

Posudek na magisterskou diplomovou práci Jana Janouškovce „The plastid of *RM12*, the photosynthetic ancestor of *Apicomplexa*“

Ve své diplomové práci se Jan Janoušek věnuje studiu fotosynteticky aktivního plastidu organismu *RM12*, blízkce příbuzného apikomplexům. Protože by výzkum této organely mohl přinést důležité poznatky o evoluci apikomplexu, jedná se o téma zásadního významu.

Pozitivně hodnotím fakt, že práce je psaná anglicky. Sice v ní není nouze o překlepy a gramatické chyby (průměrně jich je několik na stránku), text je však dobře pochopitelný a chybám v angličtině se, podle mého soudu, většina českých autorů nevyhne. Práce je členěna na obvyklé části. V Úvodu se autor na devíti stranách stručně zabývá plastidy a alveoláty včetně organismu *RM12*. Tato část je organizována poměrně přehledně, v několika případech bych upravil obsah jednotlivých kapitol, např. chromalveolární hypotézu bych zmínil ve stejné kapitole jako hypotézu Cabozoa (jakýsi její protějšek) a existenci kolpodely a perkinsa bych zmínil již v kapitole „Alveoláty a jejich fylogeneze“. V Úvodu jsem našel nepřesná či zavádějící tvrzení, anebo přímo faktické chyby. Uvádím ty nejpodstatnější:

1. Plastidy skupin Rhodophyta a Glaucophyta ve skutečnosti neobsahují chlorofyl a a b (viz Kap. 1). Peridininový plastid obrněnek pro změnu obsahuje vedle chlorofylu c také chlorofyl a (viz Kap. 2).
2. Genom apikomplexu není extracelulární (viz Kap. 2). Autor měl pravděpodobně na mysli mimojaderný.
3. V Kap. 4 se tvrdí, že většina druhů chromalveolát obsahuje dva nestejně bičíky. Odhlédneme-li od faktu, že bičíky mohou obsahovat buňky, nikoli druhy (ty obsahují např. populace nebo jedince), mohl by si čtenář podle této věty chromalveoláty představit jako poměrně unifonní skupinu bikontů. Pro veliké (ne-li největší) skupiny chromalveolát, jako jsou nálevníci a rozsivky, to však neplatí. Také o výtrusovcích, kteří mají bičíky pouze na samčích gametách, bych netvrdil, že se jedná o bikonty. Užitečnější by zřejmě v tomto případě bylo uvést, že předek chromalveolát byl pravděpodobně bikont.
4. Kap. 5 končí větou, že byl recentně popsán nový kmen (alveolát). Není zde uvedeno, o který kmen se jedná, ani žádná citace. Jakou skupinu měl autor na mysli?
5. V kapitole „Chromalveolární hypotéza“ mi chybí citace prací Harper JT, Keeling PJ (2003) *Mol Biol Evol* 20: 1730-1735 a Patron NJ et al. (2004) *Eukaryot Cell* 3: 1169-1175, které považuji pro tuto problematiku za zcela zásadní.

Z metodické kapitoly práce (2 strany a tabulka) vyplývá, že si autor osvojil řadu metod molekulární biologie a fylogenetiky, jako jsou PCR a elektroforéza DNA (i pulzní), design primerů, klonování, sekvenace, tvorba alignmentu a konstrukce fylogenetických stromů. Pokud je mi známo, tyto metody byly použity správně a jsou dostatečně popsány pro případnou reprodukci procedur.

Výsledky ve formě sekvencí čtyř genů, 17 fylogenetických stromů a zjištění velikosti plastidového genomu organismu *RM12* vypovídají o značném objemu odvedené práce. Bohužel se zde autor nevyhnul zmatkům při popisu obrázků. Obrázek 1 se vztahuje až k poslední části kapitoly, navíc jsem na něj nenašel odkaz v textu. Obr. 4A a 5 se vztahují

k jednomu datasetu, zatímco 4B a C k druhému, což snižuje přehlednost. V Obr. 6 jsou obrněnky popsány jako Glaucocystophyta (G).

Diskuse (dvě strany textu a dvě tabulky) shrnuje a analyzuje výsledky práce a navrhuje cestu dalšího výzkumu. Autor zde dochází k závěru, že analýzy jednoznačně ukázaly příbuznost apikoplastu a plastidu RM12 a zůstaly nerozhodnuté v případě příbuznosti plastidu RM12 a peridininového plastidu obrněnek. Podle mne spíše ukázaly, že plastid RM12 je blíže příbuzný apikoplastu a peridininovému plastidu, ale nerozhodly, kterému více, protože v analýzách datasetů, kde byly zahrnuti výtrusovci i obrněnky, tvoří obvykle RM12 sesterskou větev ke skupině výtrusovci + obrněnky.

