

## Oponentský posudek magisterské práce Bc. Pavlína Věchtové „Isolation and characterization of highly repetitive fraction of codling moth, *Cydia pomonella*“

Magisterská práce Bc. Pavlína Věchtové byla zaměřena na studium repetitivní složky genomu obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Hlavními cíli bylo otestovat různé postupy izolace repetitivní DNA, určit typ a distribuci nalezených repetitiv na chromozómech a nakonec otestovat jejich výskyt v genomech příbuzných druhů. Velmi oceňuji, že práce je napsána v anglickém jazyce.

Je zjevné, že studentka musela zvládnout řadu molekulárních a cytogenetických technik. Studentce se podařilo identifikovat sekvenci satelitní DNA, která byla nazvaná CPSAT-1. Tato sekvence byla detekována i v genomech některých příbuzných druhů. Kromě toho studentka určila distribuci 17 různých mikrosatelitů na chromozómech zavíječe jablečného.

Podle mého názoru nelze na základě získaných dat činit žádné obecnější závěry pokud jde o složení repetitivní složky genomu zavíječe. Podobně není možné odvodit žádnou jasnou souvislost mezi distribucí repetitivních sekvencí a holocentrickým typem chromozómů. Přesto se domnívám, že tato magisterská práce kvantitativně i kvalitativně splňuje kriteria kladená na tento typ práce a proto ji mohu hodnotit jako výbornou. To ovšem neznamená, že souhlasím se všemi tvrzeními a závěry uvedenými v předložené práci.

K práci mám tyto poznámky či kritické připomínky (při obhajobě požadují odpovědi či reakce pouze k bodům označeným tučně):

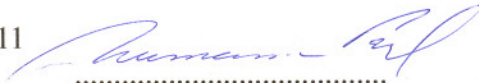
1. Velmi jsem se těšil, že se v úvodu dozvím mnoho zajímavých informací ohledně porovnání složení a organizace repetitivní DNA mezi druhy s monocentrickými a holocentrickými chromozómy. Byl jsem proto zklamán, že tomuto aspektu byl v úvodu věnován poměrně malý prostor. Naopak řada informací, jako např. v sekcích 1.4 a 1.5, s tématem práce přímo nesouvisí.
2. Strana 3, poslední odstavec: Ne všechny satelity jsou bohaté na AT. Takových je asi většina, ale existují i satelity průměrným složením bází nebo i satelity bohaté na GC.
3. Strana 4, odstavec 4: Věty na začátku a konci tohoto odstavce si logicky odporují. Nelze přece tvrdit, že satelitní DNA má funkční význam, protože je transkripčně aktivní a poté konstatovat, že funkce transkriptů je spekulativní. V této souvislosti musím podotknout, že transkripční aktivita většiny dosud prostudovaných repetitiv je velmi nízká.
4. Strana 4, poslední odstavec: Postrádám citaci pro tvrzení, že minisatelity jsou lokalizované přednostně v subtelomerických oblastech.
5. Strana 17, poslední odstavec: Tabulka, která má následovat je až na straně 26. Na straně 17 není uvedeno, že odkaz platí pro tabulku 1.
6. **Strana 23, první odstavec:** Hybridizační a odmývací podmínky byly stejné pro všechny mikrosatelitové sondy. Přitom sekvence stejné délky ale různého složení bází mají různou teplotu tání, čemuž by měly odpovídat různé podmínky hybridizace/odmývání. Jinak je velké riziko, že určitá sekvence bude hybridizovat i s jinými sekvencemi nebo naopak nebude hybridizovat vůbec. Navíc, některé výsledky *in situ* hybridizace nevypadají příliš přesvědčivě. Zejména u mikrosatelitu CAC je téměř nemožné rozlišit co je signál a co pozadí.
7. Strana 8, množství DNA má být v  $\mu\text{g}$ .
8. **Strana 27, Fig 5:** Na Southern blotu jsou vidět pouze 4 fragmenty tvořící tzv. „žebřík“ typický pro satelitní DNA. Tento výsledek má ale dvě možná vysvětlení. První je, že restriční místo je velmi konzervované a proto se satelit štěpí na fragmenty obsahující 1 – 4 monomery. Druhé vysvětlení ale je, že jednotlivé lokusy této repetice jsou tvořeny pouze několika málo monomery a pak nelze hovořit o satelitní DNA ale spíše o minisatelitu případně repetici na pomezí těchto dvou kategorií tandemově uspořádané DNA. Že možná nejde o typicky satelitní



DNA lze usuzovat i na základě poměrně rozptýleného signálu na chromozómech detekovaného metodou FISH. Byly provedeny nějaké experimenty, které by umožnily rozlišit zda se jedná o satelit či minisatelit? Pokud ne, jaký typ experimentu by bylo možné k tomuto účelu použít?

9. **Strana 27 včetně Fig.7:** Dot-blot hybridizace prokázala přítomnost CPSAT-1 sekvence mimo jiné také u bource morušového (*Bombyx mori*), jehož genom, jak studentka sama na jiném místě uvádí, byl osekvenován. Proto mne velmi překvapuje, že nebyla u tohoto druhu provedena žádná analýza této sekvence. V případě, že žádná sekvence podobná CPSAT-1 v genomu bource není, jaké následky by taková skutečnost měla pro interpretaci výsledků dot-blot hybridizace?
10. Strana 28, odstavec 4: Centromera je u drtivé většiny druhů determinována epigeneticky, přičemž primární sekvence centromerických repetitivních sekvencí hraje zřejmě až sekundární, pokud vůbec nějakou, roli. Existence sekvenčního motivu zaručujícího interakci s kinetochorem je proto velmi nepravděpodobná. Z výsledků této práce rovněž nelze vyvozovat, že sekvence CPSAT-1 s kinetochorem neinteraguje.
11. Strana 38, poslední odstavec: Porovnávat četnosti různých mikrosatelitů podle intenzity signálů po *in situ* hybridizaci není příliš spolehlivý způsob. A to tím spíše nevezmete-li v úvahu připomínku č. 6.
12. **Doplňující otázka:** Techniky použité v této práci k nalezení repetitivních sekvencí začínají být pomalu ale jistě zastaralé. Kdybyste začínala tento projekt dnes a měla k dispozici pár set tisíc Kč, jaký postup byste zvolila?

