

**Oponentský posudok na dizertačnú prácu**  
**RNDr. Štěpánky Hrdej: „Evoluce jaderných a plastidových genomů u euglenidů“**  
Študijný odbor: Parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy  
Školitel: doc. Vladimír Hampl, PhD.

Zvolená téma práce predstavuje významný príspevok do aktuálnej a zaujímavej oblasti výskumu evolúcie jadrových a plastidových genomov euglenidov. Je napísaná dobre čitateľným, zrozumiteľným spôsobom, pútavo a informatívne. Práca sumarizuje najnovšie poznatky o endosymbiotickom pôvode organel eukaryotických buniek – mitochondrií a chloroplastov s akcentom na tzv. komplexné, sekundárne chloroplasty euglenofýt. Tri pôvodné práce prinášajú nové, originálne poznatky o (i) genóme plastidov *Eutreptiella gymnastica*, (ii) mitochondriálnom genóme *Pyramimonas parkeae* a (iii) celkovom genóme a transkriptóme *Rhodomonas costata*. Prílohou je taktiež kapitola (iv) „Secondary plastids of Euglenophytes“ z knihy „Secondary Endosymbioses“. Významnou súčasťou všetkých prác je porovnávanie so situáciou u modelového bičíkovca *Euglena gracilis*. Doktorandka prispela k zadanej príprave týchto článkov hlavne na poli anotácie genómov a proteómov. V samotnej Dizertačnej práci sa venuje aj detailnejšej interpretácii získaných poznatkov z hľadiska fylogonézy a evolúcie.

Výsledky sú originálne a vyvodené závery sú diskutované v kontexte dostupných poznatkov z tejto problematiky. Načrtnutý je aj prínos pôvodných zistení autorky pre ďalší rozvoj vednej disciplíny.

Z formálneho hľadiska Dizertačná práca predstavuje kompiláciu štyroch vedeckých pojednaní, ktoré boli publikované v prestížnych medzinárodných časopisoch (resp. ako kapitola v knihe; okrem jedného rukopisu, ktorý zatiaľ nebol uverejnený). Rukopisy prešli pred uverejnením náročnou oponentúrou od expertov na predmetnú problematiku, takže by bolo nenáležité relativizovať, či kritizovať prezentované výsledky a ich interpretáciu. Dizertačná práca je však dielo iného charakteru. Hoci problematika je monotematická a metodika obdobná, práca spája viacero relatívne nezávislých publikácií, ktoré pri istom porovnaní a zovšeobecnení evokujú polozenie niekoľkých otázok, resp. pripomienok, ktoré môžu priniesť inšpiratívne odpovede aj pre zainteresovaných ľudí, ktorí nie sú expertmi v danej oblasti.

K práci mám nasledovné pripomienky a otázky, či námety do diskusie.

V pasáži venovanej pôvodu primárnych plastidov Archaeplastida, spracovanej prehľadne a recentne, sa nenachádza ani len zmienka o tom, že by aj chlamýdie mohli nejakým spôsobom prispieť k pôvodu chloroplastov u týchto fotosyntetizujúcich organizmov. Ide o hypotézu „Ménage à trois“, ktorá sa nie tak dávno pokúšala zodpovedať otázku pôvodu metabolizmu glykogénu, a to súžitím chlamýdie, hostiteľa a cyanobaktérie (Ball et al. 2013). Následne Facchinelli et al. (2013) priniesli upravený scenár, ktorý zahŕňa spolužitie chlamýdiového parazita a cyanobaktérie v jednej vezikule vo vnútri hostiteľa. Hypotéza s chlamýdiami a ich nevyhnutnou úlohou v evolúcii plastidov je síce podporená viacerými argumentmi, no ich hodnota je vzhľadom na novšie analýzy diskutabilná – fylogenetická reanalýza sekvencií dôležitých génov pre metabolizmus glykogénu/škrobu (Domman et al. 2015). Je táto záležitosť už načisto „pase“ a nestojí ani za zmienku? Prosím doktorandku o zaujatie stanoviska.

