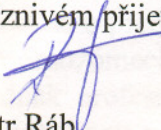


Posudek na disertační práci Mgr. Magdy Vítkové „Structural and molecular differentiation of sex chromosomes in Lepidoptera“

Když jsem dostal obálku s touto disertační prací, docela nedočkavě a zvědavě jsem je otevíral (tj. napřed obálku a potom disertační práci, obráceně by asi nešlo), ostatně jako vždy, když mám tu privilej a potěšení si přečíst nějakou práci z famózní cytogenetické dílny Františka Marece. Přiznávám rovnou, že z četby Introduction jsem se mnohé nové dozvěděl a poučil jsem se o předmětu disertace totiž nejen o pohlavních chromozómech motýlů, ale pohlavních chromozómech vůbec. Přiznávám to proto, že problematika pohlavních chromozómů je mi jednak profesně vzdálená, jednak už mě osobně vzhledem k progresivně klesající hladině testosteronu v mém organismu ani vlastně nezajímá. Když jsem ještě navíc prohlédl ony dvě primární publikace, na nichž je disertační práce založen, musím otevřeně říci, že jsem se vyděsil. Proboha, co se na tom dá vlastně ještě oponovat? Obě periodika (*Chromosoma* a *Chromosome Research*) patří v cytogenetice k nejprestižnějším, s velmi přísným recenzním řízením (to tvrdím na základě vlastní zkušenosti) a tudíž k obě studiím není co dodat. Práce mají nesmírně vysoký experimentální standard za použití zcela posledních metodických postupů mikrodisekcí studovaných chromozómů a malovací hybridizační techniky. Obě přinášejí zcela průkopnické poznatky nejen o pohlavních chromozómech motýlů, ale pohlavních dterminačních mechanismech obecně. Takže když to navíc porovnáím s téměř bezchybnou a vzornou formální vypraveností spisu, žádoucí kondenzací a stručností úvodních částí, neexistencí překlepů, tak znovu proboha, co na tom oponovat. Čili teď jsem před problémem, jak zaplnit zbytek této stránky smysluplným textem, abych dostal své pověsti pečlivého oponenta. Jinými slovy trochu se popást na úvodní části a pokusit se někde extrahovat alespoň špetičku čehosi, z čeho by se nějaká ta otázka vydobýt dala. Uvidíme. Část 1.2.1. obsahuje skutečnosti samozřejmě správné, avšak při svém širokém záběru (od hmyzu po savce) by přece jenom nějaké ty bizarnější systémy pohlavních chromozómů zasluhovaly zmínit, např. u *Leiopelma hochstetteri* W0/00 systém (ten W chromosom je vlastně B chromosom, který vznikl z W z ancestrálního systému WZ/ZZ), 00/0X u některých sítů rodu *Coregonus* (a jistě celé řadě dalších vymyšleností přírody). Chci tím říci, že tato část je informačně skoupější a zaplat' pánbůh za to, aspoň jsem mohl ukázat, že také něco vím. Dalším textem se proplétají, někde fragmentárně, popisy genetických mechanismů souvisejících s pohlavními chromozómy, kde důraz je položen na systémy a mechanismy samy a organismy, u nichž se to vyskytuje jsou jaksi mimo hlavní hledisko zájmu. To není samozřejmě chyba či omyl disertantky, ale věc převzatá z řady přehledových prací. Tento přístup mi trochu vadí, protože zanedbává, jak se to řekne česky? „sound phylogenetic framework“ Čili ono také záleží, kde nebo ve kterých skupinách/liniích se ty mechanismy vyskytují. Z tohoto hlediska by pak bylo neobyčejně vhodné pojednat o pohlavních chromozómech ne jaksi letem světem (podle toho, o čem mám separáty prací), ale cíleně u evolučně důležitých či zajímavých skupin. Tak např. bych velmi uvítal zmínku o systému pohlavních chromozómů u ptakopyska, ano to je to zvířátko, které má 5 párů X a 5x X/Y a geny související s pohlavím jak savčí, tak ptačí. Tato formální námitka má obecnější rozměr otázkou – jak vlastně mají vypadat disertační práce. Dnes je standardem téměř všude soubor publikovaných prací a „uvaří“ se k tomu více (jako je to zde) nebo méně podařený úvod (jako jsem tomu byl svědkem na slovním učilišti Karlově letos na konci jara, kde úvodní část byla rozsahem stejně dlouhá jako Poděkování, jen s tím rozdílem, že prvé - úvod byl psány s řádkováním 2, zatímco poděkování s řádkováním 1.5!). V jedné rovině je to v pořádku, disertant se vyučuje na vědce a publikace dokazuje, že zvládl řemeslo, na straně druhé výchova vědce (nebo jemu na roveň postaveného vzdělání) není jen produkce publikací (jak se dnes s dovolením fedruje na univerzitách, protože to školám vyhovuje, ježto jim nabíhají body). O tomto tvrzení jsem s mdlobnou jistotou přesvědčen - disertace by měla prokázat

