



V Praze 19.1.2019

### Oponentský posudek

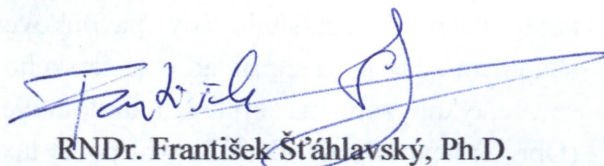
Diplomová práce Moniky Štackové představuje cytogenetickou analýzu modelového druhu sklípkan, jejíž hlavním cílem byla optimalizace protokolu TSA-FISH pro pozdější detekci pohlavně vázaných genů u tohoto řádu členovců. Dílčím úkolem bylo navíc také ověřit druhovou příslušnost analyzovaného druhu pavouka. Vzhledem k čistě metodickému zaměření práce je nejdetailněji rozpracovaný podrobný popis metod a jejich optimalizace, což plně umožňuje zopakování použitých postupů. Z popisu je znát, že si studentka zjevně tyto postupy osvojila. K této části bych měl jen velmi drobnou připomínku k použitým primerům. Zarazilo mě, že sekvence primerů LCO a HCO jsou citovány z práce Yao a kol. 2010, která se věnuje využití jiného genového fragmentu (ITS2). U primerů genů použitých pro TSA-FISH nejsou uvedeny žádné zdrojové články. Znamená to, že si je autorka navrhla sama? Již vážnější výhrady mám k části 3.1 Materiál. V celé diplomové práci totiž zcela chybějí informace o lokalitách použitého materiálu. Jelikož jeden z dílčích cílů řeší ověření druhové příslušnosti modelového druhu, tak je tato informace velmi důležitá. I s ohledem na to, že výsledky naznačují existenci více taxonů ve vlastním materiálu. Dále zde chybí i informace, kteří jedinci (a jejich pohlaví) byli použity k vlastní cytogenetické analýze, a ne zcela šťastný je i výčet sekvencí použitých z databáze GenBank přímo v textu (mnohem přehlednější by byla tabulka, ideálně také doplněná o lokality vzorků). Bohužel více kriticky se musím vyjádřit o dalších částech diplomové práce. V úvodu se autorka snaží o shrnutí znalostí o cytogenetice pavouků, nicméně přehled není většinou příliš detailní a kompletní. Například u pohlavních chromosomů (zvláštní podkapitola) kompletně vypadly varianty s pohlavním chromosomem Y. U celého úvodu je navíc zjevné, že si autorka vybrala jen několik málo rozsáhlejších prací o pavoucích, ze kterých čerpá většinu uvedených informací. Využití molekulárně cytogenetických markerů u pavouků by bylo přehlednější jako samostatná podkapitola. Jelikož se mapovali jen čtyři genové fragmenty, tak podrobnější přehled jejich využití v cytogenetických studiích v obecnější rovině by si taky zasloužilo větší prostor a své samostatné podkapitoly. Do úvodu jsou naopak začleněny části popisující GISH a CGH což příliš nechápu. Tyto metody u pavouků zatím použity nebyly. Pokud chtěla autorka uvést modifikace FISH, tak by výčet různých variant musel být mnohem delší. Ještě heslovitější než úvod je pak diskuse výsledků (2 strany). Chápu, že informace o mapovaných genech u pavouků jsou zatím jen velmi kusé, ale zejména v případě 18S rDNA se nabízí detailnější srovnání s výsledky stříbření (tam je údajů poměrně dost) nebo alespoň s dalšími řády pavoukvců či úplně jinými lépe prozkoumanými skupinami. Jak je to například u sesterského řádu pavouků? Mé nejvážnější připomínky se ale týkají zejména výsledků diplomové práce. Prezentovaný fylogenetický strom (Obr. 2) neumožňuje identifikovat počet taxonů použitých pro cytogenetickou analýzu. Pro lepší představu by snad pomohla vizualizace stromu se zobrazenou délkou větví či doplnění tabulky s p-distancemi mezi vzorky. Pro delimitaci druhů jsou ale k dispozici mnohem sofistikovanější analytické postupy, které také využívají zjištěnou topologii fylogenetických vztahů. Věděla by autorka alespoň nějaký příklad? Hlavní částí

