



Prof. RNDr. František Marec, CSc.
1) Biologické centrum AVČR, Entomologický ústav, Lab. molekulární cytogenetiky
2) Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice
Tel.: +420-387 775 250 (218, 249, 269); Fax: +420-385 310 354
e-mail: marec@entu.cas.cz <http://www.entu.cas.cz/>



OPONENTSKÝ POSUDEK

na doktorskou disertační práci RNDr. Martiny Pokorné

Evoluce způsobů určování pohlaví a genomů u šupinatých plazů (Reptilia: Squamata)

Předložená disertační práce se zabývá aktuálním a velmi atraktivním tématem u skupiny obratlovců, známé neobvyklou diversitou mechanismů určení pohlaví, zahrnujících teplotní závislost (TSD) a dva základní systémy genetického určení (GSD), závislé na konstituci pohlavních chromosomů typu XY nebo WZ. Hlavními kapitolami disertačního spisu je pět původních vědeckých prací, tři vyšlé v renomovaných zoologických či genetických časopisech a dva rukopisy; u všech je Dr. Pokorná prvním autorem, takže nepochybuji, že se na všech podílela rozhodujícím způsobem. Řešená problematika je poutavě zpracována na 18 česky psaných úvodních stranách, včetně hlavních výsledků doplněných názornými ilustracemi. Závěry vyplývající z výsledků jsou kriticky zhodnoceny a včleněny do kontextu poznání evoluce pohlavních chromosomů obratlovců na čtyřech závěrečných stranách spisu. Z těchto česky psaných částí disertace lze vycítit velké zaujetí či přímo nadšení pro studovanou problematiku. Na tomto místě podotýkám, že mě čtení celé disertace také velmi bavilo, nejen proto, že se problematikou pohlavních chromosomů sám zabývám, ale i proto, že práce je výsledkem dobře promyšleného a motivovaného výzkumu, který si klade podstatné otázky a krok za krokem je řeší.

K úvodní části mám následující připomínky a doplňkové dotazy.

- Str. 7: souhlasím, že jsou dva základní způsoby determinace pohlaví, ESD a GSD, ale pokud je GSD charakterizováno tím, že o pohlaví rozhodují geny, jež jsou vázány na pohlavní chromosomy, vypadla by z tohoto způsobu nejen početná skupina haplo-diploidních živočichů, kteří pohlavní chromosomy nemají, ale i např. *Drosophila*, u níž hlavní spouštěč kaskády genů určujících pohlaví, *Sex lethal*, neleží na pohlavních chromosomech.
- Str. 11 (a dále v textu, včetně publikací): moderní termín „syntenie“ je často používán v nesprávném kontextu – dle významu slova syntenie (doporučuji stránky Wikipedie <http://en.wikipedia.org/wiki/Synteny>, kde je termín velmi dobře charakterizován) nelze hovořit o syntenii chromosomů, ty mohou být homologní nebo homeologní; syntenie (tj. „výskyt na stejném vlákně“) se týká genů/lokusů, čili správná formulace je např. „zachovaná syntenie genů mezi pohlavními chromosomy Z u kuřete a gekona“.
- Str. 14: zaujala mě informace, že Z má vlastnosti, díky kterým se uplatňuje jako výjimečně dobrá sonda; je to díky konzervativnosti jeho sekvencí? To pak ale odporuje teorii „Fast-Z efekt“, dle které by měly Z-vázané kódující sekvence divergovat rychleji než autosomální, což bylo prokázáno v recentních studiích Judith Mank u ptáků. Čím je tedy dána lepší hybridizační schopnost Z-sond? Repeticemi? A jakými?

Poznámky a doplňkové dotazy k jednotlivým kapitolám.

Kapitola 1

Pokorná M, Kratochvíl L (2009) Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex-chromosomes an evolutionary trap? *Zool. J. Lin. Soc.* **156**: 168-183.

