



19. května 2010

OPONENTSKÝ POSUDEK

Magisterská práce: Evoluční a funkční analýza CenH3 genů u vybraných druhů z čeledi Viciaceae (autor práce: Zuzana Helekalové)

Magisterská práce Zuzany Helekalové s názvem „Evoluční a funkční analýza CenH3 genů u vybraných druhů z čeledi Viciaceae“ se týká obecně velmi zajímavé tematiky centromerických proteinů CenH3, konkrétně evoluční adaptace těchto proteinů k evolučním změnám v sekvenci centromerické DNA. Cílem práce bylo získání kódujících sekvencí proteinů CenH3 u vybraných druhů rostlin z čeledi Viciaceae s tím, že získané informace budou využity pro následné studium evoluce a funkce genů CenH3.

Na základě již známé sekvence DNA z hrachu, tolíce a sóji byly navrženy degenerované primery, pomocí nichž byly amplifikovány metodou RT-PCR cílené úseky u 13 zástupců čeledi Viciaceae. Získané fragmenty DNA byly klonovány a osekvenovány. Metodou 3' RACE a 5' RACE byly získány sekvence z 3' a 5' konce mRNA kódující CenH3 u osmi z deseti testovaných druhů. Celá sekvence byla tedy získána u osmi druhů. Takto získaná sekvence byla amplifikovaná pomocí PCR, zaklonovaná a osekvenovaná. Srovnání sekvencí mezi jednotlivými druhy ukázalo, délkovou a sekvenční variabilitu na N-konci, naopak sekvence byly podobné v HFD (histone fold domain).

U *Pisum sativum* a *Vicia faba* byla sekvence použita pro přípravu dvou typů fúzních konstruktů s YFP, a to buď s YFP umístěným na C-konci nebo YFP umístěným na N-konci. Jako kontrola byla použita také sekvence z *Arabidopsis thaliana*, a to opět ve fúzním konstruktu s YFP na 3' nebo 5' konci. Celkem bylo tedy připraveno šest konstruktů. Všech šest konstruktů bylo následně použito pro transformaci *V. faba*. Pro transformaci *P. sativum* byly použity konstrukty odvozené z *V. faba* a *A. thaliana*. Celkem bylo získáno 29-55 nezávisle transformovaných kultur pro každý druh a konstrukt. Po transformaci jak *V. faba*, tak *P. sativum* konstrukty odvozenými z *A. thaliana* byl pozorovaný fluorescenční signál v jádrech, nicméně bez centromerické lokalizace. Centromerická lokalizace fluorescenčního signálu byla pozorovaná, pokud byly oba druhy transformovány konstrukty se sekvencí odvozenou jak z *P. sativum*, tak *V. faba*. Neschopnost centromerické lokalizace fúzního proteinu obsahující sekvenci odvozenou z *A. thaliana* je interpretovaná jako důsledek rozdílnosti proteinové sekvence v oblasti smyčky L1 CenH3 u *A. thaliana* v porovnání s *P. sativum* a *V. faba*.

Je zcela zřejmé, že se autorka pro získání prezentovaných výsledků, které jsou poměrně širokého rozsahu, musela ujmout své laboratorní práce s velkým nasazením a úsilím. K tomu, jak bylo téma zpracováno laboratorně, nemám jedinou výhradu a hodnotím to jako velmi kvalitní. Ale nutno dodat, že i z toho důvodu je mi líto, že autorka nedokázala tuto kvalitu své práce plně zpečetit v textovém zpracování.

Text je členěn klasicky na části jako úvod, materiál a metody, výsledky, diskuze a reference. Snad jen k sekci Materiál a metody nemám závažnější připomínky, autorka zde

velmi pečlivě popisuje použité metody, i když v některých pasážích bych snad osobně doporučila větší střídmost. Také nevidím důvod rozepisovat složení reakčních směsí či profily reakcí do jednotlivých řádků, volila bych úspornější variantu v podobě zápisu do jednoho řádku. Nicméně toto vidím jako podružné.

Závažnější problém vidím ve zvoleném názvu práce, který slibuje výrazně mnohem více, než ve skutečnosti práce nabízí. Dalším problémem, a to linoucí se celou prací, je na četných místech absence odkazů na odbornou literaturu k tvrzením, která autorka v práci uvádí.

