

Oponentský posudek disertační práce

Název práce Genetic modification of *Claviceps purpurea* and ergot alkaloids production

Autor Mgr. Helena Hanosová

Školitel Doc. Mgr. Petr Galuszka, PhD

Pracoviště Palackého iniversita Olomouc
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Autorka předložené disertační práce si vytkla nelehký cíl a vzhledem k tomu, že se jedná o první práci na toto téma na daném pracovišti, neměla na co navázat.

Tím prvním cílem byla důkladná literární rešerše. Ta je presentována v první části disertační práce. Zahrnuje velmi širokou oblast, od historických aspektů (intoxikace námelem) přes biologii a genetiku námele až po biosyntézu alkaloidů a jejich účinky a použití. Počet citací je velmi vysoký a jejich výběr je, dle mého názoru, reprezentativní a podstatné chyby jsem tam nenašel. Drobnější chyby se najdou, třeba informace na str. 26, že fermentace je využívána k produkci paspalové kyseliny a jejich derivátů a že dokonce i ergopeptiny mohou být hydrolyzovány na kyselinu lysergovou. Správně by tam mělo být, že fermentace se využívá jak k produkci kyseliny paspalové a amidů kyseliny lysergové (ergometrin a ergin), které slouží pro, výrobu kyseliny lysergové, tak k produkci ergopeptinů a naopak, podstatná část kyseliny lysergové se vyrábí hydrolýzou ergopeptinů, které pocházejí z polní produkce námele.

Další dvě kapitoly disertační práce už zahrnují experimentální část. Jsou však napsány jako samostatné celky, tj. včetně teoretické části, která je zde označena jako úvod. Nezdá se mi to šťastné, protože čtenář tu opakovaně čte to, co už jednou četl, navíc, zde, ve zjednodušené verzi. Úvod by neměl být citováním literatury, ale rozvedením cíle následujících experimentů. To však jsou jenom formální připomínky, mnohem důležitější jsou fakta v experimentálních kapitolách presentovaná.

Druhá kapitola se zabývá chemickou sterilizací hostitelské rostliny (žita) aplikací tzv. gametocidů. Byla provedena celá řada experimentů a dovedu si představit to množství vykonané experimentální práce, zvláště když cílem bylo výsledky kvantifikovat, tj. stanovit výnos námele v každém experimentu. Jako gametocidy byly testovány dvě látky (cyklický hydrazid kyseliny maleinové (MH) a kyselina 2-chlorethylfosfonová (ETH); obě jsou u nás povoleny) a obě měly v prvním experimentu v roce 2012 negativní a na použité dávce závislý vliv, jak na vzrůst hostitelské rostliny, tak na výnos námele (tabulka 2). Pro další negativní účinky na hostitelskou rostlinu byla ETH z dalších experimentů vyřazena a pro detailnější experimenty v následujících dvou letech byla použita jenom sterilizace MH. Testy byly prováděny na dvou typech žita, na sterilním žitě (ale nedostatečně sterilním) a na fertilním žitě. Na obou byl jednoznačně prokázán vliv chemické sterilizace pomocí MH, jak na tvorbu pylu a tudíž i produkci semen, tak na výnos námele (tabulky 3 a 4). Velmi pěkné výsledky byly zejména u žita fertilního. Ostatně firma Sanofi produkovala svůj ergotaminový námel na fertilním žitě s využitím chemické sterilizace už před 30 léty. U žita sterilního jsou velmi rozdílné výsledky v roce 2013 (velké množství zrna v námelu) a 2014 (podstatně méně zrna) – dokáže to autorka vysvětlit?

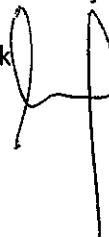
K tabulkám uvedeným v práci si dovolím poznamenat, že jsou velmi nepřehledné a těžko jsem se v nich orientoval. A přitom by stačilo dát do samostatných tabulek žito sterilní a žito fertlní a bylo by to přehlednější.

Kapitola 3 pojednává o genetické modifikaci námele. Autorka optimalizovala metodu poskytující velké množství transformovaných mutantů a tuto metodu aplikovala na dva produkční kmeny používané v Tevě (kmen GAL404 produkující ergotamin a kmen GAL130 produkující ergocristin). Většina mutantů přestala produkovat alkaloidy. Nejsa genetik, netroufám si hodnotit dosažené výsledky. Jenom se obávám, že dostat se touto cestou k nějakému užitečnému kmeni bude trvat ještě dlouho. Na druhou stranu by nás první neúspěch neměl odradit. Genetické inženýrství je určitě správná cesta. Naopak, za úspěch považuji to, že se podařilo přenést gen produkující ergotamin do ergocristinového kmene. Není to sice to, co potřebujeme, ale úspěch to nepochybně je. Je to také příspěvek k poznání, že je tvorba jednotlivých ergopeptinů daná geneticky. Na druhou stranu, když se podívám na množství minoritních ergopeptinů produkovaných průmyslově využívanými kmeny námele, není ta genetická determinace asi příliš absolutní, ale to už se pouštím do spekulací a to mi jako oponentovi nepřísluší

Na závěr proto jenom konstatuji, že předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě.

