



Biofizikální ústav Akademie věd České republiky
doc. RNDr. Eduard Kejnovský, CSc.
Laboratoř vývojové genetiky rostlin
Královopolská 135, 612 65 Brno
tel. 541 517 203, fax: 541 240 500,
e-mail: kejnovsk@ibp.cz, www.ibp.cz/labs/DPDG

Oponentský posudek dizertační práce doktorandky RNDr. **Veroniky Steinbauerové**
“Structural and functional characterization of giant plant Ogre-like retrotransposon”

Dizertační práce RNDr. Veroniky Steinbauerové se zabývá velmi zajímavou a aktuální tematikou transponovatelných elementů u rostlin. Má dnes již běžnou formu, kdy obsahuje dvě publikace v recenzovaných časopisech, jimž předchází úvod a je ukončena závěrem. Vše v anglickém jazyce. Role oponenta je velmi omezena, zejména pokud jde o komentování výsledků a související diskuse, neboť prezentované výsledky i jejich zařazení do kontextu současného poznání, již úspěšně prošly recenzním řízením. Z publikací vyplývá, že doktorandka zvládla široké spektrum metod jak experimentálních tak i bioinformatických.

Z uvedených důvodů bych si dovilil položit doktorandce několik, spíše obecnějších, otázek jako základ pro diskusi:

1. V publikaci v MGG týkající se sestřihu Ogre elementu jste první autorkou, ale nikde v dizertaci jsem nenašel zmínku o tom, které experimenty jste prováděla právě vy a jaký je tedy **váš přínos** k této publikaci.
2. Co si myslíte o **původu eORF**? Jak si mechanisticky představujete, že se buněčný gen dostal do retrotransposonu? Je poloha eORF dána jen tím, že v těchto místech je další ORF nejlépe tolerován selekcí anebo existují mechanismy specifického včleňování eORF do těchto míst? není třeba možné, vzhledem ke zřejmě podobného mechanismu replikace různých skupin gypsy elementů, že je poloha eORF („upstream“ nebo „downstream“ od gag/pol) spíše výsledkem náhody než nějakých selekčních tlaků? V případě chromovirů, kde gag/pol zasahuje do pravé LTR, lze pochopitelně čekat polohu eORF v levé části elementu. Může být

přítomnost PMD (plant mobile domain) u Tat elementů důsledkem inserce DNA transposonu do retrotransposonu?

3. Další otázkou je případná **úloha eORF**. Jaká může být vůbec selekční výhoda elementů s eORF oproti elementům bez eORF, zejména pokud nejsou eORF translatovány? V Diskusi se uvádí, že u *Vitis vinifera* jsou Ogre elementy **bez eORF**, zatímco Ogre elementy u příbuzných druhů eORF mají. Lze to vysvětlit tak, že u tohoto druhu došlo ke ztrátě eORF? V každé linii elementů jen část z nich obsahuje eORF. Lze porovnáním elementů bez eORF a s eORF datovat okamžiky, kdy se eORFs do elementů v linii jednotlivých rostlinných druhů dostaly?

Závěrem musím konstatovat, že celkově hodnotím dizertační práci RNDr. Veroniky Steinbauerové jako zdařilou. Doktorandka získala značné množství originálních výsledků, což svědčí nejen o laboratorních i bioinformatických dovednostech, ale i o její schopnosti získané výsledky správně interpretovat a při tom zúročit i svoje teoretické znalosti. K úspěchu práce nepochybně významně přispěla skutečnost, že byla vypracována ve špičkové laboratoři v oblasti rostlinné genomiky Dr. Jiřího Macase, zabývající se otázkami retrotransposonů. Z uvedených důvodů jednoznačně doporučuji dizertační práci k obhajobě.

V Brně, dne 26. dubna 2012



Eduard Kejnovský

Oponentský posudek disertační práce

RNDr. Veroniky Steinbauerové

Structural and functional characterization of giant plant Ogre-like retrotransposons.

