

Posudek na disertaci Mgr. Zoltána Füssy „Structure-function analysis of selected hop (*Humulus lupulus* L.) regulatory factors“

Výsledky formálně dobře vystrojené disertace se skládají převážně z příložených publikací publikovaných v kvalitních mezinárodních časopisech a v dalším se omezím na stručné shrnutí jednotlivých výsledků a zvl. otázky či připomínky, které k překládané práci mám.

Doktorand si ve své práci klade čtyři základní otázky, které hodlá řešit u chmele:

- A) hledání nových transkripčních faktorů (TF), které se účastní regulace syntézy lupulinu
- B) bioinformatická analýza jejich sekvencí
- C) charakterizace doménové struktury – opět bioinformaticky
- D) funkční analýzy ve vztahu k viroidní patogenezi – fenologické analýzy heterologních transformantů

Přesto, že řešené problémy jsou jasně definovány, doktorand by přeci jen měl zdůvodnit, proč je biologicky zajímavé hledat nové TF spíše, než do hloubky studovat známé – biologický problém, který doktorand řeší je přítomen spíše implicitně.

V úvodní části, přehledu dosavadních znalostí o biosyntéze antokyanů, velmi schází přehled o mnoha známých/publikovaných fytopatologických souvislostech metabolismu antokyanů (viz. dále).

V první příložené publikaci autoři popisují dva nové kandidátní transkripční faktory, které by se mohly podílet na regulaci dráhy syntézy lupulinu. K této práci doktorand dodělal další analýzy, které naznačují, že odstranění dvou potenciálních míst fosforylace na TF cílenou mutagenézou ústí do hyperaktivace reportérového promotoru.

Fylogenetický strom na obr. 2 první publikace je jistě jen předběžný a předpokládám, že se k němu vyjádří příp. další kolegové oponenti této disertace.

Ve druhé práci autoři testují jaké typy TF interagují/tvoří komplexy při regulaci aktivity užitého chalkonsyntázového promotoru. Při tom byly popsány nejen TF aktivátory a jejich cis-DNA vazebná místa, ale také transkripční represor z MYB rodiny DNA vazebných bílkovin. Další experimenty přidané k této publikaci, studující interakci TFs s vazebným místem na DNA pomocí „band-shiftu“, správně autor označuje za velmi předběžné; zvl. také proto, že by měly být v rámci kontrol zařazeny extrakty z rostlin exprimující jen jednotlivé TF a příp. jejich dodatečně vytvořená směs (tedy všechny, ale bez ko-exprese); a zvl. také použít kontrolní DNA „nevazebný“ oligonukleotid.

Třetí publikace vybočuje ze zaměření na chmel – popisuje sekvenční evoluci viroidu bramboru při adaptaci na heřmánek a ukazuje zvýšenou patogenicitu viroidově specifických vsRNA u adaptovaného viroidu. Při infekci bylo prokázáno potlačení genů pro syntézu prekurzorů ligninu.

Ve čtvrté publikaci, jejímž je doktorand nejen prvním, ale také korespondujícím autorem, ukazuje, že infekce viroidem vede k potlačení akumulace antokyanů, a naznačuje, že za potlačení syntézy antokyanů by mohly být mj. vd-sRNA, které lze predikovat a jsou homologní k sekvenci samotné chalkon syntázy, kterou by mohly potlačovat. Konečný důkaz

o účasti vd-sRNA v potlačení aktivity CHS nebyl podán – v práci Füssy et al. (2013) je ovšem doložena možnost takové regulace.

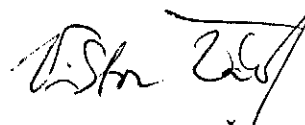
Starší i nedávná data ukázala (např. Saijo et al. 2009, EMBOJ; Serrano et al. 2012; Plant Phys), že pravděpodobně existuje kontextově specifický vzájemný regulační vztah mezi reakcí na patogeny a syntézou antokyanů – v určitých kontextech při indukci obrany proti patogenu dochází k represi biosyntézy antokyanů. Tato možnost měla být přinejmenším teoreticky zvážena a nejlépe také experimentálně testována v těchto známých souvislostech přesto, že v odpovědi na viroidovou nákazu lze očekávat specifické jevy. Tedy i úvodní část o regulaci metabolických drah biosyntézy antokyanů postrádá tuto podstatnou část (viz. připomínka výše).

