

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky, v.v.i.

Šlechtitelů 31, 783 71

Olomouc - Holice

e-mail: hobza@ibp.cz

Název práce: Telomere length compensation mechanisms as players in longevity and stress adaptation of insects

Autor: **RNDr. Michala Korandová**

Cílem předložené disertační práce je především studium telomer hmyzu a procesů, které souvisejí s jejich dynamikou ve vztahu k vývojovým procesům a stárnutí.

Po formální stránce je disertační práce pečlivě vypracována. Je celá psaná v anglickém jazyce, má celkem 123 stran a je rozdělena do osmi kapitol. Hlavní část je tvořena dvěma autorčinými publikacemi (na obou je doktorandka uvedena jako klíčová první autorka). Literární přehled je podaný přehledně a poměrně vyčerpávajícím způsobem. Autorce bych doporučil využít současné znalosti, které jsou zřejmé z úvodní kapitoly, k sepsání popularizačního článku pro širší odbornou veřejnost, třeba i v českém jazyce. Tento typ výstupu by mohl/měl být samozřejmou částí doktorandských aktivit.

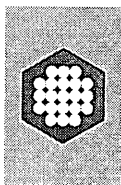
Abych se přiznal, zaujala mě hlavně část práce, která se zabývá druhem *Apis mellifera*. Jak je etablovaná včela jako model reverzní genetiky? Existuje protokol na transformaci a metodologie využívající např. RNAi nebo Crispr/Cas u včel? Co by se stalo, kdyby došlo k vyřazení (knock out) telomerázy? Jaké by byly vývojové a obecně fenotypové následky? Proč se autorka nepokusila zaměřit i na sledování aktivity telomerázy v trofocytech např. dělnic? Jeden ze závěrů práce je, že možným důvodem nenalezení korelace mezi délkou telomer a telomerázovou aktivitou je velká variabilita v hybridizačních signálech a nedostatečné množství analyzovaných vzorků. Existuje nějaká alternativní metoda (metody), která by autorce pomohla vyslovit jednoznačnější (kvantifikovatelnější) závěr? Volila by autorka jiný postup a celkový přístup k experimentům, kdyby dnes mohla začít práci znovu? Postoupila autorka dále ohledně kapitoly „unpublished data“? Předpokládám, že záměrem je vznik ucelené publikace.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že cíle vědecké přípravy byly v plném rozsahu splněny. Případné poznámky a otázky uvedené v mém posudku nemají snižovat úroveň předkládané práce. Protože se jedná o oponentský posudek, je mou snahou spíše upozornit na případné nejasnosti a ne jen na jednoznačné klady této práce. V odpovědích na otázky by pak měla doktorandka ukázat způsobilost vést vědeckou diskuzi o řešené problematice. Závěrem konstatuji, že Michala Korandová prokázala schopnost samostatně a tvořivě řešit vědecký projekt vysoké kvality a doporučuji přijetí její disertační práce k obhajobě.

V Brně dne 12. listopadu 2017

RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'R' followed by a series of loops and a long horizontal stroke.



Doktorská práce RNDr. Michaly Korandové, která nese název *Telomere length compensation mechanisms as players in longevity and stress adaptation of insects*, se zaměřuje na mimořádně zajímavé téma údržby telomer u hmyzu. Samotný výběr tohoto tématu je zárukou zajímavých a nových poznatků, protože znalosti o údržbě telomer u hmyzu dramaticky zaostávají za úrovní poznání u obratlovců a člověka, kde je téma extenzivně zkoumáno už několik dekád a publikováno v podobě nespočtu vědeckých článků.