V Opavě 31. 5. 2018

Ladislav Cvak



Oponentský posudek dizertační práce

Program: P1416 Biochemie

Doktorand: **Mgr. Helena Hanosová**

Název práce: **Genetic modification of *Claviceps purpurea* and ergot alkaloids production**

Pracoviště doktoranda: Katedra biochemie PŘF UP Olomouc

Oponent: **prof. Mgr. Jiří Drábek, PhD.**

Pracoviště oponenta: ÚMTM, LF UP Olomouc

Zhodnocení významu práce pro příslušný obor

Předkládaná dizertační práce je zaměřená na ovlivňování produkce námelových alkaloidů organismem *Claviceps purpurea*.

Námelové alkaloidy se využívají k výrobě léků pro urychlení porodu, proti migréně, proti Parkinsonově chorobě. Vyrábějí se z poloviny pěstováním žita infikovaného ergotem, z poloviny v submerzních kulturách. Dosavadní výrobní metody vykazují malou výtěžnost a je proto žádoucí výtěžnost zvyšovat za použití nových metod molekulární genetiky.

Práce je hodnotná svým **originálním postupem a získanými daty pro zvyšování produkce námelových alkaloidů z infikovaného žita**. Práce umožňuje nasadit **maleinhydrazid do polní produkce námelu** a staví základy pro další **rozvoj transformačních technik *C. purpurea***. Výsledky byly zúročeny ve dvou impaktovaných publikacích (Hanosova, 2015; Hulvova, 2013).

Vyjádření k postupu řešení problému, použitým metodám a splnění stanoveného cíle

Dizertační práce si kladla čtyři cíle:

- 1) Zpracovat literární rešerši o *Claviceps purpurea* a ergotových alkaloidech.
- 2) Zavést metodu transformace industriálních kmenů *Claviceps purpurea* na Univerzitu Palackého.
- 3) Indukovat konstitutivní zvýšenou expresi genů na biosyntetické dráze ergotových alkaloidů.
- 4) Optimalizovat polní produkci námelových alkaloidů aplikací vhodného gametocidu.

Ad 1) Literární rešerše je zpracována logickým a důkladným způsobem. Zabývá se biologií organismu *Claviceps purpurea*, genetikou produkce námelových alkaloidů, jejich chemickou strukturou a z ní vyplývající biologickou aktivitou. Popisuje biosyntetické dráhy, metody průmyslové produkce námelových alkaloidů, metody genové transformace organismu *C. purpurea* a možnosti ovlivnění produkce námelových alkaloidů metodami molekulární biologie.

Ad 2) Metoda transformace industriálních kmenů *C. purpurea*, zajišťující zisk velkého množství transformantů, byla zavedena na oddělení Molekulární biologie, Centra regionu Haná, Palackého Univerzity za pomoci skupiny Prof. Tudzyňského. Metoda byla použita k přípravě dvou nezávislých *LpsA2* knock-out mutantů vyselektovaných z množství 230 transformovaných kolonií. Chemická analýza knock-out mutantů stejně jako vzorků s náhodně integrovanou deleční kazetou prokázala degeneraci kmene a z ní vyplývající neschopnost produkce námelových alkaloidů, znemožňující vyhodnocení experimentů.

Ad 3) Zvýšení exprese tří genů klastru pro biosyntézu námelových alkaloidů (tj. *dmaW*, *easC* a *easG*) pod silným konstitutivním promotorem *gpdA* nevedla k významnému a udržitelnému zvýšení produkce námelových alkaloidů v testovaných kmenech. Z druhé strany konstitutivní exprese gen *LpsA1*, odpovědného za produkci ergotaminu v kmeni Gal 130 vedla k získání

dvou nezávislých transformantů Gal 130: OELpsA1, 20.1, u kterých bylo zjištěno významné, až desetinásobné zvýšení relativního zastoupení ergotaminu oproti wildtype kmeni Gal 130.

Ad 4) Výnos sklerocií může být významně navýšen, pokud bude zabráněno opylení, které zabraňuje infekci ovarií sporami *C. purpurea*. Aplikací vhodného gametocidu dochází k významnému zlepšení sterility žita s nedokonale navozenou cytoplasmatickou sterilitou či indukci sterility u fertilního žita. Doktorandka srovnala gametocidní účinky ethrelu a maleinhydrazidu. Pro získání vysokého množství sklerocií při minimálním znečištění zrnem vybrala maleinhydrazid, který prokázal vysokou míru gametocidního účinku u obou variant žita a přitom měl zanedbatelný efekt na klíčení spor *C. purpurea*. Určila také optimální čas aplikace a optimální dávkování.

Postup řešení problému a použité metody jsou inovativní a adekvátní. Ze čtyř cílů byly tři splněny úplně, přičemž k jednomu cíli vedla cesta až druhým testovaným způsobem. Jeden cíl skončil experimentátorským neúspěchem. Tento neúspěch nebyl způsoben chybou designu nebo provedení pokusů, ale rozsahem úkolu nad rámec dizertační práce.

