

Oponentský posudek na diplomovou práci



Biofizikální ústav Akademie věd České republiky

RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

Laboratoř vývojové genetiky rostlin

Královopolská 135, 612 65 Brno

tel. 41517203, fax: 41240500, e-mail: hobza@ibp.cz

Název práce: Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)

Autor: Martina Dalíková

Předložená diplomová práce studentky Dalíkové o struktuře pohlavního chromosomu W obaleče jablečného navazuje na projekty a významné badatelské počiny laboratoře profesora Marce. Vlastní práce je dílem velmi komplexním jak škálou použitých metod molekulární biologie (genomiky) a cytogenetiky tak svým rozsahem intelektuálním.

Přestože sám mám velké slabiny ve formálním zpracování psaného textu, zmíním alespoň jednu drobnost. V kapitole 3.4.2. autorka píše o vyizolované BAC DNA. Jaký je rozdíl mezi izolovanou a vyizolovanou DNA? Nebo například přímo název kapitoly 5.2. „Lokalizace vyselektovaných klonů“. Není lépe česky psáno „selektovaných“ nebo pro jazykové puritány „vybraných“. Chápu, že se v textu vyskytuje mnoho anglických slov, kterými si člověk usnadňuje práci (pellet resuspendovala) a nehladá násilně česká synonyma, ale používání předpon k vytváření nových českých slov je zbytečné.

Co se týče práce samotné, již na první pohled obdivuji preciznost, s níž autorka musela přistupovat k hybridizačním experimentům. Pomínou-li cytogenetické výsledky (obrázky), které jsou často finálně prezentovány po určité selekci z mnoha pokusů (možná se mýlím a jedná se jen o moji vlastní zkušenost, zde bych možná poprosil autorku o reakci), u hybridizací na membránách („BAC screen“, Southernova hybridizace) jsem překvapen, jak kvalitní mohou být výstupy „ne-radioaktivním“ přístupem značení. Velice bych autorce doporučoval realizovat myšlenku uvedenou v poslední větě diskuze. Sekvenace jednotlivých BACů je v současné době relativně levná záležitost (sekvenovat jeden BAC podle poslední nabídky od firmy využívající 454 technologii stojí 30 tisíc Kč) a podle vlastní zkušenosti se před člověkem otevře úplně nová dimenze výzkumu, kdy z anonymních markerů podivných jmen se „stanou“ nově identifikované geny vázané na pohlavní chromosomy.

V části 5.3. jsem úplně nepochopil, proč autorka neměla k dispozici dostatečné množství BAC DNA z klonu W27-1 a znovu se snažila klonovat zmíněný BAC. Autorka už neměla během práce přístup k primární BAC knihovně? Také bych autorce doporučil používat při izolaci BAC DNA postupy založené na přidání exonukleázy (např. QIAGEN Large-Construct Kit). Při izolaci běžných „high copy“ plazmidů člověk nebere v potaz, že je malá frakce izolované DNA tvořena bakteriální genomickou DNA, v případě BAC vektorů to bývá i více než padesát procent. Přestože člověk nepostřehne tento fenomén při použití BAC DNA jako sondy na FISH, například při „subklonování“ nebo sekvenování BACů je to již významná komplikace.

K autorce diplomové práce mám ještě několik dotazů. Autorka porovnává výsledky lokalizace BACů odvozených z W chromosomu bource a obaleče. Jak jsou zmíněné druhy evolučně daleko? Šlo by provádět komparativní studie (BAC z bource „použít“ na obaleče a vice versa)? V případě, že ano, jaké by autorka očekávala výsledky? Přestože autorka píše, že výsledky práce přispějí k detailnímu poznání molekulárního složení chromosomu W, je možné přinést další argumenty na podporu studia pohlavních chromosomů? V případě, že by autorka pokračovala s danou tematikou ve svém badatelském životě, jaké má další vize a cíle?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že diplomová práce studentky Martiny Dalíkové svou kvalitou výrazně převyšuje standardní úroveň a doporučuji ji jednoznačně k obhajobě.

V Brně dne 25. května 2009

RNDr. Roman Hobza, Ph.D.



JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH, PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA,
KATEDRA GENETIKY

Oponentský posudek na magisterskou práci

Název práce: Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného
Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae)

Autor: Martina Dalíková

Oponent: Alena Rego

HODNOCENÍ FORMÁLNÍ STRÁNKY PRÁCE

Po formální stránce je tato magisterská práce pěkně provedena, obrázky i tabulka jsou přehledné a text je formálně i jazykově dobře napsaný. Mám pouze dvě připomínky, které nijak neubírají na kvalitě samotné práce. V kapitole materiál a metody mohla autorka používat u sloves pouze trpný rod, který působí ve vědeckých článcích objektivněji. Dále by bylo přehlednější, kdyby autorka očíslovala tabulky a obrázky odděleně a také jejich číslování odpovídalo pořadí v textu.

HODNOCENÍ OBSAHOVÉ STRÁNKY PRÁCE

Moderní metody cytogenetiky a cytologie v dnešní době značně využívají znalosti a techniky molekulární biologie. Tento trend, který za cenu zvýšené náročnosti používaných metod přináší cytogenetikům více informací, je také základem magisterské práce Martyiny Dalíkové

Název práce dobře vystihuje její obsah.

Cíle předložené práce jsou jasně formulovány. Cílem bylo vyselektovat z existující genomové knihovny obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) BAC klony (Bacterial Artificial Chromosome) obsahující sekvence pohlavních chromosomů W a Z. Tyto klony pak měly posloužit k strukturní analýze pohlavních chromosomů a také ke studiu opožděného párování motýlých chromosomů WZ a pravidel k utváření jejich synaptonemálního komplexu.

