

Posudek na dizertační práci Mgr. Jiřího Pergnera s názvem Evoluce vnímání světla u strunatců:

Dizertační práce Jiřího Pergnera působí uceleným a kompaktním dojmem a její čtení mi bylo zejména potěšením z vědeckého poznání.

Výsledky práce sestávají z pěti publikovaných a jednoho submitovaného rukopisu, z nichž Jiří Pergner je prvním autorem na čtyřech pracích, ve třech případech sdílený s dalším prvním autorem. Jedním z prvoautorských výstupů je také review na téma fotoreceptorů u kopinatce, které zároveň obsahuje vlastní data. Autorství takovéto přehledové řeserše (review) obvykle řadí autory mezi skutečné specialisty v oboru a bývá známkou dostatečné vědecké erudice v daném oboru. Tři z článků byly dále publikovány ve speciálním čísle časopisu *International Journal of Developmental Biology*, věnovanému kopinatci jakožto modelovému druhu, a dopad těchto článků na daný obor tak bude o to cílenější.

Stručný ale výstižný úvod k práci pak vystihuje hlavní zaměření dizertační práce, a to tedy využití kopinatce jakožto modelu pro porozumění evoluce strunatců (Chordata) a hlavně obratlovců (Vertebrata), pro něž slouží jako komparativní sesterská linie (spolu s pláštěnci).

Ráda bych dále vyzdvihla, že Jiří Pergner dokázal ve svém výzkumu využít celé řady molekulárně genetických (DNA, RNA i proteinová úroveň), zobrazovacích (specifická barvení, konfokální mikroskopie) i experimentálních (manipulace s embryi) metod a vědeckých nástrojů, a tím podpořit své vědecké závěry z více úhlů pohledu.

Konečně oceňuji také celkové vyznění dizertační práce včetně nastíněním toho, co stále ještě není známo (např. kompletní fototransdukční kaskáda u kopinatce) a kam by se tedy mohl následný výzkum v oboru dále ubírat.

Čtyři originální publikace a jedno review byly publikovány v recenzovaných časopisech (jeden článek dokonce v prestižním časopise PNAS) a nebudu se k nim tedy příliš vyjadřovat, jelikož prošly podrobným oponentským řízením odborníků v oboru. Moje připomínky a dotazy budou tedy směřovat k celkovému pojetí problematiky a dále pak k nepublikovanému manuskriptu o roli transpozónů v regulaci a evoluci genové exprese.

Než přejdu ke konkrétním dotazům ráda bych závěrem uvedla, že dizertační práci Jiřího Pergnera hodnotím velmi pozitivně a těším se na hodnotnou vědeckou rozpravu při její obhajobě.

Dotazy k dizertační práci:

1) Jaká je kvalita publikovaných genomů tří druhů kopinatců? Ve submitovaném rukopise popisujete celou řadu nástrojů pro kontrolu opsinových genů, všechny však pracují s poskytnutým assemblovaným genomem. Jak moc jste si jisti bezchybností genomového assembly pro opsinové geny? Nemohlo se stát, že některý duplikovaný opsinový gen mohl teoreticky uniknout vaší pozornosti, zejména pokud by šlo o relativně nedávnou duplikaci?

2) Studium genové exprese je založeno na metodě qPCR, pro niž byly navrženy primery na základě poměrně zdlouhavého klonování a následné sekvenace cDNA. Existuje nějaký důvod (kromě finančního?), proč jste raději neosekvenovali referenční transkriptom, alespoň u jednoho jedince na stádium? Určení

palety opsinových genů z transkriptomu by bylo jistě přesnější a bez rizika přehlédnutí některé z kopií genů.

3) V úvodu práce je stručně diskutováno funkce jednotlivých opsinových genů. Ve výzkumu zraku obratlovců je celkem podrobně prozkoumán efekt záměny jednotlivých aminokyselin v opsinových proteinech na změnu citlivosti fotoreceptorových buněk. Existují nějaké studie zabývající se detailněji například konkrétní citlivostí zrakových opsinů (zejména c-opsinů) na různé složky světelného spektra u kopinatce?

4) Jaká je celková variabilita v jednotlivých opsinových genech, například mezi pěti c-opsiny? Zdá se, že čtyři z kopinatčích c-opsinů jsou specifické duplikace pro linii kopinatce. Jaký byl úspěch ve tvorbě specifické protilátky, tak, aby se vážala skutečně specificky na zvolený gen a nikoliv na ostatní duplikované geny? Existuje nějaká (vaše) experimentální hranice, například minimální počet rozdílných aminokyselin, nutná pro tuto specifitu?

5) Z výsledku studie genové exprese (v rukopise o TE) je patrné postupné zapínání a vypínání jednotlivých c-opsinových genů v průběhu ontogeneze, kdy se všech pět genů postupně "vystřídá" v expresi. Podobný jev byl pozorován i u obratlovců a popsán detailněji například u ryb (tilápie). Máte nějakou představu o funkci tohoto jevu u kopinatce? Nebo myslíte, že spíše půjde o expresi jednotlivých c-opsinů v různých částech těla kopinatce? K tomu dotazu mě také přivedl obrázek Supp. Fig. 3 (rukopis), kde mi není jasné, jaké tkáně byly vlastně použity ke studiu exprese opsinových genů. Předpokládám, že embryonální a larvální stádia byla využita celá, ale nevím, která část byla zkoumána z dospělého jedince? Šlo skutečně o celého jedince, nebo bylo nějakým způsobem rozlišeno mezi jednotlivými zrakovými ústrojími (a fotocitlivým ocasem) tak jak tomu je např. v předchozí práci Pantzartz a spol.? U některých obratlovců bylo také dále dokázáno, že exprese c-opsinů může být detekována i v jiných tkáních, např. v kůži. Toto by mohlo také zkreslit expresní profil založený na celém jedinci.

6) V práci zazní i věta, že provádět knock-out přístup na kopinatcích je složité. Je to skutečně pravda i v době dnešních CRISPR technologií, a pokud ano tak proč?

7) Můj poslední obecný dotaz je částečně filozofické povahy. S nástupem moderních evo-devo přístupů byly objeveny četné tzv. "hluboké homologie", když se ukázalo, že některé geny či genové sítě jsou stejné či podobné i pro zdánlivě nehomologní struktury evolučně velmi vzdálených organismů (nejznámější jistě je případ oka či končetin obratlovců a hmyzu...). I přesto však tyto struktury za homologní nepovažujeme. Jaký typ důkazu je tedy obecně vyžadován, aby byly struktury považovány za homologní, tak jak je například nastíněno pro případ pigmentových buněk kopinatce a RPE obratlovců, nebo fotoreceptorů (row1) kopinatce a tyčinek/čípků obratlovců?

Drobný dotaz: V Supp. Fig.1 v rukopise chybí legenda ohledně barevného zvýraznění jednotlivých větví ve stromu.

S pozdravem,



Mgr. Zuzana Musilová, Ph.D.

zuzana.musilova@natur.cuni.cz, or zuzmus@gmail.com, tel: +420 221 951 856 or +420 777 885 630

Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, CZ-128 44 Prague, Czech Republic