Stanovisko k dosaženým výsledkům předkladatele dizertační práce

Doktorandka prokázala:

- znalosti chemie, buněčné biologie, biochemie, agronomie, farmakologie
- schopnost kriticky studovat odbornou literaturu ohledně námelových alkaloidů
- laboratorní dovednosti
- schopnost rozpoznat vědecky zajímavé otázky, formulovat hypotézy a také způsob jejich testování
- schopnost reagovat na vyvrácení hypotézy generováním hypotézy nové
- schopnost dosáhnout vědecky relevantní výsledky, obhajitelné v mezinárodním měřítku
- schopnost prezentovat výsledky vědecké práce písemnou formou.

Vyjádření k uspořádanosti, přehlednosti, formální úpravě a jazykové úrovni dizertační práce

Práce je téměř bez formálních a pravopisných chyb a bez překlepů (str.8 ofergot je spojeno dohromady spíše chybou tvorby pdf formátu než překlepem).

Popis plnění čtyř cílů v dizertační práci je rozdělen do tří částí: cíl 1 je umístěn do části I, cíle 2 a 3 do části III a cíl 4 do části II. Toto členění nepřidává na přehlednosti práce. Lépe by bylo použít stejné členění při definici úkolů i při popisu jejich plnění.

Popisy elektroforetických obrázků jsou nedostatečné – každý žebřík musí mít alespoň několik proužků charakterizovaných svou délkou (nestačí název žebříku).

Zkratka dpi, použitá v textu, je poprvé definována jako „days post infection“ na straně 94. Do té doby je čtenář v nejistotě, zda-li to znamená „dots per inch“ nebo „department of public instruction“.

Dotazy

Na doktorandku mám následující dotazy, na které očekávám odpověď v průběhu obhajoby dizertační práce:

- 1) Jaké možnosti vidíte vzhledem ke globálním změnám klimatu k pěstování *Claviceps africana* nebo *Claviceps gigantea* u nás?
- 2) Jsou nějaké další možnosti indukce sterility než samčí sterilita? Existuje u žita něco jako PuraMaize™ gene system (na bázi Ga1-s) pro kukuřici?
- 3) Jsou nějaké možnosti synchronizovat zrání žita pro aplikaci *Claviceps purpurea*?
- 4) Produkci *C. purpurea* ovlivňuje počasí, kdy je příhodné vlhko. Mělo by smysl použít umělou mlhu pro zvýšení infekčnosti *C. purpurea*?
- 5) Jak si vysvětlujete degeneraci mutantů (např. Gal404)? Může mít vliv včlenění kazety do dalších míst genomu?
- 6) Nedávno se podařilo dosáhnout transformace *C.paspali* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*-zprostředkované transformace (Kozak, 2018) a byla popsána metoda Chromosome-End Knockoff Strategy pro změnu profilu produkce alkaloidů (Florea, 2016). Jsou tyto metody vhodné i pro *C. purpurea*?
- 7) Molekulárně genetickým „hitem“ posledních let je metoda CRISPR-Cas9. Byla použita už i pro vláknité houby (Nodvig, 2015). Jaké vidíte možnosti jejího použití pro *C. purpurea*?

Závěrečné vyjádření

Autorka ve své dizertační práci **prokázala** schopnost samostatní tvůrčí práce v daném oboru. Práce **splňuje** požadavky standardně kladené na dizertační práce v daném oboru. Práci **doporučuji k obhajobě** a v případě úspěšné obhajoby **doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.** dle §47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

V Olomouci, 23.4.2018

1. FLOREA, S., PHILLIPS, T. D., PANACCIONE, D. G., FARMAN, M. L. a SCHARDL, C. L. Chromosome-End Knockoff Strategy to Reshape Alkaloid Profiles of a Fungal Endophyte. *G3.(Bethesda.)*, 2016, **6**(8), 2601-2610. 2160-1836 (Electronic).PM:27334939
2. HANOSOVA, H., KOPRNA, R., VALIK, J., KNOPPOVA, L., FREBORT, I., DZUROVA, L. a GALUSZKA, P. Improving field production of ergot alkaloids by application of gametocide on rye host plants. *N.Biotechnol.*, 2015, **32**(6), 739-746. 1876-4347 (Electronic).PM:25639197
3. HULVOVA, H., GALUSZKA, P., FREBORTOVA, J. a FREBORT, I. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnol.Adv.*, 2013, **31**(1), 79-89. 1873-1899 (Electronic).PM:22261014
4. KOZAK, L., SZILAGYI, Z., VAGO, B., KAKUK, A., TOTH, L., MOLNAR, I. a POCSI, I. Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 2018, **102**(7), 3255-3266. 1432-0614 (Electronic).PM:29457197
5. NODVIG, C. S., NIELSEN, J. B., KOGLE, M. E. a MORTENSEN, U. H. A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLoS ONE*, 2015, **10**(7), e0133085-1932-6203 (Electronic).PM:26177455