



Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Miriam Demkové

Diplomová práce Bc. Miriam Demkové si klade za cíl analyzovat přítomnost/absenci a stupeň molekulární diferenciace samičího specifického pohlavního chromozómu W u rozsáhlého souboru jedinců (16 rodin z pěti českých lokalit) motýla skvrnopásníka lískového *Lomaspilis marginata*. K tomuto účelu byla analyzována polyploidní interfázní jádra malpighických tubic a také byla použita metoda komparativní genomové hybridizace na pachytenních chromozómech. Práce odhalila variabilitu mezi jedinci různých rodin a místy i v rámci rodiny, a to jak v přítomnosti či absenci sex chromatinu, tak v jeho uspořádání a také z hlediska molekulární diferenciace pohlavního chromozómu W. Tyto výsledky přizívají kritický pohled na vypovídací hodnotu dosavadních metod detekce sex chromatinu v interfázních jádrech polyploidních buněk a naznačují v tomto ohledu nutnost přezkumu u některých skupin/druhů motýlů. Práce rovněž poukazuje na důležitost analýzy jedinců různých rodin/populací téhož druhu pro získání uceleného obrazu dynamiky pohlavních chromozómů u daného taxonu.

Samotná diplomová práce má rozsah 34 stran a dvě strany příloh. Působí tedy relativně stručně, je však co do obsahu standardně a logicky členěná a obsahuje malé množství překlepů. 49 literárních zdrojů citovaných v textu odpovídá až na jednu výjimku seznamu literatury (Yoshido et al. 2011 v textu není citován). V seznamu literatury je patrná nesourodost formátování názvů časopisů (zkratky vs. zkratky s tečkami vs. plné názvy vs. absence kurzívy aj.). Na několika místech (str. 3, 29, 30, 31) je část textu tmavě šedě zbarvená namísto standardní černé.

Z jazykového hlediska se autorka nevyvarovala některým běžně rozšířeným anglicizmům (př. chromosomální místo chromosomové nebo retrotranspozabilní elementy místo retrotranspozóny) nebo nepřesné terminologii (str. 1: pozor na slovo heterogamie – je to něco jiného než heterogametrie).

Literární přehled odpovídá tématu, je napsán srozumitelně (cením si zejména přesného vysvětlení metod GISH a CGH na str. 6-7). Některé kapitoly jsou však více stručné, než by si to dané téma zasloužilo. Týká se to především kapitoly o evoluci pohlavních chromozómů, která je pojata značně komprimovaným způsobem a s nepřesnostmi (např. specifické pro dané pohlaví jsou často konkrétní alely genů, nikoliv přímo celé geny a také již není aktuální tvrzení, že B chromozómy jen výjimečně obsahují protein-kódující geny). Chybí mi zde zakomponování poznatků z více recentních literárních zdrojů. A to zrovna v posledních několika letech došlo na nebývalou nadprodukcii obsáhlých přehledových prací o pohlavních chromozómech, reflektujících rapidní vývoj toto odvětví výzkumu. Chybí také např. objasnění pojmů heteromorfní pohlavní chromozóm, pohlavně-antagonistická selekce, a v následující kapitole pojmu syntenie. Na str. 3 není jednoznačně vysvětleno, jak malovací sonda reprezentující chromozóm W objasnila molekulární odlišnost W chromozómů mezi dvěma druhy motýlů. Na str. 6: klasické cytogenetické techniky nejsou založené na G-pruhování, nýbrž obecně na způsobu uspořádání AT- a GC-bohatých sekvencí v genomu. Na str. 7: v rámci evolučního pojetí bych nemluvil o chromozómových aberacích, nýbrž o chromozómových přestavbách.

Cíle práce jsou jasně definovány, pouze dílčí cíl 1 je formulován poněkud kostrbatě.

Část **Materiál a metody** byla vesměs srozumitelně popsána, nebylo mi však jasných několik detailů, popř. jsem narazil na některé nepřesnosti:

- (1) Na str. 9 není vysvětleno, proč je možné sklíčka skladovat ve 4 °C nejdéle po dobu dvou týdnů.
- (2) Místo počtu otáček na centrifuze by bylo dle mého názoru vhodnější uvést relativní centrifugační sílu (násobky tíhového zrychlení g) nebo uvést k otáčkám i poloměr rotoru.

- (3) Není objasněno, proč byla koncentrace DNA měřena na Nanodropu i fluorometru a pakliže se naměřené hodnoty lišily, která hodnota byla použita pro přípravu sond a proč.
- (4) U nick translace (str. 11) není uveden důvod závěrečného zahřátí na 70 °C na 10 min.
- (5) U CGH (str. 11-12) není jasné, že inkubace 90 min při 37 °C je onen pre-hybridizační krok (zmiňovaný později u telomerické FISH) a jaký je smysl tohoto kroku.
- (6) Přímé označení filtrů, fluorochromů a sond jako „červený/á, zelený/á a modrý“ mi nepřijde (na rozdíl od popisu signálů) jako úplně vhodné řešení v odborném textu.