Problematike tzv. invertovaných repetícií ("Inverted repeats – IR") obsahujúcich ribozómový operón, ktoré sa v hojnej miere nachádzajú v organelách, okrem mitochondrií hlavne v plastidoch, je v práci venovaná pomerne rozsiahla pozornosť. Prezentované sú aj racionálne

vysvetlenia, aký je ich význam pre genóm organel (započatie replikácie, stabilizácia genómu a konzervácia génov), ktoré sú citované aj z veľmi recentných literárnych zdrojov. Zároveň sa však zreteľne deklaruje, že IR nemusia byť úplne identické, častokrát jedna kópia IR absentuje (nezávislá strata), no v istých prípadoch sa tieto sekvencie môžu vyskytovať aj v priamej orientácii. Takéto tandemovité („Tandem repeat“) usporiadanie úsekov plastómu obsahujúcich ribozómový operón sa vyskytuje hlavne u euglén (3x *Euglena gracilis* a *E. longa*, 2 x *E. hiemalis* a *E. clara*). Existuje nejaké racionálne vysvetlenie, prečo je tomu tak (mechanizmus, ako k tomu došlo), resp. akú selekčnú výhodu to euglénam poskytuje?

V súvislosti s IR sa taktiež uvádza, že u niektorých organizmov, napr. zástupcov Euglenaceae nebola anotácia plastómu cirkularizovaná a doplnená. V príslušnej tabuľke sú takéto genómy označené hviezdíčkou (\*), ktorá označuje genómy s neuzavretou kružnicou. Mohla by doktorandka bližšie ozrejmiť čo to znamená?, resp. sú na koncoch takýchto molekúl prítomné teloméry?

V pasážach práce venovanej tzv. komplexným plastidom, obalených tromi, či štyrmi membránami (sekundárna, resp. vyššieho rádu endosymbióza), je venovaná detailná pozornosť. Ich pôvod sa odvodzuje zo zelených a červených rias. Mohla by sa doktorandka pokúsiť vysvetliť, prečo nie aj z glaukofýt?

Otázka odhadovaného veku plastidov euglén? V Dizertačnej práci sa uvádza, že: „Euglenophyta (Excavata) jsou sladkovodní i mořští bičíkovci. Jejich chloroplast získaný před 650 – 540 miliony let má tři membrány a má původ v zelené řase podobné dnešní řase *Pyramimonas parkeae* (Jackson et al., 2018; Turmel et al., 2009).“ Existujú však aj iné odhady predpokladajúce, že plastidy euglén sú podstatne mladšie, napr. 100 miliónov rokov (viď. Stiller et al. 2014 Toward an Empirical Framework for Interpreting Plastid Evolution, J. Phycol. 50, 462–471), zatiaľ čo odhad veku ostatných komplexných plastidov sa pohybuje v časovom rozpätí 700-800 miliónov rokov (viď. tamtiež). Aké údaje slúžia ako podklad pre odhad času vzniku/veku plastidov, resp. všeobecne aj iných organel, či organizmov?

Otázka rozdielov v počte intrónov v plastómoch euglenofýt. Práca detailne dokumentuje situáciu u rôznych zástupcov tohto taxónu. Konštatuje sa v nej, že genómy plastidov euglenofýt sa napriek takmer totožnému obsahu génov výrazne odlišujú svojou veľkosťou. Ukazuje sa, že je to spôsobené práve počtom intrónov, ktorý je rôzny v jednotlivých líniiach. Možno zovšeobecniť, že druhy, ktoré sa nachádzajú na báze fylogenetického stromu euglenofýt, majú menej intrónov, no odvodennejšie druhy ich majú viac. Najviac intrónov sa zatiaľ našlo u *Euglena gracilis* (134 – 145). Existuje nejaké racionálne vysvetlenie, prečo k tomu došlo, resp. akú selekčnú výhodu to *E. gracilis* poskytuje?

