

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF SCIENCE

PhD study program: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology



Mgr. Jiří Pergner

Evolution of light detection in chordates

Evolve vnímání světla u strunatců

Summary of PhD. Thesis

Autoreferát dizertační práce

Supervisor: RNDr. Zbyněk Kozmik, Csc.

Prague 2018

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Zdena Palková, Csc.

Školící pracoviště: Oddělení transkripční regulace, ÚMG AV ČR

Autor: Mgr. Jiří Pergner

Školitel: RNDr. Zbyněk Kozmik, Csc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Abstract

Light detection is one of the crucial abilities of all animals. The light cues are important e.g. for maintaining of circadian rhythms, regulation of spawning cycles, changes of pigmentation and arguably most importantly for vision. Most animals detect light by opsins, members of the G protein coupled receptors superfamily.

Amphioxus belongs to earliest branching chordate clade, cephalochordates. Thanks to their phylogenetic position, physiology and morphology, cephalochordates became the most relevant model organism for understanding the evolutionary origins of vertebrate specific traits. Amphioxus evince various reactions to light throughout its development.

In the presented thesis light detecting systems of amphioxus were studied thoroughly. More specifically characterization of the opsin gene repertoire of two amphioxus species *Branchiostoma floridae* and *Branchiostoma lanceolatum* and their comparison with opsins from other animals is presented. In addition, remarkable similarity on the gene expression level between one of amphioxus visual organs, so called frontal eye, and neurons and retinal pigmented epithelium in vertebrate retina was shown. These data confirm the long time ago proposed homology between amphioxus frontal eye and vertebrate lateral eyes.

Taken together all the presented data help with getting insights into the evolution of light detection in vertebrates and more broadly in putative chordate ancestor.

Abstrakt

Vnímání světla je jednou ze základních vlastností živočichů. Světelné signály jsou pro ně důležité např. pro udržování cirkadiálních rytmů, regulaci rozmnožovacích cyklů, provedení změn v pigmentaci a pravděpodobně nejdůležitěji ze všeho pro vidění. Většina zvířat vnímá světlo za pomoci opsinů, členů proteinové superrodiny G protein spřažených receptorů.

Kopinatec je zástupcem bezlebečných, nejbazálnějšího podkmene strunatců. Díky jejich fylogenetické pozici, morfologii a fyziologii se bezlebeční stali nejlépe použitelným modelovým organismem pro porozumění evoluce obratlovců a jejich specifických znaků. Během svého vývoje kopinatec vykazuje mnoho různorodých reakcí na světlo.

Tato dizertační práce se zabývá studiem světločivných orgánů a opsinů v kopinatci. Do větší hloubky je zde probrán repertoár opsinových genů ve dvou druzích kopinatce, kopinatci floridském (*Branchiostoma floridae*) a kopinatci plžovitém (*Branchiostoma lanceolatum*) a jejich porovnání zejména s opsinou v obratlovcích. Dále jsou prezentována data ukazující pozoruhodnou podobnost na úrovni genové exprese mezi vizuálním orgánem kopinatce, tzv. předním okem, a neurony a pigmentovým epitelem v oku obratlovců. Tato data potvrzují dlouho předpokládanou homologii mezi předním okem kopinatce a okem obratlovců.

Celkově předložená data napomáhají s vhladem do evoluce vnímání světla u obratlovců a šířeji vzato u předka všech strunatců.

Contents

Abstract	2
Abstrakt	3
Introduction and aims of the thesis	5
List of methods.....	7
Results and discussion.....	8
Conclusion	11
Úvod a cíle práce	12
Přehled metod.....	14
Výsledky a diskuze.....	15
Závěr	18
List of references/Seznam použité literatury	19
Curriculum Vitae (in English)	21
Curriculum Vitae (česky).....	22
List of publications/ Seznam publikací	23

Introduction and aims of the thesis

Eyes of various types can be found in more than 95% of all known animal species¹ and even more animal species evince various light dependent behavior. All of these animals use for light detection specifically adapted cell type, so called photoreceptor cell. Photoreceptor cells capture photons by using light sensitive membranous receptors, mostly opsins, members of G protein coupled receptor (GPCR) superfamily. To achieve higher efficiency in capturing a photon, the photoreceptor cells usually expand their membrane surface, either by modifying a cilium (ciliary photoreceptors) or by membranous microvilli (rhabdomeric photoreceptors). Ciliary photoreceptors are typically utilized in eyes of vertebrates, while rhabdomeric are mostly used in eyes of invertebrates², but some exception in this organization were found (reviewed by Fain, *et al.*³).

The opsins are used as photosensitive pigment by representatives of most metazoan animal clades with the exception of sponges^{4,5}. The opsins are usually divided, based on their sequence, to four groups: c-type opsins (including vertebrate visual opsins), r-type opsins (encompassing invertebrate visual opsins), Cnidopsins (group consisting of cnidarian opsins) and Group4 opsins (containing various mostly non-visual opsins)⁶⁻⁹. Several important landmarks can be found in opsin's structure. First of all, the opsins can be recognized from other GPCRs by the presence of highly conserved lysine (K) residue (in bovine rhodopsins localized at position 296) necessary for binding light sensitive cofactor, usually 11-*cis* retinal⁴. Next, a negatively charged amino acid (usually glutamate, theoretically also aspartate), so called counterion, is necessary for stabilizing the bound between opsin's lysine and retinal^{4,10}. Counterion is also necessary for shifting the opsin's spectral sensitivity to visible range. The opsins with mutated counterion were shown to have the spectral sensitivity shifted to UV range¹¹. In most opsins, the counterion is located at position 181 (when aligned with bovine rhodopsin)⁴. In vertebrate opsins the counterion is located at position 113, which has the effect on opsin sensitivity and ability to activate downstream signaling cascade¹¹.

After the irradiation the opsins activate downstream signaling cascade beginning with G_{α} subunit of trimeric G proteins. The outcome of the signaling cascade differs depending on the type of the G_{α} subunit activated. C-type opsins usually signal via $G_{\alpha t}$ subunit (so called transducing), that arose from $G_{\alpha i}$ gene by tandem duplication in vertebrate lineage¹². $G_{\alpha t}$ activation leads to decrease of cellular cGMP, closure of CNG channels and cell hyperpolarization¹³. R-type opsins signal via $G_{\alpha q}$ leading to increase of intracellular Ca^{2+} , opening of calcium sensitive channels and cell depolarization¹³. It was found by exploration of the bovine rhodopsin that three amino acids, so called tripeptide, localized at the C terminal part of the opsin, are necessary for contact between opsin and particular G_{α} subunit^{14,15}. Additionally, it was found, that the tripeptide sequence probably defines which G_{α} subunit will be activated by the opsin⁸.

Numerous studies in the past have provided hypotheses about the evolutionary origin of the eyes. The authors of these studies were mostly discussing whether the eyes evolved more times independently or whether they arose only once and were modified in various animal lineages (reviewed by Fernald¹⁶). It was shown in 1990s that similar set of genes,

namely *Pax* (mainly *Pax6*), *Six*, *Eya*, *Dach* (belonging to so called Retina Determination Gene network), is involved in the development of eyes in various phylogenetically distinct animals^{17,18}. This strengthened the view that the eyes evolved from one ancestral precursor. Later, several examples of eyes, whose development was Pax6 independent, were identified. Nowadays it is widely accepted that resolving the issues of mono- or polyphyletic origin of the eye is almost impossible, because gene sharing, convergence and parallelism can be found when comparing development of various types of the eyes¹⁹.