Autorka v úvodu práce uvádí, že „role centromerické satelitní DNA pro funkci centromer nebyla doposud uspokojivě vysvětlena, ale předpokládá se, že je spíše malá nebo dokonce žádná“. Jako na vysvětlenou dodává, že „Experimenty s inzercemi centromerické DNA do jiných míst chromozómů ukázaly, že samotná centromerická DNA nepostačuje k vytvoření nové centromery. Naopak analýzou neocentromer bylo zjištěno, že nová centromera se může vytvořit i v místech, které nemají žádnou sekvenční podobnost s centromerickými sekvencemi daného druhu“. Proti tomuto tvrzení se musím ohradit. Autorka patrně nesprávně interpretovala všeobecně přijímaný model, podle kterého je centromera definovaná epigeneticky raději než pouhou primární sekvencí DNA. Tím epigenetickým znakem centromery jsou právě proteiny CenH3, tj. histonové varianty, které se specificky váží k centromerickým sekvencím. Navzdory tomu, že neexistuje nějaká přesně daná primární centromerická sekvence, předpokládá se existence univerzálního centromerického kódu, který může být kupříkladu v podobě sekvenční superstruktury, tj. symetrie, kupříkladu dané alternujícími puriny a pyrimidiny či v podobě sekundárních struktur jako jsou vlásenky. Příkladem toho může být srovnání centromerické DNA primátů a *S. cerevisiae* vykazující podobnou sekvenční symetrii. Předpokládá se, že tato či podobná charakteristika funguje jako centromerický identifikátor. Další můj argument vychází z práce Kitada et al. (Curr.Genet., 31, 122-127, 1997), kde mutace centromerické DNA vedla ke ztrátě centromerické funkce. Do třetice, pouze lidská alfa satelitní DNA může vytvářet funkční centromery v umělých lidských chromozomech, na rozdíl od jakékoliv jiné DNA, a to i neocentromerické DNA objevené u člověka (Saffery et al.PNAS, 98, 2001). Z uvedených faktů vyplývá předpoklad, že primární sekvence centromerické DNA je pro funkci centromery důležitá.

Zdráhala bych se ztotožnit s autorčím tvrzením, že u holokinetických chromozómů jsou centromery rozptýlené po celé jejich délce. Centromera jako taková u holokinetických chromozómů neexistuje. Spíš se jedná o to, že u holokinetických chromozómů je centromerická funkce, v podobě místa lokalizace kinetochoru a uchycení mikrotubulů, rozprostřena podél chromozomu a tedy není lokalizovaná do jednoho určitého ohniska, jako nacházíme u chromozómů monocentrických.

Autorka uvádí, že „experimenty s inzercemi centromerické DNA do jiných míst chromozómů ukázaly, že samotná centromerická DNA nepostačuje k vytvoření nové centromery“. Protože jsem nebyla schopna najít přímý zdroj této informace, chtěla bych se autorky zeptat, alespoň o jak velké inzerce se jednalo a u jakého organismu byly tyto experimenty prováděny, což jsou údaje poměrně důležité pro interpretaci uvedeného tvrzení.

Dle mého názoru, je na škodu, že v úvodu práce není vyhrazen prostor pro detailnější popis tzv. centromerického paradoxu, což znamená rychlá evoluce centromerické DNA na jedné straně a konzervovaná centromerická funkce na straně druhé. Např. Steve Henikoff ve svých četných publikacích (např. Malik et Henikoff Cell 138, 2009) vysvětluje vznik centromerického paradoxu modelem na základě asymetrie v samičí meioze a tzv. „meiotic drive“, kdy expanze centromerických sekvencí (díky rekombinaci) umožní lepší uchycení centromery k mikrotubulům dělicího vřetenka a tím profitující postavení v meiotické tetradě, které vede v samičí meioze k výběru daného meiotického produktu pro tvorbu vajíčka či

