

Posudek disertační práce

Mgr. Davida Reňáka

„Role of transcription factors in early male gametophyte development of *Arabidopsis*“

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích , Přírodovědecká fakulta

2011

Doktorand Mgr. David Reňák zvolil k sepsání své disertační práce moderní zkrácenou formu komentovaného souboru svých dosavadních publikací. Vznikl tak celek o základním rozsahu 65 stran, přiložením šesti publikací objemově ztloustlý na více než dvojnásobek. Postupně jej pročitat je radostí, tvořit na něj oponentní posudek je však práce daleko méně potěšující.

Oč snadněji se totiž lze i „laickému“ čtenáři orientovat v přiložených separátech, o to těžší je to v případě vlastního textu práce. Zpracovávaná problematika „biologie samčího gametofytu vyšších rostlin“ je faktologicky velmi bohatá, výpověď o ní na úrovni molekulární, biochemické, cytologické, morfologické, fyziologické, s občasnými exkursy do klasické genetiky samozřejmě dost komplikovaná. Autor tato data úctyhodně shrnul v **nepojmenované úvodní části díla (literární úvod? Odborný úvod?)** a přinejmenším tady je strukturoval do kapitol“ 1,2,3 se základní profilací na „cell biology“, „molecular biology + genetics“ a „transcriptomics“. Dále vždy členěných na několik dalších subkapitol.

Na jejich základě definoval následující „**aims of studies**“, tedy :

- 1) „To summarize male gametophyte development“ – s ohledem na strukturu a funkci pylového zrna a pylové láčky a s využitím mutantů ovlivňujících pylovou transkriptomiku
- 2) Pomocí (zejména) technologie microarrays selektovat klíčové TF geny
- 3) Provést detailní charakterizaci struktury a funkce genu *Atb ZIP 34*

Zvláštní kapitolu **materiálně-metodickou** disertace nemá. Nicméně jednak z přiložených publikací, jednak z částí textu kapitol výsledkové a diskusní může oponent odvodit, že modelovým materiálem bylo celkem 74 mutantních TF linií (jinde však údaj „...61 confirmed...“, *kolik tedy ?*). Použité metody jsou dobře dokumentovány v přiložených publikacích

S členěním kapitol výsledkové i diskusní si už doktorand žádné formální starosti nedělal.

Souhrnné „**Results**“ v rozsahu necelých čtyř textových stran (řádkování 1,5) jsou prostě čtenáři předloženy jako jednotný text bez dalšího (leđa odstavcového) členění. Autor také nedodrhuje konvenci psaní „výsledkového textu“ a zahrnuje do něj i odkazy na jiné informační zdroje.

Faktologicky, navzdory své stručnosti je však tato kapitole vysoce zajímavá a dokumentuje autorovu odbornou profesionalitu i píli. Zřejmé je to již na úrovni **cytologických analýz** materiálu. Původně zamýšlenou pětiparametrovou klasifikační stupnici autor rozšířil na dvojnásobek, hodnotil četnost pylové aborce, tvaru i velikosti pylových zrn, deformace buněčných stěn, ovlivnění buněčného cyklu, cytoplasmatické inkluse, různé typy „male germ unit“.

Poznámka : na str.21-22: v textu je popis pylových mutací (gem1, gem2, tio, tubg1, tubg2, kinesin-12a, kinesin12-b), ve Fig.3 chybí

Dotaz: Lze různé tvarové deformace přičíst spíše poruchám funkce cytoskeletu nebo třebaš celuloso-syntázového komplexu, změnám v exocytoze ... ? Nejspíš všemu, dává však autor přece jen některým interpretacím v dílčích případech prioritu ?