Předložená práce se zabývá studiem dvou specifických znaků LTR retrotransposonů Ogre, a to analýzou extra ORF oblasti předcházející gal-pol sekvencím, a přítomností intronové sekvenční odděluje sekvenční proteázu a reverzní transkriptázu. Obě uvedené charakteristiky jsou unikátní pro skupinu Ogre elementů.

Studium bylo prováděno na dvou experimentálních modelech, obou zástupců *Fabaceae* (bobovitých) a to hrachu setého a modelové rostlině *Medicago truncatula*, se známým genomem. Tento výběr experimentálního materiálu reflektuje mnohaleté zaměření a zkušenosti skupiny školitele, Dr. J. Macase, kde RNDr. V. Steinbauerová vypracovala svou disertační práci.

Práce je tematicky členěna na dvě části zabývající se výše uvedenými znaky. Práce je v rozsahu a členění typickém pro disertační práci, celkem 78 stran včetně literatury a je tvořena literárním přehledem (15 stran), uvedením cíle práce (1 strana) a dvěma publikacemi, které tvoří část obvykle věnovanou popisu experimentálního materiálu, metodickým postupům a nejdůležitější části – výsledkům.

Literární přehled:

Na 15 stranách je popsáno členění typů a skupin mobilních DNA elementů s důrazem na LTR retrotransposony, dominují genomy vyšších rostlin. Členění a popis je ve stylu review, nicméně z mého pohledu i případného dalšího uplatnění a využití doktorské práce by nebylo na škodu jej udělat ve formě přehledné tabulky. Dobře je provedena charakteristika vlivu přítomnosti mobilních elementů (TE) na strukturu a funkci hostitelského genomu. Možná bych ještě doplnil část věnující se působení TE na fungování celého hostitelského organismu, tj. možné reprodukční výhody/ nevýhody z pohledu adaptace na okolní prostředí, vývoj jedince a populaci v kontextu prostředí a času. Podrobně je zpracována problematika struktury, replikace retrotransposonů, což je důležité pro vlastní experimentální práci. Od strany 9 do str. 15 je již proveden podrobný popis Ogre retrotransposonů, od struktury, přes sestřih dále studovaného intronu a přítomnost extra ORF. Celý přehled je pečlivě zpracován, s množstvím relevantních citací, včetně nejnovějších a dokládá orientaci v dané problematice.

Výsledky:

Toto je samozřejmě pro každou disertaci nejdůležitější část, dokládající vlastní práci. I když je zcela jasně dokumentována přiloženými dvěma impaktovanými publikacemi, zasloužila by si větší prostor, zvláště přihlédneme-li k obvyklému faktu, že publikace obsahuje část dosažených výsledků. Na druhou stranu je třeba říci, že uvedené publikace jsou naplněny fakty a zcela odpovídající na dva vytyčené cíle práce. Je třeba také vyzvednout širší experimentální práce autorky, kdy zvládla jednak běžné molekulární techniky, ale také vysoce specializované jako je transformace hrachu a bioinformatické analýzy velkého množství sekvenčních dat. *Zde bych měl dotaz, co přesně autorka sama experimentálně udělala a s čím naopak pomohli kolegové, spoluautoři ?* Dnes, v době publikačního tlaku a specializace, není ostudou, že danou část práce provede odborník, na druhou stranu právě během PhD studia, je potřebné si „osahat“ vlastníma rukama co nejvíce metod.

Jelikož v podstatě celá publikovaná práce prošla recenzním řízením a byla nebo bude publikována, je moje hodnocení usnadněno.

1). **Experimental evidence for splicing of intron-containing transcripts of plant LTR retrotransposon OGRE. Mol Genet Genomics (2008) 280: 427-436**

Zde autorka, pomocí dvou komplementárních postupů analyzovala sestřih předpokládaného intronu.