Na základě srovnávací fylogenetické analýzy určení pohlaví u více než 400 druhů šupinatých plazů dospěli autoři k závěru, že původním mechanismem je TSD, které se opakovaně přesmyklo na GSD, zatímco obrácený přechod nebyl prokázán. To vedlo autory k formulování dle mého názoru dobře podložené hypotézy, že diferenciaci pohlavních chromosomů je jakousi evoluční pastí.

Zaujala mě informace v bodě 7 na str. 34 o nezávislém původu GSD u společného předka Gymnophthalidae + Teiidae + Lacertidae + Amphisbaenia + Scincidae + Varanidae + Serpentes dle morfologického kladogramu. Ale některé z těchto skupin mají pohlavní chromosomy XY a jiné WZ. Pokud by tedy vznikla GSD u společného předka, znamenalo by to, že např. nejdřív byl WZ systém, pak došlo k přesmyku na XY? Přitom v diskuzi autoři upřednostňují nezávislý vznik XY či WZ z autosomů, což se mi též zdá pravděpodobnější před přesmykem jednoho heterogametického systému na druhý. Jak to bylo tedy myšleno v bodě 7?

Rozluštění sporných otázek by jistě pomohla znalost o společném či separátním původu pohlavních chromosomů v jednotlivých skupinách, jak autoři upozorňují v diskuzi. Jsou u studovaných organismů k dispozici nějaké vhodné molekulárně-cytogenetické a genomické nástroje pro ověřování homologie pohlavních chromosomů u různých druhů či skupin?

Kapitola 2

Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PC, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W (2011) Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma*. Publikováno online 2.7.2011.

Tato práce, založená na Zoo-FISH se sondou pro kuřecí chromosom Z u 28 druhů šupinatých plazů, krokodýla a želvy, přesvědčivě dokazuje, že kuřecí Z není homologní s pohlavními chromosomy šupinatých plazů, ale přitom je zachována jeho homologie k autosomu či jeho segmentu; fascinující je vysoký stupeň této homologie navzdory obrovským evoluční vzdálenostem. Dále mě nadchla originální metoda stanovení vazby ortologů pohlavně vázaných genů kuřete pomocí PCR s templáty DNA z fluorometricky sortovaných chromosomů.

Při popisu metody FISH mě překvapil rozptyl doby (1-4 min.) denaturace chromosomů v 70% formamidu se zdůvodněním, že doba byla volena podle druhu a typu metafázi. Zajímalo by mě, jak může druh a typ metafázi ovlivnit denaturaci DNA?

Kapitola 3

Pokorná M, Kratochvíl L, Rens W: Can we predict emergence of a key evolutionary novelty? Reconstruction of ancestral sex-determining mechanism in Amniote vertebrate questions predictions for extinct marine reptiles. Rukopis.

Tato teoretická studie je reakcí na článek Organ *et al.* (2009) v časopise *Nature* tvrdící, že GSD bylo klíčovým znakem, který umožnil adaptivní radiaci vyhynulých mořských skupin plazů. Studie přináší přesvědčivé argumenty proti tomuto tvrzení, z nichž hlavním je dobře podložený výsledek fylogenetické analýzy, že ancestrální se zdá být spíše TSD než GSD a že alternativní scénář by vyžadoval 4 nezávislé tranzice z GSD na TSD a také přesmyk ze systému XY na WZ či opačně. Předpokládám, že tato studie je připravena též pro *Nature*. Je tomu tak?

Kapitola 4

Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith MA, Rens W, Kratochvíl L. (2010) Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Res.* **18**: 809-820.

V této publikaci byly detailní analýzou karyotypů 12 druhů gekončků, skupiny s oběma typy určení pohlaví (TSD i GSD), metodami klasické i molekulární cytogenetiky prokázány diferencované pohlavní chromosomy pouze u gekončíka mexického (*Coleonyx elegans*), zato však unikátního typu X_1X_2Y , kde metacentrický Y vznikl centrickou fúzí dvou akrocentrických chromosomů. Výsledky FISH se sondou specifickou pro tento neo-Y chromosom pak vedly autory k závěru, že se jedná o pohlavní chromosomy v raném stadiu diferenciaci.