*A dotaz obecnější, možná mimo okruh zájmu autora – ale blízký problematice dříve studované oponentem: Rozvoj in vitro technik umožnil nutit nezralé mikrospory různých rostlinných druhů vyvíjet se nikoliv v zralá pylová zrna, ale v různě kompletní „pylová embrya“. Účinek indukčních technik (abiotický stres, výživa, fytohormony, cytoskeletální drogy a p.) byl a dosud je interpretován jako odraz buď různých poruch fyziologických, změn epigenetických nebo přímo mutací. Zná autor nějaké práce, jež by tyto úvahy relevantně podpořily ? Existují příklady úspěšnosti ať androgeneze či přímo pylové embryogeneze u *Arabidopsis thaliana* ?*

Tak či tak, díky této kvalitní vstupní kategorizaci získal autor možnost později detailně konfrontovat „molekulární data“ s relevantními fenotypovými projevy. A vytvořil si podklady k úvahám o biologických mechanismech pozorovaných změn.

Možná nebyl nadšen tím, že pouze necelá polovina (29) hodnocených TF linií vykazovala závažnější změny fenotypu (více než 25 % aberantních zrn) a že, jak zjistil, „...relative small variance among individual pollen mutant phenotypes“. Velmi logicky však tyto výsledky doplňuje část věnovaná problematice analýzy genu Alb ZIP 34. A přijatelně je vysvětluje patřičná část diskuse.

Transkriptomická analýza tohoto mutantu prokázala „up“ změnu u 1300 a „down“ odchylku u 800 sledovaných genů.

Naivní otázka: co může být „biologicky závažnější“ ?

Z nich pak nejvíce byly ovlivněny „transportní“ ABC geny – a zvláště tvorba proteinů podílejících se v transportu/transferu lipidů či v jejich katabolismu.

Mohl by autor toto pozorování blíže komentovat co do „funkčních důsledků a souvislostí“ ? Je výskyt tukových inkluzí v zrnech odrazem takové změny ?

Vysoce zajímavé jsou i výsledky různých **promotorových manipulací**. Čtenář byl autorem poučen, že favoritním promotorem „progamické fáze“ je dlouhodobě promotor Lat 52. Problémem však bylo specifikovat odpovídající promotory pro studium následné fáze „early pollen development“. O to cennější je kladný výsledek. Z původních sedmi kandidátních genů byly nakonec vybrány tři (MSP1,2,3) - a z nich dva (MSP1,2 s TIO kodující sekvencí) vykazovaly až 50 % aberantního pylu i v heterozygotním stavu. Značení exprese pomocí GFP/GUS konstruktů je samozřejmě výborným nástrojem dalších funkčních výzkumů.

Originálním a velmi hodnotným výsledkem je samozřejmě vytvoření rozsáhlé **transkriptomické databáze**.

Velkým přínosem práce je také vytvoření kompletního seznamu mutací ovlivňujících vývoj samčího gametofytu (tabulka graficky přehledná podle vývojových stádií)

Rozsah kapitol s názvem **Discussion** bývá v disertačních pracích obecně menší než kapitol výsledkových. Nejinak i v tomto případě : text nepřesahuje necelé tři strany, obdobně jako výsledková kapitola není nijak zřetelně strukturován. Vlastní výsledky jsou konfrontovány pouze se čtrnácti sděleními jiných autorů. Celkově tato kapitola spíše simuluje tu předchozí.

Příčinou zřejmě bude spíše již zmiňovaná unikátnost autorových výsledků i postupů, než nedostatečná znalost relevantních publikací. Seznam „**References**“ přece obsahuje úctyhodných 219 položek.

Jak již zmíněno, „core body“ disertační práce je doplněno velmi impresivním souborem čtyř článků publikovaných v kvalitních časopisech a dvou knižních kapitol. Jejich obsah i formu považuje oponent za výborné. Podíl doktoranda na jejich přípravě je v disertaci dostatečně specifikován – a stvrzen i podpisy spoluautorů. Jeho publikační aktivitu nutno po právu hodnotit jako mimořádnou.

Závěrem

oponent konstatuje, že Mgr. David Reňák předložil k obhajobě velmi kvalitní disertační práci, faktologicky bohatou, v mnoha částech originální a odborně cennou. Doufá, že tato práce plně odpovídá nárokům požadovaným Oborovou radou. *Fyziologie a vývojová biologie*

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 12 .září 2011

Prof.Dr. Zdeněk Opatrný CSc.