Cephalochordates (sometimes called also amphioxus or lancelets) are the most basally branching chordate clade. The cephalochordate subphylum consists of three genera *Branchiostoma*, *Asymmetron* and *Epigonychthis*²⁰. Cephalochordates serve thanks to their phylogenetic position, morphology and physiology as excellent proxy for chordate ancestor. Studies of amphioxus are important also for understanding the evolution of vertebrate traits such as the vertebrate-type body plan, central nervous system or sensory neurons.

Amphioxus possesses four morphologically and genetically different photoreceptive organs, the frontal eye and lamellar body (both being formed by ciliary photoreceptors) and Joseph cells and dorsal ocelli (composed of rhabdomeric photoreceptors)²¹. Studies dealing with amphioxus light detecting systems were performed already at the turn of the 20th century^{22,23}, followed by thorough electron microscopical analysis of amphioxus photoreceptive organs in the second half of the 20th century^{21,24-27}. Huge gaps, nevertheless, remain in understanding the photoreception of amphioxus.

The aim of this thesis was to broaden available information about light detection in amphioxus, mainly its opsin repertoire and also to provide data about the development of amphioxus frontal eye, putative homolog of vertebrate lateral eye. This could thus provide clues about photoreception in the hypothetical chordate ancestor and thus about evolution of photoreception in vertebrates.

Particular aims were:

- Molecular characterization of neurons in amphioxus frontal eye with special attention to genes involved in the frontal eye development, phototransduction cascade and detection of utilized neurotransmitters and comparison with the data known about the development of the vertebrate eyes.
- Establishment of a cell-line based assay enabling studies of opsin function and biochemical characterization of opsins hallmarks.
- Characterization of opsin repertoire in two amphioxus species, the Florida species *Branchiostoma floridae* and the European species *Branchiostoma lanceolatum*.

List of methods

Work with nucleic acids

Genomic DNA isolation

Cloning of DNA fragments: for preparation of plasmids for heterologous peptides production; preparation of probes for RNA *in situ* hybridization; sequencing of opsin genes; cloning of whole opsin genes for biochemical analysis

Total RNA isolation, preparation of cDNA

Quantitative RT-PCR – SYBR green (Roche); detection on LightCycler (Roche)

Preparation of antisense probes for RNA *in situ* hybridization

Work with proteins

Production and purification of heterologous proteins from bacteria BL21-(DE3)-RIPL

Preparation of mouse polyclonal antibodies

SDS-PAGE and western blot

Work with animals

Tissue isolation from anesthetized animals

Whole mount immunofluorescent staining of amphioxus embryos

Confocal imaging, image processing, 3D reconstructions in FIJI software

Whole mount RNA *in situ* hybridization

Chemical manipulation of developing embryos

Work with cell cultures

Measuring of intracellular levels of cAMP using GloSensor HEK cell line (Promega)

Immunofluorescent staining of cells

Results and discussion

This PhD. thesis and the scientific papers, it was built upon, are focused on the characteristics of amphioxus opsins and development of the frontal eye of amphioxus. Obtained data are compared with known information about vertebrate opsins and development of vertebrate lateral eyes. Conclusions of this thesis are put into context of possible scenarios of evolution of vertebrate eyes from simple photoreceptive organ that was probably present in putative chordate ancestor.

Molecular fingerprint of developing amphioxus frontal eye and its circuitry resembles the situation found in vertebrate retina

We were able to show that same set of genes is used for development of amphioxus frontal eye and vertebrate retina. More specifically amphioxus orthologs of vertebrate *OTX*, *MITF* and *PAX2* (genes involved in development of retinal pigmented epithelium (RPE) in vertebrates) are involved in development of the frontal eye pigment cells²⁸. The pigment was shown to be melanin same as is in the RPE²⁸. Amphioxus *Otx*, *Pax4/6*, *Six3/6* and possibly also *Rx* (ortholog of vertebrate *Rax*) were shown to be expressed in developing frontal eye photoreceptors and the neurotransmitter was glutamate, which is all similar to the vertebrate retinal photoreceptors^{28,29}. Moreover the phototransduction cascade utilized by frontal eye photoreceptors resembles that of vertebrate retinal photoreceptors, starting with $G_{\alpha i}$ and probably ending with cell hyperpolarization^{12,28}. Vertebrate phototransduction cascade differs, however, from that of amphioxus and is probably vertebrate novelty enabling higher sensitivity of vertebrate photoreceptors¹².

Ambiguous is the situation in defining the homology between putative amphioxus frontal eye projecting neurons and vertebrate retinal interneurons. In amphioxus so called Row2 neurons, located directly posteriorly to frontal eye photoreceptors, are serotonin positive^{28,30}. Specific population of vertebrate amacrine cells was shown to be serotonin positive. On the other hand, Row2 cells' processes terminate in amphioxus putative visual processing center²⁸. This might point to similarity with vertebrate ganglion cells. No other genes involved in development of vertebrate interneurons were, nevertheless, detected in developing Row2 cells. Other putative amphioxus frontal eye interneurons, Row3 and Row4 cells, were shown to be *Pax4/6* and *Rx* positive and they utilize glutamate as neurotransmitter^{28,29}. All of these characteristics are similar to either vertebrate horizontal or amacrine cells. All mentioned expression data are summarized in Fig.1.

Electron microscopical (EM) studies of amphioxus cerebral vesicle held in 1990s scanned also projections of putative frontal eye interneurons³¹. Row4 cells' projections are contralateral similarly to majority of ganglion cells in vertebrate retina, while Row2 and Row3 cells' projections are lateral³¹. The reason for contralateral projections from vertebrate retina is improvement of spatial vision. Since amphioxus frontal eye is very simple, being formed of only about 6-10 photoreceptor cells located in one row²¹, it is not able to provide any spatial information. Two hypotheses were raised about eyes in putative chordate ancestor. The ancestral chordate eye either resembled the frontal eye in amphioxus, being of a similarly simple morphology, or the ancestral chordate possessed paired eyes as can be found in all vertebrates and the frontal eye of amphioxus is result of simplification in cephalochordate

lineage³². If the former is true, then the absence of contralateral projections in Row2 cells, that are according to our analysis most probable interneurons comparable with vertebrate ganglion cells, might be ancestral to all chordates. If the later hypothesis is true, then the lateral projections of Row2 cells might be result of losing the image forming capacity of frontal eye, or the interneurons with similar character as vertebrate ganglion cells in amphioxus frontal eye are Row3 and/or Row4 cells.