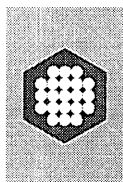
Autorka nahlíží téma údržby telomer v několika kontextech. Prvním z nich je aspekt fylogenetický, který si klade za cíl zmapovat přítomnost nejčastějšího mechanismu údržby telomer a kompenzace jejich zkracování s pomocí enzymatického působení telomerázy napříč fylogenetickou diverzitou hmyzu. Druhým aspektem je souvislost údržby telomer a telomerázového mechanismu s dlouhověkostí a stárnutím tkání a celých jedinců, a to na mimořádně patřičném modelu, tedy včele medonosné, která se jako ostatní společenský hmyz vyznačuje dramatickými rozdíly v naději dožití jednotlivých kastovních fenotypů, od efemerních samců, přes dělnice až po dlouhověkou královnu. Samotný tento cíl je nesmírně aktuální, protože výzkum dlouhověkosti společenského hmyzu je dosti moderní téma studované aktuálně v několika světových laboratořích. Třetím úhlem pohledu potom je hledání souvislostí mezi účinky oxidativního stresu a údržbou a délkou telomer, v této práci studované u octomilky vystavené dlouhodobému působení nízkého, subletálního oxidativního stresu. Jakkoli je právě u tohoto modelu mechanismus údržby telomer rozdílný a nezakládá se na působení telomerázy, autorka zkoumá vliv stresu na aktivaci alternativního mechanismu prodlužování telomer, možné fenotypové důsledky této aktivace a případné selekční mechanismy favorizující genotypy s aktivnější údržbou telomer.

Doktorská práce tak ve výsledku sestává ze čtyř studií, z nichž dvě jsou již publikované jako prvoautorské články v kvalitních časopisech (*Chromosoma* a *Chromosome Research*), jedna prezentovaná jako prvoautorský rukopis v recenzním řízení (*J. Insect Physiol.*) a jedna jako nepublikovaná studie v přípravě. Jakkoli se na první pohled mohou ony čtyři studie jevit jako do jisté míry vzájemně odlehle, nesou podle mě jasný společný jmenovatel, tedy mapování přítomnosti a aktivity opravných a kompenzačních mechanismů zkracování telomer v souvislosti s fylogenezí, dlouhověkostí a fyziologií jednotlivých hmyzích modelů.

Autorka jasně uvádí svůj podíl na jednotlivých studiích, tj. zejména provádění TRAP pokusů telomerázové aktivity, klonování TRAP produktů, real-time PCR a zpracování dat a samotných rukopisů, což ji nesporně opravňuje k prvoautorství a použití těchto publikovaných i nepublikovaných studií jako svou doktorskou práci.

Bylo by nadbytečné zde podrobně představovat obsah jednotlivých studií, protože ten je součástí samotné přednášky v rámci doktorské obhajoby a navazující diskuse, pozastavím se proto nyní u hlavních zjištění, která autorka uvádí v samotných rukopisech i v podobě krátkého shrnutí v kapitole 5, a to hlavně ve smyslu jejich významu.

Tato zjištění považuji za velmi cenná a zajímavá, některá z nich dláždí cestu k dalšímu zkoumání. V návaznosti na předchozí práci školitelky, která mapuje přítomnost ancestrálního telomerového motivu TTAGG napříč hmyzí fylogenezí, studovala autorka TTAGG specifickou telomerázovou aktivitu

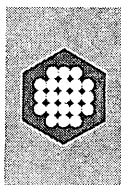


u 15ti zástupců několika řádů hmyzu a u většiny z nich potvrdila přítomnost aktivního TTAGG telomerázového mechanismu. Z jejich pozorování plyne, že jak samotný telomerový motiv, tak specifická telomerázová aktivita jsou z globálního pohledu relativně konzervované a přítomné u některých primitivních stejně jako odvozených řádů a čeledí a nepřítomnost těchto mechanismů u některých linií lze tak nahlížet jako opakovanou sekundární ztrátu či přechod k alternativním mechanismům údržby telomer. Zmapování telomerázové aktivity u rozmanitých zástupců hmyzu otevírá dveře k dalšímu funkčnímu zkoumání tematiky u jednotlivých vybraných modelů. Ve stejné studii autorka potvrzuje očekávaný trend v telomerázové aktivitě u vývojových stadií a tělesných tkání u hemimetabolního modelu *P. americana*, tj. postupný pokles z vysokých aktivit u embryí směrem k dospělci a vysokou aktivitu v germinálních orgánech dospělého kontrastující s aktivitou nízkou v somatických tkáních. Tato pozorování svědčí o přítomnosti telomerázového mechanismu v jeho kanonické podobě známé ze studia některých obratlovců, včetně člověka.