diplomové práce nicméně byla optimalizace TSA-FISH pro čtyři genové fragmenty. V tomto směru bych přivítal bohatší obrazovou dokumentaci i v případě špatných či přímo negativních výsledků. Porovnání před a po optimalizaci různých kroků a uvedení konkrétních parametrů TSA-FISH u obrázků by čtenáři umožnilo lépe posoudit vliv změněných parametrů na kvalitu vizualizace signálu. Ve fylogenetické analýze autorka naznačuje, že cytogeneticky zpracovávaný materiál je ve skutečnosti jiný druh než dříve karyotypovaný sklípkan *Grammostola rosea*. Proč do své analýzy nezařadila i popis karyotypu? Umožnilo by to specifikovat případné další mezidruhové rozdíly, a navíc i přesněji lokalizovat pozici identifikovaných signálů tří genů. Po podrobnějším seznámením se s karyotypem analyzovaného taxonu by se možná zabránilo i zcela fatálním chybám v interpretaci výsledků prezentovaných v podkapitole 4.3 a na obrázku 5.

1. Je skutečně na obrázku 5A metafáze I jak je uvedeno v popisku?
2. Pokud je na obrázku 5B diplotene, co potom představují jednotlivé viditelné elementy? A proč tudíž šipky nezobrazují dva páry signálů na opačných koncích chromosomů, ale ve skutečnosti situaci podobnou předchozímu obrázku 5A?
3. Popisek k obrázku 5 uvádí, že se jedná o samčí chromosomy. Je pak možné označit pohlavní chromosomy tak jak je to zobrazeno na obrázku 5D?
4. Na obrázku 5E jsou opět samčí chromosomy? Pokud ano tak jsou skutečně správně označené pohlavní chromosomy? Pokud to samec je, dokázala by autorka odhadnout proč se mi správnost označení pohlavních chromosomů nezdá? A proč jsem si jistý, že signál pro H3 byl detekovaný pouze na jediném metacentrickém páru a ne na dvou párech jak je uvedeno v diplomové práci (což nezáleží na pohlaví)?

Autorka se bohužel nevyvarovala ani formálním chybám opomenutím několika prací z textu v seznamu literatury (např. Nebel a Ruttle 1938, Sumner 2003, Carabajal Paladino a kol. 2014, White 1940) či přehlédnutím, že se ve skutečnosti jedná o více autorů (např. Araujo 2018, Král 2006, 2011, Kořínková 2013). Vlastní přehled literatury byl pravděpodobně generován automaticky programem, ale jeho následná kontrola by určitě ještě neuškodila. Minimálně by bylo vhodné doplnit že se v některých případech jedná o diplomové práce a zahrnout také sekundární citace (vhodně označené) a internetové zdroje.

Práce zahrnuje zajímavé originální výsledky, které jsou v mnoha případech zcela nové pro celý řád pavouků. Vzhledem k výše uvedeným nedostatkům ale bohužel považuji diplomovou práci spíše za podprůměrnou.



RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

Katedra zoologie, PřF UK



RNDr. Iva Vrbová, Ph.D.  
Laboratoř molekulární cytogenetiky  
Ústav molekulární biologie rostlin, BC AVČR, v.v.i.  
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
Telefon: (+420) 387 775 511  
Fax: (+420) 385 310 356  
E-mail: [ifukova@umbr.cas.cz](mailto:ifukova@umbr.cas.cz)

## Oponentský posudek diplomové práce Moniky Šťackové:

### Mapování vybraných sekvencí metodou TSA-FISH u pavouků

Práce Moniky Šťackové je součástí rozsáhlejšího projektu studia pohlavních chromosomů u pavouků. Tato skupina zahrnuje řadu druhů s mnohočetnými pohlavními chromosomy. K vysvětlení jejich vzniku bylo navrženo několik hypotéz. Monika se ve své práci zaměřila na zavedení metody fluorescenční hybridizace *in situ* s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH) u sklípkana *Grammostola* sp. pro detekci pohlavně vázaných genů. Tento přístup by mohl napomoci verifikovat hypotézy o vzniku mnohočetných pohlavních chromosomů pavouků a objasnit tak jejich evoluci.

Formální členění práce je v pořádku, výhrady mám však k jejímu rozsahu, zejména pak k výsledkům a jejich diskuzi (viz níže). V každém případě kapitola úvodu poskytuje slušný přehled cytogenetiky pavouků a metodiky použité ke studiu jejich karyotypů včetně představení modelové skupiny druhů. Měla bych zde jen několik málo výhrad a dotazů k upřesnění textu:

Text se čte dobře, ale např. již v kapitole 1.1 Cytogenetika pavouků na str. 2 a 3 jsou odstavce na celou stránku. Jejich rozdělení by přispělo k větší přehlednosti a lepší čitelnosti textu.

