



UNIVERZITA KARLOVA  
I. lékařská fakulta

**Oponentský posudek disertační práce „Identification and characterization of main genetic components involved in phototransduction and vision of the cubozoan jellyfish *Tripedalia cystophora*“, kterou předkládá Mgr. Michaela Liegertová v rámci Oborové rady Vývojová a buněčná biologie Doktorských studijních programů Univerzity Karlovy a Akademie věd České republiky.**

### Charakterizace předkládané práce

Práce má rozsah 158 číslovaných stran a zahrnuje asi 200 citací vědeckých prací. Práce je napsána v anglickém jazyce a sestává se ze základního textu věnovaného tématu práce (Identifikace a charakterizace hlavních genetických komponent účastnících se fototransdukce a vidění u medúzy čtyřhranky *Tripedalia cystophora*) v rozsahu 89 stran formátu A3, připojeného vedlejšího projektu v rozsahu 7 stran, dodatkových textů, připojených publikací týkajících se zahrnutých témat a seznamu literatury. Práce je doprovázena autoreferátem v rozsahu 17 stran formátu A4, který je rovněž psán v anglickém jazyce.

Práce je postavena na prestižních publikacích, z nichž na jedné je autorka první autorkou a na další spoluautorkou. Jde o následující publikace: **Cubozoan genome illuminates functional diversification of opsins and photoreceptor evolution.** Liegertová M, Pergner J, Kozmiková I, Fabian P, Pombinho AR, Strnad H, Pačes J, Vlček Č, Bartůněk P, Kozmik Z. *Sci Rep.* 2015 Jul 8;5:11885. doi: 10.1038/srep11885. (K práci je připojeno Erratum in: *Sci Rep.* 2015;5:14396 upravující přesné znění zdroje financování.) **Molecular analysis of the amphioxus frontal eye unravels the evolutionary origin of the retina and pigment cells of the vertebrate eye.** Vopalensky P, Pergner J, Liegertova M, Benito-Gutierrez E, Arendt D, Kozmik Z. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 18;109(38):15383-8.

Celkově je práce velmi dobře napsána a zakládá se na prestižních publikacích mimořádné vědecké kvality. Dělení práce je velmi dobré a srozumitelné i pro čtenáře, který není přímo z oboru předkládané práce. Cíle jsou jasně vymezené, metody velmi dobře popsány a patří do oblasti vynikajícího kompetitivního výzkumu.

Konkrétní podíl práce na publikovaných výsledcích je detailně uveden v každé části práce a dokládá zásadní přínos autorky na získání výzkumných výsledků.

Práce je velmi významná z hlediska pochopení mechanismů a průběhu evoluce živočichů.

Konkrétně si předkládaná práce klade za cíl:

Poznání hlavních molekulárních komponent percepce světla a fototransdukce *T. cystophora* a kuboidních medúz v širším pohledu a zahrnuje klonování opsinů *T. cystophora* a jejich fylogenetickou analýzu.

Příspěvek k pochopení mechanismů evoluce percepce světla a vidění.

### Postup výzkumné práce

Autoři získali materiál z přírodních zdrojů a to ve spolupráci s místním univerzitním pracovištěm, které je zřízeno s cílem provádět patřičným způsobem legislativně a materiálně zajištěný přírodovědecký výzkum v Karibské oblasti (Department of Marine Sciences, University of Puerto Rico, Isla Magueyes Laboratories) v obci La Parguera a sběr materiálu se odehrál v lokalitě

specifikované GPS 17.974932, - 67.065042. Materiál byl použit k založení laboratorních kultur *T. cystophora* a k izolaci materiálu z celých medúz nebo z jejich separovaných částí. Materiál byl použit k velkooběmovému sekvenování metodou 454. Byla vytvořena databáze 1,952,068 čtených úseků a na jejich základě pak 134,683 kontinuálních úseků (contigs). Databáze pak sloužila k inforatickým analýzám a k následným cíleným experimentům.

Práce pak zahrnuje identifikaci genů z předem určených skupin a jejich další molekulárně biologickou analýzu.