V druhé studii autorka ukazuje dramatické rozdíly v telomerázové aktivitě v somatických tkáních, zejména pak mozku, mezi krátkověkými kastami (trubec, dělnice, nízká aktivita) a královnami (vysoká aktivita) včel, včetně larev, z nichž se budoucí královny vyvíjejí. Telomerázová aktivita se neukázala být v přímé korelaci se samotnou délkou telomer, což zavdává důvod k hypotézám o odvozené nekanonické úloze telomerázy v podpoře dlouhověkosti, která je diskutována i u obratlovců. Tato pozorování považují za nesmírně zajímavá v kontextu současného extenzivního hledání faktorů, které se spolupodílejí na výjimečné dlouhověkosti reprodukčních kast společenského hmyzu. Nesporně budou představovat základ pro další výzkum.

Ostatně i sama autorka v rámci týmu školitelky bezprostředně navazuje na toto téma dalším zkoumáním, které prezentuje jako nepublikovaná data ve své doktorské práci. V této studii dává do souvislosti telomerázovou aktivitu královen a dělnic v různých obdobích ročního cyklu na straně jedné a hlavních endokrinních regulačních drah na straně druhé. Jakkoli jde o souvislosti čistě korelativní, potvrzují předložená pozorování již v minulosti postulované jedinečnosti v hormonální regulaci u včely medonosné a zároveň naznačují možné kauzální souvislosti mezi aktivací telomerázy a dynamikou klíčových hormonů, které mohou být v budoucnu empiricky testované.

V poslední představené studii autorka pozorovala zvýšení počtu telomerových retroelementů v genomu a vyšší počet jejich transkriptů u octomilek vystavených po několik generací oxidativnímu stresu v subletálních dávkách. Z uvedeného vyvozuje, že dlouhodobá expozice oxidativnímu stresu vede k prodloužení telomer, ať už jako důsledek adaptační reakce vůči stresoru nebo jako výsledek selekce jedinců s delšími telomerami a vyšší transkripční aktivitou telomerových retroelementů. Tyto výsledky také považují za výjimečně zajímavou dokumentaci poměrně rychlé, dynamické odpovědi v rámci populace na podmínky prostředí a další doklad vysoké evoluční plasticity známé u octomilek, tentokrát na úrovni údržby telomer. Zároveň tak práce přináší hodnotný důkaz přímé souvislosti mezi odolností stresovým podmínkám a údržbou telomer. Podobné doklady jsou dosud u hmyzu vzácné ve srovnání se znalostmi u obratlovců.



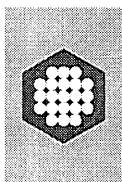
Potud k samotnému vědeckému obsahu práce. Následuje rozbor textu, který čtyři uvedené studie doprovází, v pořadí struktura práce, formální a jazykové aspekty, poznámky k úvodu, metodice a shrnutí.

Svou strukturou mi text práce vyhovoval, sestává z úvodu, uvedení cílů, metodiky, samotných výsledků a krátkého shrnutí. Jako odvážné hodnotím, že autorka „jde s kůží na trh“ a uvádí některá hrubá data a testy v podobě několika příloh.

Po formální stránce nenacházím zásadní problémy, v práci se lze dobře orientovat. Přesto mi neunikly drobné nedostatky např. v citačních formátech uvnitř textu (tj. rozdělovníky citací, „&“ vs. „a“, nadpočetné mezery, atp.) nebo např. rozdílné datum vydání v textu a v seznamu literatury (Houben et al. 2007 vs. 2008). Podobně pak sem tam nějaké ty překlady, tu *Drosophila*, onde *Drosophila*, *Bumbus* namísto *Bombus*, apod. Tyto nedostatky jsou marginální a mnohdy jdou zjevně na vrub citačnímu software nebo hromadným úpravám textu, nicméně stále platí, že je škoda tyto drobnosti neopravit s uvážením, že práce bude navěky dostupná v knihovně. Jinými slovy, ještě jedno či několikrát pozorné přečtení textu by nebylo pro autorku promarněným časem. Pozorné přečtení by pomohlo vychytat i pár faktických chyb, jako např. uvedení TTAGG telomerové sekvence jakožto univerzálního motivu obratlovců (str. 1), apod.

