

OPONENTSKÝ POSUDEK

NA DISERTAČNÍ PRÁCI MGR. PETRA FLACHSE

Analýza vlivu genové dávky myšího speciálního genu Prdm9 na fertilitu hybridů

Předložená disertační práce se na modelu křížení dvou poddruhů myši domácí zabývá analýzou genů, podílejících se na reprodukční izolaci. U hybridů mezi taxony postihuje sterilita obecně více samce. Myš domácí je vynikajícím modelem pro studium tohoto fenoménu. Mezi oběma poddruhy je vytvořena hybridní zóna, ve které se vyskytují samci se sníženou fertilitou. Důležitou roli v tomto procesu má gen Prdm9, který se podílí na určování míst, ve kterých dojde k rekombinaci. Studie Petra Flachse je zaměřena na alelické interakce genu Prdm9, které analyzuje pomocí různých typů křížení a dalších genetických nástrojů, všímá si také průběhu meiotického dělení. Taková analýza může být významná pro objasnění molekulárních mechanismů vedoucích ke sterilitě hybridů.

Práce má 81 stran textu a standardní členění, je doplněna českým a anglickým abstraktem jakož i autoreferáty v těchto jazycích. Byla vypracována na Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Rozsah jednotlivých kapitol je přiměřený. Seznam literatury obsahuje více jak 180 citací. Obsažené výsledky byly publikovány ve třech článcích s vyšším impakt faktorem. Tyto studie bohužel nejsou přiloženy, jejich seznam je uveden pouze na konci autoreferátu. To je tristní zejména u práce Baker et al. (2014). Autor ve výsledcích odkazuje na metody v této práci, článek však není přiložen. Může autor specifikovat svůj podíl na této studii? Po jazykové stránce je dizertace na poměrně dobré úrovni, frekvence překlepů a gramatických chyb je celkem nízká, místy se ale objevují gramatické hrubky. Výklad je celkem jasný a srozumitelný, občas by mohl být lépe propracován po stylistické stránce. Hůře stravitelné byly zejména partie výsledků a diskuse, věnované hybridizacím (viz níže).

Z vlastní zkušenosti vím, jak je těžké hledat vhodné české výrazy k termínům používaným v odborné angličtině. Přesto si neodpustím několik poznámek. Za zbytečné považuji používání „odborné hantýrky“ (např. vyeluování, vydeletovaný), počestlých anglických slov (chromosomální, panel), nestandardních nebo málo používaných termínů (humanizovaná sekvence, synapsování, fenotypování, heterosubspecifický) a vytváření zcela nových a komplikovaných výrazů jako mezi-poddruhový a mezi-(pod)druhový, přičemž se nechává na čtenáři, aby přišel na to, zda existuje významový rozdíl mezi těmito dvěma slovními konstrukty. Citelně postrádám seznam zkratk. Vzhledem k tomu, že autor již publikoval několik odborných článků, mě poněkud udivil způsob citování některých prací v textu, např. „převzato z (Anderson et al. 1999)“ místo Anderson et al. (1999). Autor nazývá octomilku také drozofilou či muškou, popřípadě uvádí že se jedná o mušku, tedy o zástupce mušek. Správné české označení tohoto experimentálního modelu je octomilka, jedná se o zástupce dvoukřídlých. Čtrnáctidenní se vypisuje slovy ne číslicí 14 denní. Některé obrázky by si zasloužily podrobnější popisky či vysvětlivky.

V úvodu a první části literárního přehledu je stručně charakterizována speciace. Vzhledem ke složitosti celého procesu a jeho významu pro autorovu práci mohla být tato problematika probrána přece jen poněkud důkladněji. Následuje podrobný popis meiotického dělení, autor věnuje velkou pozornost stavbě a molekulám synaptonemálního komplexu a transkripčnímu umlčování některých oblastí či chromozomů. Tato část je velmi dobře zpracována. Poslední

část je věnována genu Prdm9, jeho stavbě, funkci a evoluční dynamice. V metodické části jsou nejprve specifikovány použité kmeny. Metody zahrnovaly hybridizační pokusy, izolaci DNA, různé varianty PCR, mikroskopické stanovení počtu a morfologie spermií, analýzu meiotického dělení s použitím vybraných protilátek a statistický aparát. Výsledky křížení ukázaly, že změna genové dávky genu Prdm9 vede u hybridů ke zlepšení fertility, což vyplývá i z analýzy meiotického dělení. Meiotický blok se v profázi I hybridů projevuje řadou defektů (asynaptické chromozomy, aberantní pohlavní tělísko). Získané výsledky umožnily diskutovat interakce různých alel genu Prdm9 a efekt jejich dávky, také interakce s dalšími geny. Prezentace výsledků získaných hybridizacemi a jejich diskuse jsou dosti nepřehledné. Pro někoho, kdo se v této oblasti nepohybuje, je těžké sledovat argumentaci autora, jistě by pomohlo zařazení schémat i do diskuse, možná i vypuštění některých detailů. Autor vysvětluje na základě svých a dalších publikovaných údajů, jakým způsobem by mohl gen Prdm9 účinkovat v navození hybridní sterility. Různé formy Prdm9 mohou produkovat jiný vzor rekombinačních hotspotů, což se projevuje poruchami párování chromozomů. Závěry dokládají splnění cílů práce.

