

Oponentský posudek dizertační práce

Ing. Simona Mikula Mrštáková:

Medaka as an alternative model organism in the study of transcriptional regulation

Vedoucí práce: RNDr. Zbyněk Kozmik, Csc.

Oponent: RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Simona Mikula Mrštáková předložila dizertační práci, která je podložena dvěma publikacemi. První práce, u které je Simona prvním autorem, byla zveřejněna v časopise *Frontiers in Cell and Developmental Biology* v roce 2024. Druhá, spoluautorská, byla publikována v časopise *Development Genes and Evolution* v roce 2018. Dále dizertační práce zahrnuje ještě nepublikované výsledky popisující identifikaci enhanceru IrisE, který je vysoce evolučně konzervovaný od žraloků po savce. Simona se v této části projektu podílela na analýze meizdruhové tkáňové specifity enhanceru IrisE v medace a v zebříčce včetně generování transgenních rybích linií. Celkově je dizertační práce značně rozsáhlá (139 stran) a poskytuje fundovanou obhajobu rybiho modelu Medaka (*Oryzias latipes*) v evoluční vývojové biologii. Práce je psaná čtivým a srozumitelným anglickým jazykem, literární úvod do problematiky je podrobný a dobře zpracovaný. Dále práce obsahuje všechny požadované části jak cíle práce, výsledky, diskuse k jednotlivým projektům a závěr.

Jelikož ztřežejní částí dizertační práce je prvoautorský článek publikovaný v *Frontiers Cell Dev. Biol.*, zaměřím se převážně na tyto výsledky. Simona vytvořila mutantní linie paralogů genu Pax6.1, Pax6.2 a Pax6.3 v medace a analyzovala fenotypové změny se zaměřením na vývoj oka. Ukázalo se, že knockout mutace v Pax6.1 měla za následek narušení vývoje čočky, kdežto mutace v Pax6.2 a Pax6.3 neměly vliv. U Pax6.2 je tento výsledek očekávaný, protože Pax6.2 u medaky ztratil důležitou Paired doménu. Přestože Pax6.3 je sekvenčně velmi podobný Pax6.1 a je také v oku částečně exprimovaný, jeho delece nehraje roli a dokonce se fenotyp dvojitých knockoutů Pax6.1 a Pax6.3 neliší od fenotypu samostatného mutantu Pax6.1. Dále je zajímavé, že počáteční formování retiny nebylo narušeno ani u Pax6.1 mutantů, teprve v pozdějších stádiích se projeví rozdíly například v ganglionové vrstvě. To ukazuje na rozdílné mechanismy regulace vývoje například ve srovnání s myší. Dizertace obsahuje velké množství experimentů, které jsou shrnuty v 61 obrázcích, což je nebyvalé množství. Přestože kvalita a design experimentů, i prezentace obrázků, jsou na vysoké úrovni a zároveň rozdíly ve funkci genů Pax6 u medaky, zebříčky a myši jsou evidentní, je problematika málo diskutovaná, v mnoha případech vůbec. Sekce diskuse v podstatě jen znovu shrnuje současné poznání, opakuje literární přehled a opakuje výsledky dizertační práce. Navíc diskuse k části Pax6

obsahuje výsledky včetně obrázků 50 a 51 popisující analýzu enhanceru EE v medace. Tato část podle mého názoru patří do výsledkové části. A ještě malá poznámka. Obrázek 48 ukazuje analýzu buněčných markerů retiny v dvojitém mutantu Pax6.1/6.3, ale kontrolní vzorky WT chybí.

Jelikož diskuse je v dizertační práci značně ochuzená, rád bych ji obohatil následnými otázkami během obhajoby.

1. Popisujete expresi genů Pax6.1, Pax6.2 a Pax6.3 v oku medaky v různých stádiích vývoje pomocí ISH. Jelikož jsou si tyto geny sekvenčně podobné, jak jste zajistili specifitu navržených RNA sond, abyste předešli případné křížové reakci, jinými slovy, že např. sonda Pax6.1 detekuje jen Pax6.1 a ne další transkripty?
2. Jak si vysvětlujete, že Pax6.3 není schopen kompenzovat ztrátu Pax6.1 v oku medaky?
3. Proč je funkce Pax6 rozdílná u medaky, zebřičky a myši? Zpochybňují vaše výsledky obecně přijímaný pohled na Pax6 jako ‚eye master gene‘? Máte představu, který gen může mít v retině medaky podobnou funkci jako Pax6?
4. Enhancer SIMO u medaky není a vaše analýza funkce enhanceru EE pomocí jeho vyřazení ukazuje, že EE je nadbytečný, či možná hraje jen roli shadow enhanceru u medaky. Máte představu, který enhancer řídí expresi Pax6.1 v oku medaky? A řídí opravdu enhancer EE expresi Pax6.1?
5. Otázka k enhanceru IrisE, který kontroluje expresi Pax6 v duhovce. Duhovka vzniká jen z části retiny, t.j. z RPE a CMZ, a také z periokulárního mezenchymu. Uvádíte, že IrisE je sekvenčně konzervovaný od žraloka po savce. Vaše reportérové experimenty s enhancerem IrisE z myši, žraloka, Danio či kostlína ukazují, že IrisE řídí expresi v celé retině, spíše dokonce v její vnitřní části, než v RPE a CMZ. Jedná se tedy o obecný enhancer retiny nebo lze opravdu mluvit o duhovce? Dále je zajímavé, že delece IrisE v zebřičce nehraje roli ve vývoji celé retiny. Narazili jste tedy na další shadow enhancer?

I přes uvedené poznámky lze konstatovat, že dizertační práce je kvalitní a splňuje kritéria pro udělení titulu PhD. Doporučuji k přijetí.

V Praze, 8.ledna 2025

Ondřej Machoň

