

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Davida Chába

Identifikace a studium exprese genů účastnících se kvetení u modelové rostliny merlík červený (*Chenopodium rubrum*)

Předložená práce se zabývá studiem tří vybraných homologů genů CONSTANS (CO), FLOWERING LOCUS T (FT) a FLORICAULA/LEAFY (FLO/LFY) u merlíku červeného. Tyto geny byly v předchozích letech identifikovány pomocí mutagenese především na modelu fakultativní fotoperiodické rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). Až do nedávné doby se naše poznatky v oblasti molekulárních a genetických mechanismů fotoperiodické indukce kvetení rostlin, opírali právě jen o genomicky popsané modelové druhy. Na druhé straně existuje bohatství poznatků z oblasti experimentální fyziologie rostlin, získaných na rozmanitých druzích rostlin. Jedním z nich, na kterých česká fyziologie rostlin získala své renomé v oblasti studia fotoperiodismu, je právě merlík červený (*Chenopodium rubrum*), zástupce krátkodenních, ale i dlouhodenních rostlin. Skupina, ve které Mgr. D.Cháb pracoval v rámci své disertační práce, se zabývá právě objasněním molekulárních mechanismů, s využitím specifického ekotypu 374, kde pouhá jediná perioda 12h tmy ve stáří semenáčků jen 4-5 dnů, vede k nastartování programu vedoucího ke kvetení. Vybrané geny představují tři klíčové aktéry fotoperiodické dráhy, gen CONSTANS integrující vnitřní hodiny a vnější signály, jím přímo regulovaný gen FT, jímž kódovaný protein byl velmi nedávno identifikovaný jako dlouho hledaný mobilní signál/stimulus-florigen, a konečně gen LEAFY, který integruje vstupy i z dalších drah navozujících kvetení (vernalizace, gibereliny regulovanou a autonomní dráhu), jehož exprese pak již rozhoduje o identitě vrcholového meristému a vede k založení květenství - květů.

Přestože dnes již díky pokrokům technik a genomických poznatků není problémem identifikovat zvolené homologní geny ve studovaném organismu (**cíl 1 předložené práce**), mnohem větší úsilí je třeba věnovat průkazu jejich funkčnosti, ortologie. Zde je potřeba jednak pečlivé studium jejich exprese během normálního vývoje i manipulovaných experimentálních podmínek (**cíl 2 předložené práce**). Potvrzením funkčnosti je pak klasická genetická komplementace mutanty s vyrazeným genem a to i v případě odlišného organismu (**cíl 3 předložené práce**). Jelikož dosti často jsme v oblasti biologie konfrontováni s fylogenetickým, popř. evolučním kontextem, ani autor není výjimkou. Pokusil se o využití nekódujících oblastí, intronů studovaných genů objasnit právě fylogenetické vztahy v rámci rodu *Chenopodium* (**cíl 4 předložené práce**).

Předložená práce je poměrně rozsáhlá, nicméně však v rozsahu typickém pro disertační práci, celkem 197 stran včetně literatury a příloh. Výzkumné cíle jsou jasně formulovány. Na 25 stranách jsou stručně a přehledně presentovány vybrané relevantní poznatky z velmi rozsáhlého publikovaného materiálu. Autor se nenechal unést šíří tématu a zvolil stručné představení současného stavu poznatků v oblasti fotoperiodické regulace kvetení. Patrně vzhledem k zaměření práce do oblasti molekulární biologie, genetiky, možná až příliš stručně prošel desítky let klasických fyziologických experimentů, které však i dnes pomáhají v přesném definování experimentálních podmínek. Přestože nás zajímají konkrétní geny, nesmíme nikdy opomíjet celek, organismus, citlivě reagující a integrující veškeré podněty. Autor se pak soustředil na představení molekulárních základů, tak jak byly zjištěny nejčastěji pomocí studia mutant, *Arabidopsis thaliana*. Jedná se nejdříve o regulaci vnitřních hodin,

