

Posudek na magisterskou diplomovou práci Tomáše Chrudimského „Molecular characterization of novel symbiotic alveolate isolated from corals“

Ve své diplomové práci se autor věnuje závažnému a aktuálnímu tématu fotosyntetických příbuzných apikomplex. Na apikoplasty i blízkou příbuznost nefotosyntetických apikomplex a fotosyntetických obrněnek jsme si již zvykli, v tomto případě se však nejspíše jedná o opravdu blízkého příbuzného apikomplex, anebo dokonce o jejich vnitřní skupinu. Tento objev považuji za mimořádně významný i zajímavý.

Práce je psána v angličtině a je, přes relativně časté překlepy a gramatické chyby, dobře srozumitelná. Za všechny překlepy uvedu příklad, který mě nejvíce upoutal: na jediné straně (str. 34) jsou pro zřejmě jediný taxon použity názvy Hematosporidia, Haematosporidia, Heamosporidia, Heamatosporidia. Na téže straně se potom bez vysvětlení vykytuje ještě nadřazený taxon Haematozoa, což činí tuto část textu poněkud nepřehlednou.

Kapitola Úvod stručně představuje na deseti stranách alveoláty, jejich plastidy a mitochondrie a věnuje se i symbiózám korálů. Právě úvod je, podle mého názoru, z celé práce nejslabší částí a mám k němu řadu připomínek. Nejzávažnější z nich se týká absence jakékoli zmínky o studovaném izolátu RM12. Čtenář tak snadno získá dojem, že předložená práce se zabývá i samotným objevem tohoto organismu a právem se může ptát, proč nebyl výzkum tohoto organismu zahájen analýzou jaderné SSU rDNA nebo základní morfologickou charakterizací. Toto nedorozumění je vysvětleno až v diskusi, kde se čtenář dozví, že, ačkoli tato data nebyla dosud publikována, jsou již známy sekvence několika jaderných a plastidových genů tohoto organismu. Za zmínku stojí i to, že je známa ultrastruktura tohoto organismu a že již bylo formulováno několik hypotéz o fylogenetické pozici RM12. Vzhledem k tomu, že předložená práce se také zabývá fylogenetickou pozicí tohoto organismu, postrádám v úvodu kapitoly (nebo alespoň podrobnější zmínku) o colpodellách, v jejichž blízkosti (mimojiné) je původ RM12 hledán. Na straně 8 se autor přiklání k velice kontroverzní (a nejspíš pomýlené) hypotéze Cavaliera-Smithe jednotného původu plastidů euglenoidů a chlorarachniofyt, přitom neuznává opět kontroverzní a zavrhanou hypotézu monofylie rhizárií a exkavát. Mohl by tento svůj postoj vysvětlit? Na str. 12 nesouhlasím s tvrzením, že syntrofická hypotéza eukaryogeneze (Moreira a Garcia) je „velmi podobná“ vodíkové hypotéze (Martin a Müller). Ve skutečnosti jsou dosti odlišné, např. právě ve vztahu k původu mitochondrie, kterým se daný odstavec zabývá. Konečně kapitola o korálových endosymbiózách mi bez zmínky o organismu RM12 připadá v daném kontextu zbytečná.

Použitá metodika je přehledně popsána na 12 stranách. Domnívám se, že i u ostatních datasetů *cox1*, nejenom u datasetu 6, měly být sekvence analyzovány také jako kódující nukleotidy (nejenom jako aminokyseliny). Protože různé datasety obsahují různý počet organismů, u kterých byl předpoklad tvorby dlouhých větví, LBA artefakt by se u některých nemusel projevit. Přestože je na první pohled vidět, že získané topologie nejsou příliš stabilní a jejich statistická podpora je nízká, byla jejich podpora nějakým způsobem testována (např. AU testem)? Byl analyzován konkatenát jaderných a mitochondriálních genů? Pokud ne, proč?