Dizertačná práca sa venuje aj otázke endosymbiotického génového prenosu (EGT). S väčšinou formulácii možno len súhlasiť; sú doložené aj odvolávkami sa na originálnu pramennú literatúru. Nemôžem sa však stotožniť s nasledovným konštatovaním, a to: „Kromě celých funkčních genů se během EGT přesouvaly z organel do jádra i neúplné nefunkční fragmenty DNA ("Nuclear plastid DNA" (NUPT) a "Nuclear mitochondrial DNA" (NUMT)), kterých může být překvapivě mnoho (Makai et al., 2015).“ Je doktorandka presvedčená, že neúplné nefunkčné fragmenty DNA (NUPT a NUMT) sú v hojnej miere presúvané z organel do jadra? Nevznikajú skôr v jadre z presunutých úplných sekvencií pôvodne v organelách funkčných génov, a to preto, že sa nepodarilo zabezpečiť k nim príslušné presekvencie potrebné pre doručenie nimi kódovaných proteínov späť do organely? Takže

k pseudogenizácii by dochádzalo prednostne až v jadre, a nie už v organele? Má doktorandka predstavu, akým spôsobom sú pričleňované príslušné presekvenčné potrebné pre úspešné zacielenie (targeting) a dopravu (trafficing) príslušných proteínov naspäť do organel k sekvenciám pôvodne funkčných génov presunutých do jadra z organel?

Posledná otázka, a to o úlohe EGT pri primárnej endosymbióze. Dost' ma prekvapuje, že v práci sa vyskytuje nasledovná formulácia: „Problém odlišení genů pocházejících z případného archezoálního nebo archebakteriálního předka eukaryotů a genů pocházejících z eubakteriálního předka mitochondrie je především v tom, že dosud nebyl nalezen eukaryotní archezoální organismus bez mitochondrie nebo velmi blízká linie archebakterií, ke kterému by bylo možné vztahovat změny v zastoupení genů.“ Pokiaľ som dobre informovaný, tak taxón „Archaeoza“ bol už dávnejšie rozpustený/zrušený (ako umelo utvorený) a hypotéza o nejakom „protoeukaryotovi“ bez mitochondrie bola už dávnejšie väčšinou expertov opustená, resp. zamietnutá. Na strane druhej nedávne objavy archeónov nazvaných Lokiarchaeota poukazujú na pozoruhodnú podobnosť na eukaryotické organizmy (najbližšie známe prokaryotické organizmy k eukaryotickým). Prosím doktorandku o komentár.

Uvedené pripomienky a nastolené otázky neznižujú kvalitu odvedenej a dokumentovanej práce. To úzko súvisí aj s konštatovaním, ktoré doktorandka uviedla na záver svojej práce, a to: „Vývoj sekvenačných technológií jde velmi rychle dopředu a tak dalších genomických, transkriptomických i proteomických dat bude neustále přibývat. Kromě obohacování databází musí dojít také k vylepšování logaritmů pro jejich analýzu. Naše data i zvolené postupy k jejich vyhodnocování k oběmu výrazně přispěli a jsou připravené pro další studie.“. Počas obhajoby sa teda pravdepodobne dozvieme aj úplne najnovšie informácie o tejto problematike.

Záverom možno konštatovať, že predložená doktorandská dizertačná práca dokumentuje schopnosť jej autorky pracovať s odbornou literatúrou, premyslene organizovať experimenty a precízne ich realizovať, spracovávať výsledky a vyvodzovať z nich zodpovedajúce závery. Práca plne vyhovuje požiadavkám kladeným na doktorandské práce a odporúčam ju k obhajobe.

Na základe mnou posudzovanej Dizertačnej práce navrhujem udeliť jej autorke RNDr. Štěpánke Hrdej akademický titul "Philosophiae Doctor" ("PhD").

Bratislava 31. 10. 2020

Prof. RNDr. Juraj Krajčovič, CSc.  
Katedra biológie  
FPV UCM v Trnave