

Posudek na magisterskou práci

Vliv epigenetických faktorů při indukci diapauzy u hmyzu

Autor: **Bc. Petr Hůla**

Školitel: **Prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.**

Formální stránka diplomové práce:

Práce je standardně členěná. Přehledně zpracovaný úvod následují jasně definované cíle, precizně zpracovaná metodika, trochu příliš stručné výsledky a diskuze. Celkový dojem je pak vyzvednutý jasně sepsaným a realisticky pojatým závěrem a bohatým rejstříkem literatury čítajícím 82 citací.

Autor se v práci zabývá vlivem epigenetických faktorů na indukci fotoperiodicky podmíněné diapauzy u mouchy *Chymomyza costata*. Práce je velmi dobře promyšlená a dobře zapadá do zaměření celé skupiny dlouhodobě zkoumající problematiku mechanismu indukce diapauzy.

Součástí práce je velmi důležitá analýza recentně získaných expresních dat. Na základě těchto výsledků byl vybrán gen **dpy-30** jako jasný kandidát k dalšímu experimentálnímu ověření jeho funkce v indukci diapauzy. Tato část je velmi dobře zpracována a všechny kroky vedoucí k následujícím experimentům jsou dobře vysvětleny.

V další části práce se autor věnuje charakterizaci globálního dopadu role genu dpy-30, jakožto regulátoru metylace lysinu K4 na histonu H3. Z expresních dat vidíme až 25násobné snížení exprese v odpovědi na nástup diapauzy, což naznačuje, že bychom měli očekávat snížení výskytu těchto metylací. Autor využil několika metodických přístupů a kitů poskytovaných různými společnostmi, aby tuto skutečnost ověřil. Velmi překvapujícím je pak výsledek, který ukazuje opačný trend, než jaký byl očekávan.

Tato skutečnost dává vzniknout řadě otázek, které by měly být zodpovězeny v budoucím výzkumu nebo vyjasněny v diskusi při obhajobě práce....

1. První otázka směřuje k disekci tkání – zejména svalových buněk. Jak byla disekce těchto tkání provedena?
2. Další otázka, vyžadující spíše jen zamyšlení, se týká velmi malého množství signifikantně se lišících epigenetických regulátorů...., jak si autor vysvětluje, že některé skupiny genů se neliší vůbec?
3. Zásadní otázka se týká rozporu mezi expresí genu dpy-30 a mírou metylací H3K4 – jak si touto skutečností autor vysvětluje? Je možné vysvětlení v rozdílnosti exprese tohoto genu v transkriptomických datech získaných z celé larvy a tkáňově specifické analýzy metylací? Rozdíly transkriptomických dat by bylo vhodné ověřit i jinou metodou měření genové exprese a to globálně i tkáňově specificky... jakou metodou by bylo možné to uskutečnit?
4. Lze u *Ch. costata* využít RNAi a myslí si autor, že pouhá down-regulace dpy-30 by mohla způsobit expresní změny a případně fenotyp připomínající diapauzu (chladová odolnost)?
5. Lze využít nějakou metodu, kterou bychom mohli vystopovat, které geny jsou regulovány právě metylací H3K4 a porovnat expresi těchto kandidátů s již získanými transkriptomickými daty?

Závěr:

Celou práci jsem si s opravdovou chutí přečetl a považuji ji za skutečně průkopnickou (minimálně v rámci našeho mikroregionu). Metodická část a adaptace jednotlivých metod na hmyzí tkáň jsou velmi důležitým počinem. Bohužel většina výsledků je pouze orientačních/předběžných a neumožňuje v současné době vytvářet příliš konkrétní závěry. Na pokračování tohoto projektu se velmi těším a částečně členům tohoto experimentálního týmu závidím, že se mohou v příštích letech věnovat tak vzrušujícímu výzkumu.

Práci - ač na můj vkus příliš stručnou - hodnotím velmi kladně a doporučuji k obhajobě. Práci budu hodnotit jako výbornou, pokud bude podpořena adekvátní prezentací a zodpovězením výše zmíněných otázek.

V Českých Budějovicích, Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

Handwritten signature in blue ink, reading "Adam Bajgar".



Oponentský posudek na diplomovou práci:

Vliv epigenetických faktorů při indukci diapauzy hmyzu

Autor práce: Bc. Petr Hůla, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Předložená diplomová práce je zaměřena na hledání potenciálních změn v epigenetických regulacích, které by mohly být důležité pro plné pochopení tak složitého procesu jako je vstup do diapauzy. Jako modelový organismus byla vybrána moucha *Chymomyza costata*, u které lze diapauzu snadno navodit v larválním stadiu změnou fotoperiody na kratší den. Navíc na pracovišti autora byla vytvořena databáze změn transkriptomu této mouchy na základě nástupu diapauzy. Na základě analýzy této databáze autor zaznamenal významné změny v expresi podjednotky metyltransferázy histonů *dpy-30*. Autor si tak vybral jako vhodný primární epigenetický znak ke studiu metylaci na lyzinu 4 histonu 3, která by měla být produktem aktivity metyltransferázy obsahující tuto podjednotku. Pomocí dvou komerčních kitů a imunohistochemického stanovení je pak provedena analýza jak úrovně trimetylace tak celkové metylace H3K4. Pro analýzu si autor vybral buněčná jádra svalové a tukové tkáně. S ohledem na význam tukové tkáně v metabolismu u hmyzu, lze tento výběr považovat za velmi vhodný pro dané analýzy. Ve výsledcích pak autor prezentuje, že diapauza vede ke zvýšení metylace H3K4.

