



Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky
RNDr. Aleš Kovařík, CSc, Královopolská 135, 612 65 Brno,
Czech Republic, tel.: 541 517 178, e-mail: kovarik@ibp.cz

Oponentský posudek na disertační práci “Variabilita exprese a umlčování transgenů v rostlinách bramboru a v buněčné linii tabáku BY-2“

Autor: Mgr. Eva Nocarová

Pracoviště: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Vývoj a používání geneticky modifikovaných organismů zaznamenaly v uplynulých letech značný nárůst. Zdá se, že nejen vysoké výtěžky genového produktu, nýbrž i stabilita a možnost regulace exprese transgenů jsou důležitými parametry pro posouzení praktické využitelnosti příslušné modifikace. Rostlinné transgeny často oproti teoretickým předpokladům vykazují sníženou expresi v důsledku epigenetických změn, což negativně ovlivňuje aplikaci geneticky modifikovaných rostlin v zemědělství. Cílem předkládané disertace bylo řešit otázku genetické a epigenetické stability transgenních lokusů u bramboru a tabáku. Práce je rozdělena na tři vzájemně navazující části, které odrážejí dílčí etapy výzkumu a publikační výstupy.

V první části se autorka věnovala studiu exprese transgenů v suspenzní kultuře *Nicotiana tabacum*. Výsledky této studie ukazují na variabilitu v expresi transgenů DNA po transformaci zapříčiněnou genetickými a epigenetickými faktory, která může být z větší části odstraněna klonovací procedurou. V ojedinělých případech se variabilitu odstranit nepodařilo. Poznatky mají praktický význam vzhledem k častému používání suspenzní linie pro fyziologická a molekulární studia. Cenný je i nový metodický přístup ke klonování rostlinných buněk *in vitro*. Výsledky doktorandka publikovala jako prvotorskou práci v kvalitním časopise *BMC Plant Biology*.

V další části byla studována dlouhodobá stabilita exprese reportérových genů v transgenních rostlinách *Solanum tuberosum*. Bylo zjištěno, že v průběhu vegetativního pěstování rostlin dochází u některých linií ke změnám v epigenetickém stavu transgenů vedoucím k umlčení exprese. Byla postulována nová hypotéza o koordinovaném umlčování genů, kdy v transgenním lokusu nesoucím dva protein kódující geny se jeden z obou genů přednostně umlčuje v časně fázi, zatímco druhý gen zůstává dlouhou dobu aktivní a k jeho umlčení dojde teprve až po delší časové prodlevě.

Konečně třetí část disertace pojednává o účinku hypometylační látky 5-azacytidinu na reaktivaci umlčených lokusů a o biologické stabilitě. Při porovnání s předcházejícím dvěma studii se mi zdá tato část nejméně originální, nicméně poznatky o biologické stabilitě zasluhují publikaci v některém méně impaktovaném časopise.

K práci mám následující připomínky

1. Postrádám obšírnější úvod do problematiky. Literární přehled je zpracován na necelých dvou stranách textu. Obsahuje směs kusých formulací a vět vytržených z kontextu s odkazy na články typu review. Čtenář pracující mimo speciální oblast rostlinné epigenetiky pak může být zmaten a odložit další čtení jako nezajímavé. Mnoho důležitých pojmů jako jsou transkripční a posttranskripční umlčování nejsou pak vysvětleny vůbec. Zdá se mi, že by náročná problematika jakou transgenozu bezesporu je, zasluhovala větší pozornost a širší literární rozbor. Například samotná fráze “transgene silencing plant” generuje v databázi WOS téměř 400 odkazů, fráze “DNA methylation plant” pak přes 1300 odkazů. Poněkud

odbytý literární přehled budí dojem nepříliš dobré znalosti řešené problematiky a orientace v literatuře, což však může být mylný dojem soudě podle dosažených výsledků, množství odvedené kvalitní práce a publikací v kvalitních časopisech.

2. Obvyklá část, Materiál a metody, není zařazena vůbec. Není samozřejmě nutné popisovat dobře zavedené laboratorní metody, avšak vzhledem tomu, že se v úvodu na str. 2 praví, že “byly zavedeny nové metody studia transgenních rostlin“, očekával bych podrobnější popis těchto nových metod. Při obhajobě by autorka měla zmínit, o které metody se jednalo a jaká je jejich výhoda oproti metodám stávajícím. Rovněž klíčová publikace o klonování buněk BY-2 má metodický charakter. Zde by si zasloužil podrobnější popis pracovní postup při transformaci buněk, klonování, analýzy exprese genu GFP, nejlépe vše v samostatné stati. Detailní popis metodických postupů je důležitým zdrojem informací pro další generace studentů.

Str. 1 – Je siRNA skutečně jednovláknová molekula? Je známo, že vzniká endonukleotickým štěpením doublestrandové RNA. Prosim o vysvětlení.

Samotná výsledková část je nejzdařilejší částí disertace. Experimenty jsou pečlivě plánovány i provedeny, což je jistě i zásluha kvalitního vedení a odborné úrovně řešitelského kolektivu. Elegantní je rovněž detekční systém pro expresi transgenní DNA využívající fluorescenční genový produkt, GFP. Výsledková data jsou většinou obsažena v publikacích jako tabulky, grafy a obrázky gelů. K vlastním výsledkům, které již byly publikovány nebo jsou v recenzním řízení si dovoluji uvést několik následujících připomínek, které by mohly autorům pomoci při konečné úpravě manuskriptů.