Závěr disertace spolu s výhledy do budoucnosti (str. 84) je psán příliš obecně a jeho reálný informační obsah je minimální – že byly metodické obtíže se studiem meziproteinových interakcí a že zavedení bodových mutací zvýšilo aktivitu TF HlbZIP1A. V závěru by měly být především sumarizovány hlavní výsledky celé práce. Přesto, že každá přiložená publikace obsahuje diskusi, by bylo na místě uzavřít text disertace společnou obsáhlejší závěrečnou diskusí.

Zvl. u publikací, kde je doktorand spoluautorem, by mělo být blíže specifikováno, jak k dané publikaci přispěl.

Přes výše vyjádřené námitky či kritiku předložené publikace dokládají, že doktorand pronikl úspěšně do řešeného problému a osvojil si metody vědecké práce v daném oboru, a proto doporučuji, aby předkládaná práce byla obhájena jako práce disertační.

S pozdravem



RNDr. Viktor Žárský CSc.

V Praze 27. 3. 2013

Katedra experimentální biologie rostlin
Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Viničná 5, 128 43 Praha 2



Oponentský posudek na disertační práci

- Autor: **Mgr. Zoltán Füssy**
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta
Biologické centrum AVČR, Ústav molekulární biologie rostlin
- Název práce: **Structure-function analysis of selected hop (*Humulus lupulus* L.) regulatory factors**
- Oponent: **RNDr. David Honys, Ph.D.**
Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.

Předkládaná disertační práce je psána anglickým jazykem, tzv. zkrácenou formou. Je členěna na Úvod, Teoretický přehled ukrývající v sobě i stručný přehled metod studia transkripčních faktorů, Cíle práce, Výsledky obsahující i čtyři impaktované publikace, Závěrečné shrnutí, Životopis autora, Seznam zkratk a konečně Seznam literatury.

Nedílnou součástí práce je seznam čtyř impaktovaných publikací s autorským podílem Mgr. Füssyho, kdy u každé práce je tento podíl specifikován. Souhrnný IF předložených publikací je 12.029, což výrazně přesahuje průměrné hodnoty oboru. Jedna z publikací je prací prvoautorskou. Disertační práce má celkem 102 stran, nicméně 51 z nich zabírají publikované články. Práce je velice čtivá a až na skutečně minimální nepřesnosti psána kvalitní angličtinou, alespoň v míře, kterou je schopen posoudit cizozemec, jehož mateřštinou je čeština. Textu dokonce místy nelze upřít jistou dávku poetismu: „Therefore, we set out to a journey of discovery and characterisation of other regulators, with a battery of methods to analyse TFs discussed in the following chapter“. Realita je však často prozaičtější.

Deklarovaným tématem práce je strukturální a funkční analýza vybraných transkripčních regulátorů genové exprese chmele otáčivého, zejména ve vztahu k biosyntéze sekundárních metabolitů, především flavonoidů. To s ohledem na praktickou důležitost chmele mimo jiné naznačuje možný budoucí aplikační potenciál prezentovaného výzkumu.

První kapitola **Úvod** na několika řádcích dává čtenáři do souvislosti procesy vaření piva a regulace biosyntetických drah sekundárních metabolitů u chmele. Kapitola **Teoretický přehled** je na svých 22 stranách dominantní částí práce. Autor zde přehlednou a i laikovi srozumitelnou formou shrnuje aktuální poznatky o biologii chmele, biosyntetických drahách flavonoidů u rostlin, konečně o produkci sekundárních metabolitů u chmele. Poněkud nestandardně je součástí této kapitoly i obecný přehled metod studia transkripčních faktorů. Vlastní kapitola **Materiál a metody** v práci chybí, použité metodické postupy jsou vesměs popsány v rámci publikovaných článků, což však neumožňuje posoudit, kterými metodami prakticky vládne doktorand sám. **Cíle práce** jsou formulovány úsporně, nicméně dostatečně vyčerpávajícím způsobem. Kapitola **Výsledky** obsahuje soubor čtyř publikovaných prací doplněný o stručný popis dosud nepublikovaných dat. V pracích tohoto typu jinak běžná kapitola **Diskuse** v předložené práci zcela chybí, k dispozici jsou pouze dílčí diskuse jako součást publikovaných článků.

