

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: <b>Holá Dana</b>
	Datum: <b>14.9.2009</b>
Autor: <b>Barbora Vokatá</b>	
Název práce: <b>Genetická diverzita v genech důležitých pro přežití u koní</b>	
<b>Cíle práce</b> Charakterizovat genetickou diverzitu tří plemen koní ve dvou typech genetických markerů a provést jejich srovnání se zřetelem na výskyt endemických patogenů	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO NE Rozsah práce (počet stran): 72 + 17 stran příloh Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova: ANO NE Je uveden seznam zkratk? ANO NE	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO NE Je napsán srozumitelně? ANO NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO i NE	
<b>Materiál a metody:</b> <u>Odpovídají použité metody experimentální kapitole?</u> ANO NE <u>Kolik metod bylo použito?</u> Izolace DNA (částečný podíl diplomantky), sekvenace DNA (provedeno na jiném pracovišti), identifikace SNP a vypracování/optimalizace metodiky pro jejich genotypizaci, PCR, elektroforéza na agarózovém a polyakrylamidovém gelu, RFLP analýza, výpočet parametrů genetické diverzity populací, genetických vzdáleností a testů neutrality pomocí počítačového programu Arlequin3.1 <u>Jsou metody srozumitelně popsány?</u> ANO (s připomínkami) NE	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE — v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO NE — co chybí, v čem je nedostačující?	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE	
<b>Závěry (Souhrn) :</b> Jsou výstižné? ANO (částečně) NE	
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): výborná (s drobnými připomínkami)	

## **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Cíle práce, tak, jak byly stanoveny v kap. 3, jsou v podstatě splněny, s tím, že přímá souvislost mezi frekvencemi určitých alel studovaných markerů a odolností/citlivostí koní vůči patogenům prokázána nebyla (což ovšem v žádném případě není chyba diplomantky a bude to ještě studováno). Práce poskytuje velmi dobrý výchozí bod pro další plánované studie zaměřené na tuto problematiku.

## **Otázky a připomínky oponenta:**

### Připomínky

#### 1) *Terminologie, formální stránka práce:*

Práce je psána dobrou češtinou, množství překlepů je minimální (podle očekávání se jich nejvíce vyskytuje v Seznamu použité literatury), diplomantka zřejmě poslední verzi práce pečlivě zkontrolovala. Pro příště bych pouze doporučila dbát na to, aby mezi číslicí a následující zkratkou byly mezery (objemy, hmotnosti, procenta), pokud číslice nevyjadřuje přívlastek. Také interpunkce ve větách není vždy úplně správně, což je bohužel v současné době dosti běžné.

K práci mám několik drobných připomínek terminologického charakteru (místo „uklouznutí polymerázy“ lépe „sklouznutí“, genové čipy lépe psát v počestěné podobě, místo „drosofilů“ (str. 22) lépe „octomilky“, místo „splicing“ (str. 59) by se měl používat český termín „sestřih“, místo „ammonium persulfát“ (str. 36) → „persíran amonný“, Temed by měl být uveden buď plným názvem nebo se všemi písmeny velkými, acryl/bis by měly být uvedeny plným názvem).

V téměř celé práci se používá termín „genetická distance“ – v češtině bych dala přednost termínu „genetická vzdálenost“.

Zkratka „s.d.“ (směrodatná odchylka) by měla být uvedena v seznamu zkratk.

Místo „Futas et al., dosud nepublikováno“ (str. 56), by bylo lépe použít „ústní sdělení“ nebo „rukopis v přípravě“.

Práce Hořin et al., Králík et al., Matiasovič et al. jsou někdy uváděny s českou interpunkcí, jinde bez háčeků a čárek – mělo by být sjednoceno.

#### 2) *Literární přehled:*

Nejzávažnější nedostatek celé práce vidím právě v této části, která by podle pravidel platných na Katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK měla být „koncizním přehledem všech nejvýznamnějších dosavadních poznatků o řešené problematice, dostupných v odborné literatuře“. V literárním přehledu však zcela chybí jakékoli shrnutí dosavadních známých poznatků o genetické diverzitě u koní (případně jejich blízkých příbuzných z čeledi Equidae), ať už širěji pojaté, nebo zaměřené pouze na diverzitu ve spojení s geny pro přežití. Není tomu přitom tak, že by takové práce neexistovaly (ať už se jedná o dřívější studie pocházející přímo z pracoviště, kde diplomová práce vznikala, nebo o práce jiných, zahraničních autorů) – s řadou z nich autorka posléze diskutuje své výsledky v kapitole Diskuse, a jen zběžné prohlédnutí WOS poskytne další články, které měly být prostudovány a zpracovány právě v Literárním přehledu. Ten místo toho popisuje základní typy genetických markerů (což je v pořádku), parametry genetické diverzity a genetických vzdáleností populací (které by ovšem, vzhledem k tomu, že se jedná o diplomovou práci z oblasti populační genetiky, měly být rozebrány důkladněji, měly by být uvedeny vzorce pro výpočet jednotlivých typů koeficientů vyjadřujících genetickou vzdálenost a celá tato část by případně mohla být přesunuta do části zabývající se metodikou – viz dále). Dále tato část podává základní údaje o třech plemenech koní, která byla studována v diplomové práci (to by, podle mého názoru, také patřilo spíše do Materiálu a

