

Zápis z průběhu obhajoby disertační práce Mgr. Miroslavy Karafiátové konané dne 16. září 2014

Doktorský studijní program: P1527 BIOLOGIE
Studijní obor: BOTANIKA

Téma:

„Cytogenetické mapování genomů hospodářsky významných plodin“

Obhajoba se konala dne 16. září 2014 v 10,00 hodin ve Velké zasedací místnosti Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Šlechtitelů 31, 78375 Olomouc-Holice

Komise se sešla v celkovém počtu 10 členů včetně 2 oponentů:

Předseda:	prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc. (UP, Olomouc)
Místopředseda:	prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc. (BFÚ, Brno)
Členové:	prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc. (MU, Brno) prof. Milan Navrátil, CSc. (UP, Olomouc) prof. RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc. (UK, Praha) - omluven prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc. (UP, Olomouc) doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. (UP, Olomouc) doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D. (UP, Olomouc) doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D. (UP, Olomouc)
Oponenti:	doc. Martin Lysák, Ph.D. (MU, Brno) Ing. Pavel Neumann, Ph.D. (BC, České Budějovice) - omluven RNDr. Jiří Šíroky, CSc. (BFÚ, Brno)
Školitel:	Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.

Průběh obhajoby řídil předseda disertační komise prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc. Po uvítání účastníků veřejné části obhajoby seznámil předseda komise přítomné se stručným životopisem Mgr. Miroslavy Karafiátové. Dále prof. Lebeda přednesl stanovisko školícího pracoviště (Katedra botaniky PřF UP a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.). Následně Mgr. Jan Bartoš, Ph.D. přednesl stanovisko školitele. Poté se ujala slova doktorandka Mgr. M. Karafiátová a přednesla přednášku o tématu své disertační práce, která trvala přibližně 20 minut. Doktorandka využila k prezentaci výsledků dataprojektor. Během obhajoby kolovaly mezi přítomnými exempláře disertační práce a autoreferáty.

Dále oponenti - doc. Martin Lysák, Ph.D. a RNDr. Jiří Šíroky, CSc. - přednesli své posudky. Za nepřítomného Ing. Pavla Neumanna, Ph.D. přečetl oponentský posudek prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.

Doktorandka postupně odpovídala na připomínky a dotazy jednotlivých oponentů. Tyto odpovědi měla rovněž písemně zpracovány a jsou součástí tohoto zápisu.

Vyjádření k připomínkám oponentů k disertační práci Mgr. Miroslavy Karafiátové

„Cytogenetic analysis of crop genomes“

Ing. Pavel Neumann, Ph.D.

Připomínka 1: Podrobně jsou výsledky popsány a zasazeny do širšího kontextu ve čtyřech vědeckých článcích publikovaných v impaktovaných časopisech a jednom hotovém rukopise. U dvou z těchto prací je doktorandka uvedena jako hlavní autor. Bylo by nicméně vhodné kdyby doktorandka během obhajoby blíže specifikovala svůj podíl na jednotlivých experimentech či výsledcích.

Komentář 1: U prvoautorské publikace týkající se lokalizace jednokopiových oblastí v centromerické oblasti 7H ječmene jsem autorkou veškerých cytogenetických experimentů. Doplňující bioinformatické analýzy jsem zpracovala s pomocí svého školitele Mgr. Jana Bartoše, Ph.D. V publikaci zaměřené na chromosome painting jsem s výjimkou izolace genových sekvencí z čipu a třídění chromozómů také prováděla všechny potřebné experimenty od izolace DNA, přes přípravu sond a blokovacích DNA až po mikroskopii. U spoluautorské publikace analyzující distribuci homoelogních rekombinací u kostřavy luční a jílku mnohokvětého jsem byla odpovědná za detekci rekombinantů pomocí GISH techniky a dále jsem prováděla měření velikosti vnesených úseků s následným statistickým zpracováním získaných dat. V publikaci věnující se porovnání genomů dvou variet cizrný beraní jsem autorkou základní cytogenetické charakteristiky chromozómů obou genomů a také jsem pomocí FISH kontrolovala čistotu tříděných frakcí chromozómů pro sekvenování. V poslední práci jsem po sekvenování 4F chromozómu lokalizovala metodou FISH vytipované tandemové repetice na chromozóm izolovaný průtokovou cytometrií.