Za největší slabinu práce považuji seznam a formu citací. Ve většině prací tohoto typu oponent škodolibě upozorní na nesrovnalosti mezi citacemi v textu a v seznamu použité literatury. Zde se však jedná o několik desítek (!) citací, které přebývají v seznamu oproti textu. Kromě toho odkazy v textu nemají jednotný formát. U článků s více než dvěma autory je někdy *et al.*, jindy pouze jméno prvního autora. Vyskytuje se i neobvyklý formát typu „Cavalier-Smith 00“ a „Hall 99“. Dokonce ani v případě článku, kde je autor spoluautorem, se citace v textu a v seznamu neshodují. V textu se jedná od Moore et al. 2007, v seznamu je to Moore et al. 2008. Je zde uvedeno, že se jedná o článek in press, ne však již, o který časopis se jedná. Pakliže jde o ten, který mám na mysli, nezbyvá mi, než gratulovat.

K práci mám následující otázky:

1. Jak byly pro fylogenetické analýzy vybrány substituční modely?
2. Proč nebyl analyzován konkatenát sekvencí studovaných genů?
3. V práci se diskutuje vztah plastidu RM12, apikoplastu a peridininového plastidu obrněnek. Není zde však ani zmínka o možnostech, že RM12 je kolpodela nebo kokcidie. Z konferencí, kde byla problematika RM12 přednesena vím, že toto byly dvě hlavní hypotézy o fylogenetické pozici organismu RM12. Jaký je současný názor autora?
4. Chystá se popis nové druhu, rodu, popř. čeledi, řádu, třídy a kmene?

Celkově vzbuzuje předložená práce dojem, že byla psána narychlo a na poslední chvíli. Předpokládám, že kdyby autor věnoval více času opravám svého textu, mohl se nejspíše většině chyb snadno vyhnout. Na druhé straně je třeba ocenit množství odvedené práce a zajímavost a význam výsledků. Diplomovou práci Jana Janouškovce doporučuji k obhajobě, konkrétní hodnocení ponechávám na příslušné komisi.

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PřF UK
Viničná 7
128 44

Posudek k diplomové práci Jana Janouškovce:
**THE PLASTID OF RM12, THE PHOTOSYNTHETIC ANCESTOR OF
APICOMPLEXA**

Magisterská práce Jana Janouškovce se zabývá z evolučně protozoologického pohledu extrémně zajímavým organismem označovaným jako RM12. Mimochodem, chystá se někdo tohoto prvoka formálně popsat? Práce je psána anglicky, což je, jak chápu, na katedře molekulární biologie standard, a má přehlednou úpravu. Text je jazykově na dobré úrovni, výčet chyb a překlepů, které jsem odhalil, připojuji na konec posudku a nebudu se jimi zde zabývat. Množství chyb v textu nepřesahuje únosnou míru.

Vzhledem k lákavosti tématu jsem se na čtení práce s radostí vrhnul a musím říci, že úvod se četl jedním dechem a považuji jej za velmi zdařilý. Všiml jsem si jediné nepřesnosti hned na sedmé řádce, kde autor píše, že všechna Achaeplastida (Chlorophyta, Rhodophyta a Glaucocystophyta) mají chlorofyl a a chlorofyl b. Pokud vím, tak to platí pouze u chlorofyt a další dvě skupiny chlorofyl b nemají. Metodika práce je popsána dostatečně a přehledně. Měl bych k ní však dvě poznámky. (1) Domnívám se, že obecně a ani v tomto případě není vhodné analyzovat protein kódující geny na úrovni DNA sekvence. Vystavujete se tak totiž působení artefaktů způsobených nestejným GC složením sekvencí a odlišnou preferencí kodónů. Sám autor na toto úskalí upozorňuje v diskuzi. Co autora vedlo k analýzám na úrovni DNA? (2) Proč se autor nepokusil analyzovat všech 5 genů dohromady? Mohlo by to vést k lépe podpořenému stromu.