metodiky), a velmi stručně popisuje vybrané patogeny koní a hlavní geny obranyschopnosti (bez zvláštního zaměření na význam, který tyto geny mají u čeledi *Equidae*). V Literárním přehledu není rovněž uvedeno nic o tom, co je známo o asociaci různých genetických markerů s chorobami koní (příčemž studium této asociace mělo být, pokud to správně chápu, jedním z cílů práce). Přitom v Metodice na str. 39 je tabulka 4.6., která takové případy asociace nalezené „v různých studiích“ uvádí, ovšem bez odkazu na příslušné publikace. Měla diplomantka nějaký zvláštní důvod k tomu, že literární přehled více nezaměřila na problematiku, které se práce přímo týká (viz výše) a pojala jej spíše obecněji ?

### 3) *Materiál a metody*

Ze zásadnějších připomínek k této části diplomové práce je nutné uvést úplnou absenci údajů o postupech výpočtů různých populačně-genetických parametrů, které použitý počítačový program užívá. Nikde není vysvětleno, co je to Garza-Williamsonův index (s kterým se posléze běžně operuje v části Výsledky), jak jsou počítány Tajimovy hodnoty  $D$  pro testy neutrality SNP lokusů (co tyto testy jsou a k čemu slouží, se čtenář dozvídá až na str. 62 v Diskusi, ovšem bez toho, aby věděl, jak se provádějí).

Při popisování centrifugace není možné uvést pouze počet otáček bez uvedení typu centrifugy a rotoru (str. 27), vhodnější je uvádět přímo hodnoty  $g$ . Na str. 38 podrobnější údaje o použitém postupu centrifugace (doba,  $g$ ) zcela chybějí.

V práci často není uvedeno přesné složení použitých pufrů (B3, B5, BW a EB pufr pro izolaci DNA – str. 27, nanášecí pufr – str. 28, 33, PCR pufr – str. 31, NEB, T pufr – str. 34, PB, PE, EB pufr – str. 38). Jedná se o případy, kdy jsou pufrы součástí komerčně dodávaných kitů. Pokud je možné složení těchto pufrů od výrobce zjistit, doporučila bych doplnění přesných údajů např. formou vložení/vlepení dodatečného listu (v diplomových pracích je zvykem uvádět metodiku podrobněji, než ve vědeckých člancích). Samozřejmě, v případě, že se jedná o firemní tajemství, není absence těchto údajů chybou diplomantky a nedá se nic dělat, ovšem v okamžiku, kdy se příslušný kit přestane vyrábět, ztrácí takový popis metodiky veškerý smysl pro další použití.

Co znamená citace (???) „Mullis-Glowatzki“ na str. 28 dole ? (není v seznamu citací)

Zkratka BSA (str. 33, 34, hovězí/bovinní serumalbumin) není vysvětlena v seznamu zkratk ani přímo u příslušné tabulky (a později se vyskytuje znovu v populačně-genetické studii s úplně jiným významem – str. 48 a dále).

Kolikaprocentní etanol byl použit při barvení gelů (str. 36) ?

### 4) *Výsledky*

Výsledky jsou shrnuty velmi přehledně na 15 stranách a práce navíc obsahuje 23 stran příloh (většinou výstupy z počítačového programu Arlequin), na nichž jsou získaná data uvedena podrobněji. Porovnáním údajů v těchto přílohách a údajů ve vlastní výsledkové části jsem nicméně narazila na několik nesrovnalostí:

- a) na str. 46 největší rozpětí alel u analýzy mikrosatelitních markerů, populace Islandský pony, bylo nejen u lokusu ASB2, ale i ASB17 (viz Příloha 7);
- b) směrodatná odchylka u očekávané heterozygotnosti (tataž analýza) je 0,14664, nikoli 0,06502 (str. 47, zřejmě zkopírováno z předchozího textu a neopraveno);
- c) nejvyšší hodnota Garza-Williamsonova indexu (tataž analýza) je podle přílohy 7 u lokusu UM32 (0,63636), ne u lokusu EB2E8 (0,6);
- d) v tabulce 5.1. (str. 44) je chybně uvedena frekvence nejčastější alely u lokusu ASB23 (podle Přílohy 2 má být 0,410, nikoli 0,412);
- e) v téže tabulce – nejčastější alela u lokusu TKY394 by měla být označena 243,

nikoli 242 (viz Příloha 2);