Otázka 1: V práci Karafiátová a kol. (2013) jste ukázali, že velmi důležitou roli při detekci relativně krátkých (ca 3kb) unikátních sekvencí hraje typ fluorochromu. Nejlépe se osvědčil fluorochrom „Texas Red“. Na druhé straně sondy značené pomocí Alexa488 nebyly detekovatelné, ačkoli tento fluorochrom má podobnou hodnotou QY jako Texas Red. Jaké jiné faktory než je QY by teoreticky mohly být klíčové pro využitelnost

určitého fluorochromu pro úspěšnou detekci unikátních sekvencí? Jsou v literatuře popsány úspěšné experimenty s přímou detekcí unikátních sekvencí o velikosti ca 3 kb pomocí sondy značené jiným fluorochromem než je Texas Red?

Odpověď: Velmi důležitým parametrem je kromě QY veličina nazývaná extinkční koeficient (ϵ), který souvisí s chemickou strukturou fluorochromu a značí, kolik fotonů je daná látka schopna absorbovat. Čím více fotonů fluorochrom absorbuje, tím více jich může emitovat, což přispívá k jasnějšímu signálu. V případě zmiňovaných fluorochromů je hodnota extinkčního koeficientu $71000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pro Alexa488 a $85000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pro Texas Red. Z toho je patrné, že Texas Red je schopen pohltit více fotonů a proto je signál Texas Red při stejném kvantovém výtěžku jasnější. Dalšími stěžejními parametry jsou jistě velikost, tvar či polarita molekuly fluorochromu, což může umožnit začlenění více jeho molekul do sondy, která by ve výsledku emitovala jasnější signál. Detekce sond kratších než 10 kb je tak stále spíše ojedinělou záležitostí a v těch málo publikovaných studiích zabývajících se lokalizací takto malých sond byl použit vždy Texas Red fluorochrom (Danilova et al., 2014), příp. nepřímé značení pomocí biotinu (Fusch and Schubert, 1995).

Otázka 2: Detekce krátkých unikátních sekvencí na chromozómech představuje často problém i v laboratořích, kde je metoda FISH dobře zaběhnutá. Stává se dokonce, že dva kolegové ve stejné laboratoři postupující podle stejného protokolu stabilně dosahují výsledků velmi rozdílné kvality. To svědčí o tom, že některé v protokolech chybějící detaily mohou hrát velmi podstatnou roli. Co kromě typu značení sondy považujete za klíčové pro úspěšnou detekci? Liší se nějak protokol pro detekci unikátních sekvencí od „běžného“ protokolu pro FISH?

Odpověď: Kromě postfixačního kroku, kdy jsou preparáty ošetřeny 4% roztokem formaldehydu, se protokol nijak výrazně neliší od klasického protokolu, který jinak běžně používáme v laboratoři. Za nejdůležitější faktory považuji kvalitu preparátu a samozřejmě kvalitu sondy. U ideálních preparátů je nutné odstranit veškerou residuální cytoplasmu, která by mohla komplikovat detekci signálu. U sondy je pak rozhodující její koncentrace, specifita a zvolený typ fluorochromu.

Otázka 3: Velmi nízká reprodukovatelnost metody WCP u ječmene je bohužel poměrně vážnou vadou na kráse unikátního postupu. Kde vidíte největší prostor pro zlepšení? Co přesně je myšleno jedním experimentem, když píšete, že pouze 10 % experimentů bylo úspěšných (nová sonda i blokovací DNA, nebo třeba jen jedna z komponent mixu nová)?

Odpověď: Vzhledem k tomu, že převážná většina experimentů končila nespecifickým signálem na všech chromozómech, tak předpokládám, že jisté rezervy by mohly být v používaných blokovacích DNA. V recentní analýze sekvencí obsažených v sondě jsme zjistili, že oproti původním předpokladům jsou v sekvencích překvapivě pěti procenty zastoupeny i repetitivní sekvence. Oproti původnímu obsahu repetitiv v genomu ječmene je to sice množství zanedbatelné, ale stále dostatečné, aby mohlo způsobovat komplikace v takto náročném experimentu. Toto zjištění otevírá další možnost obohatit blokovací DNA specificky o nejvíce zastoupené skupiny repetitiv a potlačit tak pozadí, které pravděpodobně způsobují. Koncentrace blokovacích DNA jsou také značně vysoké s čímž souvisí i viskozita výsledných roztoků a problémy při rozpouštění pelet DNA po přesrážení. Předpokládám, že finální roztok blokovací DNA nemusí být homogenní a tedy koncentrace blokovací DNA v jednotlivých reakcích se může lišit, což může mít esenciální vliv na výsledný signál.

