článek není dosud publikován.

Student prokázal tvůrčí schopnosti - ANO

Práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru - ANO

V Olomouci dne 22.5. 2019

Mgr. David Kopečný, PhD
CRH-Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, PŘF UP
Šlechtitelů 27, Olomouc CZ-78371, Tel: +420 585 634 840

