

Záznam o průběhu obhajoby

Mgr. Veronika Burešová

Botanika

Studijní obor:

Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci

Školící pracoviště:

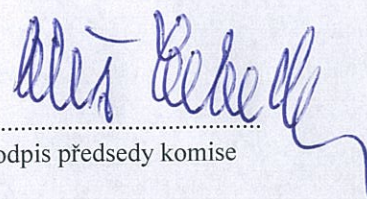
prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.

Předseda komise:

1. zahájení
2. představení životopisu uchazečky
3. představení stanoviště školícího pracoviště
4. hodnocení školitele
5. představení disertační práce uchazečkou
6. představení oponentských posudků
7. reakce uchazečky na otázky a komentáře oponentů
8. veřejná diskuse (viz samostatný zápis)
9. uzavření zpráva komise a oponentů
10. hlasování a obhájení práce (tajně)
11. vyhlášení výsledku hlasování

V Olomouci dne :

23.3.2017



podpis předsedy komise

Zápis z veřejné diskuze v průběhu obhajoby doktorské disertační práce

Mgr. Veroniky Burešové dne 23. března 2017

prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.: Jaký původ měla centromera u translokačních linií pšenice x žito? Ovlivňuje původ centromery (pšeničná či žitná) její pozici v 3D struktuře jádra u introgresních linií pšenice x žito?

Mgr. Veronika Burešová: V translokačních liniích byla část centromery žitné a část pšeničné. Vliv původu dosud neznáme.

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.: Jaká je karyotypová stabilita introgresních linií pšenice x Th. ponicum?

Mgr. Veronika Burešová: Introgresní linie nejsou úplně stabilní a je potřeba zjišťovat přítomnost introgrese u každé využívané rostliny.

prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.: Je evoluční tlak pro vznik mezidruhových hybridů?

Mgr. Veronika Burešová: Ano, evoluční tlak pro vznik mezidruhových hybridů existuje, především ve stresových podmínkách (například klimatických).

Ing. Hana Šimková, CSc.: Proč i po optimalizaci nefunguje více sond v metodě FISHIS ?

Mgr. Veronika Burešová: Bohužel se nám i přes značnou snahu a čas nepodařilo úspěšně použít více sond. Je to dáno pravděpodobně jejich malým zastoupením v genomu.

prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.: Jaká je spolupráce na projektu cytogenetické analýzy pšenic s modrým aleuronem s Mendelovou Univerzitou?

Mgr. Veronika Burešová: Projekt cytogenetické analýzy pšenic s modrým aleuronem vznikl na podnět brněnského pracoviště a pracoviště ZVÚ Kroměříž, kde se tématem modrozrnných pšenic dlouhodobě zabývají.

prof. Ing. Miroslav Strnad, DrSc.: Jakým způsobem dochází ke spuštění dráhy pro modrý aleuron, která je v běžné pšenici seté neaktivní?

Mgr. Veronika Burešová: Naše domněnka je taková, že znak pro modrý aleuron přítomný, ale neaktivní v běžné pšenici se spouští až přítomností introgrese. Vzhledem k úsekům chromatinu

detekovaným na různých chromozómech se zdá, že v introgresích je jeden či více regulačních genů, které tuto dráhu spouští.

prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.: Dochází k degradaci anthokyanů při stresových podmínkách?

Mgr. Veronika Burešová: Dle dostupných údajů z literatury se zdá, že řada anthokyanů je degradována například vysokou teplotou a dalšími změnami podmínek prostředí.

doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.: Jakým způsobem jste hodnotila experimenty s 3D strukturou jádra a jak se určuje threshold pro jaderný obal?

Mgr. Veronika Burešová: Experimenty 3D FISH jsem hodnotila ve specializovaném programu Imaris s přednastavenými prahovými hodnotami. Kalibraci jsem nepoužívala.

V Olomouci 23.3.2017



prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.

(předseda komise)

PŘIPOMÍNKY A DOTAZY OPONENTŮ

Ing. Pavel Neumann, Ph.D.

- 1) **Str. 17, obrázek 3. Schéma distribuce repetitivních sekvencí. Obecně nemám tyto modely rád, protože jsou téměř více či méně zavádějící. Na tomto konkrétním modelu mne zaujal poměr mezi rozptýlenými repeticemi a tandemovými repeticemi, přičemž většina DNA na raménkách chromozomů je podle tohoto modelu tvořena tandemovými repeticemi. Je autorce znám nějaký konkrétní druh, který by vykazoval podobnou distribuci těchto dvou typů repetitivních sekvencí?**
 - Model je skutečně zavádějící a velmi vzdálený od komplikovaného uspořádání sekvencí na rostlinném chromozomu
 - Tandemová DNA není takovým způsobem distribuována