U druhé části otázky jde nejspíše o nedorozumění. Touto formulací jsem chtěla zdůraznit, že i v případě, kdy jsem se snažila eliminovat množství proměnných v experimentech a použila jsem např. v deseti experimentech za sebou naprosto totožné chemikálie a aliquoty, tak pouze jeden z deseti pokusů byl úspěšný.

RNDr. Jiří Široký, CSc.

Připomínka 1: Některé ilustrace v úvodní části jsou poněkud nepřehledné, přinejmenším jim chybí legenda. To platí například pro tabulku na straně 26; i když je převzatá z literatury, termíny jako MDR či WGS nejsou vysvětleny a tak je tabulka pro čtenáře málo srozumitelná. Podobně je tomu na obrázku na straně 45.

S připomínkou naprosto souhlasím. Všechny zkratky použité v textu vysvětleny jsou, ale už jsem opomněla do nich zahrnout i zkratky objevující se v ilustracích. Zde je dodatečné doplnění kapitoly 6 LIST OF ABBREVIATIONS...

EdU – ethynyl-deoxyuridin

NUBI-R – maize knob probe

MCCY - maize centromeric probe

MDR – mathematically defined repeats

WGS – whole genome shotgun

Připomínka 2: Výhrady mám také ke dvěma odstavcům nazvaným "General Conclusion". Očekával bych nějaké kritické shrnutí dosažených výsledků ve světle recentní literatury, prostě nějaké počteníčko.

Komentář: Jistě bylo možné takovéto shrnutí napsat. Vzhledem k tomu, že veškeré výsledky, které byly součástí disertační práce, jsou velmi podrobně shrnuty a diskutovány v jednotlivých publikacích, kde mají přímou návaznost na použitou metodiku a jsou jasně dané do souvislostí s možnými aplikacemi a navazujícím výzkumem, jsem se zvolila pouze obecnější formu shrnutí.

Otázka 1: V publikaci Karafiátová a kol. (2013) se podařilo brilantně vizualizovat poměrně velmi krátké jednokopiové oblasti na chromosomech ječmene. Nicméně, ojediněle se vyskytly slabé signály i na neočekávaných místech v genomu - na jiných chromosomech. Autorka se domnívá, že se jedná o částečnou homologii. Zde bych namítl, že se bude jednat o úseky natolik krátké, že by jejich detekce měla být pod rozlišovací schopností metody. Navrhuje disertantka nějaké jiné vysvětlení?

Odpověď: Zde bych si dovolila plně nesouhlasit. Všechny signály, které se vyskytovaly na jiných místech, byly vždy slabší než signál originální, což naznačuje, že homologní úseky jsou ve výsledku kratší než původní sonda. Předpokládáme, že duplikované signály nepocházejí ze sekvencí s náhodou homologií, ale z duplikovaných kopií původního genu. Na utváření genomů obilovin z čeledi Triticeae se v průběhu evoluce výrazně podílely různě rozsáhlé duplikace, díky čemuž se v těchto genomech objevuje velké množství duplikovaných genů. Současná sekvence těchto duplikovaných genů není jistě naprosto totožná se sekvencí původního genu, ale v některých kratších oblastech si zachovali dostatečnou míru homologie, která může vykazovat afinitu k sondě. Je pravda, že homologické sekvence kratší než 1-1,5 kb jsou velmi pravděpodobně na hranici rozlišovací schopnosti metody, ale jejich detekce možná je, i když s nižší spolehlivostí, jak popisuje Danilova et al. (2014) v práci, kde lokalizovali

cDNA klony na metafázní chromozómy pšenice a nejkratší detekovanou sondou byla cDNA o délce pouhých 1,1 kb. Proto předpokládám, že homologie, které mají i jen poloviční délku oproti původní sondě, mohou být viditelné.