Přírodovědecká fakulta
Univerzity Karlova v Praze

Oponentský posudek disertační práce

Předkládaná disertační práce Mgr. Davida Reňáka „**Role of transcription factors in early male gametophyte development of Arabidopsis**“ je členěna na teoretický úvod popisující vývoj samčího gametofytu a jeho regulaci s přihlédnutím k úloze transkripčních faktorů a na praktickou část, která stručně uvádí výsledky a diskusi prezentované formou odborných publikací. D. Reňák je spoluautorem 2 kapitol v odborné knize, 3 publikovaných odborných článků a jednoho článku zasláno k publikaci, jehož je prvním autorem. Přehled publikací je úctyhodný a vzhledem ke kvalitě časopisů a jejich recenzního řízení, po kterých byly články publikovány, jej lze pouze ocenit. Ve svém posudku se proto budu věnovat zejména vyznění práce jako celku a jejím částem uvádějícím publikace.

Úvodní kapitola na sedmi stranách seznamuje s vývojem rostlinného samčího gametofytu z pohledu buněčného, a lze ji s některými výhradami (viz níže) přijmout jako vhodný základ pro další části. Kapitola třetí pak sleduje vývoj samčího gametofytu z pohledu analýzy transkriptomu pomocí microarray a spracování dat z těchto studií, kterých se autor také aktivně zúčastnil a připravil je pro použití na webovém rozhraní. Kapitola druhá se zabývá molekulární biologii a genetikou samčího gametofytu, podkapitola 2.1. (Transcriptional regulation) pak uvádí problematiku zřejmě pouze z obecného pohledu (?), protože se zde téměř nevyskytují citace ani uvedení specifík rostlinného světa a tudíž budí dojem učebnicového úvodu. Podkapitoly 2.2. (Regulatory sequences) a 2.3. (Specific transcription factors) již uvádějí právě rostlinná a pylově specifická data, projevuje se na nich bohužel pro mne poněkud špatně pochopitelný způsob uvádění citací, který jsem zaznamenala i v jiných částech předkládané práce (viz níže).

Cíle práce jsou formulovány srozumitelně, i když bych úvodní odstavec z formálních důvodů přesunula např. do výsledků.

Kapitola 6 shrnuje a uvádí výsledky publikovaných prací, propojuje poznatky z analýzy fenotypu T-DNA inzerčních mutantů s inzercí ve vytipovaných genech pro transkripční faktory, studie promotorové oblasti transkripčního faktoru AtbZIP34 a zpracování datových sad pocházejících z analýz transkriptomu do formy webového nástroje Arabidopsis Gene Family Profiler.

V kapitole 7 jsou výsledky přehledně diskutovány a obě kapitoly (6 a 7) hodnotím kladně.

Za kapitolou 8 uvádějící použitou literaturu je samostatně umístěna tabulka 2 a obrázek 7, který ji doprovází. Toto umístění považuji z formálního hlediska za nešťastné, protože v textu úvodních kapitol je odkazována právě tabulka 2 a to podstatně dříve, než tabulka 1 uvedená ve výsledcích, která není uvedena samostatně, ale je součástí textu. Také je tabulka 2 umístěna za seznamem literatury, ačkoli tento obsahuje citace v ní uvedené.

Poslední částí jsou čtyři publikace ve formě odborných článků.

Obecně kladně hodnotím snahu o přehlednou a úspornou formu teoretické i praktické části, také použití obrázků a schémat (např. v Table 2), i když bych očekávala v některých případech přímější úvod do problematiky a větší hloubku vzhledem k rostlinným modelům (viz níže) s uvedením např. hypotéz nebo srovnání s jinými modely.

Konstatuji, že cíle práce byly splněny a práci doporučuji k obhajobě.

K předkládané disertační práci bych uvedla několik výhrad a poznámek:

1. Celkový dojem snižuje již na prvních formálních stránkách předcházejících obsah použití různě velkého písma pocházející zřejmě z nedostatečné kontroly tištěné verze.
2. Citace, které jsou přehlednými pracemi a jako takové jsou v práci využity, nejsou správně v textu uváděny (reviewed in...)