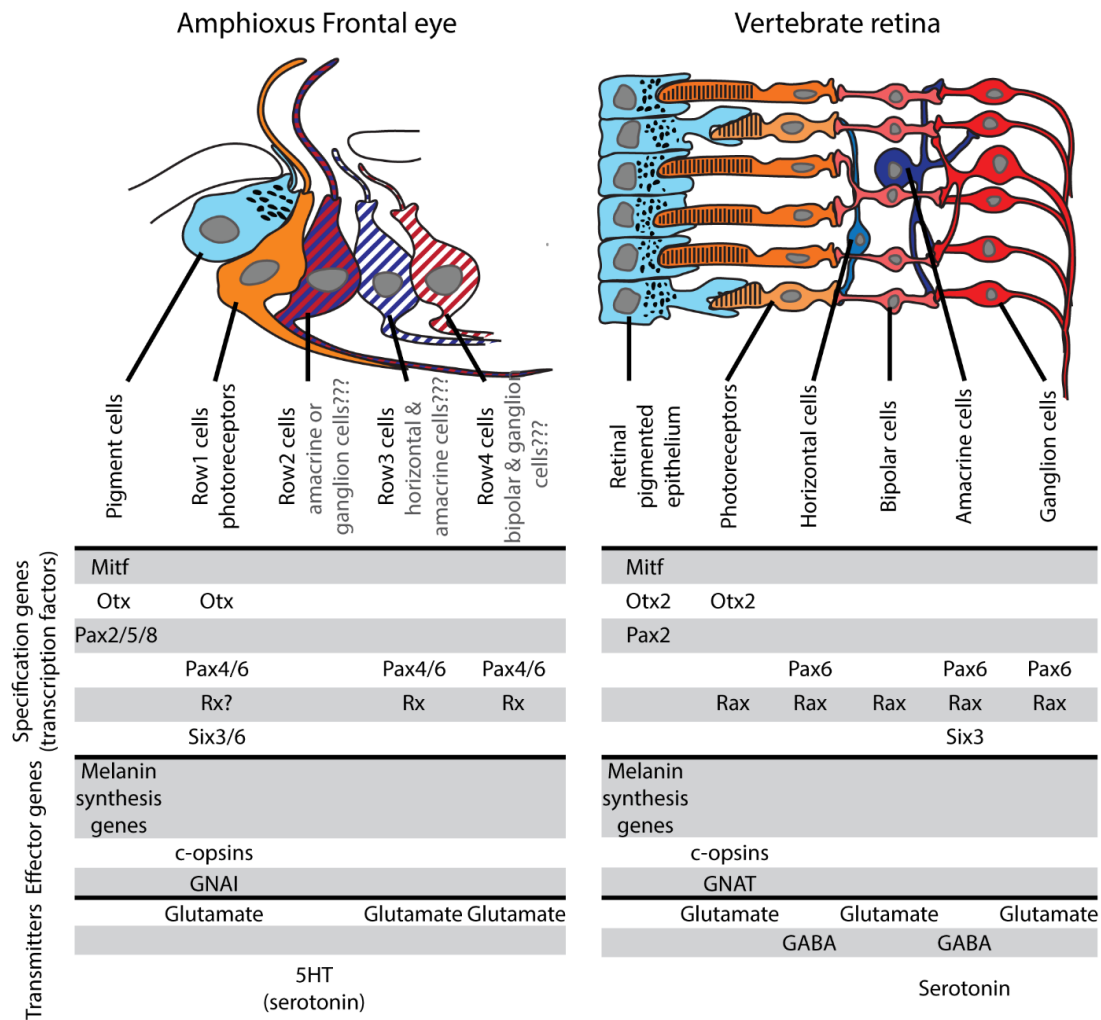


Fig.1 Schematic comparison of molecular fingerprint of amphioxus frontal eye and vertebrate retina (adapted from Pergner and Kozmik²⁹)

Proposed homologies between particular cell types in the amphioxus frontal eye and vertebrate retina are shown. For retinal specification genes, only homeobox transcription factors are shown (the only exception is *Mitf*, a member of basic helix-loop-helix transcription factors). Expression data for other than homeobox transcription factors in amphioxus frontal eye are missing in the literature. For proposed homologies between putative interneurons in amphioxus and vertebrate interneurons, data about their projections from EM analysis were also taken into account. Data for expression of amphioxus genes were taken from Kozmik, et al.³³, Kozmik, et al.³⁴ and Vopalensky, et al.²⁸. EM data were taken from Lacalli³¹. Data for molecular fingerprint of vertebrate retinal cell types were taken from Bassett and Wallace³⁵, Kolb³⁶ and Swaroop, et al.³⁷. *GNAI* and *GNAT* is alternative designation of $G_{\alpha i}$ and $G_{\alpha t}$ respectively.

In conclusion, our analysis showed, that development and physiology of amphioxus frontal eye and vertebrate retina are based on highly similar logics. This means that, no matter of how the eyes in ancestral chordate look like, all chordate eyes were probably built upon same ancestral building plan. What now remains to be solved is the character of the visual circuitry in amphioxus and its similarity and differences with visual circuitry in vertebrates.

Amphioxus opsins – cornerstones for studies of vertebrate-specific opsin adaptations

We have identified and described 21 opsin genes and one putative opsin pseudogene in genome of *Branchiostoma lanceolatum*³⁸. We have also corrected 20 previously mistakenly annotated opsin genes and identified one new opsin gene in genome of *Branchiostoma floridae*³⁹. Our phylogenetic analysis showed that representatives of three major opsin groups c-type, r-type and Group4 can be found in genomes of both amphioxus species. Moreover, we documented expansion of two opsin subfamilies, Go subfamily and amphioxus specific opsin subfamily so called “Amphiop6” group. Based on extensive bioinformatical analysis we came up with hypothesis about role of neighboring transposable elements in evolution of these opsin genes’ subfamilies in *B. lanceolatum*, *B. floridae* and also in *Branchiostoma belcheri*³⁹.

We performed expression analysis of all identified opsin genes by qRT-PCR in different developmental stages and adult tissues in both *B. lanceolatum* and *B. floridae*. Additionally, we performed RNA *in situ* hybridization for three opsin genes in *B. lanceolatum*. Our expression analyses showed both redundancy and specificity in temporal (various developmental stages) and spatial (different adult tissues) employment of opsin genes in both amphioxus species. We also revealed differences in utilization of particular opsins from previously mentioned expanded subfamilies (Go and Amphiop6).

We focused as well on describing known structural and functional landmarks of opsins, mainly counterions and tripeptide sequences. We identified opsins with negatively charged aminoacids (glutamate or aspartate) at position 113, so far functionally characterized only in vertebrate opsins and recently in one urochordate opsin⁴⁰. Counterion at this position seems to be important for higher sensitivity and decreased recovery time of vertebrate opsins and was considered as vertebrate specific novelty¹¹. Amphioxus opsins evince high variability in tripeptide sequence, including vertebrate c-type specific tripeptide NKQ in amphioxus c-type opsin and HPK tripeptide in amphioxus melanopsin (typical tripeptide for r-type opsins).

In summary, we have described opsin repertoires in two amphioxus species. We presented hypothesis explaining expansion of two opsin subfamilies in three amphioxus species. Moreover we showed that several amphioxus opsins demonstrate characteristics being considered to be typical only for vertebrate opsins, mainly the presence of negatively charged aminoacids at position 113. Whether these aminoacids serve as the counterion in amphioxus opsins needs to be determined. For this we would like to use modified cell-line based assay for monitoring of opsin-trimeric G protein coupling that we used in our study dealing with jellyfish *Tripedalia cystophora* opsins. We expect that results of our studies will be cornerstones for other studies dealing with evolution of vertebrate specific adaptations of opsin properties.

Conclusion

This PhD. thesis provided information about photoreception in amphioxus. More specifically, the opsin repertoire in two amphioxus species, *B. floridae* and *B. lanceolatum* was described. Additionally the molecular fingerprint of developing frontal eye was defined. The results of this thesis can be summarized in several points:

