

Oponentský posudek

na magisterskou diplomovou práci studentky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích

Barbory Blažkové

na téma:

Charakterizace molekulárního složení genomu obaleče jablečného, *Cydia pomonella*,

s využitím reasociační kinetiky.

Téma magisterské diplomové práce, zabývající se charakterizací genomu obaleče jablečného pomocí metod reasociační kinetiky, charakterizací podílu repetitivní DNA, izolací repetitivních a unikátních frakcí DNA a možnostmi využití těchto frakcí jako sond pro FISH je aktuální a naplňuje požadavky, kladené na vypracování diplomové práce a její úlohu v rozvoji vědeckého poznání vysokoškolských studentů biologického směru.

Svým členěním práce naplňuje formální požadavky, kladené na vypracování diplomové práce. V rešerši je studovaná problematika stručně a výstižně popsána, stejně jako modelový druh. Oceňuji stručnou a jasnou formulaci cílů práce. Použité metodické postupy jsou dobře a detailně popsány a je z nich zřejmé, že autorka dobře zvládla náročné postupy extrakce a fragmentace DNA, určení teploty tání, resp. denaturace DNA, reasociace DNA pro chromatografii, separace jedno- a dvouvláknové frakce DNA, přečištění frakcí DNA dialýzou a měření koncentrace, stejně jako přípravu chromozomových preparátů, sond a samotnou FISH. Výsledky a diskuse jsou pečlivě zpracovány. Literatura je korektně citována. Práce je psána kultivovaným jazykem, pouze ojediněle autorce do textu unikly slangové výrazy (např. „focení“). Občas se vyskytující drobné překlepy nesnižují kvalitu předložené práce.

Ve své magisterské diplomové práci autorka získala hodnoty potřebné pro izolaci vysoce repetitivní a unikátní frakce DNA, získala tyto frakce DNA a po přečištění je naznačila fluorochromem a použila pro hybridizační experimenty. Naznačené frakce použila v hybridizaci jako kompetitory, aby byla snížena nespecifická hybridizace sondy ve srovnání se standardně používaným kompetitorem sonikované gDNA opačného pohlaví vůči jedinci z chromozomového preparátu. Hybridizace ukázala rovnoměrné rozmístění unikátních sekvencí po celém genomu včetně sex chromozómu W. Vysoce repetitivní sekvence byly rozmístěny rovnoměrně v celém genomu a zvýraznily část W chromozómu. Po metodologické stránce

práce přináší cenné nové poznatky o získání optimálního kompetitora pro hybridizační experimenty a pokud se tak ještě nestalo, podle mého názoru po určitých úpravách zasluhuje publikovat.

K práci nemám žádné zásadní výhrady ani připomínky. Magisterská diplomová práce studentky Barbory Blažkové, stejně jako ostatní diplomové práce z Přírodovědecké fakulty JU jež se mi dostaly do rukou, svou úrovní převyšovala většinu diplomových prací, které jsem dosud oponoval.

Práci hodnotím **výborně** a doporučuji ji k obhajobě.

Ve Vodňanech, 16.1. 2013

doc.Ing.Martin Flajšhans, Dr.rer.agr.
Laboratoř molekulární, buněčné a kvantitativní genetiky
FROV JU

Oponentský posudek diplomové práce Barbory Blažkové „Charakterizace molekulárního složení genomu obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, s využitím reasociační kinetiky“

Cílem diplomové práce Barbory Blažkové bylo charakterizovat genom obaleče jablečného pomocí reasociační analýzy a na jejím základě poté izolovat repetitivní a unikátní frakci genomické DNA a porovnat distribuci těchto dvou typů DNA na chromozómech. Podstatným dílčím cílem bylo také otestovat využitelnost repetitivní DNA jako specifického kompetitora pro FISH. Je zjevné, že studentka musela zvládnout hned několik molekulárně cytogenetických metod. Provedené experimenty odpovídají zadaným cílům a podle mého názoru jsou dostatečně dobře popsány. Narazil jsem na několik překlepů a chyb v citacích, nicméně, nepovažuji za nutné uvádět jejich kompletní seznam. K jednotlivým částem této práce mám ale několik různě závažných výhrad či komentářů.

K úvodu práce mám jen jednu větší výhradu a to k rozdělení tandemových repetitivních sekvencí na mikrosatelity, minisatelity a satelity. Tyto kategorie tandemových repetitivních sekvencí sice skutečně existují, ovšem kritériem pro toto třídění není velikost jejich monomerů, tak jak je uvedeno v tabulce 1.