Otázka 2: Jak velký rozdíl (ve smyslu repetice a jednokopiové DNA) je v obou blokovacích DNAs použitých v protokolu chromosome paintingu?

Odpověď: Blokovací DNA typu C_{ot} obsahuje repetitivní sekvence. Složení této blokovací DNA vychází z pravidla reasociace ssDNA, u kterého platí, že nejrychleji se zpět do dvouvláknové formy párují sekvence, které jsou nejvíce abundantní, tedy přítomny v největším množství kopií. Číslo frakce pak koreluje s dobou reasociace. Tedy v C_{ot} -1 budou zastoupeny jen ty nejčetnější repetice, které se stihly spárovat v kratším čase, zatímco v C_{ot} -100 se reasociovaly i sekvence s menším počtem kopií. Nereasociované sekvence, tedy ty nejméně početné až unikátní, jsou po reasociaci odstraněny a nejsou tedy součástí blokovací DNA. Naopak blokovací DNA z tříděných chromozómů je připravována klasicky jako z genomové DNA např. u GISH, kde jsou zastoupeny všechny sekvence nezávisle na jejich četnosti v genomu a tato blokovací DNA pak může potlačit i případný nespecifický signál pocházející z homologních sekvencí na jiných chromozómech.

doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D

Připomínka 1: Jedna část popisuje jaderný genom rostlin. Tato část práce by podle mého názoru mohla být obsáhlejší, propracovanější a lépe osvědčující autorčinu znalost problematiky. Zarážející je absence citací u mnoha zmíněných faktů (např. str. 21 neobsahuje jedinou citaci.

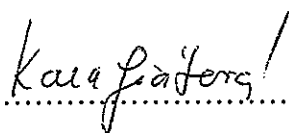
Komentář: Ano, souhlasím, že některé kapitoly v disertaci by si zasloužily dostat více prostoru, ale literární přehled je i tak v předkládané práci zastoupen na 35 stranách. S ohledem na to aby rozsah literárního přehledu neustále nenarůstal jsem se bohužel musela omezit pouze na hlavní fakta a stěžejní témata. Kvůli limitované délce úvodu nebylo tedy možné všem zajímavým a často logicky navazujícím tématům věnovat dostatečný prostor. Ze stejného důvodu nebylo možné se zabývat některou další problematikou (např. kolinearitou příbuzných genomů), která by literární přehled jistě vhodně doplnila.

Také připouštím, že v disertační práci by mělo být citací raději více než méně. Některá fakta a informace mi pravděpodobně přišla natolik základní, že jsem mylně nepovažovala za nutné je podpořit referencí.

Připomínka 2: Část 2.3 se zabývá popisem nejdůležitějších klasických i moderních cytogenetických metod. Zatímco historické exkurzy do oblastí cytogenetiky savců jsou sympatické, postrádal jsem část o přípravě hybridizačních sond vycházející z analýz next-generation dat, stejně jako obsáhlejší rozbor srovnávací cytogenetiky rostlin (srovnávací mezidruhová FISH/painting). Autorka zde ignorovala poměrně rozsáhlý počet prací z čeledí lilkovitých, brukvovitých aj.

Komentář: Souhlasím, že vzhledem k tomu, že „chromosome painting“ představuje jedno ze dvou stěžejních témat disertační práce, kapitola věnovaná této problematice mohla být delší a lépe propracovaná. Zaměřila jsem se především na původ a sekvenční podstatu paintingových sond a práce na zmiňovaných čeledích využívají stejný typ sond jako citovaná práce na *A.thaliana* (Lysák *et al.*, 2001), zástupce z čeledi bruktovitých. Nicméně komparativní mezidruhová hybridizace (CCH) je bezesporu velmi zajímavou variantou chromosome paintingu a určitě měla být v textu zmíněna. Komparativní chromosome painting (CCP) představuje velice efektní metodu studia příbuznosti druhů a evoluci jejich genomů, při které je sonda specifická pro jeden chromozóm jednoho druhu hybridizována proti genomu druhu příbuzného. Metoda je vhodná především pro studium allopolyploidních druhů s malými genomy a je velmi propracovaná zejména v rámci čeledi Brassicaceae.

