

Posudek na magisterskou diplomovou práci Jaromíra Cihláře „Molekulární charakterizace nového fotosyntetického kmene prvoků z korálů“

Předložená práce navazuje na dlouholetý výzkum týmu Doc. M. Oborníka a její téma je vysoce aktuální. Kdo by nechtěl pracovat s novou linií fotosyntetických eukaryot, která je blízkce příbuzná výtrusovcům? Práce přináší velmi zajímavé výsledky, mohla ovšem být, jak ukáží dále, lépe zpracována.

Práce je napsána srozumitelně, i když se zde dají najít, jako ve všech pracích tohoto typu, překlepy, gramatické chyby a neobratná vyjádření. Celkem však tyto chyby nikterak nepřekračují únosnou mez. Autor by měl sjednotit psaní názvů enzymů, v práci používá kombinaci českého a anglického názvosloví (včetně kombinací v jednom názvu, jako např. inosin monophosphatedehydrogenáza). Rovněž v názvech fylogenetických metod jsou časté chyby („baesiánská interference, maximum likelyhood, Clusta W“).

Úvod seznamuje čtenáře na devíti stranách s evolucí plastidů, jednotlivými taxony alveolát a s metabolismem nukleotidů u parazitů. Zejména kapitola 1.3 Alveolata považují za nepřiliš zdařilou a s vlastní prací prakticky nesouvisející. Dozvíme se zde např. pro téma práce nedůležitou informaci o kontraktilních vakuolách nálevníků, celulózových deskách obrněnek a orální kinetidě nálevníků. O příbuzenských vztazích uvnitř alveolát, které naopak jsou pro předloženou práci zásadní, se však nedozvíme nic. Je také zvláštní, že kapitoly 1.4 *Chromera velia* a 1.5 Izolát RM11 nejsou zahrnuty v kapitole Alveolata, přestože se jedná o typické alveoláty.

K úvodu mám následující otázky:

1. Co je vlastně kinetida a kolik orálních kinetid mají nálevníci? Zdá se mi, že autor v tom nemá jasno.
2. Jak se liší řasinky nálevníků a bičíky bičíkovců (autor používá u různých organismů oba názvy)?
3. V kapitole Alveolata postrádám zmínku o perkinsidech a elobiopsidech. Kam patří tyto skupiny? Pokud je autor zařazuje mezi obrněnky, existují nějaké společné morfologické znaky obrněnek?
4. Je si autor skutečně jist, že objevení se volného kyslíku na Zemi „naprosto vyhubilo tehdejší ekosystém“ (str. 6)? Není možné, že do některých prostředí kyslík nepronikl? Existují dnes, kdy je kyslíku v atmosféře a alespoň v povrchové vodě dostatek, anaerobní organismy?
5. Podle autora je apikoplast přítomen téměř u všech zástupců výtrusovců (str. 11). Je tomu skutečně tak? Jak druhově bohaté jsou skupiny, které zřejmě apikoplast nemají? Kromě toho není pravda, že hemosporidi, kokcidie a piroplasmidi jsou všechny hlavní linie výtrusovců, a to ani v případě, že k výtrusovcům nepočítáme kolpodely.

Cíle práce jsou jednoznačně definovány a zahrnují molekulární charakterizaci čtyř izolátů nové linie alveolát a druhu *Chromera velia* na základě různých genů.

Z kapitoly Metodika (5 stran) vyplývá, že J. Cihlár si osvojil řadu laboratorních a *in silico* metod zahrnující kultivaci, izolaci DNA a RNA, PCR, klonování, RACE a fylogenetickou analýzu. Použité metody jsou popsány adekvátně, až na následující výjimky. (a) Ve větě „k peletu bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufu“ (str. 16) postrádám důležitou informaci o složení onoho pufu. (b) „ T_m “ je teplota tání dvoušrobovice DNA. V textu je T_m prezentována jako annealingová teplota použitá při PCR. Tyto teploty se však od sebe často liší. Používal autor vždy T_m jako annealingovou teplotu? (c) Z výsledků plyne, že autor použil program AsaturA. O tom však není v metodice ani zmínka.

K metodice mám následující otázku:

6. Při fylogenetické analýze byly nukleotidové sekvence nejprve přeloženy do aminokyselin a poté zpět do nukleotidů (str. 20). Jaký to mělo význam? Byl při zpětném překládu zohledněn degenerovaný genetický kód, tj. byla na konci nukleotidová sekvence stejná jako ta původní? Pokud ne, mohlo to mít vliv na získané výsledky?

