



## Posudek na disertační práci “

### **Genomická architektura a molekulární mechanismy hybridní sterility myši”**

Mgr. Barbory Vališkové

Bylo mi potěšením posuzovat práci Mgr. Vališkové, protože se jedná o impozantní kompendium poznatků o veledůležitém mechanismu speciace, hybridní sterilitě. Objevy představené v této práci představují relativně zásadní posun v našich znalostech speciace, protože autorka zde výrazně objasnila mechanismus meiotické asynapse u sterilních hybridů, ověřila vliv exogenních dvouřetězcových zlomů DNA na párování chromozomů u hybridů a také se pokusila zobecnit úlohu genu Prdm9 v samčí plodnosti hybridů na jiných křížencích poddruhů myši. Obsažnost i objevnost celé práce je o to cennější, že sama autorka rozhodně žádnou sterilitou netrpí a naopak mezi experimenty a jejich sepsáním přivedla na svět a vychovala tři děti, což je samo o sobě náročné, nota bene ve spojení se sepsáním disertační práce, která netrpí žádnými zjevnými formálními či gramatickými nedostatky. Naopak, je sepsána přehledně, graficky i gramaticky hezky a relativně dobře se četla (ale... viz níže).

Ačkoliv je Mgr. Vališková spoluautorkou tří kvalitních publikací (v jednom případě co-first author v eLife), samotná práce, pokud mohu soudit, ještě publikována nebyla. Mohu jen předpokládat, že se k jejímu sepsání autorka chystá. Proto ale nerozumím, proč se rozhodla sepsat takto velmi rozsáhlou dizertaci, nota bene v češtině, když ji pak nikdo, kromě oponentů a pár zanícených česky mluvících biologů, číst nebude. Proč nebyla práce sepsána v angličtině a ideálně jako soubor článků? Současné výsledky, byť nepublikované, mohly přece být prezentovány formou manuskriptu. Formálně by s tím jistě problém nebyl a autorce by to velmi usnadnilo jejich následnou přípravu k finální submisi.

Po chvále se v dalším textu zaměřím na některé aspekty, ve kterých jsem k práci kritický (aniž bych tím ovšem snižoval výše řečená pozitiva). Doufám, že budou k užítku autorce i teamu Prof. Forejta, jehož výzkum mne do značné míry inspiroval v mé vlastní vědecké práci a uvažování, a snad mu to tedy také na oplátku přijde vhod. Jako oponent také v následujícím textu položím několik otázek, na které uchazečku o doktorský titul prosím o odpověď.

Začnu nejprve body, týkajícími se konkrétního designu práce a popisu výsledků a poté přikročím o obecnému přesahu práce.

Hned na začátek bych rád uvedl, a není to jen poznámka k Vaší práci, ale obecně k publikacím teamu Prof. Forejta, že popisy myšího modelu, především značení jednotlivých kříženců opravdu snad až příliš složité a a při snaze o pochopení, co s čím je kříženo na pozadí čeho, jsem si nejednou sáhl až na samé dno svého intelektu a pozornosti. Já chápu, že jednotlivé experimentální linie myší mají svá specifická jména, známá ve Vaší vědecké komunitě a jsou nezbytně nutná zmínit. Ale jelikož se v práci dále pracuje jen s malým omezeným počtem kmenů a typů křížení, doporučuji nahradit jejich specifická jména linií prostě kombinací jmen poddruhů, které jsou kříženy (či tam ta jména druhů uvádět alespoň za zkratky). Tak by byla orientace v textu řádově jednodušší. Například toto „...M. m. musculus (zastoupený kmenem PWD/Ph, dále jen PWD, který byl odvozen z divoké myši (Gregorova & Forejt 2000)) a M. m. domesticus (zastoupený kmenem C57BL/6J; dále jen B6) meiotickou zástavu a úplnou samčí sterilitu. Výzkum na F1 hybridních M. m. musculus (PWK/Ph; PWK) a M. m. domesticus (WSB/EiJ nebo LEWES/EiJ).... „ V metodách se tam připlou ještě jiné, v úvodu nezmíněné kmeny, třeba „Konzomické kmeny C57BL/6JChr #PWD (dále v textu popsáné B6.PWD-Chr#).... No.....Já bych vážně radil jejich detailní jména jednou zmínit, ideálně v tabulce, ale v textu užívat zkratk M.m.musculus a M.m.domesticus. a jejich kombinací u kříženců, případně upřesnit jako Typ 1, a tak dále. Takto jsem se musel neustále vracet o x stránek sem a tam abych si ověřil, co s čím vlastně se křížilo.