Výsledky jsou shrnuty na 14 stranách. Byly získány částečné nebo úplné sekvence genů pro cytosolickou GAPDH, *cox1*, H2A a H2B, byly provedeny fylogenetické analýzy a hybridizací se značenou sekvencí *cox1* na elektroforéze byla odhadována velikost mitochondriálního genomu. V této kapitole mi vadí ne-li nedostatečné, pak přinejmenším nestandardní popisky fylogenetických stromů, tedy většiny obrázků. Mám na mysli např. identickou legendu u obr. 3 a 4 (i když topologie stromů je jiná; není zde např. uvedeno, o které datasety se zde jedná), absenci informace, zda byly analyzovány aminokyseliny nebo

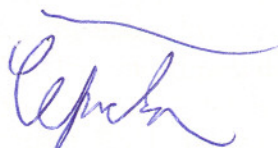
kódující nukleotidy u obr. 11 apod. (prakticky na každém popisku by se něco našlo). Z textu sice vyplývá, co přesně který obrázek znamená, čtenář však musí často tuto informaci hledat a orientace v této kapitole je tak ztížena. Abych pouze nekritizoval – objem i kvalita získaných dat postačují k jejich smysluplné interpretaci a ke tvorbě fylogenetických hypotéz.

Diskuse (8 stran) mi svou koncepcí připadá mírně zmatená a dovedl bych si ji představit přehlednější. Na začátku se objevují informace o izolátu RM12, které bych, jak jsem již zmínil, uvítal již v úvodu. Poté autor rozebírá možné fylogenetické pozice RM12 a dospívá k závěru, že se jedná o příbuzného apikomplex, spíše než o obrněnku. To, že většina získaných dat neumožňuje jednoznačný příklon k té které hypotéze, není v žádném případě vina autora (nebo někoho jiného), RM12 je nejspíše organismus mysteriózní, který své tajemství snadno nevydá. K diskusi mám několik otázek a připomínek. Je známo něco o histonech bazálních (*Perkinsus*, *Syndiniales*) nebo i (pravděpodobně) odvozených (*Blastodiniales*, *Noctiluca*) obrněnek, které alespoň v části životního cyklu nemají dinokaryon? Z pohledu na obr. 9 mi připadá, že H2A organismu RM12 je velmi podobný nejen histonu apikomplex, ale např. i stramenopil a jistě i jiných eukaryot. Spolu s existencí histonu H2B mi tato podobnost nepřijde jako silný argument příbuznosti RM12 a apikomplex, jak se píše na str. 43, spíše je to podpora už z jiných výsledků vyplývající hypotézy, že RM12 není dinokaryotní obrněnka. Co je myšleno výrazem „primitivní řády apikomplex, jako Haemosporidia a Piroplasmida“?

Na závěr bych se zeptal, která data (myšleno ze všech jemu dostupných) považuje autor za nejvíce vypovídající o fylogenetické pozici organismu RM12 a zda se rozhodl mezi možnými fylogenetickými hypotézami (nyní mám na mysli výběr mezi *Colpodella*, kokcidie, anebo něco úplně jiného z příbuznosti apikomplex nebo myzozoi).

Přes výše zmíněné výhrady hodnotím předloženou práci Tomáše Chrudimského jako celek pozitivně a předpokládám, že splňuje formální požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci. Jako takovou ji tedy doporučuji k obhajobě, konkrétní ohodnocení ponechávám na příslušné komisi.

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PŘF UK
Viničná 7
128 44 Praha 2



Oponentský posudek diplomové práce:

„Molecular characterization of novel symbiotic alveolate isolated from corals“
Tomáš Chrudimský, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, 2007

Dostalo se mi cti být osloven Ing. Miroslavem Oborníkem, Ph.D., s prosbou o vypracování oponentského posudku diplomové práce jeho studenta Tomáše Chrudimského. Diplomová práce se týká nesmírně zajímavého problému, a to molekulární charakterisace nového, formálně dosud nepopsaného zástupce eukaryotické skupiny Alveolata vyznačujícího se unikátními ryse, především přítomností fotosynteticky aktivního plastidu.

Cíle práce, explicitně uvedeny na straně 15 posuzovaného díla, byly tři: stanovení fylogenetické pozice nového alveoláta RM12 na základě molekulárně fylogenetické analýzy proteinových genů, hledání znaků alveoláta RM12 sdílených s jinými skupinami alveolát, a konečně stanovení velikosti mitochondriálního genomu tohoto organismu. Takto stanovené cíle jsou velmi ambiciózní a více než dostatečně nosné pro výzkumný projekt magisterského studenta.