Úvod je celkově jasný, přehledný a vztahuje se k zadané problematice, mohl být ovšem kratší o celou sekci 1.3. dopodrobna popisující problematiku BAC vektorů. Toto oddělení zaujímá celé dvě strany textu a vzhledem k tomu, že autorka nijak tuto metodu nevyvíjela (pouze vektory používala), zdá se mi tato část zbytečná.

Zatímco citování souhrnných článků u obecných, dobře známých faktů je pochopitelné, doporučuji Martině pro případné budoucí práce použití původních článků vždy, pokud popisuje detailní nálezy (viz. počty pohlavních chromosomů u ptakopyska a termita u kapitoly 1.1.) - tak jak to bylo příkladně provedeno například v kapitole 1.2.

Materiál a metody jsou jasně a srozumitelně napsané. Autorka zvládla obdivuhodné množství technik, které jí pomohly splnit vytčené cíle.

Výsledky předložené práce jsou dobře prezentované a **diskutované**. Uchazečka připravila W-specifické sondy (obsahující sekvence CpW2 a CpW5), které byly hybridizovány s BAC klony existující genomové knihovny. Martina tímto způsobem získala tři BAC klony a pomocí PCR a Southernovy hybridizace potom potvrdila přítomnost alespoň jedné z W-specifických sekvencí u dvou ze tří klonů. Biotinem značené sondy, připravené z těchto dvou klonů, byly použity k vlastní cytologické charakterizaci pomocí BAC-FISH. Klon 23N12 hybridizoval na chromosomu W na několika symetricky rozmístěných usecích, kdežto klon 26J11 hybridizoval kromě chromosomu W také s jedním z autosomů.

Vedle klonů s W-specifickými sekvencemi Martina vyseletovala klony obsahující Z-obohacené repetice (39 klonů) a pomocí již existujících sond také klony obsahující geny lokalizované na Z chromosomu (12 klonů). Samotné obdržení klonů obsahující sekvence pohlavních chromosomů motýlů je velmi cenným přínosem Martininy práce a tyto klony jistě v laboratoři Františka Marece v budoucnosti přispějí ke studiu pohlavních chromosomů motýlů.

Pro studium vzájemné orientace a párování pohlavních chromosomů pomocí BAC-FISH autorka potřebovala použít asymetricky hybridizující sondy z obou pohlavních chromosomů. Vzhledem k téměř symetrickému rozmístění hybridizačních signálů u Martinou připraveného klonu 23N12, a nevhodnosti použití klonu 26J11, uchazečka použila asymetricky hybridizující BAC klon s alternativní W specifickou sekvencí (W27-1). Jak jsem z předložené práce porozuměla, tento klon byl pokytnut a vysektován podle sekvence CpW27 Ivou Fukovou. Z práce je ovšem těžko pochopitelné, zda se Martina snažila naamplifikovat tuto DNA - což by vyplývalo z textu v kapitole výsledky. Nelogická se potom ale zdá spoluhybridizace W27-1 sondy s klonem 23N12, který obsahuje rozdílné sekvence (CpW2 a CpW5) a který podle autorčinných výsledků vykazuje nepoužitelnou symetrickou hybridizaci s W. **Prosím autorku o vysvětlení - včetně obrázku 13!**

Pro označení chromosomu Z byla uchazečce Petrem Nguyenem poskytnuta sonda z klonu 33L16, který vykazuje asymetrické hybridizační signály. Podle společné hybridizace výše uvedených WZ markerů došla autorka k významnému zjištění, že je pohlavní bivalent vždy tvořen chromosomy o stále orientaci. Navíc DNA z klonu obsahujícího Z-lokus hybridizovala také v protilehlé oblasti na chromosomu W.

Tyto výsledky vedly autorku k dvěma velmi důležitým **závěrům** odpovídajícím cílům práce

- A) existenci homologních oblastí u heterosomu motýlů, která nebyla zatím nikdy pozorována
- B) orientovanému párování chromosomů WZ, které nikdy předtím nebylo plně u motýlů doloženo. Poznámka: tento závěr není v rozporu s prací Marece (2001), jak autorka uvádí v diskusi, alternativní orientace fragmentu Z v trivalentu WZfragmentZ byla v této práci vysvětlována právě aberantním původem fragmentu.

Bohužel musím poznamenat, že oba výše uvedené závěry nejsou v práci podložena počtem pozorování. Tvzení ze strany 21 " *na všech pachytenních bivalentech WZ tohoto druhu jsem pomocí BAC sond, použitých jako cytogenetických markerů chromosomů W a Z, pozorovala a prokázala totožnou vzájemnou orientaci pohlavních chromosomů během meiotického párování*" se rozhodně mělo v kapitole výsledky podpořit údajem o počtu pozorování, např. u všech 30 jader získaných celkem z 5 samic atd. **Prosím autorku o doplnění během obhajoby!**

Nicméně výsledky této práce přispívají k objasnění nejasného složení a chování chromosomů W a Z u řádu Lepidoptera.

Věřím, že předložená magisterská práce bude základem pro kvalitní článek ve vědeckém časopise a také, že splňuje požadavky kladené na magisterské práce předkládané na PŘF JU. Práci proto doporučuji k obhajobě a hodnotím ji **mezi stupni výborně a velmi dobře**. Hlasuji výborně v případě, že Martina úspěšně vysvětlí hybridizaci na obrázku č. 13 a zároveň prokáže, že získala signifikantní počet použitelných jader (alespoň 9) u FISH s klony W27-1 a 33L16.

Alena Rego Ph.D.

25. května 2009