schopnost disertanta formulovat problém, srovnat a precizovat myšlenky a také prokázat kultivované užívání rodného jazyka. Říká se tomu vzdělání, což není jen suma dovedností a znalostí, prosím!

Vrátím-li se zpět k této disertační práci (už jsem splnil povinné pensum jedné popsané strany!), pak nelze mít pochyb, že i tato vzdělávací stránka disertačního procesu byla naplněna v míře vrchovaté. Proto uzavírám konstatováním, že se jedná o neobyčejně zdařilý a vysoce nadprůměrný disertační spis a doporučuji komisi jeho příznivé přijetí a po tomto (= příznivém přijetí) udělení příslušné titulatury PhD.



Petr Ráb

V Liběchově 7.12.2007



Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky
RNDr. Jiří Široký, CSc.
Laboratoř vývojové genetiky rostlin
Královopolská 135, 612 65 Brno
tel. 541517194, fax: 541240500, e-mail: siroky@ibp.cz

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Magdy Vítkové „Structural and Molecular Differentiation of Sex Chromosomes in Lepidoptera“.

Mgr. Vítková si pro svoji práci zvolila náročné téma molekulárně cytogenetických analýz hmyzích pohlavních chromosomů. Práce má čtyři základní části. V první autorka nastiňuje zevrubný literární přehled o určení pohlaví u různých skupin živočichů i rostlin, o mechanismech evoluce pohlavních chromosomů a procesech divergence pohlavních chromosomů hererogametního pohlaví. V úvodní části se Mgr. Vítková rovněž krátce věnuje metodikám cytogenetického studia hmyzích chromosomů, zejména těm, kterých v předložené disertaci použila. Další dvě kapitoly představují práce publikované v časopisech *Chromosoma* a *Chromosome Research*. O těch se zmíním později, zde bych chtěl vyzdvihnout snahu presentovanou ve čtvrté kapitole, totiž v souhrnné diskusi, kde se autorka snaží (i když poměrně úsporně z hlediska rozsahu) kriticky zhodnotit své vlastní dosažené výsledky ve světle současných poznatků. Moje zkušenosti jsou takové, že disertant vezme publikované práce, k nim přidá nějaký ten úvod a disertace je hotová.

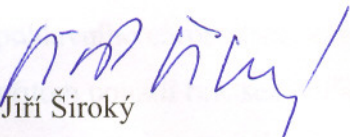
V první předložené publikaci (*Chromosoma* **116**:135–145, 2007) se autoři věnovali izolaci pohlavního chromatinu W chromosomů Obaleče jablečného pomocí laserové mikrodisekce. S výhodou přitom použili tzv. sex bodies polyploidních buněk Malpighiho trubic. To považují za velmi originální řešení, neboť mitotické chromosomy jsou velmi málo diferencované, aby bylo možné určit, který je vskutku W chromosom a izolace chromosomu W z meiotických buněk rovněž není možná vzhledem k synapsi s chromosomem Z. Nespecifickou amplifikací W heterochromatinu i euchromatinových oblastí se podařilo získat různé typy sekvencí: od jedno či nízkokopiových přes několik zástupců dosud neznámých retrotranspozonů až po non-LTR transpozony známé (či vykazující vysokou homologii) od jiných Lepidoptera, jako je *Bombyx mori*. Dále autoři využili templátu heterochromatinu W pro vyvinutí „malovacích“ sond a předkládají přesvědčivé obrázky FISH specificky iluminující W chromosomy v mitose i interfázi somatických buněk a zejména pak meiotické profázi I. Bivalenty W-Z ukazují i oblasti

s nízkým výskytem signálu, anebo žádným signálem v distálních oblastech chromosomu W. Zde bych se chtěl autorky otázat, proč se tyto subtelomerové oblasti W chromosomů paintovací sondou neznačí, má-li autorka nějakou představu o genomovém složení uvedených oblastí.

