

Posudek oponenta na diplomovou práci Veroniky Gabanové: Analýza exprese genů žahavce *Tripedalia cystophora*

Diplomová práce Veroniky Gabanové si klade za cíl porovnat genovou výbavu žahavce *Tripedalia* se zavedenými modelovými organismy a přispět tak k fylogenetickému zařazení žahavců a v důsledku pak k osvětlení původu tak fundamentální tělní struktury jakou je mesoderm.

V úvodní kapitole se autorce podařilo velmi hezkým jazykem shrnout literární údaje týkající významu studia žahavců pro pochopení evoluce genové výbavy a evoluce jako takové, stejně tak jako fylogenetického zařazení r. *Tripedalia*, a žahavců vůbec. Dále poutavě popsala vývojový cyklus *T. cystophora*, morfologii jednotlivých stádií, podrobně zejména stádium medúzy, a strukturu zvanou rhopalium. Autorka dokládá použití 86 původních prací, vesměs recentních.

Vzhledem k tomu, že přímé sekvenování genomu je stále ještě zejména finančně náročnou záležitostí, byla jako zdroj informací o genové výbavě čtyřhranky připravena a následně sekvenována knihovna cDNA. Takto vzniklá data byla porovnávána s obdobně vzniklými položkami v databázích, tzv. EST.

Konstrukce cDNA knihoven, třebaže za použití komerčních setů, představuje komplex náročných technik, náročných jednak na čistotu a jednak na organizaci práce. Veronika ji zřetelně zvládla velmi dobře, když takovou knihovnu připravila. Pokud nepoužila robotické zařízení, pak sama izolace cca 3000 klonů představuje úctyhodné množství práce vložené do fundamentu této studie.

Vzhledem k očekávanému počtu genů v genomu čtyřhranky je počet izolovaných klonů malý na pokrytí celého transkriptomu, zvláště když připravená knihovna nebyla normalizována.

Izolované klony byly sekvenovány na specializovaném pracovišti. Veronika se následně úspěšně ujala zevrubné základní bioinformatické analýzy, jejíž výsledky uvádí v přehledných výpisech a grafech. Líbilo se mi komentované zpracování výpisů z programu BLAST, svědčící o tom, že se autorka nespokojila s výpisy jako takovými, ale snažila se i pochopit a sdělit, co které číslo ve výpisu znamená. V případě tři z identifikovaných genů dále studovala jejich expresi *in situ* v *Tripedalia*, což lze rovněž považovat velmi pokročilou techniku, a stanovila expresní profil těchto genů.

V diskuzi se autorka věnuje se konzervaci genových sad, ztrátám genů v evoluci a výsledkům týkajících se hybridizace *in situ*. Diskuse je stručná, nicméně reflektuje jak dosažené výsledky tak stav poznání problému.

Práce je napsána pěknou češtinou, vcelku bez obvyklých prohrěšků. V práci je však velmi často použito anglického slovosledu. Přestože chápu, že v řadě případů není jednoduché zažítá spojení obejít, v mnoha je to zbytečné. Stejně tak chápu důvod k definování zkratk pro frekventovaně použité názvy druhů, nedomnívám se, že je to obvyklé a v textu tyto ruší.

Práce Veroniky Gabanové vznikla v jedné z předních laboratoří oboru. Veronika této skutečnosti dostatečně využila, experimentálně zpracovala velmi zajímavé téma, a výsledky studie dokázala i velmi pěkně sepsat. Práci doporučuji k obhajobě.

K práci mám následující komentáře a připomínky, k autorce pak následující dotazy:

- 1) První je jen formální: Jméno školitele "uteklo" z titulní na následující stránku.
- 2) Je si autorka vědoma, že formulace týkající se elektroforetického dělení makromolekul: „...byla provedena v 1%agarózovém gelu při 90V“, není informativní?
- 3) Jak bylo určeno, že plasmidy knihovny neobsahují insert? Použila LacZ systém, který se v případě plasmidu pBluscript nabízí. Mohu-li učinit poznámku, plasmid pBluescript je pro konstrukci knihoven zastaralý. Existují vektory, zajišťující pozitivní selekci rekombinantních plasmidů; není třeba defosforylace konců vektoru, v důsledku čehož rapidně stoupne účinnost ligace, a následně i počty získaných klonů.
- 4) Jaké je vysvětlení disproporce mezi 3000 klony izolovanými a 1187 sekvenovanými? Kam se zbylé poděly.
- 5) Nerozumím větě: “K největším chybám...“, str. 51.
- 6) Stejně tak jsem nepochopil třídění nalezených sekvencí do skupin, rovněž str. 51.

V Praze, dne 20.9.2008

RNDr. František J