V Olomouci dne 10. 9. 2014


Mgr. Miroslava Karafiátová

7

Zápis z volné diskuse obhajoby disertační práce Mgr. Miroslavy Karafiátové

prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.: „V průběhu prezentace jste zmínila, že v případě dvou cDNA sond, které jste mapovala pomocí FISH na metafázní chromozóm 7 ječmene, jste nebyla schopná jednoznačně určit jejich pořadí vůči telomeře/centromere. Jak by se dal tento problém vyřešit?“

Vzájemná poloha těchto dvou klonů by se dala určit na objektech, které poskytují vyšší rozlišení než použité metafázní či prometafázní chromozómy. To mohou být např. chromozómy pachytenní nebo DNA vlákna.

doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.: „Tak proč jste tedy k rozklíčování pozice těchto dvou low-copy sekvencí nepoužili pachytenní chromozomy?“

FISH na pachytenních chromozómech jsme s těmito dvěma sondami samozřejmě zkoušeli, ale vzhledem k velikosti genomu je problém připravit kvalitní preparát s dostatečně separovaným chromozómem, který nás zajímá. Rozvolněný chromatin pachytenních chromozómů, kde již není viditelná centromera, dále také ztěžuje identifikaci daného chromozómu a to i s použitím identifikačního markeru. Navíc, FISH na preparátech pachytenních chromozómů se vyznačuje vyšším pozadím, což je při lokalizaci krátkých jednokopiových sond problém.

doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.: „Cílem jedné části Vaší práce bylo pomocí FISH se single-copy sekvencemi zlepšit anotaci genomu ječmene v nerekombinujících oblastech v okolí centromery. Proč jsou obecně oblasti centromery hůře anotovány? Je to důsledkem přítomnosti většího počtu repetitivních sekvencí?“

Problémem je především velmi nízká četnost rekombinace v těchto oblastech a tím způsobený nedostatek molekulárních markerů, které se využívají pro ukotvení jednotlivých kontigů. Přítomnost repetit v těchto oblastech se pak odráží i v nižším zastoupení těchto úseků v BAC knihovnách, což připívá k problémům skládání fyzických map v těchto oblastech.

prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.: „V rámci studia se ti podařilo vypracovat metodiku chromosome painting pro ječmen – rostlinu s velkým genomem. Tyto metody malování chromozómů byly původně vypracovány a používány hlavně v lidském a živočišném výzkumu. Mohla bys obecně shrnout možnosti dalšího vývoje a postupu malování chromozómů u cévnatých rostlin? V jakém časovém horizontu se podaří painting aplikovat i na ostatní cévnaté rostliny?“

S ohledem na atraktivitu metody a její potenciál si myslím, že snahy o vypracování univerzálního protokolu chromosome paintingu u rostlin budou pokračovat dál. Se současnými výsledky si dokonce myslím, že se takovýto protokol opravdu podaří vytvořit, ale

7

je to otázka času, štěstí – vsadit na tu správnou strategii a hlavně peněz. Spousta projektů, které totiž nekončí úspěchem v relativně krátkém časovém horizontu, je zastavena z důvodu omezených financí. A bohužel, právě u takovýchto projektů typu chromosome paintingu je důležitá právě vytrvalost, jak vím z vlastní zkušenosti.

prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.: „Painting se využívá především pro např. komparativní a evoluční studie nebo pro studium chromozomálních změn jako např. translokace. Využívá se painting také pro kvantifikaci?“

Z mého pohledu si teď okamžitě nedovedu vybavit, co by se takto dalo kvantifikovat. Obecně se painting používá pro vizualizaci, kdy je nejdůležitější informací, kde se v interfázním jádře chromozóm nachází, jaký chromozóm je v jeho blízkosti či zda je toto rozložení neměnné mezi jednotlivými děleními. Tohle by se teoreticky kvantifikovat dalo.

Na tohle téma se rozpoutala diskuse, kde např. Fajkus řekl, že u živočichů se něco jako kvantifikace pomocí paintingu používá např. pro studium lokalizace více exprimovaných genů – ty jsou uloženy směrem do centra chromozomů/genomu, ale to je tak vše. Dají se samozřejmě kvantifikovat teritoria jednotlivých chromozomů v jádře, apod....

