



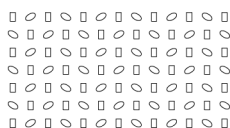
**Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Elišky Zadrobílkové
„Diverzita a fylogeneze archaméb“**

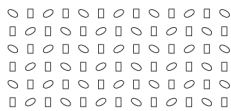
Předložená dizertační práce Mgr. Elišky Zadrobílkové se zabývá fylogenezí a diverzitou málo prostudované skupiny Archamoebae (Amoebozoa: Conosa). Archaméby jsou volně žijící nebo endobiotičtí améboidní bičíkovci nebo měňavky, blízce příbuzní aerobním mitochondriálním hlenkám (Mycetozoa). Představují poměrně malou skupinu anaerobních eukaryotických mikroorganismů se značně redukovanými mitochondriemi. Vzhledem k tomu, že někteří volně žijící zástupci opustili pro ně typické anaerobní/mikroaerofilní prostředí a obsadili střevní trakt živočichů včetně člověka, představují archaméby z hlediska fylogeneze nesporně atraktivní organismy. Na významu nabývají i proto, že se mezi ně řadí parazitické druhy, ze kterých je nejvíce probádán lidský patogen *Entamoeba histolytica*. Dosavadní data, založená na především zmatené systematice, neúplných či nepřesných popisech druhů a limitovaném počtu sekvencí, neumožnila zcela objasnit jejich fylogenezi. Situace kopíruje současný trend výzkumu a tak podobně jako i u jiných taxonů, navzdory tomu, že by studium volně žijících forem významně přispělo k objasnění evoluce parazitismu v rámci skupiny, výzkum byl zaměřen především na humánní patogeny a o volně žijících archamébách jsou k dispozici pouze omezené informace. Navíc, převážná většina dosud vytvořených druhových jmen archaméb je založena pouze na morfologických znacích, a proto je identita druhů nejistá. Odchylky ve tvaru či velikosti buňky vedly k popisu nových druhů, proto se předpokládá existence mnoha synonymních taxonů v rámci archaméb. Fylogenetické stromy byly vzhledem k chybějícím údajům z volně žijících zástupců nevyvážené a málo informativní.

Cílem práce bylo získat a dlouhodobě kultivovat nové izoláty především volně žijících, ale i endobiotických zástupců archaméb, tyto izoláty identifikovat a porovnat s již popsány druhy (příp. popsat nové druhy), pomocí molekulárních markerů co nejpřesněji zrekonstruovat fylogenetické vztahy v rámci archaméb a pokusit se zmapovat evoluci parazitismu uvnitř skupiny, a také nalézt platné morfologické znaky hlavních linií archaméb.

Dizertační práce je sepsána formou abstraktu (2 strany, verze v českém a anglickém jazyce) a úvodu (20 stran) se seznamem použité literatury (107 literárních zdrojů), doplněného o 4 rukopisy a stručné závěrečné shrnutí (2 strany). Celkový rozsah práce činí 153 stran. Za nedostatek považují fakt, že práce není celá napsána v anglickém jazyce, čímž se stává nedostupnou pro zahraniční odborníky, kteří by mohli být kvalitními oponenty. Literární úvod je sepsán ve čtivé formě naznačující pochopení tématu, avšak zařazení obrázků do podkapitol věnujících se pohybovému aparátu a systematice archaméb by napomohlo čtenářům lépe si představit popisované struktury a jejich vzájemnou polohu. Na třech ze čtyř uvedených manuskriptů je Eliška Zadrobílková prvním autorem; 2 rukopisy již byly publikované a 2 jsou přijaté do tisku v prestižních vědeckých časopisech (2x Protist, JEM, Mol. Phylogenet. Evol.). Všechny zmíněné články se věnují tématu dizertace.

