

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Karla Fuska: Meiotický efekt mutace genu MutS homolog 6 (Msh6) u dvou myších poddruhů

Cílem diplomové práce bylo využití CRISPR/Cas9 systému k vytvoření mutantních kmenů myši s delecí v genech mismatch repair (MMR) systému *Msh2* a *Msh6*. Dále pak studium fenotypu těchto delečních mutantů se zaměřením na samčí meiotické dělení a fertilitu. Experiment byl úspěšně proveden, ačkoli prozatím se podařilo připravit delecii jen pro gen *Msh6*, což je ovšem samo o sobě velkým úspěchem. Bylo ukázáno, že samci s delecí v *Msh6* genu vykazovali nižší hmotnost varlat, nižší počet spermií a také poruchy v opravě dvouřetězcových zlomů ve stadiu pachytene 1. meiotického dělení. Oproti očekávání však nebyl ovlivněn počet crossing-overů ani nebyl pozorován významně vyšší počet nespárovaných chromozomů. Výsledky jsou velmi zajímavé, neboť funkce MMR genů u obratlovců není zatím dostatečně prozkoumána, a nemám pochyb, že budou publikovány v kvalitním časopise.

Diplomová práce je rozsáhlá, celkem má 77 stran, a je velmi dobře napsaná. Po krátkém úvodu, kde autor představuje náplň práce, následuje rozsáhlá kapitola literární přehled, kde je genetický výzkum MMR genů u myši zasazen do širšího evolučního, molekulárního, ale i zoologického kontextu. Autor zde popisuje problematiku vzniku druhů se zaměřením na hybridní sterilitu, ale i biologii modelového systému myši domácích. K této části mám jen pár drobných připomínek. V samotném úvodu by mi myslím nebylo na škodu uvést citace. Na str. 10 autor uvádí, že do podskupiny „pravé myši“ *Mus* patří kromě myši i křečci, potkani a krysy. Tady měl autor asi na mysli podrodinu Murinae, a ne rod *Mus*. Dále na str. 12 autor mluví o poddruhu myši domácí *Mus bactrianus*. Pokud vím, dle nové taxonomie již tento poddruh není rozeznáván a rozeznávají se jen poddruhy *M. musculus*, *M. domesticus*, *M. castaneus* a hybridní poddruh *M. molossinus*. Ale to jsou jen drobná zoologická šokbrtnutí, které lze na katedře genetiky zcela přehlédnout. Naopak oceňuji, že autor v úvodu zasadil své výsledky do tak rozsáhlého kontextu. Materiál a metody jsou popsány vyčerpávajícím způsobem. Výsledky jsou popsány jasně a srozumitelně a diskuze je zajímavá, takže se po jejím dočtení čtenář vyloženě těší, jak dopadnou další pokusy, které by měly prokázat, zda se díky delecii genů *Msh2* a *Msh6* podaří obnovit fertilitu F1 hybridů mezi myšimi poddruhy.

K práci mám následující dotazy:

1. Na str. 14. a 15 se autor snaží popsat proč sterilita postihuje především heterogametické pohlaví (Haldaneovo pravidlo) a uvádí, že je to zejména proto, že „spermatogeneze je daleko citlivější k poruchám než proces oogeneze“. Toto vysvětlení sice vysvětlí preferenční sterilitu u organismů s XY pohlavními chromosomy, ale ne preferenční sterilitu samic u organismů s ZW chromosomy. Mohl by autor uvést nějaká vysvětlení Haldaneova pravidla, která by byla univerzální jak pro organismy s heterogametickými samci a samicemi?
2. Mohl by se autor pokusit vysvětlit konkrétně u modelového systému myši domácích, kde už je mechanismus vzniku hybridní sterility alespoň částečně objasněn, proč hybridní sterilita postihuje jen samce a ne samice?
3. Na str. 18. autor jmenuje tři identifikované geny způsobující hybridní sterilitu u *Drosophily*, *Odyseus* (*OdsH*), *JYAlpha* a *Overdrive* (*Ovd*), a dává je do souvislosti s Dobzansky-Muller inkompatibilitami. Nicméně, u jednoho z těchto genů vzniká hybridní sterilita jinak než v důsledku DM inkompatibilit. U kterého a jak?
4. Autor v práci uvádí, že MMR systém je důležitý zejména pro opravy chyb v DNA po replikaci a také kontrolu správné iniciace homologní rekombinace. V obojím hraje roli to, že dokáže rozeznávat heteroduplexy. Takové heteroduplexy ovšem vznikají nejen před samotnou rekombinací (když vyměňované řetězce nejsou homologní), ale také po rekombinaci v případech, že došlo k posunu Hollidayova spoje. Uvádí se, že oprava takovýchto

heteroduplexů po rekombinaci je příčinou genových konverzí. Mohla by případná porucha oprav těchto heteroduplexů vzniklých po rekombinaci u delečních mutantů *Msh6* genu nějak souviset s fenotypem těchto mutantů?

Celkově práci hodnotím jako velmi zdařilou a navrhuji klasifikovat známkou výborně.

V Praze, 28.1.2021

RNDr. Radka Reifová, Ph.D.