- We showed that orthologs of genes involved in the development of vertebrate photoreceptors and retinal pigmented epithelium are also utilized for the development of amphioxus frontal eye photoreceptors and pigment cells. Interestingly, frontal eye phototransduction cascade is similar but not same as the one used by vertebrate retinal photoreceptors. The vertebrate phototransduction cascade is probably specific trait that enabled improvement of sensitivity of vertebrate visual photoreceptor cells. Our data strengthen previously proposed homology between amphioxus cephalic visual organ, the frontal eye, and vertebrate lateral eye and provide also some clues about evolution of vertebrate specific phototransduction cascade.
- We documented the advantages of the use of “home-made” antibodies, raised specifically against proteins of a chosen non-model organism, in evo-devo studies. We expect that a similar approach will be used in more labs to broaden spectrum of methods enabling not only gene expression studies, but also for example chromatin immunoprecipitation analysis.
- We identified the complete opsin repertoires of two amphioxus species *B. floridae* and *B. lanceolatum*. We performed expression analysis using qRT-PCR (for all detected opsins) in various developmental stages or adult tissues. Our expression analysis showed that some opsins evince highly specific spatial and/or temporal expression pattern, while the expression of others is more ubiquitous. Moreover we documented expression of three opsins by RNA *in situ* hybridization. We unraveled two opsins with interesting expression pattern – both were expressed in the tail and in tissues in close proximity to developing mouth, where no photosensitive organs were identified previously. We uncovered several opsins having sequential hallmarks similar to those of vertebrate opsins. Our study provides several important results that should be examined in the future.
- We have established a cell-line based assay for detection of coupling between opsin and $G_{\alpha s}$ subunit of trimeric G proteins. We identified two opsins from jellyfish *Tripedalia cystophora* that signal via a $G_{\alpha s}$ -cAMP signaling cascade. We documented, for the first time, utilization of this cascade for vision guided behavior. Our assay can be modified to provide information about opsin coupling to other G_{α} subunits and thus can be used in future studies dealing with opsins from other species. We also provided data showing the advantage of our assay in characterization of important landmarks in opsins of *T. cystophora*, e.g. tripeptide, counterion, conserved lysine 296.

Úvod a cíle práce

Různé druhy očí byly nalezeny u více než 95% všech živočichů¹. Ještě větší podíl živočichů vykazuje různorodé reakce na světelné signály. Všichni tito živočichové vnímají světlo pomocí speciálního buněčného typu, tzv. fotoreceptorových buněk. Fotoreceptorové buňky zachycují foton pomocí světločivných membránových receptorů. Ve většině případů se jedná o opsiny, členy proteinové superrodiny G protein spřažených receptorů (GPCR). Aby fotoreceptorové buňky dosáhly větší efektivity v zachycení fotonu, muselo u nich v průběhu evoluce dojít ke zvětšení membránového povrchu, buď pomocí úpraveného bičíku (tzv. ciliární fotoreceptory) nebo pomocí membránových klků (tzv. rhabdomerické fotoreceptory). Ciliární fotoreceptory jsou využívány v očích obratlovců, zatímco rhabdomerické se většinou nacházejí v očích bezobratlých². V poslední době bylo nalezeno několik případů změn v tomto uspořádání (shrnutí v Fain, *et al.*³).

Opsiny jsou používány jako fotosensitivní pigment u většiny mnohobuněčných živočichů s výjimkou hub^{4,5}. Opsiny jsou většinou na základě své sekvence děleny na čtyři skupiny: c-type opsiny (zahrnující i vizuální opsiny obratlovců), r-type opsiny (zahrnující vizuální opsiny bezobratlých), Cnidopsins (skupina skládající se ze žahavčích opsinů) a Group4 opsiny (obsahující různé převážně nevizuální opsiny)⁶⁻⁹. Ve struktuře opsinů bylo identifikováno několik důležitých znaků. Za prvé se opsiny liší od ostatních GPCR přítomností vysoce konzervovaného lyzinu (K) (v bovinním rhodopsinu se nachází na pozici 296) důležitého pro vazbu kofaktoru citlivého na světlo⁴. Tím je většinou 11-*cis* retinal. Dalším znakem opsinů je přítomnost negativně nabitě aminokyseliny, tzv. counterionu, důležité pro stabilizaci vazby mezi lyzinem a retinalem^{4,10}. Counterion je také důležitý pro posun citlivosti opsinu do oblastí viditelného světla. Opsiny s mutovaným counterionem mají totiž citlivost posunutou do UV oblastí¹¹. Ve většině opsinů se counterion nachází na pozici 181 (při srovnání se sekvencí bovinního rhodopsinu)^{4,9}. V opsinech obratlovců se counterion nachází na pozici 113, což má vliv na citlivost opsinu na světelnou stimulaci a jeho schopnost aktivovat downstream signalizační kaskádu.

Po stimulaci světlem opsiny aktivují downstream signalizační kaskádu, která začíná G_{α} podjednotkou trimerického G proteinu. Výstup signalizační kaskády se liší podle toho, jaký typ G_{α} podjednotky je aktivován. C-type opsiny obratlovců aktivují $G_{\alpha t}$ podjednotku (tzv. transducing), která vznikla z genu pro $G_{\alpha i}$ tandemovou duplikací v linii vedoucí k obratlovcům¹². Aktivace $G_{\alpha t}$ vede ke snížení hladiny vnitrobuněčného cGMP, uzavření CNG kanálů a hyperpolarizaci buňky¹³. R-type opsiny signalizují přes $G_{\alpha q}$, což vede ke zvýšení vnitrobuněčného Ca^{2+} , otevření kanálů citlivých na Ca^{2+} a k depolarizaci buňky¹³. Na základě studia bovinního rhodopsinu bylo zjištěno, že tři aminokyseliny, tzv. tripeptid, nacházející se v C terminální části opsinu jsou důležité pro vazbu mezi opsinem a danou G_{α} podjednotkou^{14,15}. Navíc bylo zjištěno, že tripeptid nejspíš hraje roli v tom, která G_{α} podjednotka bude opsinem aktivována⁸.

Velké množství studií se v minulosti zabývalo evolucí oka a přišlo s mnohými hypotézami o evolučním původu očí. Autoři těchto studií většinou diskutovali, jestli se oči vyvinuly vícekrát nezávisle na sobě, nebo jestli se oči objevily v evoluci jednou a různé druhy očí v živočišné říši vznikly změnou prapůvodních očí (shrnutí v Fernald¹⁶). V 90. letech 20. století bylo ukázáno,

že se na vývoji očí fylogeneticky vzdálených živočichů podílí stejné geny, jmenovitě *Pax* (hlavně *Pax6*), *Six*, *Eya*, *Dach* (patřící do skupiny tzv. Retinal Determination Gene Network genů)^{17,18}. Toto posílilo názor, že se oči vyvinuly pouze jednou u společného předchůdce. Později bylo identifikováno několik příkladů očí, na jejichž vývoji se nepodílí gen *Pax6*. V dnešní době je všeobecně přijímáno, že nelze rozhodnout, zda jsou oči monofyletického či polyfyletického původu, protože při porovnání vývoje různých očí lze pozorovat sdílení genů, konvergenci a paralelismus¹⁹.

Bezlebeční (někdy nazýváni kopinatci) jsou nejbazálněji se odštěpujícími zástupci strunatců. Bezlebeční zahrnují tři rody *Branchiostoma*, *Asymmetron* a *Epigonychthis*²⁰. Bezlebeční slouží díky své unikátní fylogenetické pozici, morfologii a fyziologii jako vynikající model pro studium znaků předka strunatců. Díky tomu jsou studie prováděné na kopinatci důležité pro porozumění evoluce znaků specifických pro obratlovce, jako například stavba těla, centrální nervová soustava nebo smyslové neurony.

Kopinatec má čtyři morfologicky odlišné světločivné orgány – přední oko a lamelární tělísko (oba tvořené ciliárními fotoreceptorovými buňkami); Josephovy buňky a dorzální očka (oba tvořené rhabdomerickými buňkami)²¹. Studie zabývající se světločivnými orgány kopinatce byly provedeny už na přelomu 20. století^{22,23}, následované podrobnými elektron-mikroskopickými analýzami světločivných orgánů kopinatce ve druhé polovině 20. století^{21,24-27}. Přes to zbývají velké mezery v porozumění kopinatčím reakcím na světlo.

Cílem této dizertační práce bylo rozšířit informace o detekci světla u kopinatce, hlavně o repertoáru opsinych genů v genomu kopinatce a také získání dat o vývoji předního oka kopinatce, předpokládaného homologu oka obratlovců. Tímto způsobem měly být získány informace o vnímání světla u hypotetického předka strunatců, potažmo o evoluci vnímání světla u obratlovců.