Co se týče splněných cílů a dosažených výsledků, velmi pozitivně hodnotím, že autorka uspěla ve snaze o dlouhodobější kultivaci izolátů. Dlouhodobá kultivace je důležitá pro správné definování druhů tím, že umožňuje zachytit morfologickou variabilitu jednotlivých izolátů a minimalizovat tak riziko záměny vývojových stádií či morfologické





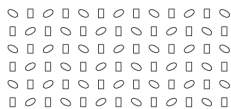
varianty za nový druh. Díky těmto kulturám bylo získáno velké množství nových sekvenčních dat z převážně volně žijících archaméb. Nejsem expertem v oblasti fylogenetických analýz, takže nemá smysl, abych hodnotila správnost použitých analýz. Je však evidentní, že autorka dizertace spolu s týmem spoluautorů významně rozšířili dataset DNA sekvencí především volně žijících archaméb, přičemž s použitím kombinovaného přístupu molekulárních a morfologických analýz bylo popsáno 13 nových druhů archaméb (*Mastigamoeba abducta*, *M. errans*, *M. guttula*, *M. lenta*, *Mastigella erinacea*, *M. rubiformis*, *M. ineffigiata*, *Rhizomastix libera*, *R. bicoronata*, *R. elongata*, *R. vacuolata*, *R. varia*, *R. tipulae*). Práce také upozorňuje na nutnost multigenových analýz pro vyřešení příbuzenských vztahů mezi hlavními liniemi. Jako první v rámci skupiny byla provedená multigenová analýza založená na sedmi genech (aktin, α -tubulin, β -tubulin, EF1 α , EF2, HSP70, HSP90), ve které byly zastoupeny všechny hlavní linie archaméb. Výsledky provedených fylogenetických analýz ukazují, že se archaméby dělí na 4 hlavní linie: Entamoebidae, Pelomyxidae, Rhizomastixidae a Mastigamoebidae. Autoři zároveň potvrdili, že rod *Rhizomastix* patří mezi archaméby, přičemž vykazuje nový typ cytoskeletárního uspořádání. Dle získaných dat je rod *Mastigella* parafyletický a rod *Pelomyxa* představuje jeho vnitřní větev, a převážně parazitický rod *Entamoeba* je sesterský zbytku archaméb. Na základě získaných informací usuzují, že společný předek archaméb byl pravděpodobně volně žijící a parazitismus se v této skupině objevil nejméně třikrát nezávisle na sobě.

I přes nespornou kvalitu dosažených výsledků, bych si dovolila poznámku týkající se různorodé kvality obrazových tabulí v uvedených publikacích. I když jsou práce fylogeneticky zaměřené, použitá fotodokumentace by si zasloužila lepší zpracování, jelikož je nezbytná nejen pro úplný popis nového druhu. Jedná se hlavně o světelnou mikroskopii, kde je nevyváženost kvality pořízených mikrofotografií nejvíce patrná. U organismů o velikosti nad 10 μm by už neměl být problém pořídit zaostřené snímky. Pokud je však snižená kvalita některých tabulí způsobena PDF kompresí, je tento komentář irrelevantní. Za nešťastné považuji i naskládání dvou až tří tabulí na jednu stranu v Zadrobílková et al. 2015b, které bylo na škodu hlavně u TEM dokumentace (za což autoři nemohou, ale většinou se to dá korigovat během korektur finálního PDF).

Dále přikládám dotazy na studentku a několik komentářů.

- 1) Jaký byl podíl autorky na přípravě publikací?
- 2) Jaké autorka vidí další perspektivy výzkumu?
- 3) Podařilo se již identifikovat domnělé endosymbionty pozorované u studovaných archaméb? Nemůže se spíš jednat o obsah potravních vakuol (především u *Rhizomastix libera*)?
- 4) U rodu *Endolimax* Kuenen & Swellengrebel uvádí autorka rok popisu 1917, ale ve většině literatury (včetně Perkins et al. 2000, An illustrated guide to the Protozoa) je to 1913. Který z uvedených roků je správný?
- 5) V publikaci Ptáčková et al. 2013 autoři zmiňují, že rody *Ioamoeba* a *Endolimax* ztratily veškerý zevně viditelný mikrotubulární cytoskelet. Předpokládám, že se toto tvrzení vztahuje pouze na ztrátu bičíku a ne vnitřní kostry mikrotubulů, protože v textu dizertační práce (str. 9) autorka uvádí, že „u parazitických rodů *Entamoeba*, *Endamoeba*, *Endolimax* a *Iodamoeba* došlo pravděpodobně důsledkem jejich způsobu života k sekundární ztrátě jak bičíku, tak přidruženého vnitřního cytoskeletu (Ptáčková et al. 2013). Na jakých datech autoři založili toto tvrzení? Uvedená publikace se těmito rody nezabývá a ani jsem nenašla odpovídající citaci. Ověřovali autoři nepřítomnost mikrotubulů i pomocí imunofluorescence? Na základě vlastní zkušenosti vím, že i když jednotlivé mikrotubuly nemusí být vždy patrné na TEM preparátech