Hlavní komentář

Za hlavní přednost práce pokládám zpracování nesnadného výzkumu transkripčních faktorů nemodelového rostlinného druhu navíc s poměrně dlouhou vegetační dobou a považuji za vhodné ocenit odvalu týmu Dr. Matouška se do takové práce pustit. Tyto skutečnosti je nutné vzít v potaz při hodnocení dílčích cílů práce a její organizace. Je zřejmé, že se Mgr. Füssy podílel na několika projektech týmu školitele, což se odráží ve spektru vyšších publikací prezentujících skutečně široký záběr témat: (1) klonování a charakterizace chmelových transkripčních faktorů rodiny bZIP, (2) funkční charakterizace chmelového regulačního komplexu MBW, (3) interakce viroidů PSTVd s různými hostiteli a konečně (4) změny exprese chalkosyntázy H1 a dalších genů po napadení rostlin chmele viroidy HSVd. V této souvislosti proto pokládám za obzvláště nešťastnou **absenci abstraktu a zejména obecné diskuse**, v níž by se autor pokusil uvést do souvislosti zajímavé, ale na první pohled vzájemně pouze marginálně související publikované dílčí výsledky s dosud nepublikovanými daty, která v tomto uspořádání nejsou diskutována vůbec.

Je jasné, že všechny publikované dílčí výsledky prošly recenzním řízením v kvalitních časopisech a jejich vědecká relevance je nepochybná. V jednotlivých publikacích jsou také jednotlivě patřičně diskutovány. Jedním z cílů disertační práce by však mělo být přesvědčit oponenty a příslušnou odbornou komisi o schopnosti doktoranda samostatně provádět experimentální vědeckou práci a prezentovat její výsledky. Podíl autora na jednotlivých publikacích je v posuzovaném textu patřičně popsán a jeho význam je zřejmý. Z tohoto popisu i ze složení autorského kolektivu jednotlivých článků se však zdá, že zásadní podíl měl doktorand jen na publikaci poslední. Právě v této souvislosti vysvítá potřebnost obecné diskuse, která by všechny publikované i dosud nepublikované výsledky uvedla do souvislostí a zejména prokázala schopnost autora se v řešené problematice orientovat.

Drobné komentáře

- 1) Kapitola Teoretický přehled má ve svém úvodu možná zbytečně široký záběr stran spektra probíraných sekundárních metabolitů s čímž kontrastuje omezení popisu regulace biosyntézy flavonoidů pouze na modelový huseníček, jak je uvedeno na konci str. 11. Domnívám se, že právě proto, že vlastní experimentální práce probíhala na specifickém nemodelovém druhu, by bylo zajímavým počinem integrovat znalosti získané studiem i jiných druhů, které jsou ostatně na straně 11 jmenovány.
- 2) Autor na straně 19 uvádí, že aktivita několika laboratoří přispěla ke vzniku databáze chmelových EST. Jako laik v daném oboru bych ocenil, kdyby u jmen reprezentujících jednotlivé laboratoře byly uvedeny buď příslušné instituce či alespoň citace jejich prací, pokud tyto existují.
- 3) Autor v kapitole 2.5.2. (str. 24) ve spektru metod fenotypové analýzy mutantů zmiňuje aplikaci systému CRES-T spočívající ve fúzi zkoumaného proteinu s represorovou doménou EAR (uvedená citace Hiratsu et al. 2003). Zde by bylo zajímavé popsat nedávný vývoj v této oblasti včetně mechanismu popisované dominantní represe s účastí proteinu TOPLESS popsaného předtím v úplně jiné souvislosti (Mitsuda et al. 2011, Kagale & Rozwadowski 2011, www.cres-t.org/fiore/public_db/index.shtml).
- 4) Obrázek 8 (str. 38-39) ukazuje aktivační potenciál divokých a mutovaných proteinů H1bZIP2. Zcela jsem nepochopil značení na obrázku, v legendě a v textu. Je faktor bZIP1A totožný s faktorem bZIP2? Odpovídají mutace bZIP1A 2993 a bZIP1A 2995 mutacím v aminokyselinách Ser41 a Thr102? Jakým způsobem byl měřen aktivační


potenciál těchto proteinů – metodou popsanou v článku nebo nějak jinak? Měl by zde být odkaz či popis.