pomocí balancovaného zpětnovazebného systému transkripčních-translačních oscilačních smyček. Tak se autor dostává až k integrátoru signálů z fotoreceptorů, reagujících na kvalitu a délku osvětlení, a podnětů vnitřních hodin – genu *CONSTANS*. Přestože byl tento gen identifikován již před 15 lety, navzdory opět geneticky identifikovaným interagujícím genům, víme stále velmi málo o proteinu jako takovém, jeho biochemické funkci. Jisté však je, že homologní gen funguje také u krátkodenní rýže a dalších rostlin. Rozdíly jsou však ve fázi akumulace mRNA, resp. proteinu. CO následně aktivuje transkripci FT genu. Autor se jen velmi letmo dotkne rozsáhle studované problematiky giberelinů a přeskočí rovnou do velmi aktuální regulace genové exprese pomocí mikro RNA. Zde přez dostatek publikačně velmi úspěšných prací, pravděpodobně vidíme stále jen pověstnou špičku ledovce. Dále jsou podobně rozebrány molekulární základy indukce kvetení u krátkodenní rýže. Je tak patrné, že sekvenčně homologní geny mohou působit jinak. Tak je tomu právě v případě *Heading Date 1* (ortologu CO), který sice působí jako aktivátor za indukční periody krátkého dne, avšak za neindukčních podmínek je Hd1 také syntetizován a tato pozměněná forma pak inhibuje transkripci Hd3a (ortologu FT).

Autor se pak podrobněji zmiňuje o jednotlivých vybraných klíčových genech. *CONSTANS-like* (*COL*) geny obsahující doménu zinkového prstu, jejichž exprese probíhá převážně ve floému listů, jako orgánu registrujícího fotoperiodu. V případě *A. thaliana* byla identifikována genová rodina, z nichž však jen CO má zásadní vliv na kvetení (a díky tomu také mohl být identifikován v mutagením vyhledávání), naopak někteří zástupci kvetení reprimují. *FLOWERING LOCUS T-like* (*FTL*) geny, kódují relativně malý protein (175 aa, 21 kDa), který byl v roce 2007 opakovaně identifikován jako dálkově transportovatelný květní stimulus, dlouho hledaný florigen. Také tento gen má v genomu *A. thaliana* sekvenční homology, z nichž pak některé (*TERMINAL FLOWER 1*, *TFL 1*) jsou opět inhibitory kvetení. Zásadní je poznatek, že FT a *TFL1* jsou kotranskripčními faktory proteinu *FLOWERING LOCUS D* (*FD*), který aktivuje, tedy váže se na promotory genů exprimovaných již v květních meristémeh, jako je *APETALA 1*. Osobně se domnívám, že právě FT by si v úvodu zasloužil více pozornosti, z pohledu florigenu, než jen 1/3 stránky (str. 34). Diskuse ohledně transportu mRNA nebo FT proteinu na velké vzdálenosti a důkazy pomocí kombinace molekulární biologie a roubování jsou stále inspirující. Konečně pak gen *LEAFY* (*LFY*), jehož exprese ve vzrůstném vrcholu je považována za indikátor spuštění procesu formování květenství a květů. Jedná se o jeden z prvních identifikovaných genů (1992, resp. 1990 u hledíku). Produkt tohoto genu reguluje expresi dalších genů určujících identitu květních orgánů, jako je například *APETALA 1*. *LFY* je vysoce konzervovaný gen, rozhodující např. u mechů za střídání fáze sporofytu a gametofytu. Jak již bylo v úvodu zmíněno, většina těchto poznatků byla zjištěna u *Arabidopsis*, popř. rýže. Nicméně známe četné homology, ortology u dalších fotoperiodicky studovaných druhů: *Pharbitis nil*, rajčete, *Lolium temulentum*.

Nakonec úvodu, autor popisuje studovaný druh - merlík červený (*C. rubrum*) z pohledu fotoperiodické indukce kvetení. Je zajímavé, že tento druh obsahuje jak krátkodenní, neutrální tak dlouhodobě ekotypy, což by však mohlo být výhodou pro další studium. Přestože se jedná o dlouhodobě intenzívně studovanou rostlinu z pohledu fyziologických mechanismů, molekulárně-geneticky víme jen velmi málo. Právě zde vstoupil autor do hry a v rámci své disertace se pokusil o prohloubení poznatků v této oblasti.

