

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce **Mgr. Tomáše Krůčka „Alternativní telomerické kompenzační mechanismy jako způsob adaptace telomer vůči stresovým podmínkám v průběhu evoluce hmyzu“** v doktorském studijním oboru Fyziologie a vývojová biologie živočichů je koncipována jako soubor 2 publikací a rukopisu opatřené teoretickým úvodem (12 stran) a diskusí (4 strany). V souboru prací, které nahrazují výsledkovou část, je Mgr. Krůček u 1 publikace prvním autorem, u 1 publikace druhým autorem, třetí práce je prezentována ve formě rukopisu, podíl Mgr. Krůčka je stručně zmíněn v úvodním seznamu publikací.

V úvodní teoretické části jsou popsány telomery a jejich struktura a způsoby jejich udržování, dále působení stresových faktorů. Nejvíce prostoru je věnováno mechanismu retrotranspozice jako mechanismu udržování telomer u drozofily, který je alternativou ke specializovanému mechanismu udržování telomer pomocí telomerázy. Cíle práce jsou po stručném uvedení pozadí jejich zadání formulovány jasně a přehledně. Krátká diskuse pak shrnuje výsledky uvedené v prezentovaných publikacích a rukopisu. Protože neznám formální požadavky pro disertace tohoto typu na Jihočeské univerzitě, zmíním formální nedostatky pouze krátce. Rozsah úvodní části a diskuse je podle mého názoru poměrně malý, vzhledem k tomu, že výsledky jsou prezentovány pouze jako publikované práce a rukopis. Zejména u úvodu bych očekávala hlubší popis alternativních mechanismů udržování telomer u hmyzu, protože jejich mechanismus je na rozdíl od jiných organismů alespoň nějak popsán nebo dokonce experimentálně prokázán. Konkrétně jde o fakt, že nejsou uvedeny ani původní citace ani poznatky o telomerách *Anopheles* a *Chironomus* nebo pohled na telomery *Drosophila virilis*, což bych vzhledem k proklamovanému evolučním podtextu celé disertace očekávala jako minimum. Proto bych ráda slyšela alespoň v rámci obhajoby přehled poznatků o alternativních hmyzích systémech. Dále celá úvodní část je opatřena jediným obrázkem zobrazujícím fylogenetické vztahy a telomery u hmyzu, který je umístěn na poslední straně za textem popisujícím odpověď na stresové podmínky a jde jasně o obrázek z publikace Korandová a kol. 2014 (není v legendě obrázku zmíněna) s popisky přeloženými do češtiny. Obecně působí text úvodní části rozporuplně, tím myslím, že části věnující se oxidativnímu stresu a struktuře telomer drozofily jsou zpracovány poměrně dobře, u částí zabývajících se pozadím a evolučními vztahy telomer jsou mezery zejména ve zpracované literatuře. Bývá zvykem uvádět přehledné práce jako (shrnutí v Xy), což jsem nikde nezaznamenala, pak není jasné, zda je citován původní pramen nebo souborný článek a k čemu se citace vztahuje. Také pořadí vícečetných citací mi bylo záhadou, protože se neobjevovaly seřazené v textu ani podle roku ani podle citovaného faktu (např. str. 4 dole, str. 9 ř. 20), podobně chyby v seznamu citací (namátkou citace Čapková a kol. 2013, nebo chybějící/špatný odkaz Halliwell 1999). Tyto drobnosti ztěžují orientaci v textu.

K výsledkové části mám několik poznámek. Všechny tři práce jsou uvedeny pouhým překladem anglického abstraktu, což pokládám za nešťastné, protože to zvyšuje pocit opakování stejných faktů a formulací v úvodu, cílech, výsledcích a diskusí. Spíše by pomohlo např. uvedení podrobností, které jsou v publikovaných pracích uvedeny pouze stručně. Práce Korandová a kol. (2014) a Krůček a kol. (2015) byly publikovány, tudíž prošly recenzním řízením v časopisech, poslední práce je prezentována jako rukopis.