## Hlavní výsledky předkládané práce

Identifikace 17 nových genů ze skupiny opsinů *T. cystophora*, přičemž všechny patří do skupiny cnidopsinů.

Na základě fylogenetické analýzy je určena příbuznost jednotlivých identifikovaných cnidopsinů a jejich vztah k opsinům v rámci známých genů čtrhranek, žahavců a obecně opsinů.

Na základě histologické a molekulárně biologické analýzy exprese jednotlivých opsinů *T. cystophora* a jejich funkční analýzy v heterologním systému transfekovaných buněk a kultivovaných medúz a identifikace komponent předpokádaných fototransdukčních kasád je určena příslušnost opsinů ke známým transdukčním cestám.

Práce určuje dva typy fotopercepčních buněk *T. cystophora* a přináší data svědčící pro pravděpodobné dvoubarevné, nebo vícebarevné vidění nebo fotopercepci *T. cystophora*.

Práce identifikuje další komponenty fototransdukce *T. cystophora* a to především Arrestin, protein důležitý pro časové ohraničení aktivace GPCR.

Dále práce identifikuje nové proteiny příbuzné proteinům tvořícím opticky hutné prostředí čočky – crystallins a to na základě jejich sekvenční podobnosti s J1A až C. Tato část je připravována k publikování a tak zatím není uveden jejich expresní vzorec.

Připojený vedlejší projekt je zaměřen na analýzu oka, expresi Mitf (Microphthalmia associated transcription factor), který je regulátor genů důležitých pro produkci melaninu v buňkách neuroectodermového původu a na jeho základě určení původu pigmentových buněk oka kopinatce *Branchiostoma floridae*.

Tato práce dokládá, že hlavní pigment oka *B. floridae* je melanin a oko je v této situaci podobné oku obratlovců. Připojený projekt je zdánlivě okrajový, protože autorka blíže nekomentuje vztah k oku *T. cystophora* a přechází otázku buněčného původu pigmentu oka medúz.

## Hlavní závěry práce

Byly nalezeny nové geny ze skupiny cnidopsinů *T. cystophora* a byla stanovena jejich podobnost s c-opsiny obratlovců. Práce dokumentuje jejich expansi během evoluce Cnidaria.

Geny ze skupiny cnidopsinů byly detailně charakterizovány ve smyslu jejich exprese a funkce.

Byl podán doklad pro pravděpodobnou dvojbarevnou percepci světla *T. cystophora*.

Byl podán důkaz o existenci Gs alfa podjednotky v obou typech očí *T. cystophora* a vytvořena hypotéza o dalším možném způsobu fototransdukce v tomto živočišném druhu.

Byl podán důkaz existence arrestinu v *T. cystophora*.

Byly nalezeny nové geny ze skupiny krystalinů *T. cystophora*.

## Doplňující otázky posuzovatele práce

Jak jsou autory chápány navrhované retrotransposice cnidopsinů, intradruhově nebo horizontálním přenosem?

Považují autoři pigment oka *T. cystophora* za pigment fotoreceptorů nebo specializovaných buněk?

Existuje nějaká hierarchie mezi rhopalií *T. cystophora*?

Jsou geny cnidopsinů shlukovány v genomu *T. cystophora* ? Jaká je velikost genomu *T. cystophora* a kolik má *T. cystophora* chromosomů.

### **Závěr**

Mohu konstatovat, že autorka v rámci předkládané práce a publikací, které jsou jejím podkladem, řešila velmi aktuální a z obecně biologického hlediska důležité téma. Použila moderní metody molekulární vývojové a evoluční biologie a získala poznatky důležité pro vědeckou komunitu a rozvoj výzkumné oblasti.

Předkládaná práce má velmi dobrou úroveň.

Práce splňuje požadavky v daném oboru podle § 47 Zákona o vysokých školách 111/1998 Sb. a jeho znění k 1.9.2016. Doporučuji proto Oborové radě tuto práci jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze 5. 9. 2016

MUDr. Zdeněk Kostrouch, CSc