Jedním z nich byla RT-PCR analýza vybraných čtyř (MT1-MT4) skupiny OGRE retrotransposonů v genomu *Medicago truncatula*. Pomocí analýzy tří typů orgánů: kořene, listů a květ, byl prokázán sestřih části retroelementů všech čtyř skupin a ve všech pletivech, s dominancí sestřihu v kořenech v případě MT4 skupiny. Navíc u tohoto typu byla zjištěna exprese antisense transkriptů. *Proč právě jen u tohoto typu a jen u vzorku RNA z kořene ?* V případě MT3 a MT4 skupin nebyla prokázána existence bezintronových kopií těchto elementů integrovaných v genomu *M. truncatula* a proveden tak důkaz o funkčním sestřihu intronů. Cílem práce nebyla kvantifikace účinnosti sestřihu, na druhou stranu by byla zajímavá a relativně jednoduše proveditelná pomocí qRT-PCR.

Druhým postupem byla příprava chimérického transgenu s GUS reportérovým genem přerušným vložením OGRE intronu. Byla získána kultura transgenních vlasových kořenů hrachu a analyzován sestřih. Byly analyzovány 4 transgenní linie, kde byl prokázán částečný sestřih intronové sekvence OGRE elementu. Závěrem je konstatována, že signál pro sestřih je slabý a navíc se projevila kryptická sekvence GUS genu pro sestřih (80/82 testovaných klonů). To je dosti výrazný podíl. *Nepřemýšleli jste o testování intronu v jiné části GUS genu, popř. jiném genu např. GFP ?* Zajímavá je linie PO10d, kde na obr. 3 je dramatický poměr sestřihovaných (99.9) versus nesestřihovaných (0.1) transkriptů. Zdá se že, u této linie i celková úroveň exprese transgenu byla vyšší, ale to nemusí být pravda, neboť není ukázána kvantifikace/normelizace k nějakému konstitutivně exprimovanému genu hrachu. Autorka (autoři) sledovali také buněčnou distribuci transkriptu pomocí frakcionace polyribosomů, což

by dokládalo export RNA do cytoplasmy a její navázání na aktivně syntetizující ribozomy, tj. možnou probíhající translaci. Z vlastní předchozí práce na obdobných frakcionacích v kontextu exprese genů vím jak tato metoda je citlivá na metodiku provedení a jak je třeba použít vhodné kontrolní geny (proteiny) pro důkaz čistoty dané frakce. Zajímavé pro mě je fakt, že důraz byl kladen na přítomnost nesestřizovaných RNA v cytoplasmě, tedy jakýsi důkaz exportu z jádra. Spíše bych očekával separaci intaktních jader versus cytosolickou frakci. Na ribozomech bych spíše očekával sestřizované, potenciálně translatované RNA. *Co by mi na to odpověděla autorka ?*

2) **A widespread occurrence of extra open reading frames in plant *Ty3/gypsy* retrotransposons.** V. Steibauerová, P. Neumann, P. Novák, J. Macas

V této části práce byla provedena rozsáhlá bioinformatická analýza celkem 12,6 Gbp sekvenčních dat s cílem identifikace LTR retrotransponů. Bylo získáno celkem 88 000 potenciálních elementů, z nichž 18 172 *Ty3/gypsy* elementů bylo podrobeno dalšímu studiu, tj. identifikování extra ORF. Tyto byly skutečně nalezeny ve třech liniích, s nejčastějším výskytem (77%) a také největší variabilitou v případě retrotransponů linie *Tat*, *Chromoviruses* a *Athila*. *Athila* linie obsahovala eORF jen v 3'části, kdežto *Ogre* elementy obsahovaly eORF jak v 5'tak 3'oblastech. Tyto eORF vykazovaly výraznou sekvenční variabilitu. Takto rozsáhlá analýza vedla k identifikaci *Ogre*-like elementů v dalších čeledích (*Malvaceae*, *Myrtaceae*) a poukázala na příbuznost 5'eORF napříč fylogeneticky vzdálenými druhy. Zároveň však byly zjištěny i výjimky, jako v případě *GmOgre* u sóji a *Ogre-SL* u silenky. Analýza proteinové sekvence kódované eORF vedla k nalezení podobnosti k „plant mobile domain (PMD)“, což naznačuje jejich možné původ z transposonových sekvencí mechanismem genové transdukce. V případě 3'eORF u *Athila* linie, jejich vztah k retrovirovým *envelope*-like genům byl shledán diskutabilní. Nalezená vysoká sekvenční variabilita naznačuje jejich nezávislý vznik, různého původu. Stále zůstává otázkou původ těchto extra ORF a jejich translace a funkce. Bylo by zajímavé otestovat jejich translaci např. v heterologním systému, nebo po získání specifických protilátek přímo v hostitelském organismu. *V kontextu prvního cíle práce, tj. sledování sestřihu intronu v *Ogre* elementech, nebyl takto rozsáhlý soubor zároveň analyzován z tohoto pohledu ? Z přiložených obrázků Fig. 3-5 je patrná jistá fylogeneticky interpretovatelná souvislost. *Nepokoušela se autorka dát do druhově/rodově fylogenetického kontextu (např. v případě *Poaceae* s dobrými genomickými a fylogenetickými daty) přítomnost a sekvenci ORF, popř. i celých retrotransponů a fylogenetické pozice druhu ?**