Práce má klasické členění na úvodní část, kde je čtenář seznámen s diapauzou a epigenetickými regulacemi obecně, následují cíle práce, metodika, výsledky, diskuze, závěr, použitá literatura a příloha. Postrádám seznam zkratk.

Úvodní část považuji za velmi povrchní, zjednodušenou, obsahově nepřekračující základní učební text. Zvláště představení fenoménu diapauzy je velmi skromné. Část o epigenetice je propracovanější, s přehlednou tabulkou histonových modifikací a jejich dopadu na regulaci transkripce. Každopádně se domnívám, že autor si mohl ušetřit seznamování potencionálního čtenáře (jakéhokoliv vysokoškolsky vzdělaného biologa) se základy molekulární biologie a měl se víc zaměřit na nastínění konkrétních mechanismů a molekulárně biochemického pozadí mezi diapauzou a epigenetickými regulacemi. Podobně, srovnávat neuron s kožními buňkami jak je uvedeno na str. 5-6, je zavádějící a hodno možná učebnice základní nebo střední školy. Jaké kožní buňky má autor na mysli? Následují jasně definované cíle. Metodická část má krátký úvod následovaný použitými protokoly. Postrádám poměrové složení diety, nebo citaci na zdroj, složení používaného PBS pufru a přesný experimentální design, což pak komplikuje nahlížení na vlastní výsledky, viz níže. Výsledková část pak ukazuje mapu transkriptů, u kterých byly zaznamenány významné změny v expresi v souvislosti s diapauzou. Následují 4 grafy ukazujících míru metylace H3K4 u jader izolovaných ze svalové a tukové tkáně, 1 graf pak vyhodnocení imunohistochemického stanovení metylace H3K4 u buněčných jader tukové tkáně. Není jasné z kolika experimentů či vzorků byla data získána. Není mi jasné, jestli larvy již diapauzují nebo do diapauzy vstupují (možné vysvětlení opačných výsledků, než bylo očekáváno?). Prakticky, přepočítávat jakoukoliv postranlační modifikaci na celkový protein je silně zavádějící, zde měla být intenzita metylace přepočítána na celkové množství H3. Mikroskopické posouzení

Tel.: +420 549 49 1411 • E-mail: pracoviště@sci.muni.cz

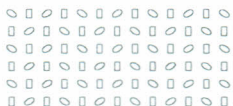


MASARYKOVA UNIVERZITA, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, Kotlářská 2, 611 37 Brno
Veřejná vysoká škola zřízená zákonem, nezapisuje se do obchodního rejstříku.

tel.: +420 549 49 1411 • fax: +420 541 211 214 • www.sci.muni.cz

Bankovní spojení: KB, pobočka Brno, č.ú.: 85636621/0100 • IČ: 00216224 • DIČ: CZ00216224

str. 1/2



čistoty jaderné frakce jak je prezentováno, považuji též s ohledem na dané analýzy a přepočty na celkový jaderný protein jako nedostatečné.

Diskuze, zde po krátkém úvodu následuje odstavec zmiňující některé regulace a ovlivnění, ovšem bez uvedení jakým směrem a tedy s jakým významem. Další diskuze k vlastním výsledkům je slabá, jeden odstavec je kopií podobného z úvodu (hESC x dpy-30). Dále shrnutí, že ke zvýšení H3K4 metylace v důsledku diapauzy došlo. Přesto, že ve výsledcích je uvedeno, že pomocí kitu Abcam tuková tkáň bez rozdílu, svalová ano. Kit Epigentek, tuková tkáň s rozdílem, svalová nehodnotitelná celkem tedy 50 : 50. Imunohistochemie ukazuje rozdíl v metylaci H3K4 v tukové tkáni. Autor se vůbec nezamýšlí nad tím, že Abcam (Ab i kit) stanovují trimetylaci, kdežto kit Epigentek celkovou metylaci. Autor také neuvažuje o možné úloze a vlivu ostatních metyltransferáz. Správně však vyvozuje, že pro vyvození správných závěrů ve vztahu k transkripční aktivitě je potřeba postranlační patern histonových modifikací sledovat ve větší šíři.

Po formální stránce je text čtivý. Za nevhodné ovšem považuji v českém textu používání termínů down-regulace, data mining, muscle + sval, fat body + tuková tkáň. Na str. 10, druhý řádek, není dokončená věta. Na str. 11 se uvádí, že exprese dpy-30 je snížena po vystavení larev dlouhému dni, na str. 13, pak krátkému, buď jde o překlep, nebo část možného vysvětlení, proč původní hypotéza nebyla potvrzena.

Závěrem, práci jak z hlediska rozsahu, tak i z hlediska obsahu považuji za podprůměrnou.

I přes výše uvedené připomínky práci **doporučuji** k obhajobě.

V Brně 2. 5. 2017

Jiří Pacherník

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