K výsledkům a diskuzi mám několik výhrad, jejichž výčet následuje:

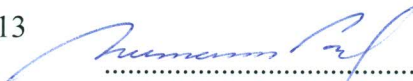
1. Nerozumím smyslu kapitoly 4.1., kde je popsán experiment zaměřený na stanovení teploty tání DNA zkoumaného druhu. Účel tohoto experimentu je sice zřejmý, ale vzhledem k tomu, že se evidentně nepovedl, je poměrně nelogické takový výsledek uvádět. Respektive logické by bylo experiment zopakovat s lepším vybavením nebo za jiných podmínek, tak aby se následující klíčové reasociační experimenty daly opřít o skutečnou T_m DNA obaleče jablečného. Jestliže bylo studentce známo, že T_m DNA bource morušového je $80\text{ }^\circ\text{C}$, proč byl použit přístroj umožňující dosáhnout maximálně $70\text{ }^\circ\text{C}$ resp., proč nebyla snížena koncentrace pufru tak aby umožnila denuraci při nižší teplotě? Nesouhlasím s vysvětlením, že T_m odhadnutá pro DNA obaleče byla nízká z důvodu odparu, protože ten by naopak vedl ke zvýšení koncentrace pufru a tudíž ke zvýšení denaturační teploty. Mimochodem, citovaná práce není „Gage a kol., 1974“, nýbrž jen „Gage, 1974“. Dále, poslední věta v této kapitole je matoucí, neboť teplota pro reasociaci byla $60\text{ }^\circ\text{C}$ a ne $80\text{ }^\circ\text{C}$.
2. Výsledky samotného reasociačního experimentu (kap. 4.2.) nepůsobí příliš přesvědčivě jednak z důvodu poměrně malého počtu bodů v grafu (obr. 3) a zejména z důvodu nekonzistentních hodnot v druhé části, které neumožnily proložení optimální křivky. Není mi jasné, jak mohla být z těchto hodnot vypočítána hodnota $C_0t_{1/2}$ pro unikátní frakci DNA. Domnívám se, že by bylo

bývalo vhodné tento experiment zopakovat. Citovaná práce „Peterson D. G., 2009“ chybí v seznamu literatury.

3. V textu jsou popisovány tři různé kategorie/frakce DNA (vysoce repetitivní, středně repetitivní a unikátní), nicméně není zřejmé, jak byly tyto frakce definovány (odkaz na program C0tQuest nepovažuji za dostatečný).
4. Podíly jednotlivých frakcí (repetitivní DNA 46,1, unikátní 25,57 a nezreasociovaná 30,36 %, str. 21, odstavec 2) tvoří v součtu 102,03 %. Jak je to možné? Není mi rovněž jasné jak bylo dosaženo hodnot 66,2 a 36,72 % (celkem 102,92 %).
5. Ačkoli považuji výsledky a závěry C0t analýzy za diskutabilní, je jisté že izolovaná C0t-1 DNA je výborným kompetitorem, který v budoucnu jistě výrazně pomůže při studiu složení chromozómů obaleče metodou FISH. Překvapivým výsledkem pro mne ovšem bylo zjištění, že vysoce repetitivní frakce DNA jako kompetitor nefungovala. Vysvětlení přišlo až v diskuzi, kde jsem se dozvěděl, že zatímco C0t-1 frakce byla vyizolována ze samice, vysoce repetitivní DNA pocházela ze samce. Vezmu-li v úvahu, že velká část repetice nacházejících se na chromozómu W je specifická nebo přinejmenším silně obohacená jen na tomto chromozómu (viz signál sondy BAC W (27-1)), nedalo se ani očekávat, že by frakce vysoce repetitivní DNA mohla repetice chromozómu W účinně blokovat. Pokud bylo cílem této práce blokovat repetice na chromozómu W, proč nebyla vysoce repetitivní DNA izolována ze samice?
6. Diskuze. I když frakce tzv. unikátní DNA obsahuje mnohem méně repetitivní DNA než odpovídá jejímu podílu v genomu, nelze považovat FISH signál takové sondy jako signál výhradně nebo převážně unikátních sekvencí. Rovnoměrné rozmístění signálu na všech chromozómech včetně chromozómu W mohlo být způsobeno spíše repeticemi než unikátními sekvencemi. Tomu nasvědčuje také fakt, že tato “unikátní frakce DNA” značila jadérka.

I přes výše zmíněné nedostatky se domnívám, že tato práce v zásadě splňuje jak kvantitativní tak kvalitativní nároky kladené na diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě s hodnocením velmi dobře.

V Český Budějovicích 21.1.2013



Pavel Neumann