

## **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lucie Hluskové „Study of the Ligand Specificity of Cytokinin Receptors“**

Předložená disertační práce Mgr. Lucie Hluskové se zabývá velmi aktuálním tématem, a to studiem specifity interakcí mezi rostlinnými hormony cytokininy (ligandy) a jejich receptory. Autorka si ve své disertační práci stanovila dva cíle. Prvním cílem byla charakterizace ligandové specifity nově identifikovaných cytokininových receptorů z agronomicky významné plodiny řepky olejky. Tohoto cíle bylo úspěšně dosaženo a získané výsledky jsou součástí první spoluautorské práce publikované v *Journal of Experimental Botany* (Kuderová et al., 2015). Druhým cílem bylo testování specifity interakcí vybraných ligandů a cytokininových receptorů a jejich mutantních forem přístupy molekulární a chemické biologie. Část výsledků získaných v rámci plnění tohoto cíle je publikována ve *Frontiers in Plant Science* (Klimeš et al. 2017). Významná část výsledků je pak shrnuta v prvoautorské práci, která je předložena k oponentnímu řízení. Obě zmíněné publikace i manuskript jsou zařazeny jako přílohy v závěru disertační práce.

Hned v úvodu mého posudku však musím konstatovat, že mě překvapilo, že disertační práce neobsahuje abstrakt, jehož cílem je nalákat čtenáře, aby si se zájmem danou práci přečetli. Abstrakt by měl tvořit neodmyslitelnou část každé vědecké práce! Cíle disertační práce se nachází ještě před seznamem zkratk a literárním přehledem. Toto uspořádání je pro mne trochu neobvyklé a snad i trochu nelogické. Pokud je toto řazení kapitol dáno předpisy univerzity pro vypracování disertační práce, tak se za tuto výtku autorce omlouvám. Když už jsme zmínila seznam zkratk, tak bych ráda upozornila, že v seznamu postrádám v textu se často vyskytující zkratky Asp pro kyselinu asparagovou nebo GUS pro  $\beta$ -glucuronidasu. Zkratka AHP by měla být správně popsána jako *Arabidopsis histidine phosphotransfer protein* a ne jen phosphotransfer protein. Zkratka CRE1, která se v seznamu vyskytuje, není vysvětlena.

Následující 30-ti stránkový literární přehled podává ucelené informace o biosyntéze a degradaci cytokininů, cytokininové signální dráze s detailnějším popisem jednotlivých komponent a cytokininovém transportu. Velký prostor je dán metodám, které se používají ke studiu biologické aktivity cytokininů a cytokininových receptorů. Jednotlivá sdělení jsou doprovázena dostatečným množstvím literárních zdrojů, dokazujících, že se autorka dobře orientuje ve studované problematice. Tady bych jen poznamenala, že tvrzení „CKI2 interacts with AHP1, AHP2 a AHP5 (Mira-Rodado et al., 2012)“ (str. 20), není úplné. V pozdější práci (Bauer et al. 2013) bylo ukázáno, že CKI2 také interaguje i s AHP3 a AHP6 proteiny.

Literární odkazy Anantharaman and Aravind, 2001 a Heyl et al., 2007 uvedené za větou „The REC domain contains the aspartate capable of being phosphorylated“ (str. 25) jsou chybné. Oba citované literární zdroje se týkají CHASE domény. Sdělení „Loss of binding capacity was observed upon mutagenesis of the CHASE domain (F304A, T317A) and the HisKA domain (H482Q) in the CRE1b splicing variant (Heyl et al. 2007)“ (str. 35) není přesné, protože mutace katalytického histidinu nemá vliv na ztrátu vazebné kapacity receptoru, ale na jeho signální aktivitu. Chybně je pak označena tato informace i v obr. 6 (str. 36). Myslím si, že spojení „constitutively activated receptor“ (str. 35, 36), i když se v publikacích nachází, není úplně správné a přiklání bych se raději k termínu „constitutively active receptor“.

V metodické a výsledkové části autorka prezentuje metody a výsledky, na kterých se přímo podílela. Ty jsou pak diskutovány v kapitole Diskuse a shrnuty v Závěru. Oceňuji, že autorka k získání dat používá několik na sobě nezávislých biologických přístupů, které přináší velmi cenná aktuální data v oblasti interakce cytokinin-receptor, zejména pak ty, které poodhalují stále ještě neznámý mechanismus aktivace receptoru a přenos signálu přes membránu.

Po formální stránce je disertační práce pěkná, napsána dobrou angličtinou, text je čtivý a doprovázený přiměřeným počtem obrázků a tabulek.

### **Dotazy:**

1) Data s 9-deaza cytokininovými analogy ukazují na důležitost vodíkové vazby mezi vazebným místem receptoru a atomem dusíku v pozici 9 adeninového kruhu cytokininu pro cytokinin-receptor vazbu. V případě ribosidů je sice dusíkový atom na pozici 9 zachován, nicméně je na něm navázána ribosa. Krystalová struktura CHASE domény odhalila, že ribosidy cytokininů se nemůžou do receptoru vázat. Lomin a kol. (2015) ukázali, že zatímco vazebné studie s cytokininovými basemi v bakteriálním a rostlinném systému jsou srovnatelné, ribosidy cytokininů se v rostlinném systému vážou velmi slabě nebo vůbec. Jaký je postoj autorky k otázce vazebné afinity ribosidů a jejich testování v bakteriálním systému? Zvažovali jste zařazení rostlinného systému, který představil Lomin v r. 2015 do portfolia metod, které používáte?

2) Bodová mutace A322V v CHASE doméně AHK4 výrazně zvýšila afinitu AHK4 receptoru k testovaným ribosidům (Tab. 3, str. 52). Máte nějaké vysvětlení, proč byla tak silná vazba naměřena pro oba testované ribosidy po zavedení mutace?

Závěrem můžu konstatovat, že i přes uvedené připomínky Mgr. Lucie Hlusková prokázala dobré tvůrčí schopnosti v oblasti daného výzkumu. Její předkládaná práce splňuje požadavky kladené na disertační práci, a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.

V Brně dne 28. 5. 2019

Ing. Blanka Pekárová, Ph.D.

Funkční genomika a proteomika rostlin

Masarykova univerzita