Část výsledků je co do množství textu poměrně krátká. Hned v úvodu bych chtěl vyzdvihnout autorovo úsilí a vytrvalost, s jakou dokázal získat sekvence ne jednoho či dvou ale hned čtyř plastidových genů. PCR amplifikace těchto genů nebyla zřejmě nic snadného, o čemž svědčí desítky vyzkoušených primerů. Také obdivuji, že autor bravurně zvládl metodiku pulzní elektroforéry a southern blot a získal cenou informaci o velikosti plastidového genomu RM12. Na rozdíl od úvodu a metodiky se výsledky čtou nicméně poměrně obtížně a mám k nim dvě výtky. (1) Víím, že je to trochu otázkou vkusu, ale nepovažuji za vhodné zahltit čtenáře 17 komplikovanými fylogenetickými stromy. I pro člověka, který je zvyklý stromy číst, je to poměrně velké sousto a není to příliš přehledné. Všichni, kdo dělají molekulární fylogenetiku, ví, že z jednoho souboru dat je poměrně jednoduché vyrobit velké množství stromů, protože máme na výběr mnoho metod a patří dokonce k dobrým mravům vyzkoušet metod více. Myslím si však, že součástí práce fylogenetika je přetvoření těchto hrubších výsledků do stravitelné formy. Obvykle se to dělá tak, že se sloučí výsledky různých metod z jednoho datového souboru do jednoho stromu. Na významné odchylky mezi metodami lze upozornit v textu. (2) Hodnoty bootstrapů jsou na většině stromů uvedeny v procentech, tj. v rozmezí hodnot 0-100. Na stromech 6, 7A a 8A jsou však uvedeny v počtu bootstrapových replikátů, kterých bylo 300, a hodnoty tak mají rozmezí 0-300. To je velmi matoucí. Mimochodem, v legendě obrázku 6 je uvedeno, že bylo provedeno 500 replikátů, ale nejvyšší hodnoty na stromu dosahují 300, takže v legendě je zřejmě chyba.

Diskuze je stručná a věcná. Měl bych k ní několik poznámek a dotazů. (1) Když autor píše: „*Use of minicircle gene sequences may however result also in phylogenetic artefacts (Inagaki, 2004). Therefore only results of “16S” and “23S” are taken into account.*“ Znamená to, že analýzy založené na protein kódujících genech prezentované celkem na 9 stromech obrazně „hází do koše“? Pozor! Fylogenetické artefakty, kterých se obává, působí jen při analýzách DNA sekvencí a ne na úrovni proteinů, takže stromy z obr. 6 a 9A není třeba z tohoto důvodu ztracovat. (2) Dále se domnívám, že autor přeceňuje účinnost metody logDet a podceňuje schopnost metody maximum likelihood při potlačování artefaktu

dlouhých větví (LBA) a artefaktu různého nukleotidového složení. Já osobně bych důvěřoval více výsledkům metody maximum likelihood. (3) Co se týče stop kodónu nalezeného v sekvenci *TufA*, který vysvětluje alternativním genetickým kódem a předpokládá, že se jedná o aminokyselinu tryptofan. Zajímalo by mě, zda může vyloučit, že nejde o obyčejnou chybu taq polymerázy vzniklou při PCR? Není-li to chyba polymerázy, nemohlo by se jednat o krátký intron? Stop kodón se nachází v málo konzervované části proteinu a u jiných organismů se v dané oblasti tryptofan nevyskytuje! (4) Chystáte se blíže prozkoumat dolní směr na southern blotu (minikroužky?) a jak?

Seznam literatury obsahuje celkem 128 položek a je plný chyb. 8 citací uvedených v textu chybí v seznamu literatury a naopak celých 56 (slovy padesát šest, několikrát jsem si kontroloval, zda mám v ruce kompletní text) citací uvedených v seznamu se nevyskytuje v textu. 2 položky jsou v seznamu dvakrát a ve třech případech by měl autor rozlišit indexy a a b dvě citace od téhož autora v témže roce. U 5 citací je zřejmě v textu nebo v seznamu chybně uveden rok nebo je překlep ve jménu autora. Chyby v seznamu literatury jsou sice formální povahy, ale považuji je za závažný nedostatek předložené práce, která by i po formální stránce měla být dokonalá.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že práce beze sporu splňuje nároky kladené a magisterskou práci. Chtěl bych znovu vyzdvihnout, že prezentuje velmi zajímavé původní výsledky a jsem si jist, že ji bude možné po určitých úpravách publikovat v impaktovaném zahraničním časopise. Po zodpovězení vznesených dotazů a, dovoluje-li to procedura, po opraveních formálních chyb práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení stupněm 2 – velmi dobré.

