

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Davida Homolky „Meiotic sex chromosome inactivation within mouse spermatogenesis“

Oponent: Ing. Michal Kubelka, CSc., ÚŽFG AV ČR Liběchov

Předložená disertační práce je zaměřena především na studium korelace mezi meiotickým umlčením asynapsovaného chromatinu (meiotic silencing of unsynapsed chromatin – MSUC) u autozomů a meiotickou inaktivací pohlavních chromozomů (meiotic sex chromosome inactivation - MSCI) během meiotického dělení ve vztahu k zástavě spermatogeneze a samčí sterilitě u myši. Tyto studie mají velký význam pro objasnění mechanismů podílejících se na regulaci správného průběhu spermatogeneze a úlohy transkripčního umlčení pohlavních chromozomů, stejně tak jako autozomální přestavby v tomto procesu.

Cílem předkládané práce bylo charakterizovat zástavu spermatogeneze spojenou s asynapsí doprovázející autozomální translokaci T(16:17)43H, analyzovat změny v expresi genů v dané oblasti a určit možný vliv této translokace na funkčnost MSCI během spermatogeneze. Dalším cílem pak bylo také charakterizovat vztah mezi rozsahem autosomálních translokací a mírou poruchy spermatogeneze.

Práce je formálně rozdělena na pět základních částí – souhrnu, přehledu současné úrovně poznání (zahrnujícím problematiku inaktivace pohlavních chromozomů, evoluce pohlavních chromozomů a MSCI, stejně tak jako problematiku účinku autosomálních translokací na průběh spermatogeneze), prezentace vlastních studií, která je shrnuta do tří tematických okruhů, diskusi získaných výsledků a závěru. Literární rešerše je zpracovaná velice důkladně a poskytuje více než dostatečný přehled o současných poznatcích ve studované oblasti. Vlastní studie jsou pak doloženy třemi prvoautorskými vědeckými články publikovanými ve vysoce kvalitních impaktovaných časopisech.

Výsledky jednotlivých cílů práce je možné shrnout následovně

1. Na modelu autozomální translokace T43 mezi chromozomy 16 a 17 byla potvrzena progresivní zástava spermatogeneze u heterozygotních samců na úrovni pachytene první meiotické profáze a stejně tak byla u těchto samců také u většiny spermatocytů prokázána asynapse na základě sledování lokalizace BRCA1 a γ H2AX (značící asynapsovaný chromatin). Byla též sledována častá kolokalizace translokačního kvadrivalentu s pohlavním tělískem, což implikuje možnou interakci mezi asynapovanými autozomy a pohlavním tělískem a ovlivnění funkčnosti MSC1, což v konečném důsledku může být příčinou zástavy spermatogeneze. Kromě toho bylo také pozorováno snížení genové exprese v oblasti asynapse, což je prvním přímým důkazem, že MSUC ovlivňuje hladiny mRNA.
2. Za pomoci genetického rozšíření asynapse vnesením t^{12} haplotypu trans k translokačnímu zlomu T43 autozomální translokace byla analyzována závislost míry samčí infertility na rozsahu asynapse. Výsledky prokázaly, že přítomnost t^{12} haplotypu značně zvýšila závažnost poruchy spermatogeneze, charakterizované úplnou ztrátou postmeiotických buněk, menším průměrem testikulárních kanálků a zástavou spermatogeneze v epitheliálním stádiu IV. Expresní analýza také potvrdila transkripční umlčení genů v asynapsované oblasti, které bylo umocněno přítomností t^{12} haplotypu.
3. Porovnáním testikulární exprese mezi myšimi druhy *Mus musculus* a *Mus spretus* za pomoci oligonukleotidových „tiling“ čipů bylo nalezeno několik rozdílně regulovaných transkriptů pocházejících z X chromozomu. Jednalo se jednak o 2 downregulované klastry z chromozomu 2 obsahující piRNA (RNA s důležitou rolí ve spermatogenezi), jednak o 1 upregulovaný klastr odpovídající transkriptu G6pdx, který je v *Mus musculus* transkripčně umlčen, avšak v *Mus spretus* dochází ke zvýšení jeho exprese, a to především ve spermatidách.

V souhrnu předkládaná práce přináší velké množství nových poznatků o mechanismech podílejících se na regulaci správného průběhu spermatogeneze a úlohy MSCU asynapsovaných oblastí autozomů stejně tak jako MSC1 v tomto procesu.

Přesto bych měl na předkladatele několik následujících otázek či poznámek, které však nijak nesnižují vysokou hodnotu předkládané disertační práce:

1. V literárním přehledu předkladatel uvádí, že mutace genů důležitých pro synapsi chromozomů (např. *Sycp3*) vede k zastavení spermatogeneze v pachytenním stádiu zatímco gametogeneze samčích gamet je touto mutací výrazně méně ovlivněna, přičemž se předpokládá, že tento fakt může vysvětlit odlišná schopnost kontrolních bodů (checkpoints) monitorujících průběh meioze v samičích gametách. Zajímalo by mne o jaké konkrétní kontrolní body by se mohlo jednat a jakým způsobem by bylo možné vysvětlit jejich odlišnou funkci v samičích gametách?
2. V kapitole 4.1.7 je diskutován možný mechanismus vlivu autozomální asynapse na poruchu funkce MSCI, přičemž jsou zmíněna dvě možná vysvětlení, a to jednak možnost „sekvestrování“ umlčujících faktorů asynapsovanými oblastmi autosomů, jednak možnost umlčení specifických autozomálních genů, které by se za normálních okolností mohly podílet na MSCI. Jaká je souvislost těchto možných mechanismů vlivu autozomální translokace a s ní spojené asynapse na MSCI s pozorovanou kolokalizací asynapsovaného kvadrivalentu s pohlavním tělískem?
3. Jaké molekulární mechanismy mohou způsobit, že jsou translokované chromozomy v asynapsi umlčeny dříve než asynapsované pohlavní chromozomy?
4. Lze považovat MSCI nebo některou jeho součást za meiotický kontrolní bod (checkpoint)?
5. Zajímalo by mne také, zda předkladatel studoval (či hodlá studovat) vliv jiných autozomálních translokací na poruchu funkce MSCI a průběh spermatogeneze.

Závěrem lze říci, že práce oponenta předkládané disertační práce byla značně usnadněna faktem, že velká většina práce již byla oponována zahraničními nebo domácími odborníky, přičemž experimentální výsledky byly natolik významné, že byly publikovány ve vysoce kvalitních mezinárodních vědeckých časopisech. Dle mého názoru se jedná o disertační práci vynikající kvality.

Z těchto důvodů jsem plně přesvědčen, že hodnocená práce splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci. **Doporučuji proto komisi pro obhajobu disertační práci přijmout a po její obhajobě udělit Mgr. Davidu Homolkovi titul, PhD.**

V Liběchově dne ...12.4.2012.....

Ing. Michal Kubelka, CSc.