Každopádně je třeba vyzdvihnout práci celého autorského kolektivu, jenž je na vedoucí světové pozici v analýze repetitivních sekvencí rostlinného genomu, jejíž důležitost (kromě vlastní evoluční otázky) vyvstává při analýze a sestavování sekvenčních dat.

Diskuze: myslím si, že navzdory diskusi v jednotlivých článcích, by bylo vhodné zařadit celkovou závěrečnou diskusi k daným studovaným cílům práce, kde by právě byla větší možnost představení svých vlastních postřehů, hypotéz a možných směrů další práce.

Současná forma a rozsah publikací toto neumožňují. Na druhé stranu chápu i možnou obavu s přílišného otevření/zveřejnění těchto pracovních hypotéz pro široký okruh možných čtenářů volně dostupné doktorské práce.

Jaký je názor autorky na dosti specifickou přítomnost extra ORF a intronových částí v OGRE retrotransposonech? Je možné vyzorovat nějakou fylogeneticky interpretovatelnou historii těchto sekvencí? Jak třeba vypadá v podčeledi Viciae (rodů Vicia, Lathyrus, Pisum) a 15 miliónů let evolučně oddělené Medicago?

Závěry, 1 strana (66) stručně, ale jasně shrnuje dosažené výsledky, z čehož je zcela zřejmé že dva původně vytyčené experimentální cíle byly dosaženy.

Seznam použité literatury – 9 stran, pokrývá dostatek aktuálních a relevantních citací a svědčí o přehledu autorky v dané problematice.

Následují **2 přílohy – přijaté publikace, v nichž je autorka prvním autorem.**

V. Steinbauerová, P. Neumann, J. Macas. Experimental evidence for splicing of intron-containing transcripts of plant LTR retrotransposon OGRE. Mol Genet Genomics (2008) 280: 427-436 (IF₂₀₁₀ = 2,456).

V. Steinbauerová, P. Neumann, P. Novák, J. Macas. A widespread occurrence of extra open reading frames in plant Ty3/gypsy retrotransposons. Genetica (2012) (IF₂₀₁₀ = 2,358).

Výsledky práce byly dále prezentovány formou 2 posterů na mezinárodních konferencích.

Autorka prokázala schopnost samostatné experimentální práce, analýzy a interpretace dosažených výsledků. Během své práce se seznámila s mnoha metodickými postupy a jejich kombinacemi, což je potřebné pro další vědeckou práci.

Celkově je předložená disertační práce na velmi vysoké úrovni a splňuje požadavky pro obhajobu doktorského titulu Ph.D.

Vypracoval

V Olomouci, 21. dubna 2012

Ing. Petr Smýkal Ph.D.

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci,
Šlechtitelů 11, 783 71 OLOMOUC

Tel. 585 634 827, E-mail: petr.smykal@upol.cz