K práci mám následující poznámky, připomínky a dotazy:

1. Model Dobzhanského a Mullera je platný pro všechny typy speciací?
2. Vzhledem k zaměření práce by bylo vhodné v přehledu literatury specifikovat alespoň stručně funkci genů, které stojí za hybridní sterilitou u octomilky
3. Str. 15, poslední odstavec: buňky nevstupují do meiózy replikací DNA, ta se odehrává v interfázi před meiózou
4. Str. 16, první odstavec – profáze I zahrnuje ještě diakinezi
5. Str. 16, první odstavec – mitóza nezahrnuje replikaci
6. Str. 16, druhý odstavec – termín bouquet se většinou do češtiny nepřekládá
7. Str. 16, poslední odstavec – bouquet je jen jedním z mechanismů, které se mohou podílet na přibližování homologních chromozomů před nebo na začátku meiotického dělení. Mohl by autor jmenovat některé další mechanismy, které se mohou uplatňovat?
8. Str. 20, poslední odstavec – pohlavní chromozomy se nevyskytují u všech pohlavně se rozmnožujících organismů (mezi pohlavně se rozmnožující organismy řadíme například i hermafrodity)
9. Na str. 23 autor specifikuje doménu PR genu Prdm9, o něco níže v textu se objevuje PR/SET doména. Vzájemný vztah těchto dvou termínů není specifikován. Dále autor uvádí tzv. KRAB doménu - jaká je pozice této domény v Prdm9?
10. Dosavadní poznatky ukazují na významnou úlohu Prdm9 v reprodukci a speciaci saveců. Mohou geny Prdm fungovat podobným způsobem i u dalších obratlovců či dokonce jiných živočichů? Jsou v tomto směru nějaké poznatky?
11. Str. 25, poslední odstavec – je uvedeno že se doména zinkových prstů nachází na C konci Prdm9, což je v rozporu s informací na str. 23 dole. Upřesněte
12. Str. 27, poslední odstavec – myši byly ustájeny (pojem ustájeny není asi úplně na místě, spíše chovány)
13. Str.30, kap. 4.3 – co znamená termín technický replikát?!
14. Str. 32, druhý odstavec – MgSO₄, CaCl₂ – počty atomů kyslíku a chlóru se uvádí spodním indexem
15. Str. 36 - poslední věta druhého odstavce – z kontextu věty není úplně jasné, na plodnost jakých jedinců má vliv zvýšená dávka Prdm9

16. Str. 37, první odstavec – dysfunkční nikoliv disfunkční
17. Str. 37, 40, 43 – ve schématech křížení chybí vysvětlení zkratk KO a Tg
18. Str. 49 a 50 – obrazová tabule č.6 by měla být na jedné nikoliv dvou stránkách, postrádám popisky útvarů v obrázcích
19. Některé pasáže výsledků by měly být zařazeny spíše do diskuse (např. závěr kapitoly 5.6.2)
20. Str. 56, konec druhého odstavce – z kontextu není jasné, jakým způsobem podporují tyto jevy kandidaturu genu Prdm9 na Hstw
21. Str. 59, poslední odstavec – upřesněte autory osobního sdělení – jednalo se o Aylora + Pardo-Manuel de Villena et al., tedy o dvě nezávislá sdělení? Z kontextu to není jasné. Pokud uvádíte iniciálu křestního jména u Pardo-Manuela de Villena, měla by to být i u Aylora
22. Str. 60, první odstavec – není mi zcela jasná informace v předposlední větě, patrně nesprávná formulace myšlenky
23. Str. 64, první odstavec – autor má patrně na mysli zastavení meiózy v časně zygotene nikoliv v pachytene jak je uvedeno (uvádí že k tomu dochází při vytváření synapsí mezi homologními chromozomy)
24. Str. 64, první odstavec - problémy s párováním homologních chromozomů nikoliv bivalentů jak je uvedeno
25. Autoreferát, str. 7 dole – odlišnou afinitu k DNA mají nikoliv alely Prdm3 ale jejich produkty

Závěrem bych rád uvedl, že disertační práce Mgr. Petra Flachse tvoří ucelený tematický celek a obsahuje řadu zajímavých vědeckých výsledků, které byly publikovány v impaktovaných mezinárodních časopisech. Autor se dobře orientuje v problematice a má schopnost přispívat k rozvoji oboru novými poznatky. Předložený text je i přes uvedené formální a drobné faktické výtky kvalitní, doporučuji jej tedy jednoznačně k obhajobě.

V Praze dne 17.1.2018

doc. RNDr. Jiří Král, Dr.