- Výsledky v publikaci Korandová a kol. (2014) jsou prezentovány velmi hutně formou tabulek, fylogeneze a grafů a množství zpracovaného materiálu je skutečně reprezentativní. Podíl disertanta je však definován pouze takto: „Tomáš Krůček se podílel na mapování TTAGGG-specifické telomerázové aktivitě v testovaných hmyzích řádech“. Vzhledem k tomu, že tato práce představuje splnění prvního z cílů disertační práce, ráda bych požádala v rámci obhajoby o přesné vymezení jeho podílu na této publikaci a prezentaci některých experimentálních výsledků disertanta včetně popisu jejich získání. Protože se disertant podílel na testování telomerázové aktivity, zajímalo by mne, zda testoval také jiné kombinace substrátových primérů, případně reversní primér s alternativní sekvencí (nabízí se alternativní sekvence TCAGG)
- Výsledky v publikaci Krůček a kol. (2015) pokládám za velice zajímavé také s ohledem na propojení molekulárně-biologických technik s fenotypovým projevem (mobilita, mortalita), ráda bych v rámci obhajoby slyšela, jak si disertant vysvětluje propojení fyziologických projevů (mortalita, mobilita) s biochemickými markery (enzymatická aktivita, hladina peroxidu) a transkripční odpovědí organismu
- Ke způsobu uvedení rukopisu ve výsledkové části mám jednu formální výhradu – v samostatné části 8. (Přílohy) jsou uvedeny poměrně podrobné tabulky, které zřejmě patří k tomuto rukopisu. V rukopisu jsou uvedeny asi jako „Supplemental data S1-20“, v části 8. jsou ale uvedeny jako Tabulka 1-20. Dále nacházím rozdíl na ose y ve Fig. 2C,2D a odpovídajících tabulkách 12,13. Uvedené výsledky by představovaly řádový rozdíl mezi transkripty v Oregon R a Hetom line, taktéž pokud je správný výsledek ve Fig. 2C,D, znamenalo by to rozdíl mezi aktivitou přirozeného promotoru a HeT promotoru v použitém konstruktu (nicméně Hetom linie ukazuje hezkou fluorescenci transgenu...) Pokud je zde nějaká chyba, prosím opravu, pokud ne, prosím vysvětlení. Mimochodem, nenašla jsem odkaz na Supplemental data S17 v rukopisu. Výsledky samotné jsou opět velmi zajímavé propojením transkripční aktivity telomerových retroelementů s odpovědí modelového organismu na navozené stresové podmínky. V rámci obhajoby bych proto chtěla slyšet více informací o organizaci telomerických retroelementů drozofily, např. zda jsou v tandemu, nebo tvoří vícekopiové ostrůvky atd. Dotaz je směřován na diskusi ohledně rozdílů v navýšení počtu kopií různých retroelementů v genomu v odpovědi na paraquat a transkripční aktivitě. Otázkou je také, zda je odpověď (navýšení počtu kopií) genomu stálá nebo krátkodobá, případně jak dlouho přetrvávají prodloužené telomery po odstranění stresu. Výsledky uvedené na Fig. 7 (akutní stres po dlouhodobé expozici nízkými koncentracemi paraquatu) jsou velice sugestivní i v případě 10^{-6} mM koncentrace, kde je podle Fig. 1 navýšení počtu kopií v 5. generaci statisticky nevýznamné. Dále mám laický dotaz k metodice - jak dlouho byly mušky vystaveny stresu/paraquat? Můžete vysvětlit hypotézu testovanou experimentem na Fig. 6?

Závěrem konstatuji, že výsledky prezentované v předložené disertační práci dokládají splnění cílů práce a práci doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 17.11.2017


Mgr. Eva Sýkorová, CSc.

Biofyzikální ústav AVČR
Královopolská 135, 61265 Brno

doc. Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.
Středoevropský technologický institut (CEITEC) a Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Brno

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Tomáše Krůčka „Alternativní telomerické kompenzační mechanismy jako způsob adaptace telomer vůči stresovým podmínkám v průběhu evoluce“

Mgr. Tomáš Krůček se v disertační práci zabýval studiem telomer a jejich stability u hmyzu. Práce je prezentována jako shrnutí současného stavu poznatků v dané oblasti následované diskusí k výsledkům, které jsou uvedeny ve formě publikací.

Úvod je dostatečně obsáhlý a autor v něm uvádí všechna data nezbytná k pochopení cílů a významu práce. Co se týče formální stránky, dovolila bych si poukázat na některé nedostatky, např. formulaci na str. 2 „...u člověka je telomerická délka dlouhá v průměru 5 – 15 kb“. Tento údaj navíc nekoreluje s 9 – 15 kb na str. 5, přičemž je uveden stejný zdroj (Moyzis a kol., 1988). Mezi proteiny savčího shelterinu je na str. 6 uveden protein TPP1, což není tripeptidyl peptidase, nýbrž TIN2-interacting protein 1 (je to jeden z možných názvů, viz. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACD>).

Cíli práce bylo stanovit (i) zda je sekvence TTAGG funkční telomerovou sekvencí u zástupců různých řádů hmyzu a (ii) zda dlouhodobá expozice nízkým dávkám volných radikálů vede k ovlivnění aktivity telomerových mobilních elementů u drosofil.