3. Na straně 6 postrádám schéma s mapou transgenní kazety. Není rovněž zřejmé, jakým promotorem byla řízena exprese genů NPTII a GFP. Informace je důležitá proto, že je známo, že promotor je právě klíčovou oblastí genu odpovědný za transkripční a možná i posttranskripční silencing. Mapu postrádám i v manuskriptu “Coordinate silencing...“. Při obhajobě by měl být promítnuto schéma s restriční mapou obsahující štěpná místa pro klíčové restriktázy.

4. Na straně 18, v části 5.2, nabýváme dojmu, že umlčování je charakteristickým rysem transgenních linií brambor. Avšak náhled do dat na straně 26, **přílohy 2** odhaluje, že k umlčování dochází jen asi u 25% linií. Tento fakt by měl být zohledněn i v abstraktu zmíněného článku v příloze 2.

5. Příloha 1, str. 5. Genetická heterogenita po primárním klonování se objevila u dvou linií 1/3 a 1/7. Interpretace, jako několikanásobná transformace buňky v průběhu jednoho buněčného cyklu mi připadá spekulativní a málo pravděpodobná vzhledem k obecně známé nízké účinnosti přenosu T-DNA do buňky a k relativně krátkému časovému intervalu S a G2 fáze buněčného cyklu. Jako pravděpodobnější se mi jeví možnost, že v průběhu klonovací procedury nedošlo ke správné separaci buněk pocházejících z různých klonů pravděpodobně v důsledku agregace řetězců. Tvorba aglomerátů v suspenzní kultuře BY-2 je zcela běžným jevem. Aglomeráty buněk lze z části odstranit protoplastováním, které však v pracovním postupu zařazeno nebylo.

6. Příloha 2

str. 20. Obr. 1. V případě, kdy autoři vybírají do obrázku jen výsledky reprezentantů, měli by se pokusit vybrat jen ty nesporné, dobře viditelné případy (př: R30, tvrdí, že obsahuje 6 T-DNA, já v jednom běhu vidím dobře 4 a v druhém možná 8.... Podobná situace u R31, R22, R18 a R17)

Str 4 řádek 12, Depicker et al., 1993 není v seznamu literatury

str.8 řádek 10, citace Salinovich and Montelaro 1986 není v seznamu literatury

str. 14, řádek 12, v práci Fojtové se jednalo o NPTII-silencing nikoliv GFP-silencing

7. Příloha 3

5-azacytidin je triviální název a bylo by zapotřebí v disertační práci uvést alepoň jednou název systematický, například 1- β -D-ribofuranosyl-5-azacytosin. Proč nebyl v experimentech použit například 5-Aza-2'-Deoxycytidine, který se neinkorporuje od RNA a je méně toxický?

V manuskriptu 3 je jako jeden z hlavních výsledků uvedena studie biologické stability 5-azacytidinu v médiu. Zajímalo by mne, zda je něco známo o příčinách lability této látky. Jedná se snad o hydrolýzu? Pokud ano, koreluje chemický poločas rozpadu s biologickým? V článku by uvažované mechanismy nestability měly být diskutovány.

Diskuse

Str. 16. Odst. 1, závěr. Integrační místa nebyla mapována, proto nelze s jistotou tvrdit, že ustanovení epigenetických stavů T-DNA je nezávislé na chromozomálním prostředí.

Str. 17.a 20. Líbí se mi myšlenkový konstrukt, prostřednictvím kterého autorka vysvětluje "záhadné" chování transgenů u některých liniích v průběhu dlouhodobé kultivace rostlin. Snad jen lze namítnout, že "pravděpodobný mechanismus tkví v silné transkripci" asi nebude jediným a hlavním zdrojem epigenetické nestability. Z výsledků na str. 26 vyplývá, že některé linie s vysokou expresí GFP zůstávají po dlouhou dobu stabilní. Pravděpodobnější iniciátorem by mohla být kombinace neobvyklé struktury transgenní inserce (např. přímá nebo inverzní repetece) a počáteční vysoká transkripce iniciovaná promotorem 35S.

Dále není zřejmé, jak šíření umlčovacích signálů (bod 2) po rostlině (tzv. systémový silencing) souvisí s koordinovaným umlčováním transgenů v jednom lokusu. Je známo, že krátké RNA, které se podílejí na úpravě chromatinu jsou odlišné od RNA molekul zprostředkávající systémový silencing.

Zajímalo by mne, zda-li autorka uvažuje o možnosti experimentálního potvrzení pracovní hypotézy. Z možných přístupů mně napadá kvantitativní stanovení genového produktu metodou qPCR, analýza metylace promotorů metodou hydrogenišřičitanového sekvenování, analýza krátkých molekul RNA.

Závěr

Disertační práce Mgr. Evy Nocarové obsahuje řadu kvalitních originálních poznatků, které byly nebo budou v budoucnu publikovány. Výsledky významně přispěly do mozaiky našich poznatků o epigenetických mechanismech řízení genové exprese. Lze konstatovat, že doktorandka se zhostila vytyčených úkolů na výbornou.

Práci doporučuji k obhajobě

V Brně, dne 5. července, 2010

Aleš Kovařík

Vážená paní Magdalena Čuříková

Odd. doktorandského studia PŘF UK,

Albertov 6,

128 43 Praha 2