- 5) Místo termínu „N-terminal end“ by stačilo napsat „N-terminus“ (str. 38).
- 6) Jakou výhodu mělo použití B2H místo častěji používaného Y2H (str. 60)? Nemohou být neuspokojivé výsledky získané touto metodou (str. 84) vysvětleny částečně právě tím, že nebylo použito eukaryotického systému? Mimoto jsem v textu neobjevil popis použité metody B2H – v žádném článku ani mezi nepublikovanými výsledky.
- 7) Výsledky prezentované na obrázku 10 (str. 60) by byly v tištěné formě práce zřetelnější v barvě. V PDF souboru tento obrázek barevně je.
- 8) Zcela jsem nepochopil postavení strany 74 mezi dvěma články. Textu na stránce by slušel nějaký nadpis.

Závěrečné hodnocení

Celkově se jedná o kvalitní práci přinášející zajímavé výsledky podpořené relevantními publikacemi. Výše popsané připomínky zásadním způsobem nesnižují její hodnotu. Práce samotná i přiložené publikační výstupy splňují standardní nároky kladené na obhajobu disertační práce v našem oboru.

Práci doporučuji k obhájení.


RNDr. David Honyš, PhD.
Vedoucí Laboratoře biologie pylu
ÚEB AVČR, v.v.i.

V Praze, dne 28. 3. 2013

Examiner's report on a PhD thesis

Title of the thesis: **Structure-function analysis of selected hop (*Humulus lupulus* L.) regulatory factors**

Applicant: **Mgr. Zoltán Füssy**

Institution: **School of Doctoral Studies in Biological Sciences, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science**

The subject of Zoltán's thesis stems from a long-term research programme being pursued in the laboratory of his supervisor, RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc., at the Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic. Using state-of-the-art methods of modern biology, the programme aims at getting better understanding of a phenomenon that has fascinated people for ages, namely the property of hop plants to make compounds conferring the unique taste of beer. The molecular underpinnings of the phenomenon are interesting from both the theoretical and practical points of view, yet their knowledge remains limited. Zoltán's thesis delivers significant new findings about molecular mechanisms of regulation of flavonoid production by hop, and is thus a welcome contribution to an important field of "basic" plant science with ramifications towards practical agricultural applications.

The structure and extent of the thesis are standard and clearly meet criteria for a good PhD thesis in the Czech academic environment. The Introduction (chapter 2), comprising over 20 pages, summarises various aspects related to the production of flavonoid compounds in plants, particularly in hop. Special attention is paid to regulation of genes for enzymes of the flavonoid pathway by various transcription factors. Given the subject of the actual Zoltán's research work, the Introduction also includes a useful overview of methods being currently used for studying transcription factors and their functioning. The rest of the thesis consists primarily of multi-author papers already published upon peer-review in scientific journals, which makes the Introduction the main original part of the thesis. Let me, therefore, focus more critically on it.

The linguistic quality of the Introduction, as far as it can be evaluated by a non-native English speaker, is excellent and I have noticed only a few places where there seemed to be an obvious mistake. One of the examples might be a sentence on page 17, reading "Overexpression of the specific both anthocyanins and PA regulators...", which does not make sense to me. Another case can be found on page 22; the sentence "Genes that resemble by expression profiles often share regulatory motifs" also does not make sense, as it probably lacks the expression "each other". Here and there I was not sure about the use of articles, but I do not feel competent enough to make any strong claims on this.

At some places the wording employed appeared imprecise from a formal point of view. For instance, Zoltán writes on page 22 that "we can take advantage of the *Cannabis* genome from two cultivars"; however, what he has in mind here is apparently *Cannabis* genome sequence rather than



Cannabis genome as such. Another case is the use of the expression “high homology” to describe a situation where two sequences (of genes or proteins) are highly similar to each other (e.g. on pages 9, 19, 21). Technically homology means common descent and cannot be quantified (so there is no higher or lower homology). I must admit, however, that exactly these two examples of a sloppy language are fairly common in the scientific literature. I was additionally in doubts regarding the claim (page 9) that “petunia contains 3 genes encoding CHI”. As far as I know, there is no full genome sequence available for petunia, so how certain we can be that the number is three? Would it be better to write “at least three”?

Sometimes I could not understand well what Zoltán means. For example, on page 19 he writes: “The VPS protein shares a high degree of homology [sic!] with plant CHSs as well as other hop CHSs”. In my understanding, “other hop CHSs” are by definition plant CHSs, so why the similarity to them is mentioned separately? Would a better wording be “The VPS protein exhibits high similarity to other hop CHSs and to plant CHSs in general”? On page 8 Zoltán writes that cytochrome P450 hydroxylase C4H is “problematic”, but it is not at all clear to me from the text why it should be so.

