Prof. RNDr. František Marec, CSc.
[1)] Biologické centrum AVČR, Entomologický ústav, Lab. molek. cytogenet.
[2)] Přírodovědecká fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích
Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice
Tel.: +420-387 775 252 (250, 249, 269); Fax: +420-385 310 354
e-mail: marec@entu.cas.cz http://www.entu.cas.cz/

O P O N E N T S K Ý P O S U D E K

na doktorskou disertační práci Mgr. Evy Seifertové

Genetické mapování u rodu *Xenopus*

Předložená disertační práce se zabývá aktuálním tématem genetiky a evoluční biologie, mapováním genomu drápatky *Xenopus tropicalis* a vývojem alternativních metod pro zpřesnění genetické mapy tohoto modelu zkonstruované dříve pomocí vazebného mapování. Základním metodickým nástrojem práce je nedávno osekvenovaný genom *X. tropicalis*, vlastní práce využívá řadu pokročilých metod molekulární cytogenetiky, genomiky a bioinformatiky. Hlavními kapitolami disertačního spisu jsou čtyři původní práce, publikované v letech 2011-13 ve vysoce renomovaných časopisech; E. Seifertová je první autorkou a též korespondujícím autorem jedné a spoluautorkou tří publikací. Předpokládám, že podíl autorky na publikacích bude upřesněn během obhajoby práce.

Řešená problematika včetně používaných metod je přehledně zpracována na cca 20 česky psaných úvodních stranách kap. 1. Z této části vyplývá i motivace práce, jejíž cíle jsou jasně specifikovány v kap. 2. Výsledky jednotlivých publikací, zařazených do kap. 3, jsou pak stručně popsány a diskutovány včetně použitých metod na 14 česky psaných stranách. Hlavní výsledky a celkový přínos disertační práce E. Seifertové jsou velmi výstižně shrnuty v kap. 5 (Závěr), kterou považuji za nejlépe napsanou českou část celé práce. I když jsou česky psané části práce psány s minimech překlepů a chyb, nemohu si odpustit kritickou připomínku ke slohu či stylu psaní. S výjimkou velmi zdařilé kap. 5, je v českých textech řada anglicismů (např. *assembly*) a slov laboratorního žargonu (např. *xenopí komunita*). Je mi jasné, že u takto moderní problematiky je nemožné se anglicismům vyhnout, ale přesto si myslím, že autorka mohla texty zpracovat pečlivěji a přejaté anglické termíny dát např. do uvozovek nebo je psát kurzívou, případně psát texty raději přímo anglicky.

K úvodní části mám následující připomínky a doplňkové dotazy.

- Str. 3, Abstrakt, 2. odstavec: spojení „celogenomová amplifikace získané DNA“ je nevhodné, neboť se nejedná o celý genom, ale jen úsek jedné molekuly DNA, získaný mikrodisekcí raménka jednoho chromosomu. Podobně je toto nevhodné spojení použito i v textu kap. 1.4 na str. 21. Naopak je správné použití tohoto spojení ve smyslu „metoda celogenomové amplifikace“ jako např. v kap. 1.5. na str. 22.
- Str. 7, Seznam zkratek: SSLP = “*Single Sequence Length Polymorphysm*” – polymorphism se píše vždy s měkkým „i”. Stejná chyba je i na str. 66 v kap. 4.1.
- Str. 9, kap. 1.2.1.1: místo „hledání polyploidních markerů“ zřejmě mělo být uvedeno „hledání polymorfních markerů“?
- Str. 10, kap. 1.2.1.3: v této kapitole, zabývající se určením pohlaví, postrádám jednoznačnou informaci, zda je u *X. tropicalis* heterogametickým pohlavím samec nebo samice, byť z dalších kapitol je jasné, že jde o chromosomální určení pohlaví typu WZ/ZZ.
- Str. 11, kap. 1.2.2.2: neříká se „heteromorfní pohlaví“, ale „heterogametické pohlaví“.
- Str. 14, kap. 1.3.1.3.1: správně je “*artificial chromosome*“, nikoliv “*arteficial chromosome*“.

- Doplňkový dotaz 1: Má *Xenopus tropicalis* štětkovité chromosomy?
- Doplňkový dotaz 2: Je gen *DM-W* primární spouštěč dráhy determinující pohlaví nebo je spíše zodpovědný za ontogenetický vývoj pohlaví, čili něco jako gen *doublesex* u hmyzu? A je lokalizován na chromosomu W?

Poznámky a doplňkové dotazy k jednotlivým publikacím.

Publikace 1

Wells *et al.* (2011) A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Dev. Biol.* **354**: 1-8.

Hlavním výsledkem této práce je vazebná mapa pomocí bioinformaticky identifikovaných SSLP markerů tvořena kolegy ze zahraničí, doplněná a upřesněná fyzickým mapováním 69 cDNA markerů velmi citlivou, ale též poměrně náročnou metodou FISH-TSA zavedou v laboratoři školitele E. Seifertové. Mapa pokrývá 66% genomu a je důležitým nástrojem pro další studia.