- f) v tabulce 5.2 (str. 46) – nejméně čtená alela u HTG4 lokusu je nejen 132, ale i 128 (viz Příloha 4);
- g) v tabulce 5.3. (str. 47) – nejčastěji se vyskytující alela u lokusu AHT4 má být označena 144, ne 141 (viz Příloha 6);
- h) v téže tabulce: frekvence nejčastější alely u HTG4 má být 0,457, ne 0,458, nejméně četné alely u UM32 lokusu má být 0,007, nikoli 0,006, a totéž platí pro nejméně četnou alelu u UM11 lokusu – srovnej s Přílohou 6);
- i) v téže tabulce: průměrná frekvence na jednu alelu u lokusu HMS7 není 0,143, ale 0,167 (lokus má 6 alel)
- j) údaje o průměrné genetické diverzitě na lokus v tabulce 5.4. se liší od hodnot, které byly výstupem programu Arlequin (Přílohy 3, 5, 7), a to u všech tří populací – kde tedy autorka uváděné hodnoty vzala ?;
- k) na str. 50 u analýzy SNP markerů, populace Murgesese – největší rozpětí pozorované heterozygotnosti bylo u lokusu IL10 (0,59184), ne IL12p40 (0,54) – viz Příloha 10;
- l) proč není na str. 50 v textu uveden lokus IfnGa, jehož  $p$  pro Hardy-Weinbergovu rovnováhu je 0,06601, když v jiných případech jsou takovéto lokusy s  $p$  o něco málo větší než 0,05 vysloveně zmiňovány ?

Všechny uvedené chyby by měly být před předáním práce do knihovny opraveny formou vložení Erraty.

Vzhledem k značně velkým hodnotám směrodatných odchylek u Ho, He aj. koeficientů je tvrzení, že populace Islandský pony je v SNP markerech méně variabilní než zbývající dvě populace (str. 52) asi ne zcela přesné (u mikrosatelitních markerů je to uvedeno jako „o něco méně“, což je akceptovatelné). Dá se takto zjištěná variabilita populací nějak statisticky srovnat ?

Možná by pro čtenáře bylo zajímavější (a přehlednější), kdyby alespoň některé výsledky byly zpracovány formou grafů – např. (spíše než v textu vždy slovně popisovat nejmenší a největší hodnoty heterozygotností či rozpětí počtu alel) připravit přehledné sloupcové grafy, kde by byly uvedeny příslušné hodnoty pro všech 30, resp. 21 testovaných lokusů zároveň a všechny tři populace by byly postaveny vedle sebe, takže by na první pohled byly vidět mezipopulační rozdíly pro jednotlivé lokusy.

#### 5) *Diskuse*

Nemám závažnějších připomínek, snad jen celý rozbor toho, jaký efekt mohou mít jednotlivé typy SNP/bodových mutací (str. 58-59) by možná patřil spíše do Literárního přehledu, ale to je věc osobního mínění. Autorka občas poměrně volně zaměňuje pojmy „mutace“ a „polymorfismus“.

#### 6) *Souhrn*

V souhrnu chybí sdělení, že autorka našla zcela nový SNP polymorfismus v lokusu TLR3, což je jeden z přínosů práce, a není zde také nic o rozdílech mezi výsledky analýzy mikrosatelitů a SNP

#### 7) *Seznam použité literatury*

Autorka použila celkem 97 literárních pramenů, což je pro diplomovou práci dostatečný počet. Téměř všechny práce jsou citovány správně, pouze s drobnými překlepy a nedostatky (chybí údaj o vydavateli u knihy Edwards 1994, u některých článků jsou uvedena i čísla, nejen svazky časopisů, zatímco u většiny ne, písmeno CH je v české abecedě řazeno až za H). V textu jsem nenašla odkaz na práci Takeda et al. 2003, citace Holzinger et al. 2007 je na str. 25 nesprávně uvedena jako 2006. Možná by neškodilo v seznamu literatury uvést i všechny literární odkazy z příloh (výstupů počítačového programu Arlequin).

### Otázky

K práci mám několik dotazů:

- 1) Nedal by se použít jiný populačně-genetický počítačový program, který by dokázal provádět např. test významnosti Garza-Williamsonova indexu ? (viz str. 58 nahoře)
- 2) Jak budou postaveny funkční experimenty *in vitro*, které jsou plánovány ke zjištění souvislosti mezi četnostmi jednotlivých alel SNP a vnímavostí koní k patogenům ? (str. 62) Bude autorka ve zmíněném výzkumu osobně pokračovat ?
- 3) Jedním ze zajímavých zjištění předložené práce byl rozdíl mezi výsledky analýzy SNP a mikrosatelitů. Chápu, že podobné srovnávací studie jsou dosud na počátku a je obtížné takové výsledky diskutovat s jinými pracemi, ale jaký má autorka svůj osobní názor na možné příčiny tohoto rozdílu ?
- 4) Proč nebyla do hodnocení zahrnuta také nějaká vysloveně česká populace koní (např. Starokladrubský kůň) ?
- 5) Jaké uplatnění mohou výsledky této a podobných studií nalézt ve šlechtitelské / veterinární praxi – a používá se již někde taková genotypizace koní běžně např. při šlechtění na zlepšenou odolnost vůči patogenům ?

I přes výše uvedené připomínky diplomová práce splňuje všechny předpoklady kladené Katedrou genetiky a mikrobiologie PŘF UK a doporučuji ji k obhajobě.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