Ve druhé předložené práci (Chromosome Research 15:917–930, 2007) se autorka zabývá molekulární divergencí pohlavních W chromosomů několika druhů zavíječů. Opět s využitím mikrodisekce W heterochromotinu, tentokrát čtyř druhů zavíječů, byly připraveny FISH sondy pro „malování“ chromosomů a použity pro tzv. ZOO-FISH. Studii dále doplňuje CGH mezi jednotlivými druhy. Byla zjištěna poměrně značná divergence pohlavních W chromosomů mezi jednotlivými zástupci a to netoliko vzhledem k unikátním sekvencím, ale zejména s ohledem na W-specifické repetitivní DNA. Autoři uzavírají, že absence meiotické rekombinace u heterogametního pohlaví motýlů se odráží právě ve značné diversifikaci W a Z chromosomů. V této souvislosti bych rád položil otázku, jak to vlastně je s párováním chromosomů W a Z. Víme, že u savců, ale i některých dvoudomých rostlin s pohlavními chromosomy jsou bivalenty X a Y neúplné, tedy že nedochází k úplné synapsi po celé délce chromosomů, ale tato se omezuje pouze na pseudoautosomální oblast. Je něco známo o mechanismech tvorby synaptonemálních komplexů motýlů a chrostíků?

Celkově hodnotím předloženou disertaci jako velmi zdařilou. Předložené práce obsahují řadu zcela prioritních výsledků. Závěrem mi nezbývá, než konstatovat, že disertační práci doporučuji k obhajobě, hodnotím ji jako vynikající a doporučuji na jejím základě udělit Mgr. Vítkové vědecko-akademickou hodnost PhD.

V Brně 8. 12. 2007


Jiří Široký



Oponentský posudek doktorské disertační práce Magdy Vítkové

“Structural and molecular differentiation of sex chromosomes in Lepidoptera”

motto: *Oh, chromosomes, my chromosomes
We've learned to know you better
We know the code of DNA.
We can recite each letter.
Our thymine must have adenine.
Our guanine must have cytosine.
Its messenger pure RNA
Puts our proteins together.*

G. Ledyard Stebbins

Během posledních sto let jsme v poznání struktury a evoluce chromosomů urazili velký kus cesty. Nicméně hlubší poznání a nové techniky neposkytují odpovědi zdaleka na všechny otázky, ba zdá se, že množství vyvstávajících otázek stále roste. Předložená disertační práce Magdy Vítkové se pokouší prohloubit naše vědomosti v oblasti struktury a funkce pohlavních chromosomů motýlů (Lepidoptera).

Disertační práce sestává z úvodní části, dvou prací doktorandky publikovaných v časopisech *Chromosoma* a *Chromosome Research*, souhrnu, diskuse a závěrečné části “future plans”.

Práce uveřejněná v časopise *Chromosoma* (Fuková *et al.* 2007) pojednává o přípravě paintovací sondy specifické pro pohlavní chromosom W u druhu *Cydia pomonella*. Mikrodisekcí získaná DNA pohlavního chromatinu (W chromatin), amplifikována pomocí DOP-PCR, byla úspěšně použita k cytogenetické a molekulární charakterizaci W-specifických DNA sekvencí. V souvislosti s touto prací mám následující otázky: Kdy dochází k formování pohlavního W chromatinu, a je tento proces přítomen ve všech tkáních? Jestliže vznik W (hetero)chromatinu je vývojově a/nebo tkáňově specifický, proč nebyla analyzována interfázní struktura W chromosomu (chromosome territory) v jádrech postrádající „W-chromatin body“? V tomto kontextu se také naskytá otázka, zda u motýlů dochází k párování homologních chromosomů v somatických tkáních jako drosophily (cf. Csink a Henikoff 1998, Fung *et al.* 1998, Hiraoka *et al.* 1993), a jak je to v tomto případě s párováním W a Z chromosomů? Pomocí W-specifické paintovací sondy by bylo zajisté také možno studovat průběh párování W a Z chromosomů během meiotického dělení. Co je známo o meiotickém párování W a Z chromosomů u WZ pohlaví, a existují důkazy pre-meiotického párování pohlavních chromosomů (viz

předchozí otázka)? Jak lze vysvětlit zajímavou absencí paintingu terminálních částí W chromosomu? Je možné, že DOP-PCR amplifikace přednostně zmnoží frakci vysoce repetitivních sekvencí a (sekvenčně?) odlišné terminální části chromosomu W nejsou pak přítomny v paintovací sondě. Prosim komentujte tyto poznámky také v kontextu druhé práce (Vítková *et al.* 2007). Zajímalo by mne, proč nebyly sekvenované W-specifické a „mostly W-chromosomal“ DNA klony lokalizovány na W chromosomu. Samozřejmě jsem si vědom obtížnosti spojené s lokalizací krátkých DNA sekvencí.

