

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Tomáše Pánka „Diverzita a evoluce anaerobních heteroloboseí“

Výzkum jednobuněčných eukaryot, protist, zažívá v posledních 10-20 letech nebývalý rozmach. Moderní techniky biologie umožňují efektivní vyhledávání protistů a jejich DNA v nejrůznějších ekosystémech, umožňují pokročilé studium jejich vývojových vztahů a diverzity. Jednou z favorizovaných skupin těchto výzkumů jsou drobní, bičíky opatření protisté, jsoucí evidentně základním materiálem evoluce eukaryot, mezi nimiž je možná někde LECA („last extant common ancestor“) eukaryot, či alespoň jeho blízký příbuzný. Tento výzkum zatím vede ke stále přesnějšímu určení pravděpodobného kořene eukaryot, upřesnění představ, jak asi univerzální ancestor eukaryot byl vybaven a k poznání, že svět protistů je skutečným vesmírem, kde protisté obsazují prostředí často zcela neočekávaná a zdánlivě pro život nepříznivá. Výzkum biodiverzity protist je prostě perspektivní součástí moderní biologie a dizertaci Tomáše Pánka, která představuje výsledky studia diverzity určité skupiny těchto organismů ve specifickém prostředí anaerobiozy, je třeba z toho hlediska nahlížet.

Centrálním tématem doktorské disertace Tomáše Pánka je diverzita zástupců monofyletického kmene Heterolobosea („amoebflageláti“ – tento termín si oponent dovoluje použít s vědomím jeho nepřesnosti a omezení) a to jejich anaerobních zástupců, kteří díky skryté existenci omezené na anoxická prostředí, představují materiál nesnadně přístupný běžnému zkoumání bez aplikace kultivačních metod.

Mimo heterolobosea je v dizertaci okrajově pojednávána diverzita i další skupiny protist, bičíkovců Jakobida, což jsou organizmy žijící v mořském prostředí, často v extrémních podmínkách a v mořských sedimentech. Jakobidi jsou fylogeneticky významnou skupinou organismů pro předpokládanou blízkost kořenu vývojového stromu eukaryot a možnost, že LECA byl jakobidní protist. Obě studované skupiny spojuje i to, že jejich relativně jednoduchá tělní organizace je předurčuje jako vhodné modely studia historického vývoje struktury a funkce eukaryotní buňky.

Práce je dobře strukturovaná, s pečlivostí připravená a je přehledná. Její jádro tvoří obsáhlá textová část nazvaná „Výsledky práce v kontextu současného poznání“, s řadou subkapitol. Ta je diskutována podrobněji dále. Následují 4 víceautorské publikace, ve kterých je dizertant první autor, 3 pojednávají o heteroloboseích, jedna o jakobidech. Následuje shrnutí a závěr, který, mimo jiné informuje o unikátní sbírce kultur anaerobních protist na katedře zoologie PřF UK. Následují obsáhlé přílohy, které mimo jiné obsahují 4 „ostatní publikace autora disertace“.

Textová část a tedy vlastní jádro dizertace je velmi fundovaným přehledem toho, co je známo o nejen o anaerobních heteroloboseích, ale do určité míry o amoebflagelátech obecně. Její jednotlivé subkapitoly diskutují diverzitu anaerobních zástupců heteroloboseí, kde práce autora disertace a jeho spolupracovníků významně obohatila druhové spektrum těchto organismů (48 izolátů s 15 druhy, z toho 11 nových). Pozornost si zasluhuje zjištění, že většina anaerobních heteroloboseí tvoří monofyletickou linii. Lze si tedy představit, že prostředí anaerobiozy vytváří specifický selekční tlak omezující ve svém důsledku diverzitu? Je tomu tak obecně u anaerobních protist? Diskuse o použití druhového a molekulárně druhového konceptu v jejich charakterizaci a taxonomii amoebflagelátů je další subkapitolou dizertace zasluhující pozornost. Zde oponent může bez výhrad souhlasit s názorem, že sekvenční heterogenita je výborným identifikačním markerem specifického izolátu, či populace biologického druhu, ale neměla by být jeho jediným taxonomickým kritériem. Následná

subkapitola „Taxonomie a fylogeneze skupiny Heterolobosea“ představuje ve stručnosti vývoj klasifikace heteroloboseí a jejich interní fylogenezi. Oponent zde upozorňuje na to, že kritizovaný systém heteroloboseí (Cavalier-Smith a spol.) se znovu objevuje i v recentní „klasifikaci všeho“ (Ruggiero a spol., 2015). Další subkapitoly charakterizují životní cyklus anaerobiotických heteroloboseí, a konfrontují záchytnost detečních metod závislých a nezávislých na kultivaci. Významnou subkapitolou, jejíž jasné podání oponent zvláště oceňuje je „Buněčná struktura anaerobních heteroloboseí“, která přehledně informuje o struktuře a evoluci bičíkového aparátu u eukaryot a exkavátních bičíkovců obecně a konfrontuje ji s heterolobosei. Subkapitola „Mitochondrie a její morfologie u anaerobních heteroloboseí“ je pak vyčerpávajícím přehledem řady strukturálních a fyziologických modifikací těchto organel, ke kterým u amoebflagelátů dochází. Konečnou subkapitolou je pak vytyčení budoucího směru výzkumu heteroloboseí s důrazem na využití transkriptomických dat. Tato kapitola demonstuje vynikající orientaci autora dizertace i v molekulárně biologických a biochemických aspektech výzkumu anaerobního energetického metabolismu.