Následuje kapitola – **Materiál a metody**, 30 stran. Jedná se o výčet (abecední) použitých chemikálií, softwaru, přístrojů a dalších postupů, s přesným citováním původu. Domnívám se, že přehlednější a praktičtější by bylo použít členění a formy obvyklé v publikacích. Rozsáhlá pozornost je

věnována přípravě cDNA knihoven a několika postupům prohledávání pomocí PCR postupů: RACE, semi-nested PCR. Pro kvalitu výsledků je pak zásadní část týkající se měření exprese pomocí kvantitativní Real-Time PCR. Oceňuji upřímnost autora v uvádění i jiných spolupracovníků provádějících dané analýzy, ne ve všem musí být člověk odborníkem a doba, kdy si jedinec prováděl celý experiment sám, je asi již minulostí.

Proč byla izolována DNA pro PCR detekci transgenose až z pletiv odumřelých rostlin ?

Výsledky, 65 stran

Toto je samozřejmě pro každou disertaci nejdůležitější část, dokládající vlastní práci. Pro získání pokud možno úplných sekvencí tří vybraných genů si autor (a laboratoř v níž pracuje) zvolil postup pomocí dnes velmi rozšířené PCR technologie. Nejprve si tedy připravil cDNA knihovny (resp. využil již připravené knihovny) obohacené o cílové transkripty, tedy z indukovaných růstových vrcholů a přilehlých listů. Následuje tak rozsáhlá PCR „anabáze“, využívajících nejdříve „univerzálních“ primerů cílených do konzervovaných oblastí, s následnými RACE amplifikacemi chybějících 5' a 3' konců. Osobně jsem před lety podnikal obdobné práce, nicméně i nyní se spíše přikláním k tradičním postupům, jako je prohledávání knihoven pomocí hybridizace. Zdá se to možná dnes již archaické, ale přeci jen to má své výhody, například právě pracujeme-li s novým, genomicky ne moc známým druhem. PCR často svádí k rychlosti, ale na druhou stranu často přináší řadu artefaktů, jejichž skládáním a ověřováním se nakonec stráví více času. Přesto, a jsem sám tomu rád, autor zdá se, dobře uspěl v případě CrFTL 1-2 genů, o délce cDNA, 528 respektive 504 bp. Porovnání translatovaného proteinu, přineslo 52% identitu (62% podobnost) k proteinu FT *A.thaliana*, což podpořila i fylogenetická analýza metodou maximální parsimonie. V případě hledání CrCOL genů byl využit stejný postup, vedoucí k nalezení 4 odlišných cDNA (CrCOL1, 1s, COL2 a 2s.) o délce 1089, 999, 1098 a 1011 bp. Jejich porovnání vedlo ke zjištění pravděpodobného alternativního sestřihu 90 resp. 87 bp dlouhých intronů. Byly nalezeny klony s možnými rekombinantními formami genu, což není vyloučeno, ale může stejně tak představovat artefakt vzniklý díky PCR. Tomuto ověření autor věnoval nemálo pozornosti. Je zajímavé, že právě analýza genomové DNA, jenž by měla obsahovat jen nesestřiženou formu, byla nalezena i forma kratší, sestřižená. To naznačuje např. i možnost existence kopie pseudogenu.

Nerozumím, proč byl použit právě primer CrCON51for542, nasedající svou polovinou právě na rozhraní studovaného alternativního sestřihu ? Tohoto postupu je s výhodou využíváno pro amplifikaci cDNA což vylučuje právě amplifikaci z reziduální gDNA. Pokud byly použity stringentní podmínky PCR, nasednutí 11 bp by nemělo být dostatečné (str. 80).

Následně autor použil sofistikovanějšího postupu qPCR se specifickou TaqMan sondou. Takto bylo zjištěno, že gDNA obsahuje pouze nesestřižené sekvence CrCOL1 a COL2, což naznačuje jistou malou kontaminaci výchozí cDNA knihovny gDNA. Nicméně alternativní sestřih je možný a poměrně často se vyskytující regulační mechanismus, rozšiřující isoformy daného genu. Úplná kódující sekvence genu CrFL byla získána obdobnou kombinací RACE a semi-nested PCR, dedukovaný protein vykazuje 54% identitu, 60% podobnost s LFY *A.thaliana* a 67, 76% k homologu *Silene coeli-rosa* ze stejné větve *Caryophyllales*. Následně se autor pokusil o určení počtu kopií CrTFL1-like genů v genomu *C. rubrum*, pomocí klasické Southern hybridizace štěpené genomové DNA. S využitím specifické sondy, připravené pomocí DIG PCR (*nebylo by na škodu mít kromě seznamu PCR primerů i schéma genu s vyznačením míst nasednutí, nebo alespoň zmínit jak velký fragment daná kombinace amplifikuje*).

