

## Posudek disertační práce Ing. Petra Skůpy

### „Rodina auxinových přenašečů PIN: funkční a evoluční přehled“

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

2011

Doktorand Ing. Petr Skůpa vcelku logicky zvolil k sepsání své disertační práce moderní zkrácenou formu komentovaného souboru svých dosavadních publikací. V první řadě se tak vyhnul nutnosti kompilovat četná fakta z velmi rozsáhlé problematiky hormonálních regulací u rostlin, zprostředkovaných auxiny. To podstatné z ní shrnul v kvalitním a přehledně strukturovaném patnáctistránkovém „*Literature overview*“. Z příložených publikací pak vybral podstatnou ilustraci použitých metod a pokusných modelů. Ve následných třech subkapitolách soustředil klíčové výsledky – a celek uzavřel dvanáctistránkovou diskusí. Forma i metodická bohatost jsou špičkové, invenční, kladoucí nejen odpovědi, ale také další otázky po původu, příčinách i biologickém významu nejrůznějších aktérů autorovy favoritní přenašečové rodiny „PIN proteinů“.

Takto je vlastně koncipován i závěr samotné disertační práce. Z výsledků získaných zejména (vlastní) komplexní biochemickou, růstovou a cytologickou analýzou transgenních buněčných linií tabáku BY-2 autor postuluje několik významných závěrů, týkajících biologické funkce jednak klasických „dlouhých“ (PIN 4 a do určité míry i PIN 6) jednak novějších „krátkých“ (PIN 5) přenašečů. Jistě originálním výsledkem je mj. soubor poznatků o endomembránové lokalizaci PIN 5 – a jejich funkčních důsledcích/souvislostech. A onou otázkou do budoucna, včetně již prvních kroků jejího řešení, je nejen uvažování nad stávající komplexitou relevantních dějů – ale také nad jejími počátky evolučními. V kontextu mj. se zásadním fylogenetickým krokem vzniku cévnatých rostlin.

Vložené originály pěti publikací velmi impresivně podtrhují celkovou kvalitu díla. Není divu, časopisy *Science*, *Nature* či *Development* přece patří mezi uznávaná ba kulturní periodika, vysoký standard mají i zbývající dva.

Celková kvalita disertace je tedy mimo jakoukoli diskusí. Oponenta však úkol ji objektivně posoudit i tak staví před obvyklý nelehký problém. Jak zmíněné rukopisy, tak je podkládající experimentální práce jsou samozřejmě dílem kolektivním, zahrnujícím autory tuzemské i zahraniční. Včetně vedoucích osobností mezinárodně uznávaných týmů.

Jaký však byl samotný přínos Ing. Skůpy k této kolektivní práci ?

Prvním vodítkem pro oponenta bývá prvoautorství příložených publikací. Z uvedených pěti publikací je Ing. Skůpa „děleným prvoautorem“ práce jediné, té nejnovější, z roku 2009. Z kontextu v textech vlastní disertace i obsahu nejen této práce je však více než zřejmé, že k jejímu vzniku přispěl podílem zcela zásadním. A je očividné – a vyplývá to nejen z jeho komentářů k relevantním publikacím (ať již v anglické verzi originální disertace či v českém souhrnu) – že právě studium „evoluční historie polárního transportu auxinu“ bylo jednou z jeho pracovních priorit. A nutno říci, prioritou nesmírně zajímavou.

Také komentáře k dalším publikacím dokládají, že Ing. Skůpa zdaleka nebyl, není a doufejme ani nebude jen cenným kolečkem v onom týmovém stroji na výsledky. Z rozsáhlého výčtu jeho experimentálních aktivit si oponent vybral k bližšímu posouzení ty, jež jsou mu metodicky a profilově nejbližší. Tedy problematiku fenotypového hodnocení buněčných linií v odpovědi na navozené změny v auxinové „bilanci“ různých transgenních modelů, v růstově polaritních buněčných funkcích, ale také ve vztahu k regulaci buněčného dělení (nástupu, blokády, orientace) či buněčné smrti.

Nejprve několik *obecných* otázek : Mohl by doktorand sdělit svůj názor na důvod/důvody dosavadní unikátnosti polárního fenotypu některých tabákových buněčných linií – a naší neschopnosti odvodit obdobné modely od *Arabidopsis thaliana* ? Má s jejich přípravou také osobní zkušenost ?

Nakolik stabilní je fenotyp různých transgenních PIN/ BY-2 sublinií ? Přežívají dlouhodoběji nejen modely GFP značené, ale také PIN „nadprodukční“ či (možná) „deficitní“? Nebo bylo nutné pro opakovaní dílčích pokusů připravovat a selektovat takové sublinie *de novo* ?