Text diplomové práce je napsán v angličtině členěn obvyklým a proporčně vyváženým způsobem do kapitol úvodu, materiálů a metod, výsledků, diskuse, a závěru. Rozvržení samotného obsahu mezi jednotlivé kapitoly je však již méně šťastné, zejména pokud jde o kapitoly úvod a diskuse, a zčásti též kapitoly materiál a metody a výsledky. Před kapitolou Introduction nebo na jejím začátku velmi postrádám pasáž, která by stručně představila předmět práce, tj. alveoláta RM12. O tomto organismu není v celém úvodu ani zmínka a základní fakta, například že jde o dosud nepopsaný fotosyntetizující organismus s plastidem izolovaný z korálu *Plesiastrea versipora* skupinou vedenou Robertem Moorem, je možné se dozvědět až v kapitole Discussion. Heslovité uvedení cílů práce na straně 15 je sice užitečné, chybí však rozvaha o postupu vlastní experimentální práce, tedy zdůvodnění výběru charakterizovaných genů. Bez obdobného uvedení tak čtenáři zcela uniká kontext a ztěžuje pochopení kapitoly Introduction a Results. Přitom stačilo přesunout po mírných úpravách některé odstavce z diskuse na začátek práce.

V kapitole Introduction se autor pokouší shrnout současné znalosti o biologii a diversitě eukaryotické skupiny Alveolata, podrobněji se pak věnuje plastidům a mitochondriím alveolát. Z textu je zřejmé, že se autor seznámil s rozsáhlou literaturou o alveolátech, přesto mám ke kapitole úvodu několik výhrad. Autor věnuje samostatné kapitoly třem hlavním skupinám alveolát, tedy nálevníkům, výtrusovcům a obrněnkám, avšak zcela opomíjí alespoň uvést, že Alveolata zahrnují další skupiny, například perkinsidy. Tyto skupiny, byť méně významné co do počtu druhů, jsou nesmírně významné z hlediska pochopení evoluce alveolát a jejich plastidu, a tedy i studovaného organismu RM12, viz např. nedávno publikované doklady pro přítomnost plastidu u rodu *Perkinsus*. Pasáž o nálevnících je zbytečně obecná a rozvěklá (bylo možno např. vynechat vysvětlení toho, co jsou řasinky). Odkaz na práci Perkins et al 2001a (str. 5) v tomto oddíle je mylný, neboť stránkám v citovaném zdroji [The illustrated guide to the protozoa, 2nd Edn. (Lee J.J., Leedale G.F., Bradbury P., Eds.), pp. 371-655, Allen Press, Lawrence, USA] odpovídá kapitola o nálevnících, jejímiž autory jsou Lynn a Small. Popis charakteru plastidů u obrněnek na straně šest nepovažuji za výstižný. Jednak by bylo vhodnější vyhnout se kategorickému tvrzení o tom, že peridiniový plastid je sekundární, neboť to je předmětem sporu a charakterisace plastidu organismu RM12 by mohla pomoci tuto záležitost rozřešit. Dále není pravda že ostatní fotosyntetizující obrněnky (tj. ty bez peridiniového plastidu) mají jen terciární plastidy nebo kleptoplastidy. Například rod *Lepidodinium* má podle všeho sekundární plastid odvozený od prasinofytní zelené řasy. Autor si je plastidů odvozených od prasinofytních řas vědom, ale nesprávně o nich níže (str. 9) hovoří jako o terciárních plastidech. Za nepodložené považuji tvrzení v pasáži o výtrusovcích, že kolpodelidi představují jeden z případů sekundární ztráty plastidu, neboť nedávný objev plastidu u rodu *Perkinsus* a heterotrofních obrněnek i samotný pozdní objev apikoplastu u jinak intenzivně studovaných výtrusovců jednoznačně ukazují, že plastid se běžně vyskytuje i u organismů, u nichž tradičně není znám, a bez detailního studia včetně analýzy genomu nebo alespoň EST sekvencí, které u kolpodelid dosud nebylo provedeno, je nutno nechat otázku