(nejspíš v důsledku nevhodné fixace), většinou není problém je vizualizovat pomocí imunofluorescence.

- 6) Další dotaz a připomínka se týkají metody zpracování archaméb pro elektronově mikroskopickou analýzu. V publikacích Ptáčková et al. 2013, Zadrobílková et al. 2015b i Pánek et al. in press je uvedeno, že před fixací v glutaraldehydu byly buňky peletovány centrifugací. Zkoušela autorka i další postupy? Uvedený postup se mi nezdá být úplně vhodný pro měňavkovou formu, jelikož i při šetrné centrifugaci dochází k jejímu poškození a hlavně se tyto organismy zafixují v pro ně nepřírodném stavu (většinou se zakulatí); tj. buňky neadherované na pevné medium vytvářejí stacionární tzv. „resting“ formu. I sama autorka uvádí, že „...pro morfologické srovnání jednotlivých druhů mezi sebou je nejvhodnější se detailně zaměřit především na tzv. „gliding“ neboli klouzavé formy buněk. Tyto formy mají v rámci stejného druhu obvykle poměrně stabilní velikost a tvar buněk a lze na nich nejlépe pozorovat významné diagnostické znaky (Ptáčková et al. 2013)“. Proto se z mého pohledu jako mnohem vhodnější jeví fixace excizí odebraných vzorků (agarové bločky) z kultur adherovaných na agarových plotnách (na agar je možno udělat povrchové jemné zářezy, aby si do nich buňky přisedly). Při použití tohoto postupu je zachován typický tvar buňky v adherovaném stavu nebo během pohybu, a následná analýza distribuce subcelulárních struktur, především cytoskeletu, je proto věrohodnější. Alternativou je protokol, kde se měňavky nechají přisednout na vrstvu polymerované pryskyřice (dle Smirnov and Goodkov 1994, Smirnov and Brown 2004). Tato metoda je vhodná i pro kultury s malým počtem buněk, které autorům v Zadrobílková et al. 2015a znemožnily elektronově mikroskopickou analýzu druhů *Mastigella erinacea* a *M. eilhardi*.
- 7) Jaký postup zpracování pro TEM byl využit u *Mastigella rubiformis*, *M. ineffigiata* a *Pelomyxa schiedti* popsanych v Zadrobílková et al. 2015a? Výsledek se kvalitativně výrazně liší mezi jednotlivými druhy a v publikaci jsem nenašla příslušný metodický postup.
- 8) Autorka zmiňovala, že rody *Entamoeba* a *Pelomyxa* tvořily na fylogenetických stromech dlouhé větve, jejichž uskupení bývá často umělé. Vzhledem k tomu, že se s tímto problémem neustále potýkáme i my, zajímá mě, jaké metody by navrhla použít k odstranění fylogenetických artefaktů.

Závěr

Předložená disertační práce je bezesporu kvalitní a zcela jistě splňuje požadavky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy kladené na disertační práce v oboru Zoologie. Proto ji doporučuji přijmout jako součást řízení k udělení vědecké hodnosti PhD její autorce.

V Brně dne 29. 2. 2016

RNDr. Andrea Valigurová, Ph.D.

Tel: +420 549 49 7895, Fax: +420 541 211 214

E-mail: andreav@sci.muni.cz

Ústav botaniky a zoologie
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Kotlářská 267/2, 611 37 Brno
Česká republika