Some criticism must be raised regarding the number of figures accompanying the Introduction. Some parts were somewhat difficult to read without any graphical support, particularly the section 2.4 “Secondary pathways of hop”, which would very much benefit from inclusion of at least a simple a graphical scheme of the metabolic pathways described in the text; I also lacked chemical formula of at least the main flavonoid compounds of hop, such as xanthohumol.

Let me now say a few words about the chapter 4 – Results. Four original papers published in impact-factor journals are accompanied with short treatises on some unpublished results related to the content of the papers. All of the papers have multiple co-authors and only one has Zoltán as the first author, but his contribution to each paper is clearly described at the beginning of the thesis. Although it is not a fundamental criticism, it must be admitted that the paper 3, entitled “Biological and molecular analysis of the pathogenic variant C3 of potato spindle tuber viroid (PSTVd) evolved during adaptation to chamomile (*Matricaria chamomilla*)”, does not fit well the general subject of the thesis, as it deals with neither hop nor regulatory factors. Zoltán should probably explain in more detail the links between this study and the main focus of his thesis during the defence. I was also not always completely satisfied with the sections describing the unpublished results. For example, there seems to be a conflict between what is stated in the text and in the legend to Fig. 9 on page 60. Specifically, in the text Zoltán writes: “In Fig. 9, specific protein-DNA interaction can be seen in MBW complex-containing sample (lanes 3) and a partial inhibition of this interaction of mutated *Pchs_H1* DNA is used as probe.” However, in the legend to the figure, we can read: “Mutation of ACE and MYB elements in *Pchs_H1* did not clearly inhibit the M3B2W1-DNA complex formation”. So is there any effect of the mutations in the promoter region of *Pchs_H1* on the interaction with the regulatory complex or not? Next, further downstream on page 60 Zoltán speaks about screening BAC libraries and isolation of the HIMYB1 promoter, but no methodical details are provided, so it is not at all clear how he achieved this. Nevertheless, the chapter 4 altogether gives a clear idea that the amount and methodical diversity of Zoltán’s experimental work is completely sufficient for a PhD thesis.



UNIVERSITAS
OSTRAVIENSIS
Facultas Rerum Naturalium

› Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity v Ostravě • 30. dubna 22
701 03 Ostrava • Česká republika • telefon +420 597 092 100
fax +420 596 120 478 • www.osu.cz

IČO 61988987 • DIČ CZ 61988987
Bankovní spojení ČNB Ostrava
931-761 / 0710

Chapter 5 provides a brief summary of the thesis with some perspectives for the future work. I cannot resist expressing some reservations about this chapter, as I think it should more explicitly discuss to what extent the aims of the thesis as declared in chapter 3 have been achieved. For example, one of the stated aims was to perform phylogenetic analyses of hop transcription factors, but the thesis does not include any such analyses that would be done by Zoltán (the phylogenetic trees in paper 2 were apparently constructed by another co-author, since Zoltán's claimed contribution was only preparation of the cDNA library). It would be good to explain in conclusions why some of the aims have not been achieved.

Additional minor issues of the thesis include:

- 1) the wrong order in the list of abbreviations (page 86), where abbreviations starting with the letter "Q" precede those starting with "P" or the abbreviation "Y2H" precedes the abbreviation "XN", thus not following the alphabetic order.
- 2) the abbreviations DMX or PR not explained in the list of abbreviations at the end of the thesis
- 3) the legend of Fig. 4 (page 10) would strongly benefit from including explanations of the abbreviations used for the individual enzymes of the biochemical pathways depicted. The necessity to check every abbreviation by consulting the abbreviation list at the end of the thesis is very impractical.
- 4) a typographic error in the legend of Fig. 8, page 38 ("reportem")

For the defence of the thesis, I have an additional question to the applicant. On the 24th of January 2013 an important paper was published in BMC Plant Biology (Clark et al., *BMC Plant Biol* 13:12, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/12>) dealing with the transcriptome of lupulin glands sequenced using the RNA-seq method. Although the thesis seems to have been submitted only after this paper had been published, there was probably not enough time to incorporate the results of this apparently important paper into the text of the thesis. Could Zoltán briefly discuss the significance of this paper and the transcriptomic resources it delivers with regard to the subject of his thesis?

Altogether, despite some criticism I am confident that Zoltán's thesis demonstrates his eligibility to be awarded the title Ph.D.

In Ostrava, 28th of March 2013.

Mgr. Marek Eliáš, Ph.D.