### **Metody:**

Bylo by vhodné popsat a blíže vysvětlit, čím jsou ty studované kmeny jiné od přírodních a jak a kdy vznikly a odkud pochází. Dále bych radil lépe vysvětlit, jak jste získala jistotu, že kmeny jednotlivých poddruhů jsou skutečně „čisté“ a nepocházejí samy o sobě již z nějakých post-F1 kříženců. Například, pocházejí z alopatrických částí areálů?

Také bych rád viděl detailněji vysvětleno, jak víte, že hybridy, kteří mají „vsegregován“ jeden homospecifický pár chromosomů, je mají skutečně celý konsubspecifický. Jde mi o to, že při tvorbě gamet je pro každý bivalent nutné alespoň jedno chiasma, takže mi není jasné, jak je při zpětném křížení hybridů možné vnést jeden celý nezrekombinovaný chromosom. Vůbec neříkám, že to máte špatně, jen bych uvítal detailnější vysvětlení, jelikož v textu píšete, že používáte druhově specifické markery, kterých je samozřejmě jen omezený počet na chromosom. A jelikož jedním ze základních Vašich objevů je minimální délka konsubspecifické sekvence nutná pro synapsi, je tato otázka na místě.

K vizualizaci synaptonemálního komplexu (SC) bylo použito protilátky proti SYCP3 proteinu, což je ale laterální komponent SC a tudíž dle mých vlastních zkušeností může být správně utvořen i na univalentech bez synapse. My proto používáme i SYCP1 marker. Můžete to krátce okomentovat?

Bohužel, statistické analýzy jsou až velmi stručně popsány v Metodách, což je skutečně na škodu, jelikož se ve výsledcích objevují typy testů, o kterých se v Metodách vůbec nemluví (korelační testy, MWM atp..) a naopak některé testy, které se podle metod patrně použily (GLM a jejich variace) nejsou zase dobře popsány ve výsledcích a ani není vysvětlen jejich design. Buď to tedy mělo být zmíněno v úplnosti, nebo kapitola z metod odstraněna a popis testů nechán na výsledky (dostanu se k tomu níže).

## Výsledky

Výsledky jsou pečlivě napsané, ale trochu v sobě míchají i diskusi, což ztěžuje orientaci v díle. Například věta „Předpokládáme, že nepřítomnost aktivního euchromatinu je důsledkem selhání meiotické synapse intersubspecifických chromozomů, známé jako meiotické umlčení nesynapsovaného chromatinu (Burgoyne et al. 2009), která může přispívat k meiotickým fenotypům sterilních hybridů (Larson et al. 2016).“ patří do diskuse a tady se moc nehodí Takových příkladů je více, radím se tomu vyvarovat, anebo rovnou napsat kapitolu Results & Discussion, což je zcela legitimní.

str. 40: Není dobře vysvětleno, jak byly hodnoceny asynapse. To chybí už v metodách, kde mělo být jasně řečeno, co se myslí úplnou, částečnou atp. asynapsí. Dokonce ani ve výsledcích se toho člověk nedobere, ale stručné vysvětlení se objevuje jen v popisu obrázků. Takže potom věta „...silnou negativní korelaci (Spearmanovo  $\rho = -0,760$ ,  $p = 0,0003$ ) mezi mírou asynapse a předpokládaným počtem symetrických DSBs...“ se mi těžko chápe, když není jasné, co konkrétně je míra asynapse. Jelikož se jedná o jeden z hlavních sledovaných parametrů, prosím v publikaci si na to dejte pozor a vysvětlete to zcela jasně.

Kapitola 5.1.4 cis-Trans: je to extrémně zajímavé, ale není mně to jasné. Například už jen to, že grafy mají na osách procenta asynapsovaných pachytenů, ale v textu mluví o poměru synapsovaných (tedy vlastně opak škály osy na onom grafu). Proč tomu tak je? Za další, úvodní věty nejsou jasné. Myslela jste tím, že podíl asynapsí u konsomiků s jednotlivými chromosomy by byl stejný (per chromosom), jako u F1?

Z toho pak pramení, že nejsem schopen říci, zda chápu, jak jste sestavovali svá očekávání počtu a/synapsovaných chromosomů. Poněkud se o tom rozepisujete až v diskusi, ale to je jednak pozdě (definici predikcí prosím uveďte nejpozději tam, kde s ní statisticky pracujete, tj, ve výsledcích, ale ideálně už v Materials and Methods) ale jednak, když píšete „Pomocí pravděpodobnostního modelu založeného na teorii asymetrie rekombinačních hotspotů...“, není mi jasné, co myslíte pravděpodobnostním modelem a co přesně očekáváte a proč.