Obecně, v celé textové části dizertace oponent oceňuje šíři i hloubku podávaných informací a doporučuje, aby byla publikována ve formě samostatného přehledového článku.

Jak uvedeno nahoře, součástí předkládané dizertace jsou dále tři publikované práce pojednávající o heteroloboseích, jedna práce v podobě pro publikaci připraveného rukopisu o jakobidech. Tyto práce jsou víceautorské, dizertant je jejich prvním autorem, je vyjádřen jeho podstatný a tvůrčí podíl na jejich realizaci. Jako oponent nemohu nezdůraznit to, že složení autorských kolektivů těchto prací samo svědčí o jejich kvalitě. Stejně je tomu s výběrem časopisů, ve kterých bylo publikováno. Dále je k práci připojen soubor některých dalších prací dizertanta (4 práce).

Metodickým klíčem v dizertaci prezentovaných výsledků bylo dle názoru oponenta úspěšné zvládnutí kultivace, na kterém se dizertant bezesporu významně podílel, a které ve svém důsledku umožnilo dizertantovi a jeho spolupracovníkům publikovat data ze 48 nových izolátů heteroloboseí představujících 15 druhů, 11 z nich popsat a stanovit jejich fylogenetický vztah, definovat dvě čeledi amoebflagelátů, z nichž jedna obsahuje ojedinělý druh vybavený jedním až mnoha bičíky s unikátní strukturou bičíkového aparátu. Kultivace byla rovněž důležitá při studiu jakobidních bičíkovců, kde bylo v kultuře získáno 21 kmenů, asi 10 ti druhů, byly definovány 2 čeledi a popsáno 6 druhů nových. To umožnilo významně rozšířit znalost diversity jakobidů, kdy jediná čeleď pojednávána v práci a v ní obsažené druhy jsou ekvivalentem všech dosud známých druhů jakobidů. Oponent by uvítal, kdyby během obhajoby autor dizertace uvedl další podrobnosti k izolaci a kultivaci anaerobních heteroloboseí a jakobidů. Jaká je asi úspěšnost záchytu vzhledem k počtu odebraných vzorků. Je uvedeno, že jednotlivé izoláty jsou uchovávány jako sbírkové položky? V jaké formě? Lze tyto organizmy uschovávat v zamraženém stavu? Jaká je perspektiva, že tento unikátní materiál bude zachován i po eventuální změně projektu? Jaké jsou perspektivy eventuálního převedení sbírky do ATCC?

Po metodické stránce oponenta dále zaujal komplexní přístup k charakterizaci jednotlivých izolátů heteroloboseí a jakobids. Vedle zmíněné kultivace byla použita k charakterizaci organismů světelná mikroskopie a mikrofotografie, barvení cytoskeletálních elementů protargolem, transmisní elektronová mikroskopie a metody molekulární biologie a fylogenetiky. Tento komplexní přístup byl zárukou, že popisované taxony a jejich vývojové vztahy jsou na solidní bázi a odpovídají požadavkům současné taxonomie. Protože tyto

metodiky byly uplatněny ve více autorských pracích, nelze předpokládat, že všechny spadají na vrub autora dizertace, lze však s jistotou odvodit, že jako první autor publikací měl zodpovědnost za jejich aplikaci a interpretaci jimi získaných výsledků. Ačkoliv je technická úroveň prací, tak jak jsou prezentovány v doprovodných publikacích vysoká, oponent si dovoluje kritickou poznámku ke kvalitě zachování ultrastruktur. Není pochyby, že všechny prezentované elektronogramy opravdu dokumentují struktury, které mají ukazovat, ale ale je jasné, že zpracování materiálu bylo z technického hlediska suboptimální. Buť se jedná o materiál obtížně zpracovatelný, neměl by být vypracován postup optimalizující fixaci a další preparaci heteroloboseí pro EM?

Závěr. Doktorskou dizertační práci Mgr. Tomáše Pánka hodnotím jako vynikající práci, splňující nároky na tento typ práce, vhodnou pro obhajobu a získání titulu „doktor“ (PhD.). Práce představuje jejího autora jako vyzrálou vědeckou osobnost tohoto titulu hodnou.

Prof. RNDr. Jiří Vávra, DrSc.
Katedra parazitologie
PřF JU, České Budějovice

17. 8. 2015