V Českých Budějovicích 19.5.2011



.....  
Pavel Neumann

## Oponentský posudek na diplomovou práci

Název práce: Isolation and characterization of highly repetitive fraction of codling moth, *Cydia pomonella*

Jméno autora(ky): Bc. Pavlína Věchtová

Oponent Mgr. Zdeněk Kubát, Ph.D.

### Hodnocení:

Bc. Pavlína Věchtová si ve své diplomové práci dala za cíl izolovat a charakterizovat vysoce repetitivní sekvence z genomu obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Tento organizmus je zajímavý holokinetickými chromozomy, které neobsahují primární centromerické konstriktce typické pro velké množství živočišných i rostlinných druhů. Neobvyklá struktura kinetochoru rozloženého po většině délky holocentrických chromozomů má zajímavé důsledky pro dynamiku genomu na úrovni karyotypu, struktury chromozomů a distribuce repetitivních sekvencí. Studium repeticí u druhu obsahujícího holocentrické chromozomy může přinést zajímavé výsledky, které se nemusí shodovat s poznatky získanými studiem organismů s monocentrickými chromozomy.

Diplomová práce obsahuje velmi přehledný úvod rozdělený na kapitoly, které se postupně věnují různým typům repetitivních sekvencí a jejich roli v genomech hostitelských organismů. V závěru úvodu je pak připomenut aktuální stav výzkumu modelového organismu obaleče jablečného, který je teprve v začátcích. Metodika práce je velmi srozumitelně popsána stejně jako dosažené výsledky. Během zpracovávání diplomové práce bylo využito poměrně široké spektrum molekulárně biologických a cytogenetických metod, práce tedy byla značně časově náročná.

Autorce se z genomu obaleče jablečného podařilo izolovat a charakterizovat jednu novou satelitní sekvenci, kterou nazvala CPSAT-1. Zjistila také, že je tento satelit přítomen u několika příbuzných druhů, byť je u nich sekvenčně divergovaný. Southern blot hybridizace napovídají, že genom obaleče obsahuje větší množství různých repeticí a je tedy politováníhodné, že se jí autorce nepodařilo izolovat a charakterizovat více. Předpokládám, že je to způsobeno nezdary při klonování, což je častý problém při práci s tandemovými repeticemi. V další části se autorka zabývala distribucí mikrosatelitů na chromozomech obaleče jablečného. Mikrosatelity se v některých genomech s monocentrickými chromozomy velmi výrazně kumulují v oblastech, v nichž došlo v nedávné minulosti k zástavě rekombinace. Zde pak mohou fungovat jako vhodná místa pro inserce mobilních elementů a podporovat tak degeneraci chromozomu. Distribuce mikrosatelitů na holokinetických chromozomech obaleče je oproti tomu velmi homogenní, což autorka velmi obsáhle diskutuje v závěru své práce.

Diplomová práce je napsána v anglickém jazyce dobré úrovně. Práce obsahuje jen malé množství drobných formálních nedostatků, například chybu ve jméně a opomenutí kurzívy u latinského názvu bakterie *Carsonella ruddii* na první straně úvodu nebo chybějící čárka mezi jménem a rokem vydání citace (Thomas, 1971) na téže straně. Z odborného hlediska je nemilou chybou špatně uvedené přístupové číslo klonu CP5.173 z databáze NCBI (DO394030.1 místo DQ394030.1) na straně 27. Žádná z těchto a podobných drobných chyb



nemá vliv na celkové dobré vyznění práce. Celkově je práce velice přehledná a pečlivě zpracovaná a hodnotím ji v tomto směru velmi kladně.

**Otázky:**

- 1) Vzhledem k tomu, že jsem se v práci nedočel, jaká je přesná délka monomeru satelitu CPSAT-1 a z příloženého Southern blotu není zcela zřejmá, zajímala by mě odpověď alespoň nyní.
- 2) Autorčiny výsledky ze Southern blot hybridizací a FISH se sondou CPSAT-1 naznačují, že genom obaleče jablečného je velmi chudý na dlouhé bloky tandemových repetice, což autorka odůvodňuje holokinetickým charakterem chromozomů u tohoto druhu. Zajímalo by mě, jestli totéž platí i u příbuzných druhů lepidopter s holokinetickými chromozomy, nebo jestli je to dokonce společný znak všech druhů s holokinetickými chromozomy.
- 3) Autorka zmiňuje, že mikrosatelity mohou být v genomu šířeny pomocí retrotranspozonů. Nejsou známy i případy, kdy by byly stejným způsobem šířeny také tandemové repetice s delšími monomery?

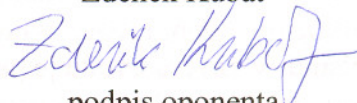
**Závěr:**

Předloženou diplomovou práci považuji za velmi zdařilou a doporučuji ji k obhajobě.

V Brně

dne 18.5.2011

Zdeněk Kubát



podpis oponenta