



INSTITUTE OF BIOPHYSICS ACADEMY OF SCIENCES
Aleš Kovářík, PhD
Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic
tel.: 541 517 178
fax: 541 211 293
e-mail: kovarik@ibp.cz

Oponentský posudek na disertační práci "Studium mechanizmů RNAi v tabákové buněčné linii BY-2 a rostlinách lilku bramboru"

Autor: RNDr Dimitrij Tyč

Pracoviště: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Obecná charakteristika dizertační práce

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 však 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 úlohu RNA interference v regulaci exprese transgenních lokusů u bramboru a tabáku. Práce je rozdělena na tři vzájemně navazující části, které odráží dílčí etapy výzkumu a publikační výstupy. Téma disertace je vysoko aktuální, vhodně zadáne a odráží dlouholetou tradici kvalitního výzkumu prováděného v laboratoři školitele.

Publikační aktivita uchazeče o PhD je na velmi dobré úrovni. Je autorem jedné prvoautorské a jedné spoluautorské publikace v kvalitních odborných časopisech. Během své práce uchazeče zvládl celou řadu náročných laboratorních technik, jako jsou například příprava binárních vektorů pro transgenózu, fluorescenční mikroskopie, kvantitativní RT-PCR nebo metylační bisulfitová analýza. Byl rovněž hlavním řešitelem projektu GA UK v letech 2013-2015.

Specifické připomínky

1. Úvod.

Str. 14. Věta "20-22 nt miRNAs made mainly by DCL1 and heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs) formed by DCL3 activity." Mělo by být uvedeno, že heterochromatické siRNA jsou zpravidla délky 23-24 nt.

Str. 18. "...chromatin is a nucleosome, DNA segment wrapped around a core of eight histone proteins.". Přesněji "...core composed of dimers of four histone proteins".

Str. 18. Mělo by být uvedeno, že stupně modifikace jednotlivých amino kyselin jsou epigenetickým znakem. Například pro řízenou metylaci DNA je důležitá dimetylace lysinu v pozici 9 histonu H3 (H3K9me2). Monometylace není z hlediska heterochromatizace důležitá. Podobně aktivátorovou značkou je trimetylace lysinu v pozici 4 histonu H3 (H3K4me3).

Str. 19. Věty "Genome-wide analysis of DNA methylation in *A. thaliana* using the bisulphite-illumina sequencing revealed overall levels of 24% CG.." Za ní následuje věta "Major part of CG sites is highly methylated (80-100 %) or unmethylated...". Není zcela zřejmé, jak se z 24% stane 80-100%.

Str. 13. Autor zde popisuje historický vývoj směřující k objevu RNA interference. Správně poukazuje na skutečnost, že výzkum na rostlinách, především pak práce z laboratoří R. Jorgensena, manželů Matzkeových a Davida Baulcomba předznamenal a do značné míry i umožnil objev RNAi u hlístice *Caenorhabditis*, za který byla udělena Nobelova cena. Lze polemizovat o tom, zda by si i tito rostlinní biologové Nobelovu cenu nezasloužili. Zajímalo by mne autorův názor na věc.

2. Metody

Str. 34. sRNA analysis. Otázka: Je RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) skutečně vhodný pro extrakci krátkých RNA? Z našich zkušeností plyne, že na kolonce, která je součástí procedury purifikace RNA dochází k výrazným ztrátám krátké RNA frakce. Uvedený kit je především designovaný pro isolaci mRNA a jiných delších molekul a není vhodný pro isolaci krátkých molekul RNA, což je uvedeno i v manuálu.

Str. 35. Preparation of sRNA solution for BY-2 treatment. Chybí bližší charakteristika frakce RNA, která byla použita pro BY-2 treatment. Například, mohl být fotograficky dokumentován elektroforetický profil frakce "enriched for low molecular weight (LMW) RNA fraction by 20% (w/v) PEG 8000 and 2M NaCl precipitation".

3. Výsledky

Str. 39, bod "Transient 10µM AzaC treatment of *S. tuberosum* leaf segments during *de novo* regeneration gave rise to plants with restored expression of previously silenced transgenes at the whole plant level.

Otázka: Byla studována meiotická stabilita reaktivovaných transgenů po působení 5-AzaC? Informace by byla užitečná z hlediska využití 5-AzaC aktivátoru v šlechtitelských programech. Je známo, že meloza, gametogeneze a procesy v rané zygotě navozují epigenetické reprogramování genomu.

Str. 39, bod "De novo regeneration of *S. tuberosum* plants from leaf segments could trigger transgene silencing and thus this procedure might be used to test susceptibility of transgenic plants to spontaneous silencing".

Otázka: Má uvedené pozorování obecnou platnost nebo je regeneraci-indukovaný silencing omezen jen na určité transgenní lokusy například s charakteristickou genomickou organizací?