5.1.2 Minimální délka konsubspecifické sekvence nezbytná pro meiotickou synapsi: Tato část mně přijde extrémně zajímavá, ale bohužel statistické zpracování dat není dotažené a proto mi pak přijde jejich interpretace příliš zjednodušující a místy až zavádějící. Jestli to chápu, tak jste provedla vkřížení různě dlouhých konsubspecifických úseků chromosomů na pozadí 6ti testovaných chromosomů a testujete otázku, zda existuje minimální délka takto vneseného úseku, která je nezbytná pro synapsi. Podle mne na takto položenou otázku není možné z Vašich grafů jednoduše odpovědět, (anebo to nechápu) a otázka by měla být formulována jinak. Jednak totiž podle Vašich údajů v tabulkách 5-10 a souvisejících grafech dochází na těchto ortologních chromosomech k synapsím i bez vnesení jakékoliv konsubspecifické části (tedy u linií, kde jsou tyto chromosomy plně ortologní a i u F1 hybridů, protože nikde není míra asynapse 100%). Dále, z pochopitelných důvodů nejste schopna testovat plynulé rozložení všech možných délek insercí, ale jen ty intervaly, které Vaše márkry dovolí označit jako homozygotní interval a to ještě u každého chromosomu jinak. Pak byste se neměla ptát na existenci nějaké minimální délky, ale spíše na sérii lépe testovatelných hypotéz a jim přizpůsobit výběr statistických testů. Jmenovitě navrhuji tyto:

- a) zda délka detekovatelného homozygotního úseku hraje roli v míře asynapse. ( to je z Vašich grafů zřejmé, ale jakým přístupem jste to testovala?)
- b) zda se efekt délky na zlepšení synapse liší mezi chromosomy (bylo by dobře otestovat interakci mezi efektem délky konsubspecifického úseku a identitou chromosomu, na kterém k jeho vnesení došlo)

c) zda existuje ve Vámi pozorovaných trendech signifikantní “breakpoint” (to by byl důkaz oné zmiňované minimální délky a k tomu účelu se dá vybrat vhodný statistický test, třeba my jsme na podobný typ dat používali piecewise regression models), či prostě zda efekt té délky je, nebo není lineární (tedy spíše testovat otázku, zda od určité délky již k markantnímu zlepšení nedochází)

Vsadil bych, že všechny tyto predikce budou správně, protože v biologii se téměř všechny jevy vyskytují v kontinuech a proto jsem nepochopil, proč by měla existovat nějaká jasná a univerzální délková hranice platná pro všechny chromosomy. Prosím o vysvětlení.

Nakonec, d) nepochopil jsem, jak jste došla k závěru, že ona minimální délka je 27Mb, jelikož nikde v tabulkách 5 až 10 se tato konkrétní délka neuvádí. Není mi tedy jasné, jak její existenci mohou tato data implikovat.

## Diskuse

Interpretujete svá data z několika úhlů a nabízíte několik vzájemně se nevylučujících vysvětlení, se kterými souhlasím, a hezky zasazují Vaše objevy do širších souvislostí. Ale vlastně vůbec neříkáte, jak Vaše data vysvětlí tu jednu z hlavních otázek, a sice že se sterilita týká jen samců, a jak tedy přispěla k pochopení Haldaneova pravidla, kterému je věnována nemalá část úvodu. Vlastně mi přijde, že místy se rozdíl mezi hybridní sterilitou obecně, a sterilitou heterogametického pohlaví konkrétně, až moc zakrývá, což je škoda. Tak třeba píšete: „Kritickým krokem pro úspěšnou spermatogenezi je vytvoření DNA dvouřetězcových zlomů (DSBs) pomocí SPO11 topoizomerázy (Keeney 2008).“ Jenže Keeney to nemyslel, jako male-specific funkci, jelikož píše, že to platí i pro samice. Možná ta asymetrie souvisí s efektem lokusu Hstx, ale ani interpretace „. Tento náleznaznačil, že heterozygotnost genu Prdm9PWD/B6 a PWD alela lokusu Hstx2 jsou nezbytnou avšak ne dostačující podmínkou pro hybridní sterilitu s tím, že je navíc nutný cis-efekt chromozomově-autonomní interakce mezi homology (Bhattacharyya et al. 2013, 2014)“, přímo nevysvětluje, proč se sterilita netýká samic, protože nekompatibilní alela Hstx2 je přítomna i u nich, jen v heterozygotním stavu. Myslím, že toto je důležitý aspekt Vaší práce a stojí za obsažnější diskusi. V Úvodu se Haldaneovu pravidlu věnujete obširně, v diskusi o něm nepadne slovo.

