

Oponentský posudek na magisterskou práci Venduly Branišové

Charakterizace mitochondriálního genomu vybraných myxozoi

Magisterská práce Bc. Venduly Branišové se zabývá nesnadným, pro magisterskou práci možná ambiciózním, úkolem charakterizovat enigmatické mitochondriální (mt) genomy několika vybraných zástupců rybomerek (Myxozoa), k čemuž využívá moderních přístupů masivní sekvenace DNA, bioinformatiky, ale i elektronové mikroskopie. Zvolený experimentální přístup se skládá z extrakce genomické DNA, její obohacení o mitochondriální frakci, a následně dvou sekvenačních kroků. V prvním byla mt frakce osekvenována na platformě Oxford Nanopore Technologies (ONT), provedena assembly a konsenzuální sekvence byly porovnány s dostupnými mt genomy myxozoi. V druhém kroku byly konsenzuální sekvence vykazující podobnost s mt geny použity pro navrhnutí primerů a re-amplifikaci dlouhých úseků těchto sekvencí pomocí Long and Accurate PCR a jejich finální kontrolní přesekvenování metodou BTseq využívající přesnější platformu Illumina. Dovedu si představit, že Vendula musela zejména při druhém kroku vynaložit nemalé experimentální úsilí a prokázat vytrvalost zejména při pokusech pospojovat nesouvislé kontigy z prvního kroku pomocí LA PCR do větších celků. Hlavní výsledky magisterské práce, kterými jsou úspěšné získání sekvencí jednoho kompletního a tří (pravděpodobně) částečných mt genomů zástupců *Zschokkella nova*, respektive *Myxidium lieberkuehni*, *Nephrocystidium pickii* a *Zschokkella* sp., tak považuji za velmi zdařilé, a tímto bych také experimentální část práce rád vyzdvihl.

Samotný text magisterské práce čtenáře pak logicky provází jednotlivými částmi, text je veskrze srozumitelný, místy podrobný, s minimem překlepů a obsahuje vše podstatné. V sekcích 1.2.3 a 1.2.4 diskutujících specifika mt DNA pak česká gramatika a kvalita textu poněkud pokulhává, což je zjevně dáno překladem z anglických zdrojů, často vídaným problémem studentských prací. Z hlediska formátování uteklo pozornosti nekonzistentní používání citací a identické Obrázky 3 a 4 (Obrázek 4 měl ukazovat životní cyklus myxosporeí).

K práci mám následující poznámky či dotazy:

Zaujala mě následující poznámka na straně 13 týkající se mt genomu *Enteromyxum leei* (složeného z 8 cirkulárních molekul): „Každý z chromozomů obsahuje konzervativní oblasti, které jsou identické až na výjimky u chromozomu 7 a 8.“ Znamená to tedy, že jsou sekvence těchto konzervovaných oblastí identické? A jak je to v porovnání jediné známé cirkulární mtDNA u *Kudoa iwatai/haxapunctata* a *Kudoa septempunctata* s dvěma známými cirkulárními mtDNA molekulami?

str. 14 „třibodová mutace“ či tři bodové mutace?

str. 16. „Z délky větvi [Obrázek 7] a nízkého počtu identifikovaných mitochondriálních genů, vyplývá, že evoluční rychlost je u myxozoi ještě vyšší, než u druhu *P. hydriforme*. Dále pak *P. hydriforme* a Myxozoa sdílejí ztrátu tRNA. Tyto molekulární znaky definující architekturu mitogenomu tak poskytují další důkaz příbuzenského vztahu myxozoi, parazitického druhu *P. hydriforme* a medusozoi.“ Nemohla by ale relativně velká sekvenční rozdílnost mt sekvencí

Myxozoa i *Polypodium* relativně ke zbývajícím zástupcům žahavců na stromu místo společné evoluce poukazovat na jeden artefakt? O který artefakt by se mohlo jednat?

str. 27, Obrázek 10. Bylo by mnohem informativnější, kdyby fotka gelu, byť čistě pro ilustrativní účely, obsahovala alespoň velikosti hlavních fragmentů markeru a stručný popis vzorků.

str. 28. Nebylo by lepší nejdříve provést polishing ONT konsenzuálních sekvencí Illumina daty a až poté mezi contigy vyhledávat mt sekvenční? Nemůže vyšší chybovost ONT sekvencí negativně ovlivnit počet vyhledaných mt homologů pomocí BLAST?

str. 29. Jaký genetický kód byl pro predikci mt ORF myxozoi v programu Geneious použit? Není teoreticky možné, že byly některé potenciální mt geny přehlédnuty díky minimální délce ORF nastavené na 300 bp?

Tabulka 9. Jako zdroj by bylo informativnější v tabulce citovat NCBI Accession number.

Metodika i Diskuze obsahují pasáže zabývající se samotnou izolací mt DNA z tkáně parazita, ve výsledcích o tomto není ale ani zmínka. V metodice lze sice narazit na rozmezí DNA použité pro sekvenaci na ONT, ale nic více. Bylo by možné alespoň řádově přiblížit, jaké bylo pro přípravu mt frakce DNA použito počáteční množství tkáně, a jaká byla ztráta DNA během obohacení o mt frakci?

str. 47-51. Bylo by vhodné vědět, jak dlouhé byly alignmenty jednotlivých genů, na jejichž základě byly jednotlivé stromy zkonstruovány.

str. 54. Předpokládám, že použití pozitivních kontrol při LA PCR nebylo možné?

str. 54 a dále. Proti používání anglicismů nic nenamítám, naopak je velmi hojně sám používám. Nedal by se ale termín “polishování” nahradit něčím vhodnějším? Také mi není jasné, co si mám představit pod výrazy „více [a] méně polishované kontigy“? Jaký byl přínos použití dlouhých Illumina readů získaných na platformě BTseq v této práci? Podařilo se nějaké ONT kontigy pomocí LA PCR spojit? Je možné benefity použití BTseq porovnat s použitím pouhých klasických ~150 nukleotidů dlouhých Illumina pair-end readů?

str. 57. „Dále byla v práci studována fylogeneze mitochondriálních genů. Jedním z důvodů bylo i ověření toho, že identifikované úseky nejsou částí jaderných mitochondriálních pseudogenů, které by byly odhaleny právě fylogenetickou analýzou.“ Pokud bychom ale chtěli zmíněné mt pseudogeny pomocí fylogenetické analýzy odhalit, museli bychom je nejdříve do analýzy zahrnout. Tato analýza na základě prezentovaných výsledků ale provedena nebyla...

str. 58. Pokud správně rozumím, SSU rDNA studovaného izolátu *Zschokkella* sp. byla studentce dostupná – je tedy možné přiřadit tento mt genom konkrétnímu druhu?

Součástí práce jsou i neúspěchy. Zkoušela studentka v průběhu řešení práce charakterizovat i další mt genomy v textu nezmíněné? Na čem případně tyto pokusy ztroskotaly?

V závěru svého hodnocení bych rád konstatoval, že předkládaná magisterská práce je celkově zdařilá a splňuje všechny požadavky kladené na magisterské práce na Katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, a doporučuji ji tak k obhajobě.

V Českých Budějovicích, dne 22. května 2023

RNDr. Jan Brabec, Ph.D.