Z Výsledků (10 stran) plyne, že autor odvedl značné množství práce. Osekvenoval a analyzoval čtyři geny u všech čtyř izolátů nové linie fotosyntetických alveolát a gen pro uridin fosforylázu chromery. U obr. 4 – 6 (analýza genu pro histon 2B) není uvedeno, zda byly analyzovány aminokyseliny nebo nukleotidy a čtenář si to musí domyslit podle použitých substitučních modelů nebo podle odkazů na tyto obrázky. Na str. 26 autor uvádí, že ve stromu genu pro GAPDH „všechny čtyři izoláty pak spolu s *C. velia* tvoří sesterskou skupinu příbuznou s obrněnkami s terciárním plastidem.“. Lepší by bylo říci, že je tato linie příbuzná haptofytům, které jsou ve stromu též zastoupeny a ostatně představují i předky daných terciárních plastidů.

Diskuse je poměrně krátká a zahrnuje pouze tři strany včetně obrázku na půl strany. Při jejím čtení jsem se nemohl ubránit dojmu, že se jedná spíše o rozšířené výsledky a že by se některé výsledky, např. konfliktní topologie stromů jednotlivých genů, daly (a měly) diskutovat více. Chybí mi také závěrečná syntéza výsledků.

K diskusi mám následující otázky:

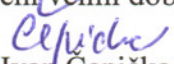
7. Ve výsledcích (str. 25) i diskusi (str. 32) autor naznačuje, že dvojice izolátů RM11 a RM26 / RM24 a RM2, které se liší dvěma aminokyselinami v GAPDH, by mohly představovat odlišné druhy. Co ho k tomu vedlo? Dá se vůbec z rozdílů sekvencí zjistit, kolik druhů představují naše izoláty? Je rozdíl dvou aminokyselin opravdu tolik významný?

8. Z rozdílné pozice těchto dvojic izolátů na stromě psbA autor správně vyvozuje dvě hypotézy, které by toto velmi zajímavé zjištění vysvětlily. Pokud by opravdu platila možnost, že RM24 a RM25 obsahují zelený plastid, který nahradil původní červený, jednalo by se podle mě o převratný objev. Je dobře, že autor nezapomíná na možnost kontaminace kultur. Odhalila by však jím navrhovaná analýza pigmentů případnou kontaminaci? Jaké pigmenty by byly zjištěny v případě, že došlo skutečně k výměně plastidů, a jaké v případě kontaminace kultur?

Na závěr mám ještě otázku:

9. Z názvu práce vyplývá, že autor považuje izobáty ze skupiny RM11 za nový kmen alveolát. Z anglické anotace se dále dozvíme, že se jedná skutečně o „phylum“, nikoli o „strain“. Toto závažné tvrzení však již není v práci nikde diskutováno. Víím, že taxonomické úrovně jsou pouze formální záležitosti. Úroveň kmene je však velice populární a bylo by dobré se u ní chvíli zastavit. Když už autor tuto kategorii v názvu použil, jaké je jeho pojetí kmene u protist? Jaký je jeho názor na používání formálních kategorií? Pokud kolpodelidi patří do kmene výtrusovců, je skutečně oprávněné zařazení chromeny a linie RM11 do samostatných kmenů?

Přes uvedené výhrady doporučuji magisterskou práci Jaromíra Cihláře k obhajobě a navrhuji hodnocení velmi dobře.


RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PřF UK

Posudek k diplomové práci Jaromíra Cihláře:

Molekulárním charakterizace nového fotosyntetického kmene prvoků z korálů

Diplomová práce si vytkla dva velmi zajímavé a aktuální cíle. Tím prvním bylo určit fylogenetické postavení 4 prvoků označované jako RM11, RM24, RM25 a RM26, kteří byli izolováni z korálu společně s druhem *Chromera velia*. Tomu se také morfologicky v mnohém podobají a všichni obsahují zřejmě fotosyntetické plastidy. Vzhledem k tomu, že se *Chromera velia* nachází na klíčovém místě v evoluci alveolát – jedná se o fotosyntetizujícího příbuzného apikomplex – dá se očekávat, že studiem dalších organismů s plastidem nacházejících se v této části stromu se můžeme dozvědět více o evolučních událostech, které předcházely vzniku apikomplex. Prvním krokem je samozřejmě fylogenetická analýza. Pro tu si Jaromír Cihlár vybral tři jaderné geny – aktin, histon 2b a GAPDH – a plastidový gen psbA. Sekvence těchto genů se mu podařilo získat od všech čtyř izolátů. Genové fylogeneze jaderných genů ukazují, že všechny RM izoláty si jsou blízce příbuzné a na stromu se nachází někde na bázi apikomplex a dinoflagelátů. Na základě těchto stromů ovšem není možné rozhodnout jaká je jejich poloha vzhledem k druhu *Chromera velia* který se větví na nejrůznějších místech. Z bootstrapové podpory je patrné, že genové stromy neobsahují dost informace pro řešení této otázky. V této souvislosti bych se rád zeptal, jestli **jste se pokoušeli tyto geny konkatenovat a zvýšit tak podporu větvení**. Tento postup se zde přímo nabízí. Plastidový gen psbA poskytl zcela jiný příběh. V jeho případě se dva izobáty větví zcela jasně společně s chromerou, kdežto další dva RM24 a RM25 společně s organizmy se zelenými plastidy. Tento překvapivý fakt autor interpretuje tak, že tyto dva izoláty mohou obsahovat zelený typ plastidu, nebo že jejich kultura obsahuje dosud přehlíženou kontaminaci zelenými řasami. Osobně považuji toto za nejpozoruhodnější výsledek diplomové práce. Zajímalo by mě, **zda se izobáty RM24 a RM25 od pohledu liší od ostatních a chromery barvou nebo i morfologií plastidů**. Také by mě zajímalo, jak **plánujete do budoucna ověřit, o jaký typ plastidu se vlastně jedná**.