Na základě obrázku 24 (str. 87) bych osobně odhadl počet kopií na 2 místo zmíněných 3, ale je mi jasné že originál autoradiogramu je lepší než reprodukce v tisku.

Proč nebyly takto testovány i ostatní získané geny ? (CrFTL2, CrCOL) ?

Přestože však použitý *HindIII* enzym je uveden jako neštěpící v autorovi známé oblasti CrFTL1, nabádal bych osobně k opatrnosti, přeci jen byla známa jen cDNA a ne kompletní gDNA kopie. I když v trochu nelogicky zařazené následující subkapitole 5.3. byla pomocí PCR studována právě i struktura CrFTL1-2 genů, tj. intronů a exonů, a ta následně porovnána se známou sekvencí FT A. *thaliana*. Obdobně bylo postupováno i v případě získání genomické CrCOL1 sekvence. Tyto výsledky patrně vedly k myšlence amplifikace homologních genům fragmentů z vybraných druhů rozsáhlého rodu *Chenopodium*, především v kontextu fylogeneze a polyploidie. Kombinací PCR a Southern hybridizace byly v tetraploidním druhu *C. bonuc henricus* detekovány 2 proužky odpovídající genu CrFL, o délce 448 a 713 bp, jenž byly následně sekvenovány. Výsledky vedly autora k interpretaci přítomnosti CrFL-like kopie bez druhého intronu v genomu *C. rubrum*.

Co ostatní druhy, analyzované v rámci experimentu na obrázku 27 (str. 92) C. murale, C. quinoa ?

Další, tématicky **druhá část práce**, se zabývá studiem exprese nově identifikovaných genů během vybraných fotoperiodických podmínek. Subkapitola 5.4.1.1 (str. 99) demonstruje vzrůstající exprese CrFTL1 mRNA v reakci na 1-3 induktivní periody 12 h tmy. Naopak stejné podmínky neměly vliv na expresi CrFTL2 mRNA (je více méně konstitutivní). V případě CrCOL byly sledovány expresní profily 4 identifikovaných forem transkriptů. Ty vykazaly rytmickou expresi všech tří CrCOL genů s maximy na konci fází tmy, relativní hladiny exprese byly nejvyšší pro CrCOL1 a COL2, nejnižší u COL1s a COL2s forem. Důležitým zjištěním bylo, že maxima crCOL1 za tmy odpovídají minimům CrFTL1 a za světla naopak (kapitola 5.4.1.3.1. str. 101-2, obrázek 34). Vzrůstající hladiny CrFL mRNA pak korelovali s mírou kvetení, která je maximální (100%) po aplikaci 3 fází 12h tmy. Dále pak délka fáze tmy koreluje s výší exprese CrFTL1 transkriptu (20- násobné zvýšení po 12h tmy, 6x po 6h). 4 h tma se zdá být prahovou hodnotou, indukující kvetení u 20% semenáčků, což odpovídá 3x zvýšení CrFTL1 exprese. Naopak CrFTL2 exprese není ovlivněna délkou fáze tmy. Pokusy s pěstováním na stálém světle navodily arytmiickou expresi, naopak ve stálé (resp. 72h) tmě navodily rytmickou expresi CrFTL1 s nízkými a CrCOL s vysokými amplitudami (str. 107-109).

Třetí část práce je věnována přenosu cDNA CrFTL1 a 2, CrCOL1 a COL2 do *ft* a *co* mutantů a standardního Ler genotypu *A. thaliana*, pro přímé zjištění funkčnosti. Autor provedl přípravu transformačních vektorů potřebných pro tyto v podstatě komplementační testy.

Při hodnocení efektu kvetení bych uvítal výsledky ve formě obvyklé pro A. thaliana, tj. počty listů v růžici, jenž jsou v odpovídající korelaci a je pak možné provést srovnání i mezi publikacemi, laboratořemi. Fenotypový štěpný poměr by bylo nejlépe zpracovat formou přehledné tabulky, s uvedením PCR důkazu integrace transgenu a nejlépe pak i jeho expresí (str. 119-121).