*Konkrétněji:* Fenotypové změny transgenních BY-2 sublinií přesvědčivě demonstrovují nástup „auxinového hladovění“ v situacích nadprodukce vynašečů (PIN 7, PGP 19), jen v případě PIN7 však bylo možno tento proces (dloužení buněk zřejmě doprovázené blokadou dělení – a možná i předčasnou senescencí a smrtí ?) zvrátit aplikací NPA. Byl sledován také účinek zvýšení koncentrace auxinu (ať již samotné 2,4-D či NAA) v kultivačním mediu ? Byly brány do úvahy a alespoň „zkusmo testovány“ také účinky standardních auxinových spolu- či protihráčů, zejména cytokininů ?

Lze se domnívat, že změny v auxinovém transportu resp. vnitrobuněčné distribuci auxinu regulované PINy se, na rozdíl od zásahů kupř. do systému AUX1/LAX (viz mj. disertace Laňková ) neprojevují v narušení základní polaritu růstu resp. směru dělení BY-2 buněk ? Je snad pro tyto procesy daleko významnější mechanismus řízeného vnášení auxinu do buněk než jejich „vymytání“ ? A jak oba tyto transporty zapadají do mašinerie udržování vnitrobuněčné auxinové homeostáze?

V souvislosti s tím: byly studovány/pozorovány fenotypové důsledky změněné produkce PIN5 (resp.6 či 8) v transgenních buněčných liniích tabáku ? (možná tyto údaje jsou v disertaci uvedeny, oponent ale neuspěl v jejich vyhledání).

V kontextu s fylogenetickými příčinami i důsledky vzniku různých PIN tříd si lze přemítat nejen o evoluci PINů samotných. Pochopil oponent správně, že evolučně staršími by (snad) měly být PINy „dlouhé“ ? Byla tedy potřeba udržovat dynamickou vnitrobuněčnou auxinovou homeostázi až druhotnou, modernější ? Proč ? Nemohlo se jednat o širší shodu okolností celkové fylogeneze rostlinných buněk jako takových ? Zajímalo se autor také kupř. o fylogenezi formování struktur podílejících se na vnitrobuněčném transportu různých kompartmentů auxin distribujících ? Jmenovitě různých isoformů aktinů, jehož významné údobí zřejmě také spadá kamsi k počátkům fylogeneze cévnatých rostlin resp. sporofytů? Připadají mu takové souvislosti spíše jen jako nahodilé, nebo i kauzální?

Na závěr svého posudku považuje oponent za vhodné vyjádřit se ještě k celkovému stylu resp. formě práce. Nemůže než přiznat, že se mu při její četbě velmi zastesklo po dávných klasických tuzemských disertačních monografiích či knížečkách, jež vydávají ještě dnes různé zahraniční univerzity. Nebylo by i pro současné autory moderních „svodek“ snazší či lákavější psát jednoduše text s využitím dřívějších publikací, než tvořit stávající mozaiky s mnoha odkazy?. Zvláště pak, je-li práce podávána v jazyce anglickém? A má-li, celým svým profilem spíše charakter monografie, jejíž autor zřetelně ví, co podstatného by chtěl/mohl tímto svým dílem sdělit?

Otázka je jistě určená spíše pro oborovou radu – ale oponent by rád znal i osobní názor doktorandův. I proto, že je z různých dílčích částí disertace (počínaje poděkováním) znát, jak si autor vyhrál i s její stylistickou stránkou. Oponent se pravda necítí být dostatečně kompetentní posoudit jazykovou úroveň anglické verze, ale byl potěšen její bohatostí. Ne již tolik jej nadchla stylistická kvalita českého souhrnu. Ta zřejmě odráží dokončovací časový stres a byla i příčinou několika půvabných „hrubek“ (*fyzykálně- str.3, znalosti ...chyběli – str.7*). Je však jen malou vadou na celkově velmi zdařilém díle.

### **Závěrem**

oponent konstatuje, že Ing. Petr Skůpa předložil k obhajobě velmi kvalitní disertační práci, faktologicky bohatou, v mnoha částech originální, odborně cennou a velmi čtivě sepsanou. Doufá, že tato práce plně odpovídá nárokům požadovaným Oborovou radou anatomie a fyziologie rostlin UKPřF.

**Z uvedených důvodů proto doporučuji práci k obhajobě (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb.) a po jejím úspěšném obhájení udělení vědecké hodnosti PhD.**

V Praze, dne 5.zář 2011

Prof.Dr. Zdeněk Opatrný CSc.

Přírodovědecká fakulta  
Univerzity Karlova v Praze