megaspory. Takto pro přenos do další generace jsou preferovány chromozomy s více rozšířenou (namnoženou) centromerickou sekvencí, což ale postupem času na druhou stranu přináší škodlivý efekt v podobě navázaných škodlivých mutací. To vede k propagaci supresorů takovýchto tzv. sobeckých centromer v podobě zmutovaných centromerických proteinů a v konečném důsledku neustálé adaptaci centromerické DNA centromerickým proteinům a naopak. V návaznosti na to, bych se chtěla autorky zeptat, jestli vůbec existují nějaké informace ohledně centromerických determinantů na úrovni DNA u skupin s holokinetickými chromozomy a také informace ohledně centromerických proteinů, konkrétně proteinů CenH3, a případně jejich evoluční studie. Má otázka vyplývá z mého teoretického předpokladu, že holokinetické chromozomy by mohly být díky své roztroušené centromerické aktivitě více odolné k „meiotic drive“ a tím méně sekvenčně variabilní na úrovni proteinů a DNA majících zodpovědnost za centromerickou funkci. Ze stejného důvodu mně napadá otázka, jaká je evoluce centromerické DNA a centromerických proteinů u organismů, u nichž nedochází k meiotické asymetrii, jako např. u hub. Jeví se mi, že hypotéza meiotické asymetrie pro vysvětlení centromerického paradoxu je v souladu právě s jednoduchostí centromery u *S. cerevisiae*. Bylo prováděno srovnání centromerických sekvencí a proteinů mezi různými druhy kvasinek nebo alespoň mezi *S. cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*?

Část Výsledky: věc, kterou jsem velmi zvažovala je, že podstatnou část informací uvedených v této sekci bych místo do Výsledků osobně zařadila do sekce Materiál a metody, a to proto, že i když tyto informace sice odrážejí významné kvantum provedených laboratorních experimentů, *de facto* popisují doladování metodických přístupů. Na druhou stranu, vzhledem k tomu, že se jedná o diplomovou práci, lze uvedený postup akceptovat. Nicméně je škoda, že autorka dala jen nevelký prostor informacím, které se týkají zcela jistě již skutečných výsledků, jako je popis získaných sekvencí a popis výsledků z transformačních experimentů.

Pro lepší přehlednost, bych osobně zařadila obrázky přímo do textu a ne na samotný konec práce.

V tabulce 8 nejsou vysvětleny rozdíly mezi druhy fúze jako např. mezi PS CenH3-YFP označeno zeleně a oranžově. Také bych pro lepší přehlednost k jednotlivým počtům uváděla také i procentuelní zastoupení či frekvence. Na obrázcích elektroforetických gelů nejsou popsány velikosti proužků λ DNA, která byla použita jako marker. Chybí také informace o velikosti požadovaných produktů amplifikačních reakcí. Z těchto důvodů dané obrázky ztrácí na informativnosti.

V obrázku 10, je nesprávně vyznačena pozice smyčky L1, alespoň v porovnání s literaturou (Lermontova et al. The Plant Cell, Vol. 18, 2006, Cooper et Henikoff Mol. Biol. Evol. 21(9):1712–1718. 2004). Je na škodu, že v obrázku 10A, kde jsou porovnávány sekvence proteinů CenH3 z testovaných druhů, nebyla připojena také sekvence pro histon H3, který je na rozdíl od CenH3 vysoce konzervovaný a srovnání by mohlo vést k zajímavým interpretacím. Ze stejného důvodu je škoda, že v obrázku 10A není uvedena sekvence z *A. thaliana* či jiného rostlinného zástupce. Obrázek 10B není v textu vůbec zmíněn. V obrázku 11, kde jsou ukázány výsledky transformačních experimentů, nejsou jasné rozdíly v popisku mezi A,B a C, D, a E,F a G,H.


Jaké jsou fylogenetické vztahy mezi testovanými skupinami? Nezařazení fylogenetického srovnání považuji vzhledem ke zvolenému názvu práce za zcela chybné.

Dle mého názoru, diskuze mohla být daleko lépe propracovaná, alespoň co se týče srovnání s již publikovanými výsledky a zařazení fylogenetických srovnání.

V českém textu by se autorka měla vyvarovat poangličtěných tvarů jako např. „CenH3 histon“, „L1 smyčka“, CenH3 protein“ či „HFD doména“, protože v češtině gramaticky správně je „histon CenH3, smyčka L1, protein CenH3“ či doména HFD“.

Jakkoliv jsem podstatnou část svého oponentského posudku věnovala nedostatkům textového zpracování, závěrem bych chtěla velmi zdůraznit, že zmíněné nedostatky, pramenící patrně jen z nezkušenosti autorky, vidím u této práce jako poněkud podružné, a to zejména proto, že si velmi cením zajímavého tématu, které si autorka vybrala, skvělé kvality laboratorního zpracování, širokého rozsahu experimentů a důležitých výsledků, které tato práce přináší pro další studium rostlinných centromer. A je jen trošku škoda, že autorka nedokázala tato pozitiva zúročit při sepisování práce.