Jednotlivé cíle této práce byly:

- Charakterizace expresního genového profilu neuronů v předním oku kopinatce, s důrazem na geny důležité pro jeho vývoj a ustavení fototransdukční kaskády a dále detekce neurotransmiterů v jednotlivých neuronech předního oka.
- Optimalizace testu, založeného na buněčné linii, který by umožňoval studium funkce opsiny a jejich charakteristických strukturních vlastností.
- Charakterizace repertoáru opsiny u dvou druhů kopinatce, kopinatce floridského (*Branchiostoma floridae*) a kopinatce plžovitého (*Branchiostoma lanceolatum*).

Přehled metod

Práce s nukleovými kyselinami

Izolace genomové DNA

Klonování DNA fragmentů: pro přípravu plazmidů pro heterologní expresi peptidů; přípravu prób na RNA *in situ* hybridizaci; sekvenování opsinových genů; klonování celých opsinů pro biochemické analýzy

Izolace celkové RNA, příprava cDNA

Kvantitativní RT-PCR – SYBR green (Roche); detekce na LightCycler (Roche)

Příprava antisense prób pro RNA *in situ* hybridizaci

Práce s proteiny

Produkce a purifikace heterologních proteinů z bakterií BL21-(DE3)-RIPL

Příprava myších polyklonálních protilátek

SDS-PAGE a western blot

Práce se zvířaty

Izolace tkání z anestezovaných zvířat

Imunofluorescenční barvení celých larev kopinatce

Snímání konfokálním mikroskopem, zpracování obrázků a 3D rekonstrukce v softwaru FIJI

RNA *in situ* hybridizace na celých larvách kopinatce

Chemická manipulace vývoje kopinatčích embryí

Práce s buněčnými kulturami

Měření vnitrobuněčné hladiny cAMP pomocí GloSensor HEK buněčné linie (Promega)

Imunofluorescenční barvení buněk

Výsledky a diskuze

Tato dizertační práce a vědecké publikace, na kterých je založená, jsou zaměřeny na charakteristiku opsinů kopinatce a vývoj jeho vizuálního orgánu, tzv. předního oka. Získaná data jsou porovnána se známými informacemi o opsinech obratlovců a o vývoji očí obratlovců. Závěry této práce jsou zařazeny do kontextu možných scénářů evoluce očí obratlovců.

Expresní profil vyvíjejícího se předního oka kopinatce připomíná expresní profil sítnice obratlovců

Naše výsledky ukázaly, že stejný set genů je použit pro vývoj předního oka kopinatce i sítnice obratlovců. Přesněji řečeno, kopinatčí ortology *OTX*, *MITF* a *PAX2* (důležité pro vývoj retinového pigmentového epitelu (RPE) obratlovců) se podílí na vývoji pigmentových buněk předního oka kopinatce²⁸. Použitý pigment je melanin, stejně jako u RPE²⁸. Kopinatčí *Otx*, *Pax4/6*, *Six3/6* a pravděpodobně i *Rx* (ortolog proteinu *Rax* obratlovců) byly detekovány ve vyvíjejících se fotoreceptorech předního oka kopinatce a neurotransmitter jimi používaný je glutamát, stejně jako u sítnicových fotoreceptorů obratlovců^{28,29}. Navíc fototransdukční kaskáda, použitá ve fotoreceptorech předního oka kopinatce, připomíná tu používanou ve fotoreceptorech obratlovců, tím, že začíná aktivací $G_{\alpha i}$ a končí hyperpolarizací fotoreceptorové buňky^{12,28}. Fototransdukční kaskáda obratlovců se nicméně liší od hypotetické fototransdukční kaskády v kopinatci a je pravděpodobně evoluční novinkou, která umožnila zvýšení citlivosti fotoreceptorů obratlovců¹².

Nejasná je situace ohledně definování homologie mezi předpokládanými neurony důležitými pro vizuální projekce u kopinatce a interneurony u obratlovců. U kopinatce tzv. Row2 neurony, nacházející se přímo za fotoreceptorovými buňkami předního oka, jsou pozitivní na neurotransmitter serotonin^{28,30}. Specifické populace obratlovcích amakrinních buněk jsou také potivní na serotonin. Na druhé straně axony Row2 neuronů končí v hypotetickém vizuálně-procesivním centru²⁸, podobně jako u gangliových buněk obratlovců. Žádné další geny důležité pro vývoj interneuronů obratlovců nicméně nebyly detekovány ve vyvíjejících se Row2 buňkách kopinatce. Další hypotetické interneurony v předním oku kopinatce, Row3 a Row4 neurony, jsou *Pax4/6* a *Rx* pozitivní a jako neurotransmitter používají glutamát^{28,29}. Všechny tyto charakteristiky jsou podobné horizontálním nebo amakrinním buňkám v sítnici obratlovců. Všechna zmíněná expresní data jsou shrnuta v Obr.1 (Fig.1).

Elektron-mikroskopické (EM) studie v mozgovém váčku kopinatce, provedené v 90. letech 20. století hledaly projekce předního oka interneuronů³¹. Projekce Row4 buněk jsou kontralaterální podobně jako gangliové buňky v sítnici obratlovců, zatímco Row2 a Row3 buňky mají laterální projekce³¹. Důvod pro kontralaterální projekce v sítnici obratlovců je zlepšení prostorového vidění. Přední oko kopinatce je velmi jednoduché a je tvořené pouze cca 6-10 fotoreceptorovými buňkami seřazenými v jedné řadě²¹ a tím pádem není schopné podat prostorovou informaci. Ohledně vzhledu očí u předka strunatců byly podány dvě hypotézy. Oko u předka strunatců bylo buď podobné přednímu oka kopinatce, svou jednoduchou morfologií, nebo předek strunatců měl párové oči podobně jako u všech obratlovců a přední oko kopinatce je výsledkem zjednodušení v linii vedoucí ke kopinatcům³². Pokud je pravdivá první hypotéza, pak absence kontralaterálních projekcí v Row2 buňkách kopinatce, které jsou podle našich analýz nejpravděpodobnějšími interneurony podobnými

gangliovým buňkám obratlovců, může být ancestrální pro všechny strunatce. Pokud je pravdivá druhá hypotéza, pak laterální projekce Row2 neuronů mohou být způsobené ztrátou schopnosti předního oka poskytovat prostorovou informaci, nebo interneurony funkčně podobné gangliovým buňkám obratlovců jsou u kopinatce Row3 a/nebo Row4 buňky.

