

Oponentský posudek dizertační práce

**Mgr. Jan Štundl: Analýza buněk neurální lišty a raného kraniofaciálního vývoje vybraných zástupců paprskoploutvých ryb**

Vedoucí práce: Robert Černý, PhD.

Oponent: RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Mgr. Jan Štundl předložil dizertační práci, která je podložena třemi publikacemi. První práce, u které je Jan spoluautorem na druhém místě, byla zveřejněna v Nature. Druhá, jeho prvoautorská, byla publikována v časopise eLife. Aby toho nebylo málo, u třetí práce v Journal of Morphology je Jan Štundl už korespondujícím autorem. Již jen výčet publikací jasně dokládá zcela vyjímečnou vědeckou kvalitu této dizertační práce. Vedle nesporné vysoké úrovně publikací je namístě zdůraznit, že všechny tři články se věnují hlavnímu tématu práce, tj. kraniofaciálnímu vývoji zajímavých zástupců paprskoploutvých ryb. Mohu říci, že takto jednoznačně definované a ucelené téma doložené vzájemně propojenými publikacemi není zdaleka pravidlem u dizertačních prací, které jsem měl možnost posuzovat. V zázemí ‚evo-devo‘ laboratoře Dr. Roberta Černého měl Jan přístup k unikátním a neorthodoxním experimentálním modelům ryb: bichir, jeseter a kostlín jako zástupci nekostnatých bazálních rybích druhů a štika představující kostnaté ryby. Jan se soustředil na specifikaci a migraci buněk neurální lišty. Tato nesmírně zajímavá embryonální populace buněk typická pro obratlovce se podílí na vývoji mnoha odlišných buněčných typů a tkání jako nervů, pigmentových buněk, chrupavek a kostí, srdečních chlopní atd. V hlavové části obratlovců tvoří neurální lišta velkou část obličejových struktur a jejich specifický vývoj tak určuje širokou rozmanitost například tvaru čelistí. Buňky neurální lišty začínají migrovat z neurální tkáně v definované časové posloupnosti vzhledem k předozadní ose embrya. Podle všeobecně přijímaného schématu anteriorní trigeminální migrující proud předchází hyoidnímu a hyoidní posteriornímu branchiálnímu proudu. Jan studoval časovou posloupnost těchto proudů u zmíněných rybích druhů pomocí fluorescenčního značení buněk Dil, in situ hybridizace, imunofluorescenčního barvení buněk neurální lišty a mikrotomografického zobrazení. Zjistil, že hyoidní proud H u všech studovaných druhů začíná putovat dříve než anteriorní proud trigeminální TRI. Tyto údaje dal následně do souvislosti s vývojem specifických struktur u jednotlivých druhů, jak jsou vnější žábry u bichira, mohutné operkulum u kostlína nebo chrupavčitý element hyosymplectic u štiky. Presentované výsledky tak upravují obecný koncept vývoje neurální lišty, který byl založen na jasné časové posloupnosti migrace trigeminální, hyoidní, branchiální v anterior-posterior tělní ose. Dizertace obsahuje enormní množství experimentů, které jsou shrnuty v 27 hlavních obrazcích, nepočítám-li obrázky v příložených

publikacích. Za získanými výsledky je také obrovské množství ‚neviditelné‘ práce se složením transkriptomů a anotací genů u použitých rybích druhů, které předcházely klonování potřebných RNA sond na in situ hybridizace. Já, pracující s modely myši a Dania s dokonale popsány genomy v databázích, si ani neumím náročnost takové práce představit.

Celkově je dizertační práce Jan Štundla vyjímečná, tématicky ucelená a obsahuje všechny nezbytné části jako je úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky a diskuse. Úvod je přehledný a poskytuje dostatek informací k získání náhledu do problematiky. Jednotlivé články jsou nejen přiloženy, ale také dostatečně diskutovány. Jejich vzájemné propojení je zdůrazněno v diskuzi. Přehlednost textu byla trochu zhoršená tím, že obrázky výsledků byly vřazeny najednou ve dvou velkých sadách a pochopení výsledků vyžadovalo trochu únavné listování tam a zpět. Dále se v seznamu zkratk na straně 14 vloudila chyba, kdy došlo k posunu řádkování.

Bylo potěšení i čest se seznámit s prací Jana Štundla a obohatit si znalosti v oboru evo-devo. Nicméně jsem si při čtení kladl některé otázky, které bych rád během obhajoby prodiskutoval.

1. Na straně 24 píšete, že u doposud studovaných obratlovců byla potvrzena časová posloupnost proudů TRI, H a B v A-P ose. Naproti tomu u všech vámi studovaných druhů jste našel posloupnost H, TRI a B, a to včetně jediné kostnaté ryby štiky. Je vhodné na základě analýzy jednoho kostnatého druhu zobecňovat, že možná všechny paprskoploutvé ryby mají vámi popsanou heterochronii H proudu (str. 27)?
2. Velmi jsem ocenil, že jste zavedl CRISPR/Cas9 mutagenezi v embryích jesetera. Jak ukazujete, Shh mutovaná embrya jsou silně malformovaná a mají mimo jiné velmi zredukovaný TRI proud. Z výsledků dovozujete, že nefunkční signalizace Shh v předústním střevu POG je příčinou ztráty TRI. Tento závěr se mi zdá malinko zbrklý, vzhledem k tomu, že Shh je aktivní nejen v POG, ale i na další místech, které mohou ovlivnit migraci TRI. Navíc mi z obrázků nebylo jasné, jaký vliv má ztráta Shh na morfogenezi POG.

Závěrem s radostí oznamuji, že dizertační práci, která je věrohodným základem k udělení titulu PhD, doporučuji k přijetí.

V Praze, 18.9.2019

Ondřej Machoň