Metodický dotaz: čím byla značena telomerická sonda? Cy3-dUTP? Předkládám, že sonda pro 28S rDNA byla značena biotinem, když byl k její detekci použit FITC-Avidin.

Ve výsledcích autoři uvádějí, že u chromosomu Y nebyly prokázány intersticiální telomerické sekvence (ITS). Avšak dle mého názoru to neznamená, že v místě fúze nejsou zbytky telomer, protože standardní FISH má nedostatečné rozlišení pro detekci krátkých degradujících ITS.

Neuvažovali jste o možnosti molekulární diferenciaci pohlavních chromosomů u druhů s GSD či podezřelých z GSD metodami GISH nebo CGH?

Na obrázku Fig. 2J je vidět, že sonda pro Y poměrně dobře značila též autosomy. Použili jste nějakou kompetitivní DNA k zablokování hybridizace s autosomy? Mohla by též oslabit hybridizaci s X_1 , čili odhalit známky molekulární diferenciaci mezi X_1 a Y.

Kapitola 5

Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E: Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stage of heteromorphism and heterochromatinization in lizards (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). Rukopis.

V práci byla zkoumána distribuce mikrosatelitů a repetitivní GATA metodou FISH na chromosomech dvou modelů s pohlavními chromosomy odlišného typu, gekončíka *C. elegans* s X_1X_2Y a paještěrky *E. velox* s WZ. Autoři zjistili uniformní distribuci satelitů v genomu gekončíka a potvrdili tak závěr předchozí práce o raném stádiu molekulární diferenciaci euchromatinového chromosomu Y. Naopak heterochromatinem tvořený chromosom W paještěrky vykazoval silnou akumulaci většiny mikrosatelitů v souladu s pokročilým stupněm jeho diferenciaci. GATA sekvence, spojené s určením pohlaví hadů, nebyly u obou modelů prokázány.

Rukopis jeví známky přípravné fáze, např. v popise metod postrádám informaci, jak byly sondy značeny; čtenář se to dozví až v legendách k obrázkům. Též ve výsledcích chybí odkazy na konkrétní obrázky, značení obrazových tabulí pouze Fig. 1 a Fig. 2 je nedostatečné.

Na str. 101 mě zarazila zmínka, že chromosom W paještěrky je DAPI-negativní. Není to přepis? Vždyť je plný repetitivní a v kapitole 2 na Fig. 2i (str. 69) se mi naopak zdá jako DAPI-pozitivní!

Mohla by mi autorka blíže vysvětlit tvrzení v diskuzi dole na str. 103 a odkazem na Rutkowska and Badayaev (2008) o ochraně proti „female meiotic drive“ jako možnému mechanismu udržení homomorfie chromosomů W a Z u linie ještěrek vedoucí k *Eremias velox*? Je „female meiotic drive“ popsán u obratlovců? Poznámka: homomorfní pohlavní chromosomy, ale výrazně diferencované molekulárně jsou typické pro motýly – dle mého názoru to může souviset s meiotickým párováním WZ včetně tvorby synaptonemálního komplexu – morfologická podobnost je výhodná.

Závěr

Disertační práce Dr. Pokorné má vynikající odbornou úroveň. Řeší základní otázky současné evoluční biologie a genetiky na základě hluboké znalosti problematiky a s využitím fylogenetických metod a moderních nástrojů molekulární cytogenetiky. Díky perfektnímu zvládnutí těchto metod, systematickému a nezvykle rozsáhlému výzkumu získala autorka originální výsledky, které výrazně přispěly k prohloubení znalostí o mechanismech určení pohlaví šupinatých plazů a jejich evoluci. Předložená práce výrazně převyšuje požadavky kladené na disertační práce a s velkým potěšením ji

d o p o r u č u j i j i k o b h a j o b ě v doktorském studijním programu Zoologie.



František Marec

V Českých Budějovicích, 28. srpna 2011