- 2) **Str. 18, odst. 2. Přestože je rozdělení tandemových repetit pouze podle délky monomeru hojně používané, není úplně přesné. Zcela jistě může existovat satelit s monomerem kratším než 26 bp a naopak minisatelit s monomerem delším než 25 bp. Víte jaký je nejpodstatnější rozdíl mezi minisatelity a satelity? Také by mne zajímalo, z jakého pramene pochází informace, že bloky mikrosatelitů jsou dlouhé okolo 150 bp.**
 - Hlavní rozdíl mezi satelity a minisatelity: v délce monomeru a četnosti výskytu
 - Další možnosti dělení: uspořádání, četnosti výskytu, lokalizace na chromozomu, rozmanitosti sekvencí v chromozomu/mezi chromozomy, transkripční a expresní aktivity, funkce,...
 - Chaudhari et al. 2014, Liu et al. 2002

- 3) **Str. 22, řádky 4-5. Tvzení, že demethylace H3K9me2 umlčuje transkripci genů, není pravda. Předpokládám, že se jedná jen o překlep**
 - Jde o překlep, měla jsem na mysli dimethylaci histonu H3 na lysinu 9 (H3K9me2), která je důležitým epigenetickým markerem a koreluje s nízkou genovou expresí

- 4) **Str. 28, poslední věta. Tvrzení, že většina genů se nachází v chromocentrech tvořených centromerickým heterochromatinem je chybné a celá věta by měla být přeformulována.**
- Tvrzení je samozřejmě chybné, chromocentra jsou oblasti konstitutivního heterochromatinu, o němž je známo, že je vysoce kondenzovaný, transkripčně umlčený, s nízkou frekvencí výskytu genů
- 5) **Str. 45, ods. 2. V textu se píše, že metoda PRINS je oproti FISH více specifická a o kus dále, že nevýhodou PRINS je relativně vysoké pozadí. Bez uvedení dalších faktorů ovlivňující výsledky těchto dvou cytogenetických technik jsou tyto informace poněkud matoucí.**
- **PRINS:**
 - > Výhody: jednoduchá, rychlá
 - > Nevýhody: nepoužitelná pro lokalizaci různých typů DNA sekvencí
 - **FISH:**
 - > Výhody: lokalizace jakéhokoliv typu DNA sekvencí, „multimetodická“
 - > Nevýhody: časově náročnější
- 6) **Introgresní linie pšenice a pýru pontického s modrým aleuronem vykazují výrazně vyšší hladinu anthokyanů v porovnání s běžnými odrůdami pšenice. V jedné z publikací se uvádí, že obsah anthokyanů u některých druhů rostlin, např. v borůvkách, může obsahovat až 5 g v 1 kg. Možná jsem jen nepozorný čtenář, ale nikde jsem nenašel informaci o obsahu této látky u pšenice s modrým aleuronem. Jako naprostého laika by mne také zajímalo, zda se anthokyany neničí při pekařském či kuchyňském zpracování mouky.**
- **Escribano-Bailó et al. 2004:**
 - > Mouka: 20 mg/kg
 - > Šrot: 160 mg/kg
 - > Otruby: 460 mg/kg
 - Anthokyany jsou látky nestabilní, citlivé na degradaci
 - Stabilita a koncentrace anthokyanů je závislá na mnoha faktorech (struktura a koncentrace pigmentů, pH, teplotě, intenzitě světla,...)
 - Bylo prokázáno, že ze vzrůstající teplotou, pH, intenzitou světla dochází k destrukci anthokyanů obsažených v ovoci a zelenině

- Modrozmá pšenice:

- > nevýhoda: přítomnost anthokyanů v povrchové vrstvě obilky
- > velké část anthokyanů odstraněno mletím, zbytek pečením
- > přírodní barvivo potravin

Doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

- 1) **Na straně 81 je uveden abstrakt týkající se studia organizace genomu resp. organizace buněčného jádra u mezidruhových hybridů pomocí 3D FISH metody. Výsledky jsou zde uváděny jako předběžné, ovšem i vzhledem k názvu práce by bylo dobré se o nich více zmínit. Mohla by tedy studentka blíže popsat získané výsledky a v jakém stádiu se výzkum v této oblasti nachází?**

- **Předběžné výsledky:**

Hodnoty objemu jádra a délky ramen obdobné pro všechny linie ($1200-1500 \mu\text{m}^3$, $10-13 \mu\text{m}$)

Zjištěny 3 pozice žitných ramen v pšeničném jádře:

- > Ramena jsou těsně vedle sebe na jaderné periférii
- > 1 rameno je na periférii, 2. prochází středem jádra
- > Ramena jsou proti sobě na periférii jádra

- 2) **Organizace interfázního buněčného jádra je zajímavá i z pohledu rozdílů mezi uspořádáním jádra živočichů včetně člověka a uspořádáním buněčného jádra rostlin. U živočichů hraje důležitou roli v organizaci jádra i jaderná periferie včetně laminy a různých proteinových komplexů umístěných u či v jaderných membránách. Může autorka práce srovnat jaderné periferie mezi živočichy a rostlinami?**

- Jaderný obal je u živočichů a rostlin organizován obdobným způsobem
- Proteiny vnitřní a vnější jaderné membrány:

Živočichové: multiproteinový komplex LINC s doménami KASH a SUN

Rostliny: ? multiproteinový komplex? domény KASH (WIPs, WITs) a SUN (AtSUN1 + AtSUN2)

- > obě membrány se liší také chemickým složením lipidových komponent

- Proteiny jaderné laminy:

Živočichové: proteiny laminy (Lamin A, B, C,...)

