



Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

V Praze dne 31.8.2010

Posudek na dizertační práci RNDr Evy Nocarové:

Název práce: Variabilita exprese a umlčování transgene v rostlinách bramboru a v buněčné linii tabáku BY-2

Práce sestává ze stručného shrnutí řešené problematiky a nejdůležitějších výsledků v tradičním členění (Literární přehled, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuse atd..) o celkovém rozsahu 25 stran a přílohy, která je tvořena třemi původními vědeckými publikacemi, z nichž jedna byla publikována v roce 2009 v BMC Plant Biology, jedna další byla přijata do Annals of Botany a jedna zaslána tamtéž .

Předkládaná práce se věnuje velmi zajímavé problematice epigenetických změn v expresi rostlinných genů. Přes svoji relativní stručnost je práce poměrně rozsáhlá ať co se týče rozsahu použitých metodik tak i prezentovaných výsledků.

První část práce se zabývá heterogenitou exprese reportérového genu GFP v populaci transgenních tabákových protoplastů BY-2. Pro snížení pozorované heterogenity studentka zavedla novou unikátní metodiku pro vytvoření klonálních linií. Tím se povedlo u některých linií snížit heterogenitu danou geneticky, tj tím, že některé linie byly ve skutečnosti několika geneticky nezávislými populacemi. Nicméně u některých linií nebyla ani tímto postupem odstraněna heterogenita exprese GFP, přestože byly buňky geneticky identické. Byla prokázáno, že tato heterogenita je do značné míry způsobena methylací DNA v oblasti transgenu. Umlčování exprese reportérových genů bylo pozorováno přednostně u linií s větším počtem inzercí.

V druhé části se studentka zabývá dlouhodobými změnami v expresi reportérových genů na úrovni celých rostlin a to vegetativně propagovaných rostlin bramboru. Práce je unikátní v tom, že rostliny byly sledovány po relativně velmi dlouhou dobu 4,5 let, tedy déle než bývají délky standardních grantových projektů, ve kterých se zpravidla tzv. dlouhodobé sledování provádí. Bylo zjištěno, že k umlčování exprese může docházet i po velmi dlouhé době několika let. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že v tomto systému umlčení exprese genu GFP vždy předcházelo umlčení genu NPT II a nikdy tomu nebylo naopak.

Pravděpodobnou příčinou tohoto jevu je, že velmi silná exprese GFP řízená promotorem 35S vede v některých buňkách nejprve ke vzniku aberantních mRNA a ty poté ke vzniku systémového PTGS. Ten je pak zatím neznámým mechanismem zodpovědný za methylaci genomové DNA genu pro GFP, která se následně rozšíří i na nepříliš vzdálený gen NPTII. Dalším unikátním výsledkem práce je metodika získání rostlin bramboru s obnovenou expresí

transgenů pomocí 5-azacytidinu. Tyto rostliny mohou být vynikajícím materiálem pro další sledování mechanismu methylace genomové DNA.

K práci mám jenom několik drobných připomínek

- v poslední přiložené publikaci je 5 strana bílá, nicméně se nezdá, že by část textu chyběla
- Southern blot na straně 20 poslední publikace - zajímalo by mne, zda byl v některém z blotů jako kontrola použit samotný plasmid, aby se vyloučila přítomnost použitého agrobacteria, které podle některých studií může v rostlinách přežívat.
- z obrázků 3 a 4 (strana 22 a 23 poslední publikace) se zdá, že u linie R24 došlo k umlčení genu pro GFP, zatímco podle tabulky na straně 26 tato linie umlčená nebyla. Předpokládám, že je to dáno sníženým kontrastem na přiloženém obrázku, nebo je důvod jiný?

Kromě toho bych si dovilil vznést i následující dotaz, pokud nebude již vysvětlen v rámci úvodní přednášky -

V práci je navržen velmi zajímavý model dědičného umlčování částí genomu, podle kterého dojde nejprve k vzniku aberantní mRNA, zřejmě v důsledku neobvykle silné genové exprese, ta vede k vzniku dvouvláknové RNA a následně k PTGS. Postranskripční umlčování se ve formě siRNA signálu systémově šíří rostlinou a pak zřejmě nějakým zatím neznámým způsobem ovlivní metylaci homologního genu. Jde velmi významný proces regulace genové exprese a o jeho objasnění se jistě pokouší nejedna skupina ve světě. Zajímalo by mne, zda bude výzkum na objasnění tohoto mechanismu pokračovat a případně jakým způsobem.

Doporučuji tímto práci Evy Nocarové k obhajobě.

S přátelským pozdravem

Tomáš Moravec

Ústav Experimentální Botaniky AV ČR

Na Karlovce 1a

Praha 6

160 00