Obtížněji pochopitelná je pro mě kapitola 1.2 Karyotypová evoluce u pavouků, kde je zmiňována řada taxonomických skupin různých úrovní, což je pro mne jako čtenáře neznalého pavoučí taxonomie matoucí. Pomohlo by přesunutí první části (prvního odstavce) z kapitoly 1.3 Modelový organizmus včetně obr. 1 ještě před tuto část.

Není mi jasné, co autorka myslí tvrzením: „...barevné formy *G. anthracina* ve skutečnosti nepředstavují ani sesterské skupiny.“ Znamená to, že tyto barevné formy jsou tedy spíše na úrovni druhů?

Cíle práce jsou nastíněné stručně a jasně, nicméně poslední věta této kapitoly není cílem. Mělo by zde být uvedeno, čeho chce autorka dosáhnout a jaké k tomu navrhuje použít metody a postup práce. Nepatří sem tedy konstatování, jak probíhala optimalizace protokolu hybridizace.

Kapitola Materiál a metody poskytuje vyčerpávající přehled metod použitých v práci. Postupy jsou popsány svědomitě a pečlivě. Jen bych zde měla poznámku k pravopisu, neboť právě zde se vyskytuje několik, ať už pravopisných či typografických chyb. Např. v kapitole 3.8 na str. 14 je hrubá chyba ve shodě přísudku s podmětem: „Pozice jader na preparátu byly zapsány, aby mohli být po TSA-FISH znovu nalezeny.“ V celé kapitole se navíc vyskytují

chyby v psaní jednotek. Mezi číselnou hodnotou a značkou jednotky se obvykle vynechává mezera. Píšeme tedy např. 20 mM KCl a nikoli 20mM KCl. V práci se toto pravidlo uplatňuje nejjednoduše, často však mezera chybí, zejména při uvádění molárních koncentrací roztoků a jednotlivých složek reakčních směsí.

Ještě bych se ráda zeptala na pár drobných detailů u použitých postupů:

V kapitole 3.6 na str. 12 je v PCR reakci použita koncentrace primerů 2,5 mM. Tato koncentrace se mi zdá o 3-4 řády vyšší, než se běžně používá. Je to v pořádku nebo se jedná o chybu?

Dále by mě zajímalo, zda autorka rozumí principu nick-translace. Jak tato reakce probíhá? V prvním odstavci kapitoly 3.7 na str. 13 je totiž uvedeno: „Následně byl enzym inaktivován...“ V reakci jsou nicméně zapotřebí enzymy dva.

Stěžejní částí práce by měla být kapitola výsledků, ale bohužel právě k ní mám nejvíce výhrad. Ty méně závažné jsou uvedeny v několika málo následujících bodech:

Hned v úvodní kapitole 4.1 je na str. 17 nedostatečný popis obr. 2. Ten navíc předchází celý text kapitoly, což nepůsobí dobře.

V následující kapitole 4.2 Optimalizace protokolu pro TSA-FISH je v tabulce 2 na str. 19 koncentrace DAPI uvedena v  $\mu\text{l/ml}$ . Tato jednotka je nicneříkající.

Na obr. 4 na str. 20 je ukázáno odmytí chromatinu, ke kterému docházelo u některých preparátů během procesu TSA-FISH. Nemohlo to být způsobeno vynecháním postfixace chromatinu paraformaldehydem? Navíc je v legendě k tomuto obrázku nadbytečný text, který činí popis nesmyslným.

Hlavní výsledky práce jsou pak prezentovány na obr. 5 na str. 22. Popisek k obrázku je však velmi nepřehledný a velmi špatně čitelný. Nepovažuji za příliš šťastný způsob popisu výčtem jednotlivých atributů a jejich přítomnost na tom kterém dílčím obrázku (zde A-E). Čtení výsledků z takového obrázku je značně frustrující. Čtenář je nucen neustále lovit v textu popisku, co je na dané části obrázku jak zobrazeno. Daleko lépe je nejprve popsat každý obrázek kompletně a souhrnně pak označit např. použití barev v jednotlivých kanálech, použité značky a měřítko.