Str. 40. Název práce: "Unexpected variations in posttranscriptional gene silencing...". Proč neočekávaná variabilita? Myslím, že název práce slibuje poněkud více než ukazují výsledky. V experimentech byly použity různé konstrukty vykazující různou účinnost umlčování. Nejvyšší účinnost vykazovaly konstrukty s obrácenou repeticí (IR), což je známá mnohokrát ověřená zkušenosť – viz například práce z konce 90. let z laboratoří A. Depicker (Mol Gen Genet 2000, 263:995-1002, doi: 10.1007/pl00008700) nebo J. Kootera (Plant Mol Biol. 2000, 43:243-60. doi: 10.1023/a:1006491613768).

Supplement 10.6. obr. 1. Myslím, že není zcela přesné nazývat konstrukt pER8-IR invertovanou repeticí. Jedná se o typický vlásenkový (hairpin) konstrukt, který obsahuje jen malou část jako obrácenou sekvenci (<1 kb z celkových >5 kb). Navíc jsou invertované GFP geny odděleny relativně dlouhým mezerníkem, přičemž druhá kopie GFP neobsahuje promotor. Ke konvergované transkripcii tak patrně nedochází na rozdíl od invertované repetice T-DNA. Bylo by proto na tomto místě správnější konstrukt pojmenovat jako pER-HP (hairpin).

Supplement 10.6 obr. 2. V experimentu chybí kontrola, tj. netransformovaný kalus nesoucí akceptorový GFP lokus vystavený působení estradiolu.

Supplement 10.6. Věta "The silencing maintenance was unlikely caused by promoter leakiness because in all analyzed lines the silencer transcript levels at day 35 were lower than the background levels". Avšak dále se píše, že "...maintenance of silencing in the UT3 line was accompanied by the continual presence of sRNAs". Tudíž v rozporu s první větou daný silencer konstrukt produkuje transkripty (GFP transkripty silencera a akceptoru nelze jednoznačně odlišit). Transkripce je však v tomto případě patrně řízená jiným promotorem než je pIND. Skutečnost, že linie UT3 vykazuje metylaci DNA ještě před indukcí podporuje hypotézu, že se jedná o rearanžovaný a inherentně epigeneticky nestabilní lokus. Nekanonická iniciace transkripce z endogenního nebo i transgenního promotoru je zde tudíž očekávaná.

Str. 56. Věta "...absence of mutant lines and genome instability; Kovarik et al., 2012, not later confirmed by Srba et al., 2016)". Mohl by autor, prosím, vysvětlit, v čem spočívá rozpor mezi oběma publikacemi.

Str. 58, Fig.4.4.4b Pictures of tobacco BY2. Je evidentní, že v přítomnosti estradiolu dochází k vyhasínání exprese reporterového genu. Není tudíž pochyb o tom, že silencer konstrukty v transgenních buňkách BY2 fungují. Na tomto místě oceňuji úsilí spojené s přípravou důmyslných vektorů, které jistě zabraly autorovi hodně času. Pozoruj však, že i v kontrolních buňkách neovlivněných estradiolem jsou buňky, které vykazují nízkou fluorescenci. Může to být způsobeno tím, že promotor induktoru je "leaky", anebo že se v linií BY-2 projevuje genetická a epigenetická variabilita. Prosím o Váš názor.

Str. 65. Protoplasts were prepared from three different lines (GRED213, GRSA33 and GRCE1) and treated with sRNA solution...

Otázka: Jaká byla účinnost protoplastování? Obvykle jen male procento BY-2 buněk je plně protoplastováno a tvoří typické sférické buňky. Většina buněk má jen parciálně natravenou buněčnou stěnu. Ptám se, zda tato heterogenita nemůže ovlivňovat interpretaci výsledků. Dále pak, byla exprese transgenů analysována v protoplastových klonech nebo ve směsi buněk? Analýza klonů by mohla být přesnější.

Pro studium mechanismu transportu a šíření siRNA by možná bylo lepší použít *in vitro* syntetizované molekuly siRNA (jedno nebo dvouvláknové) než izolovanou RNA frakci z buněk. Je totiž známo, že množství lokus specifických-siRNA je v celkové RNA poměrně malé a jen velmi těžko kvantifikovatelné (největší díl patří ribosomálním RNA). Navíc nelze vyloučit, že nadbytek nespecifické RNA nezpůsobí v buňce pleiotropní efekty. Syntéza 21-25 nt RNA formou zakázky není v dnešní době finančně i technicky náročná.

Formální nedostatky nejsou v práci téma žádné:

Str. 35. „..To create“ – chybí mezera

Zkratka „RNAi“ by mohla být rozepsána, t.j. „RNA interference“, v názvu práce.

Závěr

Disertační práce RNDr Dimitrije Tyče obsahuje řadu kvalitních originálních poznatků, které významně přispěly do mozaiky našich poznatků o RNA interferenci u rostlin. Po stránce objemu vykonané práce, množství dat i publikací práce převyšuje celostátní průměr v daném oboru. Lze uzavřít, že se doktorand zhodil vytyčených úkolů na výbornou.

Práci doporučují k obhajobě

V Brně, dne 14. července, 2020

Aleš Kovařík