Rostliny: CRWN (CRWN1-4), KAKU (KAKU4)

Doc. Mgr. Martin A. Lysák, Ph.D.

- 1) Byl jsem překvapen zjištěním, že ačkoliv se doktorandka zabývala tříděním chromozomů průtokovou cytometrií, v práci není zmínka o procesech zodpovědných za rozdílný počet chromozomů a jejich (ne) rozdílnou velikost (např. přestavby chromozomů, bimodální karyotypy, strukturální genomová diploidizace následujících po genomových duplikacích – kukuřice, válečka – když zůstaneme u trav). V závěrečné práci jsem postrádal jakoukoliv zmínku o oligo-paintingu, FISH na DNA vláknech, „natahování chromozomů“ pomocí průtokové cytometrie (a to taktně přehlížím, že některé z těchto technik jsou spojeny s pracovištěm doktorandky). Když je diskutována organizace chromozomů v interfázi a obecně malování chromozomů (chromosome painting), nechápu absenci relevantních prací na válečkách (*Brachypodium*) – pravda, není to tribus *Triticeae*.
 - Práce byla koncipována určitým způsobem a výše uvedené procesy a techniky, i přes jejich nepopiratelný význam k dané problematice, nebyly jejím primárním cílem.
- 2) Za nejproblematictější pokládám dvě části disertační práce. V první řadě jsou to strohé cíle (str. 67). Čtenáři naprosto uniká, jak byly tyto cíle stanoveny a proč bylo podstatné je řešit. Tuto výtku nelze odbýt konstatováním, že je to uvedeno v příložených publikacích. Podobně stručné jsou závěry. Z formulace druhého ze závěrů je zřejmé, že metoda FISH byla aplikována při třídění chromozomů u několika druhů trav. Jednoduše chybí diskuze, porovnání, problémy, interpretace, výzvy apod. Možná by práce měla obsahovat diskuzní část a možná by taková část měla být obligátní součástí disertačních prací.
 - Souhlasím, že zavedený koncept není úplně vhodný a že by disertační práce měla mít jasněji stanovenou formu. Svoji disertační práci jsem však koncipovala na základě konceptu několika předešlých disertačních prací, které jsou takovýmto způsobem strukturované.
- 3) Ačkoliv využití přístupu FISH bylo klíčové pro všechny publikované studie, ani v jedné z publikací není popsána optimalizace (v rozporu s cílem práce). O to víc zaráží absence rozsáhlejšího závěru a diskuze alespoň k tomuto cíli práce. Takto práce navozují dojem, že doktorandka pouze aplikovala již etablovanou metodiku.

Možná by tyto optimalizace mohly být diskutovány v rámci obhajoby disertační práce.

- Synchronizace BC příprava chromozomové suspenze:
 - dle protokolu společného pro obě laboratoře
 - zvýšení koncentrace chromozomů v suspenzi
 - DNA sondy:
 - zvýšení koncentrace
 - testována široká škála synteticky připravených oligonukleotidů (Sigma-Aldrich: FITC, Cy3; způsoby značení: oba konce sondy, jednotlivé nukleotidy)
 - Alkalická denaturace: zkrácení času (z 20 na 15 minut)
 - Hybridizace: zkrácení času (z 2 na 1 hodinu)
 - Třídění chromozomů: jednoznačná dvouparametrická analýza → nebylo nutné dále měnit podmínky
 - Technika byla zkoušena na vybraných druzích z rodů: *Triticum*, *Aegilops*, *Hordeum*, *Agropyron*, *Silene*, *Festulolium*,...
- 4) **Z předložené disertace si oponent může udělat jen mlhavý obrázek o vědeckém potencionálu uchazečky, zvláště když všechny předložené práce jsou kolektivního charakteru. Není také zcela zřejmé, jakým dílem se Veronika podílela na vzniklých publikacích?**
- Na předložených publikacích jsem se podílela metodicky (FISHIS bylo nutné pro každý projekt zoptimalizovat) a následně rutinní prací v délce několika měsíců/projekt. Třídění chromozomů prováděl Mgr. Jan Vrána, PhD. Značení chromozomů v suspenzi bylo prováděno pouze naší laboratoří.
 - Podílela jsem se na psaní metodiky a čtení manuskriptů