V části **Výsledky** oceňuji mapku s lokalitami a přehledy výsledků v Tab 1 a Obr. 6. Autorka nicméně v textu na str. 14 zmiňuje rodinu F18-07, která v Tab 1 a Obr. 6 chybí (překlep?). U výsledků CGH se mi nezdá, že by samičí-specifické bloky v typu W-1 byly všechny terminální, jak je popisováno na str. 20 a také mi připadá, že kromě uvedené odlišné spiralizace by různý počet bloků mohl být způsoben např. odlišnou amplifikací a distribucí zúčastněných repetit. Je škoda, že zrovna rodina F20-01, která má jedny z nejzajímavějších charakteristik (fragmentovaný nebo chybějící sex chromatin vs. vzor CGH typu W-2) nebyla analyzována přes barcoding, a proto sumarizace jejích charakteristik chybí v Obr. 6, čímž v celkovém textu trochu zapadá. Ale rozumím tomu, že materiál zkrátka občas už není k dispozici.

Dokumentace výsledků je zdařilá a dostačující, cytogenetické obrazové přílohy jsou prezentovány v podstatě v publikační kvalitě. Snad jen na některých obrázcích (zejména 4b) by bylo možné výrazněji ořezat přebytečné černé pozadí. Jako ne úplně šťastné považuji v Obr. 3 použití toho samého typu šipky pro dokumentaci třech různých jevů a šipka poukazující na NOR spíše vlastně ukazuje na přetrvávající jadérko. Jadérko by se dalo označit i ve spodní části obrázku 4a.

Diskuze je opravdu diskuzí a její rozsah je v podstatě dostačující. Je ale trochu škoda, že výsledky nebyly diskutovány ve trochu širším kontextu. Některé konkrétní záležitosti rozvádím níže v otázkách 4-6.

Otázky:

- 1) V textu se mnohokrát hovoří o tom, že heterochromatin chromozómů W je výrazně podbarven DAPI. Nikde ale není řečeno, co to říká o typu sekvencí, kterými jsou bloky heterochromatinu tvořeny. Jaké sekvence preferenčně DAPI barví? Co potom v tomto kontextu může znamenat, pokud některé chromozómy W nejsou pomocí DAPI výrazně podbarveny, zatímco CGH je zvýrazní?
- 2) Autorka uvádí, že některé motýlí W chromozómy neobsahují determinantu pohlaví. Existuje nějaké vysvětlení nebo teorie, proč takové chromozómy W setrvávají v karyotypu?
- 3) Co znamená, že jsou chromozómy u motýlů „celkem malé“ (str. 6)? V jakém rozsahu velikostí se tedy pohybují?
- 4) Zнала by autorka nějaké jiné živočišné rody/druhy, kde metoda CGH odhalila variabilitu v molekulární diferenciaci pohlavních chromozómů?
- 5) Zнала by autorka příklad ještě jiného živočišného taxonu (kromě uvedené bzučivky a ideálně mimo hmyz), kde byl odhalen vnitrodruhový polymorfismus v míře diferenciace nepárového pohlavního chromozómu?
- 6) Na str. 24 je diskutována přítomnost DAPI-pozitivního univalentu nebo bivalentu u některých samic z rodin s typem W-3. Když pomineme počítání mitotických chromozómů u samic jako možnost (u samců bychom si nepomohli, tam by bylo ZZ v každém případě), jak bychom mohli metodologicky (alespoň na teoretické bázi) odlišit v meióze univalent od bivalentu? Jak by se ještě jinak dala vysvětlit přítomnost detekovaných telomerických repetit pouze na jednom konci tohoto pozoruhodného elementu?

Závěr velmi zdařile shrnuje hlavní přínos diplomové práce.

Celkové hodnocení: Cíle práce byly podle mého názoru splněny. Získaná originální data významně doplňují a rozšiřují současný stav poznání problematiky evoluce W chromozómu a sex chromatinu u motýlů. Autorka zároveň svými výsledky dokázala, že si osvojila potřebné cytogenetické a fylogenetické metody, a že je schopná ze získaných dat vyvodit relevantní závěry.

V případě uspokojivé prezentace (včetně zodpovězení otázek) doporučuji práci k úspěšné obhajobě.

V Liběchově, 19.5.2022

Mgr. Alexandr Sember. Ph.D.