První cíl je zpracován v publikaci Korandová a kol. 2014, kde je Mgr. Krůček druhým autorem a podílel se na analýzách aktivity telomerázy v extraktech připravených z tkání různých druhů hmyzu, což byla v tomto článku klíčová analýza. Telomeráza byla potvrzena jako běžný telomerový

kompenzační mechanismus u hmyzu, nicméně aktivní telomeráza nebyla nalezena u některých druhů, u nichž byla v předchozích studiích repetitivní sekvence TTAGG na koncích chromozómů detekována (zástupci řádů Zygentoma, Orthoptera, Phasmida).

Dlouhodobé působení nízkých dávek redukčního činidla paraquatu, což je běžně používaný herbicid, bylo u drosofil studováno z hlediska antioxidační a lokomoční aktivity v práci Krůček a kol. 2015. Autoři získali velice zajímavé výsledky, ukazující změny v transkripci superoxid dismutázy a katalázy v důsledku působení paraquatu, přičemž citlivější byli samci a obecně reprodukčně aktivní jedinci.

Délka a transkripční aktivita telomerových retroelementů drosofil v reakci na chronické působení subletálních dávek paraquatu byla studována v práci Korandová a kol., která byla odeslána na posouzení do časopisu Journal of Insect Physiology. Od třetí generace jedinců vystavených relativně nízkým koncentracím paraquatu bylo pozorováno prodloužení telomer a zvýšení jejich transkripční aktivity.

Diskusi, která je v disertační práci zařazená před publikace a rukopis shrnující výsledky, bylo možno si řádně „užít“ až po prostudování těchto materiálů.

Dotazy a komentáře:

- Za velice zajímavý výsledek v práci Korandová a kol. 2014 považuji absenci aktivity telomerázy u druhů, u nichž byl kanonický telomerový motiv TTAGG na koncích chromozómů nalezen. V diskusi (str. 19) k tomu uvádíte, že na základě pouhé přítomnosti krátké repetitivní sekvence na koncích chromozómů nelze usuzovat, že tato funguje jako funkční telomera právě kvůli možné absenci aktivity příslušné telomerázy a že u těchto druhů mohl být systém udržování stability telomer založený na

telomeráze ztracen, případně došlo k změně templátové sekvence telomerázy. Můžete nastínit experimentální přístupy, na základě kterých by bylo možno tyto hypotézy ověřit?

- Souhlasím s tvrzením v diskusi práce Korandová a kol. 2014 (str. 42), že dle výsledků in situ hybridizace nelze spolehlivě rozlišit subtelomerickou a telomerickou lokalizaci repetitivní sekvence. Bylo by k tomuto účelu možno využít analýzy TRF ve spojení s limitovaným štěpením exonukleázou BAL31, která specificky degraduje konce dvouvláknové DNA a v případě vysokomolekulární DNA jsou koncové sekvence chromozómů (tedy telomery) jejím preferenčním cílem?
- V práci Krůček a kol. 2015 mě zaujalo, že hladina transkriptu SOD je výrazně vyšší u samců než u samic (Fig. 2C, D, vzorky 0 μ M; str. 51). Rozdíl v hladinách transkriptů mezi pohlavími byl, jak uvádíte v diskusi, prezentován v několika pracech, nicméně aktivity SOD jsou u zástupců obou pohlaví zcela srovnatelné (Fig. 3, vzorky 0 μ M; str. 52). Můžete toto, prosím, komentovat?
- Z téže práce je zřetelné, že reprodukčně aktivní jedinci obou pohlaví jsou citlivější k působení paraquatu ve srovnání s jedinci neaktivními. Z prezentovaných výsledků navíc vyplývá, že jak aktivita SOD (Fig. 4; str. 52), tak hladina peroxidu vodíku (Fig. 5; str. 53) jsou vyšší u samců kontrolní populace reprodukčně aktivní ve srovnání s neaktivní kontrolou. U reprodukčně aktivních i neaktivních samiččích kontrol jsou aktivity SOD srovnatelné (hladina peroxidu vodíku nebyla pro reprodukčně neaktivní samice stanovena). Domníváte se, že to lze korelovat s rozdílnou fyzickou aktivitou během reprodukce, jak píšete v diskusi pro vysvětlení rozdílů v reakci na oxidativní stres mezi populačně aktivními a neaktivními jedinci obou pohlaví?

Závěrečné hodnocení

Mgr. Tomáš Krůček prokázal dostatečné tvůrčí schopnosti, schopnost samostatné vědecké práce a kritické interpretace experimentálních dat. Předložená disertační práce splňuje všechny formální i věcné požadavky kladené na práce v tomto oboru.

Disertační práci Mgr. Tomáše Krůčka doporučuji k obhajobě.

v Brně, 22. 11. 2017

Miloslava Fojtová

Miloslava Fojtová