3. Práce Scott et al. 2004 je v seznamu literatury uvedena dvakrát, citace Gupta et al. 2007 má nesprávně uvedený časopis (uveden Cell Biol Morph, správně je zřejmě Plant Cell Rep), citace Čapková et al. 1997 a 1994 jsou uvedeny v seznamu v opačném pořadí, správněji by bylo 1994 a 1997.

4. Jak jsem uvedla v předešlém vyjádření, považuji práci s literaturou v úvodních kapitolách za poněkud chaotickou a nesystematickou, některé části odkazy na původní práce, ale ani na přehledné články, téměř neobsahují, jinde zase chybí, ačkoli by je čtenář očekával, nebo bylo uvedení citace poněkud překvapivé a nebyl jasný vztah mezi uváděným faktem a citací. Naproti tomu údaje v pozdějších kapitolách majících přímý vztah k praktické části jsou citovány dostatečně. Jako příklady za mnohé mohou posloužit - chybějící citace pro quartet 3 na straně 9, pro sidecar pollen na straně 21, pro první větu na straně 20 odkazující na kvasinky, věta a odkazy „Disruption of cell polarization dramatically changes the developmental programme and may even lead to a haploid embryogenesis as often used in plant biotechnologies (Hause et al. 1993, Eady et al. 1995).“

5. Vzhledem k zaměření práce na regulaci transkripce a funkci promotoru bych očekávala zevrubnější popis a zejména rostlinně specifické citace v části zabývající se právě těmito aspekty související s organizací genů (kapitola 2.1.).

6. V návaznosti na použití T-DNA inzerčních mutantů v jednom ze stěžejních výsledků, na kterých se disertant podílel, bych očekávala alespoň drobnou zmínku o vlastnostech těchto linií a kritické hodnocení jejich možných úskalí, se kterými se ve své práci setkal.

Konkrétní dotazy:

1. ad 5) za zajímavou vlastnost související s regulací transkripce považuji umístění např. enhancerů do oblastí vzdálených desítky kilobází nebo do 3'UTR oblasti, jak uvádí Mgr. Reňák na straně 14 („Additionally, the transcription of many genes...“), prosím o uvedení pramenů pro rostlinné geny.

2. ad 6) V práci odeslané k recenznímu řízení Reňák et al. jsou využity T-DNA inzerční linie. Autor zmiňuje genotypování linií pomocí PCR a fenotypovou analýzu. Vzhledem k umístění T-DNA inzerce v různých částech genů a různému fenotypovému efektu se nabízí otázka, zda pro svou studii zjišťovali, že jde o knockout mutanty na úrovni transkripce, tj. zda byla provedena nějaká analýza transkripce.


3. Pro gen At1g77850 byly použity dva inzerční mutanti v promotoru s různým fenotypovým efektem, čím se lišili a zda i v jiných případech mohl být výsledný efekt ovlivněn pozicí inzerce.

4. Žádný fenotypový efekt nebyl zřejmě pozorován pro mutantu v genu At2g34820 s T-DNA inzerce v intronu 1, existuje nějaké vysvětlení?

5. Podle specifikací uvedených k jednotlivým publikacím soudím, že podíl Mgr. Reňáka byl zejména v částech zabývajících se mikroskopickými analýzami, tudíž otázka, zda byly kromě fenotypových efektů v průběhu vývoje samčího gametofytu v mutantech sledovány také možné změny v jiných částech rostliny (kořen, embryo apod.), tj. zda byly defekty omezeny pouze na pyl.

Závěrem konstatuji, že předkládaná disertační práce se zabývá velmi důležitou a dosud málo prozkoumanou problematikou a považuji předložené výsledky za velmi přínosné pro výzkum transkriptomu ve vztahu k specifickým fázím vývoje rostlin.

V Brně dne 13.9.2011


Mgr. Eva Sýkorová, CSc.
oponent

BFÚ AVČR, v.v.i.
Královopolská 135
61265 Brno