Angličtina je napříč celým textem obecně v pořádku ve smyslu vědecké nebo faktické srozumitelnosti. Je jasné, co chce autorka říct. O trochu méně v pořádku je na úrovni gramatické a syntaktické, během čtení jsem mnohdy narážel na místa, která by zasloužila opravit (singulár vs. plurál a koncovky sloves, předložky, čárky a členy, apod.). Výstižně je tato určitá jazyková neobratnost otisknuta také v samotném názvu celé doktorské práce v sousloví „*Telomere length compensation mechanisms*“, přeloženo tedy „mechanismy kompenzace délky telomer“. To je do jisté míry nevhodná formulace a významově správněji by bylo „telomere shortening compensation“ či „telomere attrition compensation“.

Úvod mě celkem mile překvapil tím, že na dvanácti stranách dokáže shrnout prakticky všechny stránky studované problematiky od mechanistických aspektů struktury a údržby telomer u hmyzu až po obecnou problematiku stárnutí, včetně společenského hmyzu, a souvislosti mezi stárnutím, dlouhověkostí a stresem. Pouze v pasážích, které se zabývají endokrinními aspekty regulace dlouhověkosti s důrazem na společenský hmyz (str. 10, 11) jsem měl pocit, že pro autorku není téma úplně komfortní a nepodařilo se jí dostatečně oddělit proximální faktory, které umožňují dlouhověkost, od faktorů, jež dlouhověkost regulují. Podobně tak zmíněné pasáže ne zcela rozlišují mezi zákonitostmi platnými univerzálně, platnými u obratlovců a dokumentovanými u bezobratlých a hmyzu. Metodická pasáž se na trochu více než pěti stranách pokouší shrnout použité metody. Dle mého názoru není metodika zpracována úplně šťastně. Jde vlastně o zkopírované pasáže z jednotlivých rukopisů, které v principu v identickém znění následují o několik stran později v samotných rukopisech. Ve výsledku pak jejich seřazení do metodické kapitoly vnáší do práce trochu zmatek, často není úplně patrné, na kterých modelech a v kterých studiích byly ty které metody použity a toto se vyjasní až přečtením samotných rukopisů. V tomto smyslu je metodická pasáž pro čtenáře jen málo přínosná a do značné míry nadbytečná.



Podobně tak mám jisté výhrady ke kapitole 5, která nese název Summary. Při její délce dvou stran jsem jako čtenář očekával shrnutí nejdůležitějších výsledků čtyř studií zahrnutých do doktorské práce. Uspokojivé shrnutí jsem nicméně našel pouze pro první článek o distribuci telomerázové aktivity u hmyzu a její vývojovou dynamiku u *P. americana* a pro článek druhý o mezikastovním srovnání telomerázové aktivity u včely. Naopak zajímavé studii o souvislosti oxidativního stresu a údržbě telomer u octomilky je věnováno poměrně obecných sedm řádků, aniž by samotná *Drosophila* byla jmenována. Výsledky o časové dynamice telomerázové aktivity u včel a hormonálním pozadí pak nejsou uvedeny vůbec. Naopak téměř polovinu oněch dvou stran zabírá úvaha o stárnutí savců. Tímto tak ona dvoustrana s názvem shrnutí jaksi supluje diskusi, která v práci není zahrnuta, nicméně na zoufale malém prostoru.

Závěrem sděluji, že předloženou práci považuji za zcela způsobilou k obhajobě a po obsahové stránce za práci zdařilou. Jako takovou ji také k obhajobě doporučuji.

Dotazy k obhajobě:

1. Na několika místech své doktorské práce dochází autorka k opatrnému závěru, že telomeráza může mít ještě jinou (sekundární, nekanonickou) úlohu než pouze prodlužování telomer jaderných chromosomů. Jaké jsou současné poznatky o eventuální odvozené roli telomerázy?
2. Jaká bude budoucnost studie uvedené na stranách 39-43, tedy nepublikovaných dat o souvislosti telomerázové aktivity, sezóny, kasty a endokrinních regulace u včely?

Některé věcné dotazy budou následovat při samotné obhajobě.

V Praze dne 21.11.2017

Robert Hanus
