



## Posudek na disertační práci Mgr. Barbory Vališkové „Genomická architektura a molekulární mechanismy hybridní sterility myši“

Disertace Mgr. Vališkové (115 stran) je sice napsána v tradičním formátu kvalifikačních prací, opírá se však o tři vědecké články už publikovaných v prestižních mezinárodních časopisech (eLife, PLoS Genetics) s IF 5,175–7,080. Po krátkém úvodu a popisu současného stavu znalostí o vzniku postzygotických reprodukčních bariér a mechanismech meiotického dělení autorka definuje tři cíle práce: 1. objasnění mechanismu asynapse u sterilních hybridů pomocí náhodného začleňování různě dlouhých konsubspecifických homologních segmentů DNA, 2. ověření vlivu exogenních dvouřetězcových zlomů (DSB) produkovaných pomocí aplikace cisplatinu na zlepšení meiotické synapse u sterilních hybridů a 3. ověření role genu *Prdm9* v plodnosti samců s hybridním genomem odvozeným od tří poddruhů domácích myší. Následuje rozsáhlá kapitola podrobně popisující použitou metodiku, výsledky, diskuse, závěrečné shrnutí výsledků a seznamy publikací autorky, zkratk a použité literatury.

Už samotná skutečnost, že jednotlivé cíle byly publikovány v respektovaných mezinárodních periodikách, svědčí o jejich splnění. V prvním případě bylo zjištěno, že míra asynapse jednotlivých autozomů sterilních F1 samčích hybridů vzniklých křížením PWD/B6 je statisticky významně vyšší u pěti nejkratších chromozomů v sadě. Náhodně začleňovaný konsubspecifický úsek PWD/PWD obnovuje synapsi daného autozomálního páru, pokud je delší než 27 Mb. Pro úspěšnou synapsi chromozomu jsou nezbytné minimálně dva symetrické DSB a pro alespoň částečnou obnovu plodnosti hybridních samců je třeba obnovit synapsi alespoň ve třech ze čtyř nejkratších segregujících chromozomů (15, 16, 18 a 19).

V případě druhého cíle bylo zjištěno, že injekce roztoku cisplatinu (min. v koncentraci 5 mg/kg), která vyvolává vznik symetrických DSB, vedla k signifikantnímu zvýšení četnosti synapsí v pachytenních jádrech. Zvýšení frekvence DSB bylo pozorováno především u jader, která byla v době aplikace cisplatinu v S-fázi a integrovala 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), který je analogem thymidinu. Důvodem může být, že homologní rekombinací jsou lépe opravitelné exogenní DSB indukované v S-fázi než v leptotene/zygotene, kdy jsou zlomy indukovány proteinem SPO11.

Třetím klíčovým výsledkem práce je potvrzení role genu *Prdm9* v hybridní sterilitě i u samčích hybridů všech tří nejrozšířenějších myších poddruhů (*musculus*, *domesticus*, *castaneus*). Zajímavé je, že u genu *Hstx2*, který je u hybridů PWD/B6 nezbytný pro vyvolání sterility, v tomto případě nebyl prokázán signifikantní vliv. Autorka předpokládá, že kromě asymetrických DSB v tomto případě hrají roli nezmapované modifikátory *M. m. castaneus*.

K práci nemám závažnější připomínky, i když působí dojmem, že byla sepisována v časové tísní. Obsahuje řadu pravopisných chyb a zejména spoustu anglicismů, takže v některých případech má čtenář problém s porozuměním textu a musí daný úsek textu číst opakovaně. Ve Výsledcích se zbytečně opakují informace z Úvodu nebo dokonce z Metodiky apod.

Za chvályhodné považuji zahrnutí *M. m. castaneus* do zkoumání mechanismů myší sterility. Na druhou stranu je škoda, že jako reprezentant poddruhu *M. m. domesticus* se stále používá kmen C57BL, jehož genom je sice z drtivé většiny typu *domesticus*, ale těch pár procent pocházejících z jiných poddruhů (především *musculus*) a roztroušených po genomu může hrát významnou roli. Navíc (a ještě významněji), tento „klasický“ inbrední kmen má chromozom Y typu *musculus*, ne *domesticus*.

