



ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY, v.v.i.

Akademie věd ČR

doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

### OPONENTSKÝ POSUDEK PhD PRÁCE

**Studijní program:** Zoologie – PřF, Univerzita Karlova  
**Název práce:** Srovnání kraniální skeletogeneze a odontogeneze bazálních zástupců paprskoploutvých ryb  
**Jméno studenta:** Anna Pospíšilová  
**Jméno oponenta:** Doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

Projekt byl zaměřen na analýzu skeletogeneze a odontogeneze u bazálních skupin paprskoploutvých ryb s využitím řady netradičních modelových duhů. Cílem práce bylo odhalit rozdíly či podobnosti v modelování chrupavčitých i kostěných kraniálních elementů a detailně popsat raná i pozdější stádia odontogeneze včetně molekulární regulace obou procesů. Všechny vytýčené cíle byly splněny.

Předložená dizertační práce nemá zcela typické členění vědecké práce, jelikož kapitola metod a diskuze se prolíná s výsledky samotné praktické části. Nicméně tato skutečnost neubírá práci na kvalitě, jelikož informace o použitém materiálu jsou dostatečně diskutovány a detailní metodické postupy jsou rovněž součástí příložených publikací. Naopak lze říci, že toto uspořádání zjednodušilo a zpřehlednilo text pro čtenáře. Celá práce je psána velmi přehledně s logickou návazností a s minimem překlepů.

Dizertační práce obsahuje 3 prvoautorské práce a 4 spoluautorské, z nichž 4 články již prošly oponentním řízením a 3 jsou v současné době v přípravě. Co se týká rozsahu práce, obsahuje 72 stran textu, včetně seznamu literatury (celkově 240 stran včetně příloh).

Studentka během řešení projektu využila široké spektrum metod a naučila se základním principům a postupům využívaným v molekulární a vývojové biologii. Pro jednotlivé analýzy bylo nezbytné odebrat velké množství embryí všech zvolených modelových druhů, jednotlivé vzorky a embryonální materiál zpracovat pro *in situ* hybridizace. Embrya byla rovněž zpracována na standardní histologické řezy. Barvení alizarinovou červení a microCT skeny byly využity pro vizualizaci skeletálních elementů včetně mineralizovaných zubních základů. TRAP analýza pak byla využita pro detekci osteoklastů.

Celkově lze shmout, že využití unikátního embryologického materiálu (embrya bichira, jesetera, kostlina a štiky) umožnilo získat nové poznatky o osteogenezi kraniálních struktur u bazálních skupin ryb v komparativním pohledu. Bylo zjištěno, že se vývoj skeletálních tkání již od prvopočátku mezi druhy značně lišil a sekvence



ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY, v.v.i.

Akademie věd ČR

doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

osifikace jednotlivých elementů probíhala s různým načasováním. Výsledky jsou diskutovány nejen v kontextu publikované literatury, nýbž i s osobním pohledem autorky na možné důvody odlišností mezi jednotlivými skupinami. Práce rovněž přinesla detailní popisy odontogeneze u bazálních ryb včetně molekulární regulace iniciačních fází vývoje zubů, které mohou do budoucnosti sloužit jako klíčová data pro plánování funkčních experimentů.

Aplikantka jasně prokázala schopnost samostatné vědecké práce, její publikace představují významný přínos na poli komparativní morfogeneze se zaměřením na formování tvrdých tkání. Na závěr zejména velice oceňuji kvalitu a rozsah obrazové dokumentace a obsáhlé a kvalitní publikační výstupy.

Dizertační práce Anny Pospíšilové na téma „Srovnání kraniální skeletogeneze a odontogeneze bazálních zástupců paprskoploutvých ryb“ tedy **splňuje** požadavky standardně kladené na dizertační práce v oboru Zoologie (podle §47 VŠ zákona 111/98 Sb.) a tedy doporučuji tuto práci k obhajobě.

#### Dotazy k diskuzi:

Píšete, že u jeseterů došlo k rozsáhlé redukci osifikace a ztrátě ganoidních šupin a současně se ztrátou zubů. Mohla byste více diskutovat příčiny této redukce? Jsou známy mutace/změny exprese skeletárních genů způsobující tento stav? Souvisí ztráta ganoidních šupin se ztrátou zubů nebo jsou to oddělené události? Mají stejné regulátory iniciační fáze vývoje?

Na str. 24 píšete „nejrychlejší nástup osifikace překračující prahový limit nutný pro detekci rentgenovým paprskem byl identifikován u jesetera“. Jak jste zajistila standardizaci analýz jednotlivých vývojových stádií pro možnost takového porovnání napříč druhy s různou délkou vývoje?

Na str. 25 uvádíte „intenzivní osifikace okrajových částí kosti u jesetera“ to je zajímavý, a ne úplně obvyklý jev - čím je způsobeno, že u jesetera neprobíhá osifikace z centrální části osifikačního centra - máte nějaké vysvětlení?

Jako marker kosti uvádíte *Col10a1*. Šlo o pravou osifikaci či spíše mineralizaci chrupavky? Dá se to ve Vašem materiálu nějak odlišit? Jaká je homologie tohoto genu napříč studovanými druhy? Kterou oblast genu jste si vybrala pro syntézu RNA sondy? Nemohlo dojít k vazbě sondy i na jiný kolagen?



ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY, v.v.i.

Akademie věd ČR

doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

Str. 27 "variabilní se ukázala být interakce genu *Col10a1* s aktivitou chrupavčitého markeru COLII" – zde není úplně jasné, co myslíte pojmem interakce – jak interakce probíhala? Možná by jiné vyjádření více vysvětlovalo vaše pozorování?

Je možné, že Col2 exprese na RNA úrovni u bichira rovněž předchází expresi Col10a? Dívali jste se i na ni?

V práci se mi nepodařilo najít obrazovou dokumentaci k proteinové expresi COLII – mohla byste ji během obhajoby ukázat pro porovnání s Col10a1 expresí?

Na str. 40 uvádíte, že se na procesu nahrazování zubů se u bichira nepodílí zubní lišta. V textu práce nejsou uvedené odkazy na mikroskopické snímky – mohla byste je připomenout během obhajoby. Jaký máte názor na embryonální původ náhradních generací zubů u bichira? Mohla byste navrhnout experiment, který by jej prokázal?

Str. 49: Na dentale u kostlína popisujete vznik náhradních zubů na labiální i linguální straně. Jak běžný je to jev u ryb?

Na str. 54 píšete, že se "nepodařilo identifikovat žádnou epiteliální strukturu která by se mohla považovat za dentální laminu". Nicméně na obr. 16D jsou nicméně vidět prstovité epitelové výběžky v laterální části zubu – nemohou to být základy zubní lišty? Nezkoušeli jste vizualizovat okraj/hranice zubu u kostlína lamininem nebo cytokeratinem? Pozorovali jste nějaké progenitorové buňky v této oblasti zubního epitelu?

Plánujete připravit i publikace zaměřené na odontogenezi u bichira a kostlína?

Jaké funkční experimenty byste navrhovala do budoucna s využitím CRISPR/Cas9 systému?

Marcela Buchtová

Brno, dne 1. 11. 2020

doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.  
Laboratoř molekulární morfogeneze  
Ústav živočišné fyziologie a genetiky, v.v.i.  
AV ČR  
Veveří 97, 602 00 Brno 2