Vladimír Hampl

Překlepy a drobné chyby textu:

- Strana 1, řádek 6: ... Chloroplastida...
- Strana 1, řádek 24: ... Yoon AT al., 2004).
- Strana 1, řádek 26: ... see Cavalier-Smith 2000).
- Strana 1, řádek 27: ... (Rogers et al., 2007).
- Strana 1, řádek 28: ... with 3 (*E. gracilis*) and 4 (*B. natans*) membranes.
- Strana 1, řádek 32: ... (Delwiche, 1999).
- Strana 2, řádek 14: ... apicoplast was discovered...
- Strana 2, řádek 15: ... which showed to be extracellular nuclear and inherits maternally...
- Strana 2, řádek 16: ... *in situ* [kurzíva]
- Strana 3, řádek 12: ... Yon et al. (Irok),
- Strana 3, řádek 31: ... as revealed by ...
- Strana 4, řádek 11: ... plastid targeting ...
- Strana 4, řádek 12: ... fractions.
- Strana 5, řádek 5: ... (Hackett, 2003)
- Strana 5, řádek 17: ... It suggests suggesting a ...
- Strana 5, poslední řádek musí končit tečkou, která je až na další straně.
- Strana 6, řádek 8: ... Alveolatae is a ...
- Strana 7, řádek 4: ... such as an apically opened conoid...
- Strana 7, řádek 11: ... Morphology and phylogenetic position of Perkinsus [ne kurzíva] sp.
- Strana 7, řádek 12: ... mollusks...

Strana 8, řádek 29: ... (Moore et al., 2007 ~~8~~ **in press**)
Strana 8, řádek 31: ... of the plastid small ~~nuclear~~ subunit rRNA...
Strana 8, řádek 36: ... amino_acid...
Strana 11, řádek 12: ... (Hall, **1999**).
Strana 11, řádek 17: ... Amino_acid...
Strana 11, řádek 18: ... amino_acide...
Strana 13, řádek 28: ... „16S+DINO“ dataset (Fig. **23**)...
Strana 14, řádek 12: ... sequences are added...
Strana 19, legenda k obr. 6: PsbAML tree **LogDet tree** derived...
Strana 24, řádek 8: ... resuts of “16S” and “23S” ~~of~~ are taken...
Strana 25, řádek 14: ... (because of grouping of coccidian and [**chybí text**])...

Citace uvedené v textu a chybějící v seznamu literatury:

Rodríguez-Ezpeleta and Philippe, 2006
Kilejan et al., 1975
Chesnick 1996
Pienaar, 2007
Harper, 2005
Patron, 2007
Saldariaga, 2002
Leander and Hoppenrath, 2007

Citace uvedené v seznamu literatury a chybějící v textu:

Ben Ali et al., 2001
Archibald and Keeling, 2002
Azevedo, 1989
Bachvaroff et al., 2005
Baldauf et al., 2000
Barbrook and Howe, 2000
Barbrook et al., 2005
Barta and Thompson, 2006
Brugerolle, 2002
Bushek et al., 2002
Cai et al., 2003
Carreno et al., 1999
Cavalier-Smith, 2002
Cavalier-Smith, 2002
Cavalier-Smith, 2003
Cathleen et al., 2001
Daugbjerg et al., 2000
De Konig and Keeling
Ellis et al., 1998
Embley and Hirt 1998
Escalante and Ayala, 1995
Foth and McFadden, 2003
Funes et al., 2002
Gast et al., 2006
Gleeson, 2002

Gockel and Hachtel, 2000
Gunderson et al., 1999
Hackett et al., 2005
Harper and Keeling, 2003
Howe et al., 2003
Iida et al., 2007
Inagaki et al., 2000
Inagaki and Roger, 2006
Ishida and Green, 2002
Janson and Grane'li, 2003
Keeling, 2004a
Laatsch et al., 2004
Lang-Unnasch and Aiello, 1999
Leander et al., 2003
McFadden and Waller, 1997
Morrison and Ellis, 1997
Mugridge et al., 1999
Patron et al., 2005
Patron et al., 2006
Petersen et al., 2006
Robbens et al., 2007
Saldariaga et al., 2004
Takishita et al., 2004
Van de Peer and Wachter, 1997
Van de Peer et al., 2000
Waller, 1998
Waller et al., 2003
Williamson et al., 1994
Wilson et al., 1996
Wilson and Williamson, 1997
Yoon et al., 2005
Zardoya et al., 1995
Zhang et al., 2002

Zdojené položky v seznamu literatury:

Ben Ali et al., 2001
Kohler et al., 1997

Položky v seznamu literatury, které je potřeba rozlišit na a a b:

Brugerolle, 2002
Hackett et al., 2004
Yoon et al., 2002

Položky v seznamu literatury, u kterých je rok, či hláskování jména nesouhlasí s textem:

Figueras et al., 2001
Moore et al. 2008
Swofford, 2002

Zhang, 2001 [v textu]
Koikea et al., 2005

Další chyby v seznamu literatury:

DE LA HERRAN, R., GARRIDO-RAMOS, M. A., NAVAS, J., RUIZ REJON, C., RUIZ REJON, M.
(1999). Molecular characterization of the
ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and molecular
diagnostics. *Parasitology* (2000), 120,
345±353.