Zajímalo by mě, při jakém zvětšení byly foceny chromosomy po TSA-FISH? Není možné, že slabé signály sond pro 18S rDNA a 5S rDNA na obr. 5B, resp. 5D jsou viditelné právě díky většímu zvětšení? U obr. 5D by navíc pomohlo rozložení na jednotlivé kanály, neboť slabé hybridizační signály nejsou příliš patrné (alespoň tedy v tištěné verzi práce).

Kolik preparátů lze připravit z jednoho jedince *Grammostola* sp.? Jedná se o poměrně velké zvíře a přestože neplatí přímá úměra mezi velikostí těla a velikostí pohlavních orgánů, řekla bych, že to bude více než jeden. V textu na str. 21 se totiž uvádí, že sonda pro 18S rDNA u některých jedinců poskytovala pouze jeden silný terminální signál na krátkém raménku submetacentrického páru chromosomů, zatímco u jiných jedinců byly detekovány navíc slabší signály na opačném konci téhož chromosomového páru. Byly tedy výsledky u jednoho jedince konzistentní?

Na základě kolika pokusů, resp. obrázků byly vyhodnocovány výsledky TSA-FISH? Zdá se mi, že na obr. 5E jsou promíchány chromosomy ze dvou figur. Jednak je na obrázku přítomno na první pohled více elementů než u těch ostatních a dále je u jedné sady těchto chromosomů chromatin o něco málo více rozvolněný a chromatidy jsou částečně separované v porovnání s druhou polovinou chromosomů. To by znamenalo, že klastr genů pro histon H3 by byl přítomen pouze na jediném chromosomovém páru.

Byla při TSA-FISH použita nějaká pozitivní kontrola? Tedy preparát z druhu, kde je metoda již dobře zavedená, souběžně s testovanými preparáty, aby se ověřilo, zda je protokol funkční a zda barvení a detekce probíhají v pořádku. Je zde vůbec možnost takové kontroly?

Případně nebylo by možné detekovat genové rodiny 18S a 5S rDNA nejprve nějakou jednodušší a zavedenou technikou, jako např. pomocí FISH s přímo značenou sondou? Optimalizace metody TSA-FISH na neznámém druhu je přinejmenším složitá. Amplifikace signálu a řada kroků předpůsobení skel při této metodě přináší řadu komplikací a roste tak počet kritických míst protokolu.

Bylo u studovaného druhu použito barvení dusičnanem stříbrným pro detekci organizátorů jadérka (NOR)?

Diskuze svým rozsahem odpovídá výsledkům. Významnější připomínku mám pouze k její druhé kapitole, kde je diskuze výsledků fylogenetické analýzy vystavěna na nedohledatelné dosud nepublikované práci. Takovéto závěry by měly být citovány jako osobní sdělení.

Přehled použité literatury obsahuje celou řadu závažných chyb. Zajímalo by mě, jak byl generován? Nejenže citace nemají jednotný formát, druhová jména nejsou psána kurzívou, před čárkami a tečkami jsou často mezery, ale v přehledu chybí např. zásadní práce, která je podkladem pro použitou metodiku Carabajal Paladino a kol. (2014). Je politováníhodné, že se navíc jedná o publikaci školitelky. U řady dalších položek chybí název časopisu, u studentských prací je často jen název a není jasné, o jakou práci se jedná, dokonce chybí jména autorů nebo obsahují chyby. Např. práce Kořínková a Král (2013) je v textu na str. 6 citována jako Kořínková (2013), nicméně v přehledu literatury je uvedena jako „Tereza Kořínková JK (2013)...“, což redukuje jméno druhého autora na iniciály, řadí citaci pod písmeno T a navíc není jasné, zda se jedná o článek v časopise, kapitolu v knize, či jinou formu prezentace, neboť je uveden pouze název práce.

Celkově na mě práce Moniky Šťackové působí spíše jako práce bakalářská než diplomová, a to jak rozsahem, tak zpracováním. Zajisté obsahuje nové a originální výsledky a ani by nevadilo, že jich není více. Metoda TSA-FISH totiž vyžaduje náročné a zdlouhavé optimalizování podmínek pro každý nový druh a způsob přípravy preparátů. Přesto nebo snad právě proto bych očekávala daleko pečlivější a pozornější zpracování získaných výsledků hybridizací. Práce může sloužit jako podklad k obhajobě magisterského titulu, nicméně navrhuji snížený stupeň jejího hodnocení, konkrétně pak známku dobře.

České Budějovice, 19. 1. 2019

  
Iva Vrbová