přítomnosti či absence plastidu otevřenou. Z výše uvedeného rovněž plyne, že se autor na straně devět mýlí, když hovoří o rodu *Perkinsus* coby o nedávno popsaném organismu bez plastidu, a navíc jsou zástupci tohoto rodu známi desítky let. Tvrzení o sekundární ztrátě plastidu u rodu *Cryptosporidium* by bylo vhodné opřít o citaci článku popisujícího analýzu kompletního genomu kryptosporidia (Abrahamsen et al., *Science* 304:441-5, 2004), neboť teprve tato práce potvrdila absenci apikoplastu, a citaci na práci dokládající geny v genomu kryptosporidia pravděpodobně odvozené ze nyní již ztraceného plastidu (Huang et al., *Genome Biol* 5:R88, 2004). V popisu primárních a sekundárních endosymbióz, které daly vzniknout jednotlivým typům plastidů, se rovněž najde řada nepřesností, např. kategoricky uvedené datování událostí primární endosymbiózy do doby před 1,6 miliardou let a sekundární endosymbiózy v červené linii do doby před 1,3 miliardy let – přímé doklady z fosilního záznamu neexistují a datování pomocí molekulárních hodin je sporné, několik prací z poslední doby datuje vznik samotných eukaryot teprve do doby okolo 1,2 miliardy let. Na straně osm autor hovoří o sekundární endosymbiose způsobem, jako by tato událost nastala jen jednou a dala vzniknout červené i zelené linii plastidů, což je samozřejmě nesmysl. Nesprávné je tvrzení, že sekundární zelené plastidy u krásnooček a chlorarachniophyt jsou monofyletického původu, byť se autor opírá o referenci na práci renomovaného autora (Cavalier-Smith, 1999). Tato od počátku kontroverzní hypotéza byla prakticky vyvrácena nedávnou fylogenetickou analýzou postavenou na úplné sekvenci plastidového genomu chlorarachniophyta *Bigeloviella natans*. Na straně deset v souvislosti s evolučním původem plastidové GAPDH u chlamydií nepřesně používá pojem „homologní“. U tabulky 1 chybí odkaz na literární pramen (patrně se jedná o učebnici Graham a Wilcox, 2000). Hodně zavádějící v pasáži o teoriích vysvětlujících vznik mitochondrie je tvrzení, že syntrofická hypotéza Moreiry a Lopez-Garciové je velmi podobná vodíkové hypotéze Martina a Mullera. U prvé je deltaproteobakterie hostitelskou buňkou pro archeobakterii dávající vznik jádru a takto vzniklá chiméra později přijímá alfaproteobakteriálního endosymbionta – předchůdce mitochondrie, u druhé je hostitelskou buňkou pro alfaproteobakterii přímo archeobakterie.

Ke kapitole pojednávající o použitých experimentálních metodách nemám větších výhrad, vyjma zcela nesrozumitelné pasáže popisující způsob získání sekvencí oblastí genu *cox1* vně oblastí vymezené primery BROWNKOX1f a KOX1R2 a občasných formálních nedostatků (např. uvedení názvu restričního enzymu EcoRI v podobě odporující konvenci).

Kapitola Results dokládá, že autor v průběhu řešení svého diplomového projektu odvedl množství dobré práce, ale její zpracování do textu je celkově spíše nešťastné. To, že popisované nově získané sekvence pocházejí z alveoláta RM12 a nikoliv dalších organismů, si musí čtenář domyslet. Není jasné, jak byly spočteny hodnoty nukleotidových frekvencí v tabulce 3 a 5 (u druhé tabulky navíc nevhodně označené jako „nucleotide rates“), hodnoty jsou uváděny pro skupiny organismů, byť je zřejmé, že se ty hodnoty liší u každého jednotlivého genu. Výsledky série fylogenetických analýz genu *cox1* jsou presentovány zmatečně. Autor nevysvětluje důvod, proč nukleotidové sekvence analyzoval právě a jen pro dataset 6. Vůbec nerozumím tomu, proč ve stromech na obrázcích dva až šest autor nezobrazuje pro Alveolata jednotlivé operační taxonomické jednotky, čímž zastírá vnitřní topologii v podobě boxů zobrazených podstromů. U obrázku 2 není zřejmé, které sekvence posloužily jako outgroup. Na straně 26 autor hovoří o tom, že se změnou složení sekvenciálního datasetu se v některých případech RM12 objevil bazálně k obrněnkám, ale vůbec není jasné v kterých případech a chybí jakákoliv obrazová dokumentace. Rovněž postrádám obrázky s výsledky analýz datasetů 1, 7 a 9. Poslední věta této pasáže je pak redundantní (ve stejném znění se vyskytuje na předchozí stránce).