U části 6.3 mám už výše zmíněné výhrady směrem k odhadu minimální nutné konspecifické délky chromosomů a také k Vaší poznámce, že autozomální synapse je cis-regulovaná a chromosomově specifická (podle mne jste chromosomovou specifitu efektu délky sekvence netestovala).

No, a nakonec, ač se mi práce velmi líbila, mám k ní také několik výhrad z hlediska toho, jak zasazujete Vaši práci do nejobecnějších biologických souvislostí.

Především, jaká je zobecnitelnost Vašich objevů? Není mi jasné, co máte na mysli větou: „Regulace rozmístění rekombinačních hotspotů Prdm9 genem je však omezena pouze na savce a lze předpokládat, že podobný mechanismus reprodukční izolace by mohl fungovat obecně i u druhů, které ortholog Prdm9 genu NEMAJÍ, nebo mají jeho nefunkční variantu.“ Tak podle mne, buď je Prdm9 regulace rekombinace omezena JEN na savce a pak není důvod podobný mechanismus předpokládat jinde, nebo NENÍ omezena na savce a pak se může jednat o obecnou věc. Pokud vím, tak Baker et al. 2017 eLife ukázali přítomnost ortologů genu Prdm9 u většiny z 225 studovaných obratlovčích druhů, tedy nejen u savců.

V úvodu zmiňujete, že klasické modelové organismy ve speciálním výzkumu (str. 7) mají menší počet fenotypových projevů? Co tím myslíte? Není to jen naše nepochopení těch organismů a fakt, že my sami, jako savci, se zaměřujeme na fenotypové projevy, kterým sami rozumíme, zatímco širokou škálu

fenotypových projevů jiných organismů prostě zjednodušíme a přehlídíme? Obzvláště u bezobratlých či u cévnatých rostlin bych si skutečně nedovolil tvrdit, že mají chudší fenotypový repertoár, než my, savci.

Také, jakkoliv chápu, že Vaše práce se nezabývá polyploidii, tak když už jste ji zmínila, pak mně přijde, že ji odbýt větou „Polyploidie je běžná u rostlin a dále se jí nebudeme zabývat.“ je trochu příliš redukcionistické a nereflektuje to poznání několika posledních desetiletí. Jak k tomu přijdou ty dlouhé zástupy polyploidních živočichů obecně a obratlovců zvláště, a vůbec my sami, kteří jsme jako strunatci prošli minimálně dvěma koly celogenomové duplikace? Můžete zmínit několik skupin neopolyploidních a naopak paleopolyploidních živočichů?

Na Str. 9 uvádíte čtenáře do problematiky mezidruhových bariér a jejich vlivu na speciaci, pročez citujete Dobzhanskeho 1937. Ale tyto genetické aspekty v nejobecnější rovině byly o desetiletí dříve formulovány Batesonem (1909) a to na negenické úrovni (píše tuším o roli „nongenic residues“, které, na rozdíl od genů, nepodléhají přírodní selekci). Vlastně, Bateson není ani jednou zmíněn v celé práci, což mně přijde škoda, protože Vaše objevy vlastně zpochybňují genostředný pohled inherentní v Dobzhansky-Mullerově pojetí, ale spíše kombinují jejich pohled s pohledem Batesona. Jelikož mne tato historická perspektiva pohledů na speciaci a nekompatibilitu přijde velmi důležitá s ohledem na Vaše objevy interakcí proteinu (ta genostředná věc) a sekvencí DNA (ten nongenic residue), můžete prosím krátce shrnout, jak se vyvíjel pohled na hybridní sterilitu od Darwina a proč on sám měl takový nepřekonatelný problém ji zahrnout do své evoluční teorie o vývoji druhů?

Závěrem bych Vám rád pogratuloval k tak rozsáhlé práci, snad Vám moje poznámky a potřeba se nad nimi zamyslet usnadní jejich finální publikaci, o níž nemám pochyb, že padne na nějaký prestižní časopis. Přeji Vám hezký, plodný a šťastný pracovní i osobní život s titulem Ph.D., k jehož získání Vás, jako oponent Vaší práce, doporučuji.

S pozdravem,  
Mgr. Karel Janko, Ph.D.