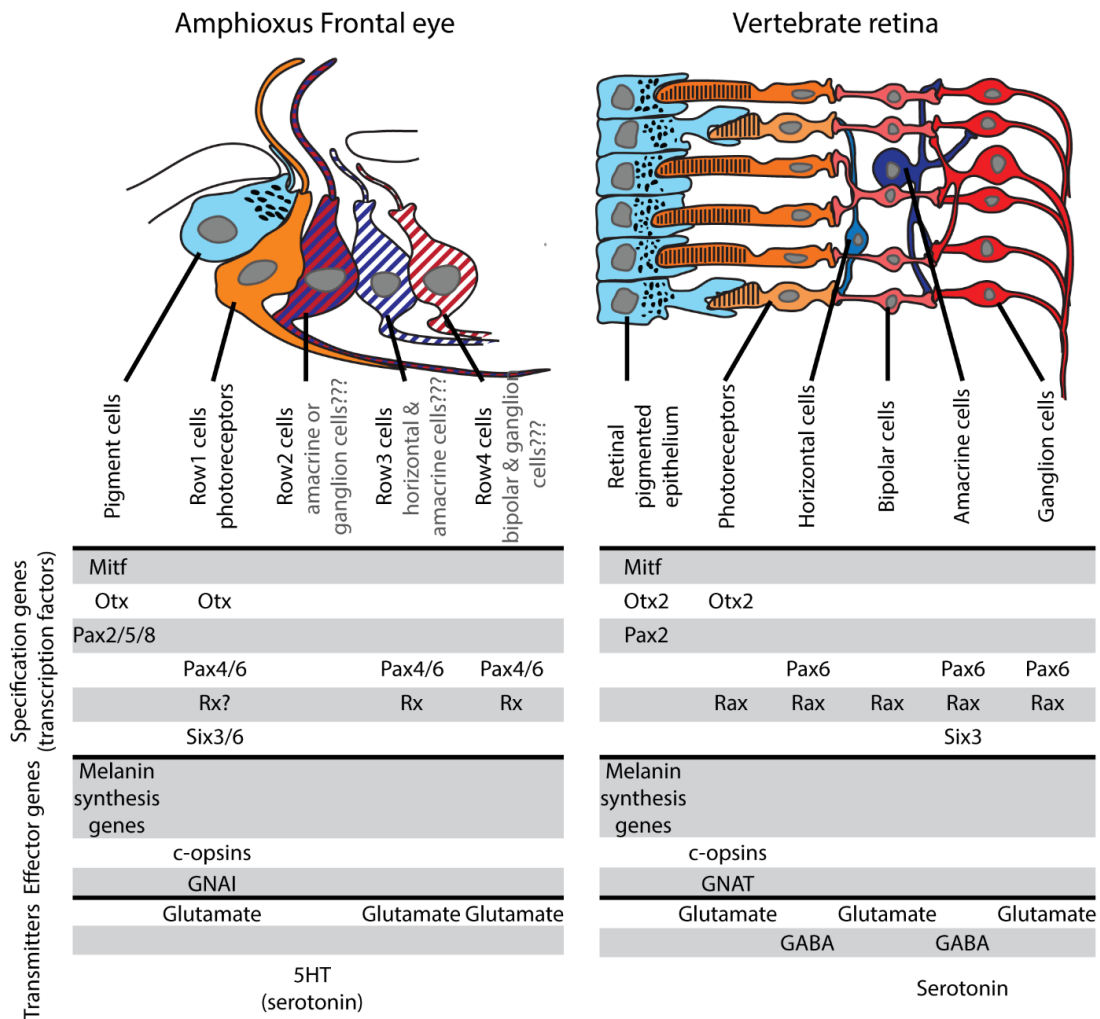


Fig.1 Schématické srovnání expresního profilu předního oka kopinatce a sítnice obratlovců (upraveno z Pergner and Kozmik²⁹)

Zobrazeny jsou předpokládané homologie mezi jednotlivými buněčnými typy. Z genů důležitých pro vývoj sítnice jsou zobrazeny pouze homeoboxové transkripční faktory (jedinou výjimkou je Mitf, člen rodiny helix-loop-helix transkripčních faktorů). Expresní data pro jiné než homeoboxové transkripční faktory u předního oka kopinatce totiž chybí v literatuře. Pro předpokládanou homologii mezi navrženými interneurony kopinatce a interneurony obratlovců, byly vzaty v úvahu i výsledky EM analýz projekcí neuronů z předního oka kopinatce. Data pro expresi genů kopinatce byla převzata z Kozmik, et al.³³, Kozmik, et al.³⁴ a Vopalensky, et al.²⁸. EM data byla převzata z Lacalli³¹. Data o expresním profilu neuronů v sítnicových buňkách obratlovců byla převzata z Bassett and Wallace³⁵, Kolb³⁶ and Swaroop, et al.³⁷. GNAI a GNAT je alternativní označení pro $G_{\alpha i}$ a $G_{\alpha t}$.

Celkově vzato naše analýzy ukázaly, že vývoj a fyziologie předního oka kopinatce a sítnice obratlovců jsou založeny na podobné logice. To znamená, že nezávisle na tom, jak oči předka strunatců vypadaly, vývoj očí u všech strunatců je pravděpodobně založen na stejném stavebním plánu. Co nyní zbývá vyřešit je charakter vizuálních projekcí u kopinatce a jeho podobnost a rozdíly s vizuálními projekcemi u obratlovců.

Opsiny kopinatce – základní kameny pro vznik specifických znaků obratlovčích opsinů

Podařilo se nám identifikovat a popsat 21 opsinových genů a jeden předpokládaný pseudogen v genomu *Branchiostoma lanceolatum*³⁸. Opravili jsme některé z 20 dříve špatně anotovaných opsinových genů a našli jeden nový opsinový gen v genomu *Branchiostoma floridae*³⁹. Naše fylogenetická analýza ukázala, že v genomu obou druhů kopinatců jsou zastoupeny opsiny patřící k c-type, r-type a Group4 opsinům. Navíc jsme zdokumentovali expanzi dvou opsinových podrodin – Go a podrodiny specifické pro kopinatce, tzv. “Amphiop6” skupiny. Na základě naší důkladné bioinformatické analýzy jsme přišli s hypotézou o roli transpozibilních elementů, nacházejících se v blízkosti těchto opsinových genů v jejich evoluci ve třech druzích kopinatců – *B. lanceolatum*, *B. floridae* a *Branchiostoma belcheri*³⁹.

Provedli jsme expresní analýzu všech nalezených opsinových genů pomocí qRT-PCR v různých vývojových stádiích a tkáních dospělé kopinatce u *B. lanceolatum* a *B. floridae*. Navíc jsme provedli RNA *in situ* hybridizaci (ISH) pro tři opsinové geny u *B. lanceolatum*. Naše expresní analýzy ukázaly redundanci i specifitu v časovém (různá vývojová stadia) i místním (různé tkáně dospělce kopinatce) využití opsinových genů u obou kopinatčích druhů. Také jsme odhalili různorodost v použití opsinových genů z obou zmíněných rozšířených opsinových podrodin – Go a Amphiop6.

Zaměřili jsme se také na popsání známých strukturních a funkčních znaků opsinů, zejména counterionů a sekvencí tripeptidů. Objevili jsme opsiny s negativně nabitými aminokyselinami (glutamát nebo aspartát) na pozici 113, kde byla doposud funkčně charakterizována přítomnost counterionu pouze u obratlovců a nedávno i u jednoho opsinu pláštěnců⁴⁰. Counterion na pozici 113 se zdá být důležitý pro vyšší citlivost a snížený čas obnovy funkce u obratlovčích opsinů a je považován za evoluční novinku specifickou pro obratlovce¹¹. Kopinatčí opsiny vykazují velkou variabilitu v sekvenci tripeptidu, včetně tripeptidu NKQ (typický tripeptid pro obratlovčí c-type opsiny) nalezeného v kopinatčím c-type opsinu a HPK tripeptid v kopinatčím melanopsinu (typický tripeptid pro r-type opsiny).

V našich článcích jsme popsali repertoár opsinových genů u dvou druhů kopinatce. Předložili jsme hypotézu o mechanismu rozšíření dvou opsinových podrodin u třech druhů kopinatce. Navíc jsme ukázali, že několik opsinů z kopinatce vykazuje charakteristiku typickou pro obratlovčí opsiny, hlavně přítomnost negativně nabitých aminokyselin na pozici 113. Jestli tyto aminokyseliny slouží jako counterion u kopinatčích opsinů musí být prozkoumáno. Pro tento výzkum bychom chtěli použít upravený test pro studium vazby mezi Gα podjednotkou a opsinem, založený na speciální buněčné linii, který jsme použili v naší studii o opsiněch v medúze *Tripedalia cystophora*. Očekáváme, že výsledky našich studií budou pilíři pro další studie, zabývající se evolucí specifických úprav opsinů u obratlovců.

