

Posudek

Téma disertační práce :

Role bZip transkripčních faktorů v samčím gametofytu

Arabidopsis thaliana

Doktorand: Mgr. Antónia Gibalová

Školitel: Doc. David Honys Ph.D.

Posuzovatel: **RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.**

Téma disertační práce doktorandky Mgr. Antónie Gibalové je velice aktuální, jelikož přispívá k vědeckému poznání regulace vývoje pylu a ze širšího hlediska samčí gametogeneze. Předložená práce je stále jednou z mála týkajících se analýzy této regulace, i když se jedná o modelový objekt *A. thaliana*, což ukazuje na komplexnost i komplikovanost podobných analýz. Práce je napsána velice přehledně na 146 stranách textu včetně ilustrací a obsahuje úvod (13 stran) dobře shrnující současné poznatky v uvedené oblasti rostlinné fyziologie a molekulární genetiky, jasné a stručné vymezení cílů práce. Následují výsledky ve třech hlavních kapitolách, jež se týkají selekce analyzovaných genů, jejich funkčních charakteristik a identifikace části sítě analyzované regulace. Výsledky jsou přehledně komentovány na 17 stranách. Na 11 stranách jsou stručně shrnuty metodické přístupy. V kapitole 6 jsou presentovány závěry práce a jsou adekvátní získaným poznatkům; použitá obsáhlá literatura je citována na 16 stranách a zahrnuje recentní práce. Disertační práce je podložena dvěma vyšlými publikacemi v renomovaných časopisech *Plant Molecular Biology* a *Plant Cell Environment* a jedním manuskriptem zaslaným do tisku do redakce *Journal of Experimental Botany*. Na dvou titulech je paní doktorandka jako první autor. Presentované disertaci se z formálního hlediska nedá nic podstatného vytknout, odhalené drobné překlepy jako na str. 23 nebo 113 nesnižují obsah ani formální úpravu práce, velice pekně ilustrované barevnými ilustracemi z elektronové mikroskopie, histologických či mikročipových analýz.

Bezesporu autorka práce velice dobře využila metodické přístupy na školícím pracovišti k vlastní analýze jako rozborů microarray, RT PCR pro kvantifikaci exprese a dále pak *in vivo* analýzy, zejména pomocí transgenozy a genetických studií ke zjištění tkáňové specificity sledovaných transkripčních faktorů, jejich vlivu na rostlinný metabolismus i vitalitu pylu během overexprese zkoumaných TFs. V neposlední řadě práce využívá metody pro analýzu

protein-proteinových interakcí. Výsledkem práce je potvrzení důležitosti dvou hlavních sledovaných transkripčních faktorů (TFs) bZIP34 a bZIP18 pro vývoj pylu, například bezprostředního vlivu bZIP34 na formování pylové exiny a podobně. Některé závěry například o redundanci TFs potvrzují obecné pravidlo, jiné například o jaderné a cytoplasmatické lokalizaci AtbZIP18 fúzované s GFP v ER lze považovat za unikátnější i s hlediska základního výzkumu. Za důležitý závěr, ke kterému autoři dospěli považují úlohu protein/proteinového poměru nebo balancu pro vlastní regulaci metabolických procesů v návaznosti na dimerizaci charakteristickou pro tento typ TF.

V souvislosti se zjištěnými poznatky se nabízí několik obecných i specifických otázek v rámci obhajoby práce:

1. Disertace prakticky nezahrnuje nebo nemanipuluje s poznatky, které by zahrnovaly srovnávací evoluční charakteristiky např. presentované pomocí „trees“ zahrnujících homologické TFs těchto dvou hlavních zkoumaných faktorů, přitom dnes jsou již dostupné genomové údaje a analýzy transkriptomu u celé řady rostlinných druhů. Doporučuji v rámci obhajoby presentovat minimální základní přehled např. formou tree o příbuzných proteinech u různých druhů pakliže jsou dostupné, případně i poznatky z předešlých publikací autorského kolektivu školicího pracoviště, vč. známých funkcí. Nehledě na fakt, že přednětem výzkumu je hlavně vývoj gametofytu, recentní poznatky by mohly rozšířit specifické znalosti o zkoumaných TFs vč. různých interakcí. Kromě toho jedním ze závěrů práce je exprese uvedených bZIP i v somatických pletivech.
2. Nelze si nevšimnout, že v rámci provedených experimentů existují určité diskrepance v expresi TFs podle zvolené metody. Například GUS analýza promotorové aktivity odhalila nižší tkáňovou specifitu než jiné kvantifikace např. na úrovni RNA. Nabízí se otázka, zda se použité konstrukty přece jen neliší v této specifitě například změnami 5' degradomu oproti nativním sekvencím díky specifickým mikroRNA, jejichž cílová místa jsou často lokalizována v 3'UTR nativní mRNA. Mohl by GUS stabilizovat fúzní mRNA nebo naopak destabilizovat? Jsou popsány nebo lze predigovat nějaké mikroRNA, které by mohly specificky regulovat zkoumané transkripční faktory v somatických pletivech či u pylu nebo v průběhu gametogeneze?
3. Aniž by se to dalo práci vytýkat jako seriózní nedostatek, je faktem, že posuzovaná práce postrádá podrobnou charakteristiku (alespoň tyto bioinformatické analýzy nejsou podle mne jasně, například graficky presentovány) promotorových cis-elementů,

například u obou promotorů v rámci cca 1 kb klonovaných a manipulovaných 5' upstream sekvencí. Přitom by bylo v návaznosti na zkoumanou expresi uvedených bZIP genů v pylu tyto poznatky diskutovat. Je zjevné, že tato exprese bude ovlivněna jinými TFs v rámci širšího networku, o kterých lze soudit již na základě predikce cis elementů. Dle mého názoru by kompozici uvedených promotorů (tj. promotorů studovaných bZIP TFs) bylo vhodné prezentovat při obhajobě např. po predikci dostupnými programy nebo i s využitím již publikovaných údajů z dřívějších prací mateřského pracoviště a podobně. Je zde dle promotorových analýz pravděpodobnost, že při expresi studovaných bZIP TFs hrají roli i jiné případně nějaké unikátní transkripční faktory? Vhodnost komplexní analýzy se týká i vlastních cílových cis elementů na cílových genech studovaných faktorů bZIP34 a bZIP18 i když práce poukazuje, že tyto analýzy budou provedeny v budoucnu. Je něco známo například o boxech, G-boxech, jejich kompozicích v případě homo a heterodimerů? Existuje nějaký typický příklad konkrétní kompozice (sekvence) promotoru (cis elementů atd.) z pylově-specifických či částečně pylově specifických genů, jejichž exprese může být ovlivněna studovanými TFs, jež by například vedla k pozorovaným aberacím pylu? Podle mého názoru na této úrovni by mohla být zakódována specificita determinující pozorované překvapivé difference u homo- a heterozygót.

Předloženou disertační práci doktorandky Mgr. A. Gibalové považuji za koncepčně ucelenou, umožňující jednoznačné závěry a jako oponent ji plně doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 20.12. 2015

RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.