Po pečlivém zvážení všech kladů a záporů, hodnotím předloženou práci Zuzany Helekalové jako výborně.


Dr. Radmila Čapková Frydrychová
Oddělení genetiky,
ENTÚ, Biologické centrum AVČR
Branišovská 31
České Budějovice
Telefon: 387775282
Email: Radmila.Frydrychova@seznam.cz



Magda Vítková
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
a
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05



Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Zuzany Helekalové

„Evoluční a funkční analýza CenH3 genů u vybraných druhů z čeledi *Viciaceae*“

Autorka se ve své magisterské práci zabývala studiem genů pro centromerický histon CenH3 u 13 zástupců čeledi *Viciaceae*, k čemuž použila celé spektrum metod, počínaje návrhem degenerovaných primerů pro RT-PCR, přes klonování, sekvenování, RACE, až po přípravu fúzních konstruktů se získanými geny a transformaci modelových rostlin.

Celá práce je velice hezky a přehledně napsaná a prakticky neobsahuje formální chyby. Stručný úvod přináší nezbytné informace, které čtenář potřebuje k proniknutí do dané problematiky a metodika detailně popisuje použité metody takovým způsobem, že by případný následovník ve většině případů neměl problém experimenty zopakovat. K pochopení principu některých metod pomáhá i obrazová příloha, kde jsou schématicky znázorněny metody RACE a příprava fúzního vektoru. Výsledky jsou přehledné, diskuse stručná a relevantní.

K celé práci mám následující poznámky a otázky:

Poznámky:

- 1) První věta úvodu, která říká, že nedílnou součástí chromosomů všech eukaryotických organismů je centromera, neboli místo primární konstrikce, není přesná. Řada eukaryot má holokinetické chromosomy, kde primární konstrikce chybí a kinetochor může být rozptýlen i po celé délce chromosomu. Existence holokinetických chromosomů je pak zmíněna v následujícím odstavci, čímž je vše uvedeno na pravou míru, ale vzniká tím rozpor mezi uvedenými informacemi.
- 2) Z výsledků vyplývá, že produkty RACE byly zaklonovány, ale v metodice o tom není žádná informace.
- 3) V tabulkách s primery by bylo dobré uvést délky očekávaných produktů, případně teploty nasedání, pokud se u jednotlivých primerů lišily.
- 4) Na stranách 23 a 26 autorka popisuje transformace *Pisum sativum* a *Vicia faba* fúzními konstrukty s geny CenH3 z téhož nebo jiného druhu a jejich následnou lokalizaci v jádře a na chromosomech. K demonstraci výsledků slouží obrázek 11 s mikrofotografiemi kořínků transformovaných rostlin. Podle mého názoru je pro tento účel potřeba získat fotografie chromosomů, protože signály v interfázních jádrech nedokazují lokalizaci v centromerách. Rovněž DNA by bylo vhodné obarvit, protože na uvedených obrázcích z Nomarského kontrastu jsou jádra obtížně viditelná. Dále bych přidala obrázek difúzního signálu

z transformace konstruktem s CenH3 z *Arabidopsis thaliana* pro srovnání se signály z *V. faba* a *P. sativum*.

Otázky:

- 1) Existuje nějaká teorie o tom, proč je histon CenH3 tak variabilní, zatímco histon H3 je velice konzervovaný?
- 2) Jaký byl smysl použití primeru 3'RACE_oligoT pro první RT-PCR (sloužící k amplifikaci vnitřní části genů pro CenH3 (str. 8) místo klasického oligoT?
- 3) Ve výsledcích na straně 23 autorka píše, že velice krátká sekvence na N-konci byla u nově osekvenovaných druhů překvapivá. Proč, když bylo totéž pozorováno už dříve u *P. sativum* a *Medicago truncatula*?

Závěrem prohlašuji, že předložená práce je vynikající a plně splňuje požadavky kladené na magisterskou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a proto ji doporučuji k úspěšné obhajobě.

V Českých Budějovicích
24.5.2010



RNDr. Magda Vítková, Ph.D.