K metodice v zásadě komentář nemám, tedy až na dvě poznámky. Zaprvé, přestože je metodická část práce velmi rozsáhlá, kap. 4.14 Statistická analýza je naopak naprosto nedostatečná. Není uvedeno, v jakém programu byly uskutečněny GLM, GLMM a QTL analýzy (v R?, v něčem jiném?, citace?); Mann-Whitneyův U test je poprvé zmíněn až na str. 70. Zadruhé: v testech počínaje stranou 70 (obr. 28), jsou použita vícenásobná srovnání, takže hrozí inflace chyby I. typu („false positives“). V takových případech je třeba použít některou z metod korekce hodnoty statistické významnosti. Např. v případě Bonferroniho adjustace by se tradiční hodnota 0,05 vydělila počtem párových testů (tj. minimálně 4), takže prahová hodnota by potom nebyla 0,05, ale 0,0125; některé z testů by pak evidentně neprokázaly signifikantní rozdíly.

Drobné poznámky:

Obr. 30: asi by mělo být  $p < 0,0001$ .

Na str. 82 (obr. 40) je komentována vysoká korelace, ale ta není nijak testována.

Dále mám na autorku následující dotazy:

1. Má autorka nějaké vysvětlení, proč je úplná asynapse na chromozomech 15-19 *skokově* vyšší než ostatní?
2. Může skutečnost, že F1 hybridní samci jsou více postiženi při křížení samice PWD se samcem B6 než při recipročním křížení, mít nějakou souvislost s tím, že zatímco u konsomiků *musculus* s vloženým Y *domesticus* jsou hybridy ve všech směrech znevýhodněni ve srovnání s geneticky čistými samci *musculus*, v opačném případě měli konsomičtí samci (samci *domesticus* s chr. Y *musculus*) nižší procento disociovaných spermií (s odlomenou hlavičkou), častěji vyhrávali dyadické střety a měli kratší generační obměnu (Vošlajerová Bímová et al., *Heredity* 2020)? Tyto výsledky jsou navíc v souladu s tím, že chr. Y *musculus* na mnoha místech v Evropě introgresuje hluboko do areálu *domesticus* (Macholán et al., *BMC Evol Biol* 2008; bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2019.12.23.887471>).
3. Mohla by autorka nějak podrobněji objasnit nám laikům, jak vypadá asymetrický DSB? Podobně jsem nepochopil větu na str. 22: „Hlavním úkolem pachytemního stádia je dokončení synapse, ke kterému dochází vytvořením všech tří částí synaptonemálního komplexu podél celé délky chromozomu.“ Mám zato, že k synapsi nedochází po celé délce chromozomu.
4. Proč je v tabulce 14 a na obr. 23  $2 \times 7$  dní? Možná mi to někde uniklo, ale nějak jsem vysvětlení nenašel. Podobně proč v tab. 14 chybí řádek „5 dní“? A konečně proč v tab. 14 nedává součet hodnot v buňkách 1. řádku (kontrola) 100 % (u ostatních lze odchylky pravděpodobně přičíst na vrub zaokrouhlení)?

Poslední dotaz je spíš poznámka: na str. 89 se objevuje tvrzení, že jednou z podmínek sterility F1PWD/B6 je autozomální PWD/B6 heterozygotnost. Chtěla tím autorka naznačit, že ve skutečnosti existuje spousta bariérových lokusů s malým účinkem? To by poněkud rehabilitovalo studie „variabilních a složitých nestandardizovaných systémů“, které k tomuto závěru dospěly už před 15 lety. (To prosím berte jen jako přátelské rýpnutí o hodně staršího kolegy.)

Na závěr nezbyvá než se uchýlit k obvyklé zaklínací formuli, že před uvedené drobné nedostatky jde o práci kvalitní a dosažené výsledky po právu náleží do zlatého fondu výzkumu vzniku reprodukčních bariér u savců. Mgr. Vališková prokázala přehled v jí studované problematice i odborné literatuře a musela si osvojit celou řadu náročných laboratorních technik. Předložená práce splňuje všechny požadavky na podobné kvalifikační práce kladené, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Brno 9. 1. 2021

Prof. RNDr. Miloš Macholán, CSc.