RNDr. Jiří Široký, CSc.: „Když to zjednoduším, tak se dá říct, že repetitivní sekvence u živočichů jsou chromozómově specifické, kdežto u rostlin jsou genomově specifické. Z toho tedy vyplývá, že u živočichů se pro painting používají repetice, ale u rostlin se k paintingu používají právě jednokopiové nebo low-copy sekvence. Což tedy bylo využito pro painting u brassicaceae, kde bylo využito znalosti celogenomové sekvence pro identifikaci vhodných BAC klonů a ty byly následně použity jako sonda pro painting.“

Tady nebyla položena otázka. Šlo pouze o komentář k diskutovanému tématu množství a typu repetice v rostlinných genomech.

doc. Mgr. Martin Lysák, Ph.D.: „V průběhu prezentace jsi zmínila, že i přes použití blokovací C₀t DNA, jsi při paintingu pozorovala nespecifický signál na ostatních chromozomech. Nemůže být tento nespecifický signál náhodou pozůstatek genomových duplikací?“

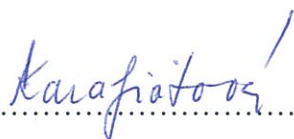
Vzhledem k tomu, že v experimentech byla využita blokovací DNA připravená z ostatních chromozomů, která by právě tyto duplikované signály měla potlačit, tak si myslíme, že nespecifický signál má jinou příčinu.

prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc.: „Bylo zmíněno, že genom ječmene obsahuje 80% repetice. Má přítomnost tak velkého počtu repetice nějaký pozitivní vliv pro rostliny a jejich přežití? Proč mají rostliny ve svých genomech tolik repetitivní DNA?“

Na tuto otázku neexistuje jednoznačná odpověď. Je to silně diskutované téma, které je stále předmětem studií. Obecně převládá názor, že valná většina těchto repetice představuje určitou balastní DNA bez výraznější funkce. Dá se ale předpokládat, že toto množství repetice umožňuje rostlině vyrovnat se lépe se stresovými podmínkami, kterým jsou denně vystavovány. Bylo popsáno, že pro některé rostliny je velký genom a tedy přítomnost

velkého procenta repetice evoluční výhodou, především vzhledem k pomalejšímu buněčnému cyklu, který hraje roli v adaptivním procesu rostlin vůči prostředí. Dále, některé repetice, především mobilní elementy hrají roli v duplikačních procesech některých genů, respektive vzhledem k možnosti jejich aktivního pohybu v genomu mohou hrát roli v míře exprese některých genů (pokud se inzertují do např. promotorových oblastí genů) a další typy repetice – tandemově organizované jsou nezbytnou součástí centromer u rostlin a telomer.

V Olomouci dne 16.9.2014


.....

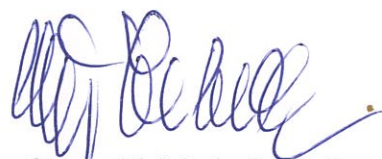
Mgr. Miroslava Karafiátová

V neveřejné části obhajoby bylo uskutečněno tajné hlasování. Z celkového počtu 12 členů komise pro obhajobu disertační práce a oponentů se hlasování zúčastnilo 10 členů. Všechny hlasy byly souhlasné. O hlasování byl proveden samostatný zápis.

Na následném veřejném závěru obhajoby oznámil prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc. doktorandce, že na základě jednání komise a v souladu s článkem 47, odst. 7 Studijního a zkušebního řádu Univerzity Palackého v Olomouci ze dne 1. července 2011 a rovněž v souladu se Směrnicí děkana PřF UP, kterou se provádí některá ustanovení Studijního a zkušebního řádu UP, obhájila disertační práci a je hodnocena klasifikačním stupněm „*prospěla*“.

Mgr. Miroslava Karfiátová podepsala prohlášení, že ji předseda komise s výsledkem obhajoby disertační práce seznámil (podle ustanovení Studijního a zkušebního řádu UP v Olomouci, část II, článek 47, odstavec 7).

Komise doporučuje, aby byl Mgr. Evě Miroslavě Karafiátové udělen akademicko-vědecký titul „doktor“ (ve zkratce Ph.D.) v souladu se zákonem č. 111/1998 Sb.



prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
předseda komise

V Olomouci dne 16. září 2014



Zapsala: Irena Vaculová