Závěr

Tato dizertační práce podává informace o vnímání světla u kopinatce. Zejména se zabývá repertoárem opsinových genů v genomu dvou druhů kopinatce, *B. floridae* a *B. lanceolatum*. Navíc byl popsán genový expresní profil vyvíjejícího se předního oka kopinatce. Výsledky dizertační práce lze shrnout do několika bodů:

- Ukázali jsme, že ortology genů, důležitých pro vývoj fotoreceptorů a retinového pigmentového epitelu v oku obratlovců, jsou důležité i pro vývoj fotoreceptorů a pigmentových buněk předního oka kopinatce. Zajímavé bylo zjištění, že fototransdukční kaskáda v předním oku kopinatce je podobná, ale ne stejná jako ta, která je použita ve fotoreceptorech v sítnici obratlovců. Obratlovčí fototransdukční kaskáda je pravděpodobně specifický znak, který byl důležitý pro zvýšení citlivosti obratlovčích vizuálních fotoreceptorů. Naše data podpořila dříve předpovězenou homologii mezi kopinatčím vizuálním orgánem, předním okem, a obratlovčím okem, a podala také vodítka k nahlížení na evoluci specifické obratlovčí fototransdukční kaskády.
- Zdokumentovali jsme výhody použití protilátek připravených v laboratoři specificky proti proteinům z nemodelového organismu v evo-devo studiích. Očekáváme, že podobný přístup bude použit ve více laboratořích a umožní rozšíření spektra metod použitelných při studiích těchto nemodelových organismů. Kromě expresních studií tak bude možné provést např. chromatinovou immunoprecipitaci.
- Opublikovali jsme repertoár opsinových genů ve dvou druzích kopinatců *B. floridae* a *B. lanceolatum*. Provedli jsme analýzu exprese u všech nalezených kopinatčích opsinů pomocí qRT-PCR v různých vývojových stádiích a tkáních dospělého kopinatce. Naše expresní analýza ukázala, že některé opsinové geny vykazují vysoce specifickou expresi v místě a/nebo čase, zatímco jiné opsinové geny jsou exprimované ve více různých tkáních. Navíc jsme zdokumentovali expresi tří opsinových genů pomocí RNA *in situ* hybridizace. Odhalili jsme dva opsiny se zajímavým expresním profilem – oba byly exprimovány v ocase a oblasti okolo úst, čili ve tkáních, kde se nenachází světločivné orgány. Odhalili jsme několik opsinů, které mají sekvenční charakteristiku podobnou opsinům obratlovců. Naše studie poskytly řadu výsledků, které mohou být v budoucnosti odrazovým můstkem pro další studie.
- Zavedli jsme test pro vazbu mezi opsinem a $G_{\alpha s}$ podjednotkou trimerického G protein, založený na speciální buněčné linii. Objevili jsme dva opsiny z medúzy *Tripedalia cystophora*, které signalizují přes $G_{\alpha s}$ -cAMP signální kaskádu. Poprvé jsme zdokumentovali využití této nestandardní kaskády ve vizuálně řízeném chování. Náš test může být upraven pro zjištění vazby mezi opsinem a jinou G_{α} podjednotkou a může být proto použit v dalších studiích vlastností opsinů. Výhody našeho testu jsme ukázali při charakterizaci důležitých funkčních vlastností opsinů z *T. cystophora* např. tripeptidu, counterionu, nebo vysoce konzervovaného lyzinu.

List of references/Seznam použité literatury

- 1 Parker, A. in *Encyclopedia of perception* Vol. 1 (ed E. Bruce Goldstein) 440-441 (SAGE publications, 2010).
- 2 Arendt, D. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *The International journal of developmental biology* **47**, 563-571 (2003).
- 3 Fain, G. L., Hardie, R. & Laughlin, S. B. Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Current biology : CB* **20**, R114-124, doi:10.1016/j.cub.2009.12.006 (2010).
- 4 Terakita, A. The opsins. *Genome biology* **6**, 213, doi:10.1186/gb-2005-6-3-213 (2005).
- 5 Feuda, R., Rota-Stabelli, O., Oakley, T. H. & Pisani, D. The comb jelly opsins and the origins of animal phototransduction. *Genome biology and evolution* **6**, 1964-1971, doi:10.1093/gbe/evu154 (2014).
- 6 Liegertova, M. *et al.* Cubozoan genome illuminates functional diversification of opsins and photoreceptor evolution. *Scientific reports* **5**, 11885, doi:10.1038/srep11885 (2015).
- 7 Plachetzki, D. C., Fong, C. R. & Oakley, T. H. The evolution of phototransduction from an ancestral cyclic nucleotide gated pathway. *Proceedings. Biological sciences* **277**, 1963-1969, doi:10.1098/rspb.2009.1797 (2010).
- 8 Plachetzki, D. C., Degnan, B. M. & Oakley, T. H. The origins of novel protein interactions during animal opsin evolution. *PloS one* **2**, e1054, doi:10.1371/journal.pone.0001054 (2007).
- 9 Porter, M. L. *et al.* Shedding new light on opsin evolution. *Proceedings. Biological sciences* **279**, 3-14, doi:10.1098/rspb.2011.1819 (2012).
- 10 Sakmar, T. P., Franke, R. R. & Khorana, H. G. Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 8309-8313 (1989).
- 11 Terakita, A. *et al.* Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. *Nature structural & molecular biology* **11**, 284-289, doi:10.1038/nsmb731 (2004).
- 12 Lamb, T. D. & Hunt, D. M. Evolution of the vertebrate phototransduction cascade activation steps. *Developmental biology*, doi:10.1016/j.ydbio.2017.03.018 (2017).
- 13 Fernald, R. D. Casting a genetic light on the evolution of eyes. *Science* **313**, 1914-1918, doi:10.1126/science.1127889 (2006).
- 14 Ernst, O. P. *et al.* Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1937-1943 (2000).
- 15 Marin, E. P. *et al.* The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1930-1936 (2000).
- 16 Fernald, R. D. The evolution of eyes. *Brain, behavior and evolution* **50**, 253-259 (1997).
- 17 Gehring, W. J. & Ikeo, K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends in genetics : TIG* **15**, 371-377 (1999).
- 18 Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W. J. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* **265**, 785-789 (1994).
- 19 Piatigorsky, J. A Genetic Perspective on Eye Evolution: Gene Sharing, Convergence and Parallelism. *Evolution: Education and Outreach* **1**, 403-414.
- 20 Bertrand, S. & Escriva, H. Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development* **138**, 4819-4830, doi:10.1242/dev.066720 (2011).
- 21 Lacalli, T. C., Holland, N. D. & West, J. E. Landmarks in the Anterior Central Nervous System of Amphioxus Larvae. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **344**, 165-185 (1994).
- 22 Hesse, R. Untersuchungen über die Organe der Lichtempfindung bei niederen Thieren. IV. Die sehorgane des Amphioxus. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 456-464 (1898).
- 23 Parker, G. H. The Sensory Reactions of Amphioxus. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* **43**, 415-455 (1908).