V pasáži o stanovení velikosti mitochondriálního genomu, stejně jako v popisu obrázku 7, chybí jakákoliv specifikace experimentálního postupu předcházejícího samotné hybridizaci s radioaktivní próbou, takže čtenář musí pracně rekonstruovat z kapitoly Methods, jak vlastně obrázek 7 vznikl. Nikde z textu ani z pospísku obrázků 10 a 11 jednoznačně nevyplývá, jestli na nich zobrazené fylogenetické stromy byly odvozeny od aminokyselinových anebo nukleotidových sekvencí. První věta na straně 34 odkazuje na obrázek 11, byť tento v žádném případě nezobrazuje výsledky v této větě diskutované a obrázek s těmito výsledky v práci zcela chybí. Tvrzení na straně 33, že sekvence histonu H2A u RM12 se velmi odlišuje od sekvencí obrněnek a je spíše příbuzná k sekvencím z jiných alveolát, není podepřeno žádnými číselnými údaji nebo fylogenetickým stromem. U žádné fylogenetické analýzy v celé práci není uveden počet posic alignmentu použitý pro analýzu, chybí „accession numbers“ sekvencí z databázi.

V kapitole diskuse, která jinak charakterem vyhovuje nároků kladeným na tuto část, se opět najde řada problematických míst, zejména pokud jde o odstavec začínající na straně 40 a pokračující na straně následující. Rozhodně bych nesouhlasil s tvrzením o GAPDH v první větě odstavce. V souvislosti s fylogenetickou analýzou tohoto genu autor hovoří o výsledcích na datasetech 3 a 6, což je evidentní omyl způsobený záměnou s genem *cox1*, neboť nikde v metodách nebo výsledcích není o takovýchto datasetech u genu GAPDH zmínka a žádné obdobné výsledky není v práci nikde možno nalézt. Nesouhlasím s tvrzením na straně 43, že přítomnost histonu H2B u RM12 podporuje jeho příbuznost s výtrusovci, neboť tento histon se vyskytuje i některých alveolát blíže příbuzných obrněnkám než výtrusovců (např. *Perkinsus*). Obdobná výtka pak platí i pro oddíl Conclusions.

To že je práce napsaná v angličtině, velmi vítám, neboť to považuji za ideální způsob, jak začínající vědec může získat obrovské množství zkušeností s psaním anglických odborných textů. Nelze pochopitelně předpokládat, že anglický text magisterského studenta bude bezchybný, přesto se však obávám, že těch jazykových nedostatků je zbytečně mnoho. Mám za to, že autor svůj text nekonzultoval s někým s lepší znalostí angličtiny (ať už školitelem, nebo kýmkoliv jiným), čímž se připravil o možnost zjistit, kde jsou největší slabiny jeho angličtiny a jakých chyb se propříště vyvarovat. Nedostatky v použití anglického jazyka se dotýkají mnoha jeho stránek, ať již jde chybné volení jednotlivých slov a gramatických tvarů, špatný slovosled ve větách, obrovské množství chybějících nebo nesprávně použitých neurčitých a určitých členů (chyba je i v samotném názvu práce!), či chyby v interpunkci a ve stylistice místy značně ztěžující pochopení toho, co přesně se autor snaží vyjádřit.

Na závěr je možné konstatovat, že se autor během práce na svém diplomním projektu seznámil s bohatou škálou metodických postupů molekulární biologie a fylogenetiky a získal mnoho cenných experimentálních dat, která zajisté poslouží v dalším studiu organismu RM12 a pravděpodobně se i stanou součástí kvalitních vědeckých publikací. Nedostatky samotného zpracování textu diplomové práce jsou však takového rozsahu, že mi nezbyvá než navrhnout hodnocení velmi dobře.



21. května 2007, Mgr. Marek Eliáš
Katedra botaniky a Katedra filosofie a dějin přírodních věd
Přírodovědecká fakulta, Universita Karlova v Praze
Benátská 2
128 01 Praha 2