- Str. 67, 2. odstavec: autorka uvádí, že v době vydání článku (tj. 2011) bylo podezření, že se na krátkém raménku chrom. 2 vyskytuje gen determinující pohlaví. Vzápětí pak ale píše, cituji: „Poloha sex určující oblasti byla později určena na krátkém raménku chromzómu 7“, ale odkazuje přitom na práci Olmstead *et al.* (2010), publikovanou o rok dříve! Jak to tedy bylo?
- Doplňkový dotaz 3: Proč je u jednotlivých vazebných skupin důležitá orientace? Z Tabulky 1 na str. 67 ani z textu mi to není jasné, v Tab. 1 je uvedena pořadím ramének, buď *q-p* nebo *p-q*.

Publikace 2

Krylov *et al.* (2010) Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. *Chromosome Res.* **18**: 431-439.

V této studii vyvinuli autoři malovací sondy pro 8 z 10 chromosomů *X. tropicalis* pomocí laserové mikrodisekce a otestovali 2 odlišné metody celogenomové amplifikace. Jejich zjištění, že DOP-PCR není vhodnou metodou, zatímco pomocí WGA4 a WGA3 kitů od firmy Sigma-Aldrich získali dostatečně specifické celochromosové sondy, je v souladu i s našimi zkušenostmi u hmyzu. S takto připravenými sondami pak úspěšně identifikovali homeologní chromosomy u *X. laevis*. Výsledky, dokumentované fascinující digitalními fotografiemi (naštěstí mám PDF publikace), podpořily hypotézu o původu genomu *X. laevis* křížením dvou druhů s následnou polyploidizací.

- Doplňkový dotaz 4: Máte nějaké vysvětlení proč DOP-PCR, která je úspěšně používaná pro amplifikaci vysoce specifických malovacích sond u savců a ptáků, nefunguje podobně i u jiných organismů včetně drápatek?

Publikace 3

Seifertova *et al.* (2013) Efficient high-throughput sequencing of a laser microdissected chromosome arm. *BMC Genomics* **14**: 357.

Tato práce je zaměřena na získání sekvencí DNA z krátkého raménka chromosomu 7, tedy jedné ze dvou oblastí genomu *X. tropicalis*, které se nepodařilo včlenit do vazebné mapy díky absenci markerů. Laserovou mikrodisekcí tohoto raménka, amplifikací kity WGA4 a WGA3 a následným osekvenováním Illuminou, doplněnou fyzickým mapováním na chromosomech metodou FISH-TSA se autorům podařilo doplnit a podstatně zpřesnit mapu této oblasti genomu. Tato práce přináší unikátní výsledky, dokumentované skvělými ilustracemi, a je velmi cenná i z metodického hlediska, neboť vyvinuté techniky lze použít k mapování problematických úseků u mnoha dalších organismů.

- Ve druhém odstavci kap. 4.3 na str. 70 má být „sekundární konstrikci“ nikoliv „... restrikci“.
- Doplňkový dotaz 5: při amplifikaci DNA kitem WGA4 jsou k fragmentům DNA ligovány adaptory, jejichž sekvence není veřejně dostupná. Jak se vám jejich sekvence podařilo odhalit a jakým bioinformatickým postupem jste je ze získaných sekvenačních dat odstranili?

Publikace 4

Bewick *et al.* (2013) A large pseudoautosomal region on the sex chromosomes of the frog *Silurana tropicalis*. *Genome Biol. Evol.* **5**: 1087-1098.

Drápatka *X. tropicalis* nemá morfologicky rozlišitelné pohlavní chromosomy W a Z. Kombinací několika pokročilých technologií, zahrnujících Rad tag sekvenování pro idendifikaci SNP polymorfismů a sekvenování laserovou mikrodisekcí získané chromosomální DNA autoři prozkoumali chromosom 7, který dle jiných studií nese gen(y) determinující pohlaví a je kandidátem na pohlavní chromosomy. Studie potvrdila jen minimální rozdíly mezi „samčími" a „samičími" chromosomy 7, svědčící o velmi nízkém stupni jejich molekulární diferenciace.

- Doplňkový dotaz 6: Mohla by autorka blíže vysvětlit, co myslí „více než 32-násobnou změnou pohlavních chromosomů" a jakou to má souvislost s absencí diferenciace pohlavních chromosomů u drápatek?
- Autorka uvádí, že jsou výsledky shodné se studií Uno *et al.* (2008), ve které se nepodařilo proužkovacími technikami najít rozdíly mezi samčími a samičími chromosomy u *X. tropicalis*, ale citovaná práce je o skokanovi *Rana rugosa*. Jde o nevhodnou citaci nebo nepřesnou interpretaci?
- Práce Anderson et al. (2012) chybí v seznamu použité literatury. Podotýkám, že jde o jediný nedostatek v seznamu, což při tak velkém počtu citovaných prací svědčí o mimořádné pečlivosti autorky při zpracování literárních pramenů.

Závěr

Disertační práce E. Seifertové významným způsobem přispívá k poznání struktury genomu modelu vývojové biologie, drápatky *Xenopus tropicalis*. Kromě vynikajících výsledků, publikovaných ve vysoce renomovaných vědeckých časopisech, přináší i řadu vyvinutých originálních metod a postupů, relativně snadno aplikovatelných i na jiné modelové i nemodelové organismy. Předložená práce nepochybně splňuje požadavky kladené na disertační práce a s velkým potěšením ji

doporučuji ji k obhajobě v doktorském studijním programu Buněčná a vývojová biologie.

František Marec

V Českých Budějovicích, 17. května 2014