- 24 Nakao, T. On the Fine Structure of the Amphioxus Photoreceptor. *The Tohoku journal of experimental medicine* **82**, 349-363 (1964).
- 25 Ruiz, S. & Anadon, R. The fine structure of lamellate cells in the brain of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*, Cephalochordata). *Cell and tissue research* **263**, 597-600 (1991).
- 26 Ruiz, M. S. & Anadon, R. Some considerations on the fine structure of rhabdomic photoreceptors in the amphioxus, *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata). *Journal fur Hirnforschung* **32**, 159-164 (1991).
- 27 Meves, A. Elektronmikroskopische Untersuchungen über die Zytoarchitektur des Gehirns von *Branchiostoma lanceolatum*. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **139**, 511-532 (1973).
- 28 Vopalensky, P. *et al.* Molecular analysis of the amphioxus frontal eye unravels the evolutionary origin of the retina and pigment cells of the vertebrate eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 15383-15388, doi:10.1073/pnas.1207580109 (2012).
- 29 Pergner, J. & Kozmik, Z. Amphioxus photoreceptors - insights into the evolution of vertebrate opsins, vision and circadian rhythmicity. *The International journal of developmental biology*, 665-681, doi:doi: 10.1387/ijdb.170230zk (2017).
- 30 Candiani, S., Moronti, L., Ramoino, P., Schubert, M. & Pestarino, M. A neurochemical map of the developing amphioxus nervous system. *BMC neuroscience* **13**, 59, doi:10.1186/1471-2202-13-59 (2012).
- 31 Lacalli, T. C. Frontal eye circuitry, rostral sensory pathways and brain organization in amphioxus larvae: evidence from 3D reconstructions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **351**, 243-263 (1996).
- 32 Lacalli, T. C. Looking into eye evolution: amphioxus points the way. *Pigment Cell & Melanoma Research* **26**, doi:10.1111/pcmr.12057 (2012).
- 33 Kozmik, Z. *et al.* Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region. *Development* **126**, 1295-1304 (1999).
- 34 Kozmik, Z. *et al.* Pax-Six-Eya-Dach network during amphioxus development: conservation in vitro but context specificity in vivo. *Developmental biology* **306**, 143-159, doi:10.1016/j.ydbio.2007.03.009 (2007).
- 35 Bassett, E. A. & Wallace, V. A. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends in neurosciences* **35**, 565-573, doi:10.1016/j.tins.2012.05.004 (2012).
- 36 Kolb, H. Neurotransmitters in the Retina by Helga Kolb. *Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Available from: <http://webvision.med.utah.edu/book/part-iv-neurotransmitters-in-the-retina-2/part-iv-neurotransmitters-in-the-retina/> (updated 2011). (2011).*
- 37 Swaroop, A., Kim, D. & Forrest, D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 563-576, doi:10.1038/nrn2880 (2010).
- 38 Pantzartzi, C. P., Pergner, J., Kozmikova, I. & Kozmik, Z. The opsin repertoire of the European lancelet: a window into light detection in a basal chordate. *The International journal of developmental biology*, 763-772, doi:10.1387/ijdb.170139zk (2017).
- 39 Pantzartzi, C. N., Pergner, J. & Kozmik, Z. The role of transposable elements in functional evolution of amphioxus genome: the case of opsin gene family. *Sci Rep (in revisions)* (2018).
- 40 Kojima, K. *et al.* Evolutionary steps involving counterion displacement in a tunicate opsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 6028-6033, doi:10.1073/pnas.1701088114 (2017).

Curriculum Vitae (in English)

Name: Jiří Pergner

Date of birth: 26th March 1986

e-mail: jiri.pergner@img.cas.cz

Education

9/2010 – present: PhD. student in Biomedicine, Faculty of Sciences, Charles University in Prague and Institute of Molecular Genetics AS CR

10/2008 – 9/2010: Master studies, Faculty of Sciences, Charles University in Prague
Molecular biology, genetics and virology

10/2005 – 9/2008: Bachelor studies, Faculty of Sciences, Charles University in Prague
Molecular biology and biochemistry of organisms

Work experience

9/2010 – present: PhD. student at Department of Transcriptional regulation IMG AS CR

10/2006 – 8/2010: researcher as Bachelor and Master student in the Laboratory of Virology, Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University in Prague

Teaching experience

12/2012 – presentation at the Seminar of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Ostrava

2013 – present – 50% participation at lecture of Developmental biology and genetics at Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Ostrava

2014 – presentation at the Seminar of Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Sciences, Charles University in Prague

Conference attendance

6/2013 – Presentation at PhD. conference at IMG AS CR

7/2012 – 4th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology

9/2014 – Meeting of the Genetic Society of Gregor Mendel – oral presentation and poster

9/2014 – Genes, Epigenetics and Evolution in Eye Development and Disease – oral presentation and poster

5/2016 – conference of the Genetic Society of Gregor Mendel dedicated to system of PhD studies at Czech and Slovak Universities – oral presentation

7/2016 – 6th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology - poster

Curriculum Vitae (česky)

Jméno: Jiří Pergner
Datum narození: 26. březen 1986
e-mail: jiri.pergner@img.cas.cz

Vzdělání

9/2010 – současnost: PhD. student oboru Biomedicína, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Ústav molekulární genetiky AV ČR

10/2008 – 9/2010: Magisterské studium, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze Molekulární biologie, genetiky a virologie

10/2005 – 9/2008: Bakalářské studium, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze Molekulární biologie a biochemie organismů

Pracovní zkušenosti

9/2010 – současnost: PhD. student na Oddělení transkripční regulace, ÚMG AV ČR

10/2006 – 8/2010: výzkumný pracovník (bakalářský a magisterský student) v Laboratoři virologie, Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Výuka

12/2012 – přednáška na Seminári Katedry biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská Univerzita

2013 – současnost – 50% spoluúčast na přednáškách k předmětu Vývojová biologie a genetiky na Katedře biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská Univerzita

2014 – přednáška na Seminári Katedry genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita v Praze

Účast na konferencích

6/2013 – přednáška na PhD. konferenci ÚMG AV ČR

7/2012 – 4th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology

9/2014 – Genetická konference Genetické společnosti Gregora Mendela – ústní prezentace a plakát

9/2014 – Genes, Epigenetics and Evolution in Eye Development and Disease – ústní prezentace a plakát

5/2016 – konference Genetické společnosti Gregora Mendela věnovaná PhD. studiu na českých a slovenských univerzitách – ústní prezentace

7/2016 – 6th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology – plakát

List of publications/ Seznam publikací

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. Epub 2012 Sep 4.
IF = 9.661 (WOS 2016)

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.
* Equal contribution
IF = 4.259 (WOS 2016)

Amphioxus photoreceptors - insights into evolution of vertebrate opsins, vision and circadian rhythmicity. (review)

Pergner J, Kozmik Z
International Journal of Developmental Biology 2017;61(10-11-12):665-681.
IF = 1.981 (WOS 2016)

The opsin repertoire of the European lancelet: a window into light detection in a basal chordate.

Pantartzzi CN*, Pergner J*, Kozmikova I, Kozmik Z
International Journal of Developmental Biology 2017;61(10-11-12):763-772.
* Equal contribution
IF = 1.981 (WOS 2016)

Polyclonal antibodies as a useful tool for expression studies in amphioxus embryos

Bozzo M, Pergner J, Kozmikova I, Kozmik Z
International Journal of Developmental Biology 2017; 61(10-11-12):793-800.
IF = 1.981 (WOS 2016)

The role of transposable elements in functional evolution of amphioxus genome: the case of opsin gene family

Pantartzzi CN, Pergner J, Kozmik Z
Scientific reports (in revisions)
IF = 4.259 (WOS 2016)

Popularization of Science/Popularizace vědy

2014 – TV show for children Lovci záhad topic Eye / TV pořad pro děti “Lovci záhad” téma Oko
vystoupení na téma oči u různých druhů živočichů

2016 – publication Life without head (publication in Czech)/ publikace Život bez hlavy (česky)

Jiří Pergner, Vladimír Soukup

– popularizační článek pro speciální online číslo časopisu Vesmír nazvané “Hlava”