

Posudek školitele na magisterskou práci

## Vliv epigenetických faktorů při indukci diapauzy hmyzu

Student: Bc. Petr Hůla

Školitel: Vladimír Košťál

Petr Hůla

V zadání této magisterské práce dostal Petr Hůla poměrně těžký úkol, a to, otevřít téma, které nebylo v laboratoři školitele metodicky připraveno, a které je stále velmi nové v rámci celého oboru výzkumu hmyzí diapauzy. V době zadání tématu byly k dispozici pouze tři publikované experimentální studie, které se nějak, více-méně povrchně, dotýkaly role epigenetiky v diapauze hmyzu. Během práce přibýly další dvě publikace, podobně obecné a korelativní. Každá z těchto pěti studií se navíc týká jiného typu epigenetické modifikace a jiného druhu hmyzu, a tedy i jinak regulované diapauzy. Při zadání práce jsme tudíž vycházeli především z vlastních publikovaných výsledků. V rámci širěji pojaté transkriptomické studie (Poupardin et al., 2015), jsme předběžně identifikovali gen *dpy30* jako jeden z nejsilněji odpovídajících na fotoperiodickou indukci diapauzy u octomilky *Chymomyza costata*. Tento gen kóduje důležitou podjednotku metylázy histonů H3K4. Z literatury jsme zjistili, že mutace genu *dpy30* vede, u lidských buněk, k zastavení buněčného cyklu a potlačení jejich proliferace. Tedy k fenotypickému projevu nápadně připomínajícímu diapauzu hmyzu. Tato velmi předběžná data nám naznačila, že epigenetické modifikace, konkrétně metylace histonu 3 na lysinu 4 (H3K4), by mohly být součástí regulačního programu, který vede k indukci diapauzy hmyzu.

Cílem zadaného magisterského projektu tedy bylo: 1) prohledat naši publikovanou RNAseq databázi a zjistit, zda nějaké další geny, kódující jakékoli další epigenetické faktory, jsou rozdílně regulovány v průběhu indukce diapauzy u larev octomilky *C. costata*. 2) Vytipovat vhodnou epigenetickou modifikaci a pokusit se přímo experimentálně ověřit, zda je tato modifikace spojena (kauzálně nebo alespoň korelativně) s indukcí diapauzy u *C. costata*.

Prohledáním RNAseq databáze *C. costata* našel Petr mnoho desítek strukturních homologů pro geny kódující epigenetické faktory. Zároveň potvrdil, že právě gen *dpy30* vykazuje nejsilnější down-regulaci v odpovědi na krátký den (tedy při indukci diapauzy). Ukázalo se, že gen vykazující druhou nejsilnější down-regulační odpověď (*wds*, *will die slowly*), také kóduje další podjednotku metylázy histonů H3K4. Tyto výsledky nás vedly k formulaci hypotézy, že výsledkem snížené aktivity genů *dpy30* a *wds*, by mohla být nižší úroveň metylace H3K4, jež vede ke kondenzaci chromatinu a tím pádem k potlačení celkové transkripční aktivity genů při indukci, nebo po indukci, diapauzy u larev *C. costata*. Tuto hypotézu měl Petr empiricky testovat. Petr postupně vyzkoušel tři různé metodické přístupy pro kvantifikaci metylace H3K4. Všechny metody bylo potřeba nejprve zavést a vyzkoušet a teprve poté je "naostro" použít v experimentu. Všechny tři metody ukázaly velmi podobný výsledek a to jak u larev právě (tukové těleso, sval a CNS). Výsledek ovšem byl takový, že úroveň metylace H3K4 se buď nelišila u

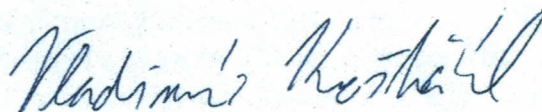
fotoperiodických variant, nebo byla dokonce mírně silnější u diapauzních než u nediapauzních variant. Výsledek tedy zcela jasně nepotvrdil naši hypotézu.

Příčin nesouladu mezi hypotézou a empirickým výsledkem může být mnoho. Některé z nich Petr zmiňuje v Diskusi. Diskusi bohužel považuji za slabší část diplomové práce. Petr jakoby podlehl frustraci z "negativního" výsledku, ztratil motivaci hledat pozitivní vysvětlení a, hlavně, už neměl čas se rozboru svých vlastních dat patřičně věnovat. Výsledkem je poměrně lakonická Diskuse.

Celkově však hodnotím práci velmi kladně. Je třeba vzít v potaz, že šlo o skutečně neprobádaný směr a o zavádění nových metodik. Petr si v tomto ohledu počínal velmi samostatně a úspěšně. Zorientoval se v obecné problematice epigenetických modifikací. Našel potenciální cílové geny u *C. costata*, na které zaměřil praktické experimenty. Nakonec zavedl tři různé metodiky, všechny velmi složité, a získal pomocí nich solidní data, byť falsifikující naši výchozí hypotézu.

Doporučuji práci jako velmi kvalitní podklad k obhajobě.

Dne 9. 5. 2017  
V Českých Budějovicích



.....  
Vladimír Košťál (školitel)