Z výsledků je patrné, že CrFTL1 gen komplementuje nefunkční kopii *ft* *A. thaliana* a dá se tak usuzovat na ortologní gen (na rozdíl od CrFTL2). Pro objasnění funkce CrCOL1 a COL2s byl tyto vneseny do Ler a *co* mutantu *A. thaliana*, tato část je v současné době ještě ve stádiu hodnocení T1 generace.

Poslední část se zabývá využitím **třetího intronu FTL genů, jako markeru pro fylogenetickou analýzu** a určení původu v rámci rodu *Chenopodium*. Byly získány sekvence ze 13 druhů

Chenopodium a *Atriplex nitens*. Na základě sekvencí byly konstruovány fylogenetické stromy. Zde bych chtěl na základě vlastní práce podotknout, že využití jediného intronu jednoho genu pro studium fylogeneze v rámci rodu je v současné době nedostatečné pro získání publikovatelných a především spolehlivých výsledků. Každý gen je vystaven působení určité selekce a navíc v případě polyploidních druhů je třeba mít na paměti existenci více kopií.

Autor tak svou práci dokládá zvládnutí mnoha molekulárních technik, od mnoha variant PCR, přes qRT-PCR až po konstrukci transfomačních vektorů a transgenosi.

Diskuse (9 stran) Autor přehledně shrnuje a vhodně konfrontuje s publikovanými poznatky, dosažené výsledky. Identifikovaný gen *CrFTL1* je velmi pravděpodobně funkčním ortologem FT *A. thaliana*, a to jak na základě své exprese tak i komplementací *ft* mutantu. *CrFTL2* je pak gen s neznámou funkcí. Byly nalezeny 2 *CrCOL* homology, oba pak s alternativním setřihem intronu. Přestože za induktivního světelného režimu tyto geny vakazovaly cirkadiální expresi s maximem na konci noční periody, nebylo možné jednoznačně rozhodnout o jejich funkci. Předběžné výsledky transformace *co* mutantu *A. thaliana* však naznačují komplementaci genem *CrCOL2*.

Závěry, 1 strana – přehledné shrnutí dosažených výsledků.

Seznam použité literatury – 19 stran, pokrývá dostatek aktuálních a relevantních citací. Následuje celkem 28 příloh.

Výsledky práce byly publikovány v časopise *Planta* (IF=3,058), kde je D. Cháb prvním autorem. (Cháb D, Kolár J, Olson MS, Storchová H. (2008): Two flowering locus T (FT) homologs in *Chenopodium rubrum* differ in expression patterns. 228: 929-940). Dle autoreferátu je předkládán do časopisu *Theor Appl Genet* další článek týkající se využití FTL intronu jako markeru pro identifikaci původu polyploidních druhů. Další tři články jsou v přípravě. Jeden článek bez přímého vztahu k vlastnímu tématu práce, kde je však D. Cháb spoluautorem, je předkládána do *Plant Mol Biol*. Výsledky práce byly dále presentovány formou posterů na 4 mezinárodních konferencích.

Z formálního hlediska by kromě dříve uvedených poznámek, bylo vhodnější provést jiné, méně detailnější členění do kapitol a podkapitol, což by dle mého názoru prospělo květší čtivosti a srozumitelnosti. Rovněž tak by bylo vhodné buď důsledně používání cizích slov nebo naopak jejich nahrazení českými ekvivalenty (např. apex - vrůstný vrchol). Nicméně z vlastní zkušenosti vím jak je toto obtížné, když se v běžné práci používá spíše jen anglická terminologie.

Autor prokázal schopnost samostatné experimentální práce, analýzy a interpretace dosažených výsledků. Celkově se domnívám, že předložená disertační práce je na vysoké úrovni a splňuje požadavky pro obhajobu doktorského titulu Ph.D.

Vypracoval

V Šumperku, 21. dubna 2009

Ing. Petr Smýkal Ph.D.

Oddělení biotechnologií, Agritec Plant Research s.r.o., Zemědělská 2520/16, 787 01 ŠUMPERK

Tel. +420 583 382 127 , Fax. +420 583 382 999, E-mail: smyskal@agritec.cz, www.agritec.cz