Druhým cílem práce bylo získat sekvenci pro enzym uridin fosforylázu – potenciálního cíle léčby – který apikomplexa a, jak se ukázalo, také *Chromera* získaly laterálním přenosem z bakterií. Ukázalo se, že v případě chromery je tento protein fúzován s funkčně nesouvisejícím ribozomálním proteinem L23. Zde bych se chtěl zeptat, **jestli se**

vám podařilo neamplifikovat tento „fúzní protein“ v jednom kuse, takže si můžete být jisti, že se tomu tak skutečně je a že se nejedná jen o chybu skládání sekvencí. Dále by mě zajímalo, zda je podle Vás takováto uridin fosforyláza funkční?

Zatímco po stránce výsledků není této diplomové práci co vytýkat, po stránce formálního zpracování je v ní nedostatků poměrně dost. Na práci je patrné, že byla sepisována ve spěchu. Obsahuje velký počet překlepů a chyb, nevhodných formulací a anglicismů. Na práci tohoto typu a rozsahu je to počet těchto nedostatků podle mě příliš vysoký.

Ty podstatnější překlepy a chyby jsou uvedeny níže:

- Používá anglické názvy enzymů, např. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenasu*.
- Pirimidin místo pyrimidin.
- Likelyhood místo likelihood.
- *Baesiánské interference* místo inference nebo prostě metody.
- *Outgroop* místo outgroup
- *Archeobacteria* na obr. č. 11.

Některé nevhodné nebo nepřesné formulace uvádím níže:

- Na straně 3. se mluví o **vzniku** kyslíku na Zemi před 2,3 miliardami let, ale míní se pochopitelně zvýšení jeho koncentrace.
- Na straně 9 v charakteristice alveolát autor píše: “*Dalším charakteristickým znakem této skupiny jsou zřetelné otvory na povrchu buňky zvané mikropory.*” Domníval jsem se, že mikropory se vyskytují pouze u apikomplex a ne u celých alveolát.
- Metody fylogenetických analýz jsou celkově popsány způsobem, jakoby jim autor příliš nerozuměl a jen převzal a nevhodně použil některá slovní spojení. Co znamená například u metody maximum likelihood slovní obrat ... *gama distribucí ve čtyřech kategoriích...* nebo... *parametry byly odhadovány z datasetů a podpořeny bootstrapovou analýzou všech odvozených stromů.*
- Na straně 25 autor píše, že ...*porovnal je [Sekvence] s dostupnými sekvencemi na Blast Search.* Přitom měl na mysli, že porovnal sekvence s ostatními sekvencemi v databázi pomocí funkce BLAST.

Diskuze také není příliš dobře napsána. Místo toho, aby v ní autor konfrontoval vlastní výsledky s literaturou a hypotetizoval, co jeho výsledky naznačují ohledně evoluce plastidů u alveolát, pojal autor diskuzi v podstatě jako rekapitulaci výsledků a dokonce v ní představil i nová fakta. Až v diskuzi jsem se dozvěděl, že plastidy RM kmenů používají kanonický genetický kód. Tento výsledek je mimochodem také poměrně zajímavý a rád bych věděl z čeho tak autor vlastně usoudil? **Nalezl jste tryptofany kódované jiným kodonem než UGA (to by ještě nic neznamenal) nebo jste našli UGA ve funkci stop kodonu (to by samozřejmě již vylučovalo, že by mohl být používán i pro tryptofan)?**

V seznamu literatury chybí 5 citací uvedených v textu: Tengs 2000, Williams a Keeling 2003, Chan a kol. 2006, Pizzorno a kol. 2002, Johansson 2003.

Na závěr svého posudku bych rád konstatoval, že diplomová práce obsahuje zajímavé a originální výsledky a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě. Vzhledem k mnoha formálním nedostatkům však navrhuji hodnocení velmi dobře.


Vladimír Hampel