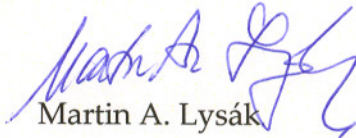
Domnívám se, že doktorandka nesprávně konstatuje (např. str. 43) prvenství v realizaci chromosomálního paintingu u hmyzu. První práce tohoto typu byla publikován téměř před deseti lety Fuchsem a kol. (Fuchs *et al.*, Chromosome painting in *Drosophila*. *Chromosome Res.* 6: 335-336, 1998). Fuchs *et al.* mikrodisekcí izolovali distální části chromosomu X a dvou autosomů, a následně provedli úspěšný painting korespondujících úseků na polytenních i mitotických chromosomech *D. melanogaster*. Samozřejmě je vcelku jedno, kdo byl první a kdo druhý... Chtěl bych jen upozornit na zcela evidentní přehlédnutí této pionýrské práce. Jörg Fuchs *et al.* použili k přípravě paintovacích sond polytenní chromosomy ze slinných žláz drosophily. Bylo by možné použít polytenních chromosomů k přípravě paintovacích sond u motýlů?

Druhá publikovaná práce (Vítková *et al.* 2007, *Chromosome Research*) pojednává o komparativní cytogenetické analýze W chromosomu u 4 druhů čeledi Pyralidae. Autorka použila metodu komparativního chromosomálního paintingu (Zoo-FISH) a komparativní genomické hybridizace (CGH či komparativní GISH). Tato studie je zřejmě první prací tohoto typu v rámci třídy hmyzu a snad i v rámci všech bezobratlých. Autorka jasně prokázala evoluční diferenciaci pohlavního W chromosomu napříč čel. Pyralidae a přednostní akumulaci repetitivních DNA sekvencí (retrotransposonů) na W chromosomech. Snad jen několik dílčích poznámek: Možná jsem přehlédl argumentaci, proč byl k přípravě W-specifické paintovací sondy použit právě druh *Ephestia kuehniella*. Také postrádám víc informací o čel. Pyralidae (počet druhů, počet chromosomů, fylogenetické vztahy). Například, má-li táto čeleď jen dvě podčeleďi, jak vyplývá z publikace? Bylo by možné analyzovat druhy s jiným počtem chromosomů než $2n=60$? Jestliže ano, je možné očekávat jinou strukturu/evoluci W chromosomu? Jaké jsou pracovní hypotézy doktorandky v rámci plánované cytogenetické analýzy čeledi Nymphalidae? Jestliže je Zoo-FISH prováděna na ZW páru pachytenních chromosomů, je možné jednoznačně identifikovat hybridizační signály na „překrytém“ Z chromosomu? U druhu *Cadra cautella* je WZ bivalent silně heterochromatizován, zatímco absence heterochromatinu je charakteristická pro WZ pár u *Galleria mellonella*. Zoo-FISH jednoznačně identifikovala homeogní W chromosom u *C. cautella*, nikoliv však u *G. mellonella*. Je možné spekulovat o vztahu mezi diferenciací W chromosomu (intenzitou Zoo-FISH signálů) a množstvím heterochromatinu?

Obecná a závěrečná otázka: Proč dochází k akumulaci repetitivních sekvencí na pohlavních X/Y chromosomech a tím k jejich evoluční degeneraci?

Položené otázky nikterak nesnižují vysokou kvalitu předložené disertační práce, byly spíše motivovány „amatéřským“ zájmem oponenta o řešenou problematiku. Magda Vítková publikovala pět prací v impaktovaných odborných časopisech, z nichž dvě jsou prvoautorské. Vysoce také hodnotím přehledně a zasvěceně zpracovanou úvodní část práce. Magda Vítková jednoznačně prokázala schopnost samostatné i týmové vědecké práce, a proto doporučuji její doktorskou práci k obhajobě.

V Brně 3. prosince 2007


Martin A. Lysák