

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Radka Symonová, Ph.D.
Habilitační práce	Kompoziční evoluce genomu strunatců
Oponent	prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.
Pracoviště oponenta, instituce	Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Habilitační spis je tvořen souborem 19 vědeckých publikací a doplněn 22stránkovým komentářem shrnujícím dosavadní poznatky a diskutujícím výsledky přiložených publikací. V práci je jasné shrnutí získaných výsledků a uveden předpokládaný směr dalšího výzkumu.

Autorka ve své habilitační práci objasňuje mechanismy, které se podílely na kompoziční evoluci genomu strunatců. Sleduje procento G+C vůči A+T jako důležitou druhově specifickou veličinu při sekvenování genomu. Ukazuje význam cytosinu v epigenetických mechanismech regulace genové exprese a asociace procenta GC s četnými aspekty biologie genomu jako je densita genů, načasování replikace DNA, proporce transposonů, rozeznání míst sestřihu exonů, tvorba nukleosomů, intenzita rekombinace, intenzita exprese genů, počet a délka exonů a intronů na gen atd.

Autorka spolu se svým týmem cytogeneticky a bioinformaticky odhalili kostlíný jako nositele AT/GC heterogenního genomu, což významně přispívá k opuštění teorie termodynamické stability. Popsali kvantitativní vztahy mezi velikostí genomu, velikostí chromosomů a procenta GC genomu napříč fylogenetickým stromem strunatců a ukázali význam transposomů. Vytvořili bioinformatické nástroje k detailním analysám a visualisacím procenta GC a proporcí transposonů napříč chromosomy což umožnilo stanovit integrativní a pluralistické pojetí kompoziční biologie eukaryot a vytvořit podmínky pro globální výzkum napříč fylogenetickým stromem živočichů.

Habilitační spis je postaven na 19 vědeckých publikacích ve velmi kvalitních specializovaných časopisech, které prošly náročnou oponenturou, a o jejich kvalitě není nutné pochybovat. Práce přináší originální výsledky velké vědecké hodnoty, s využitím všech dostupných vědeckých metod pro studovanou problematiku. Habilitační spis má vysokou odbornou úroveň a mohu proto doporučit, aby byl přijat k obhajobě.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

Kromě normálního karyotypu obsahují populace některých druhů zvířat (u nás například u lišky obecné, *Vulpes vulpes*) tzv. B chromosomy. Jejich počet se u jednotlivých zvířat může lišit a u některých jedinců zcela chybí. Mají nějaký význam z hlediska kompoziční biologie.

Závěr

Habilitační práce Mgr. Radky Symonové, Ph.D. „Kompoziční evoluce genomu strunatců“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Brně dne 31. 8. 2021



✓ podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Radka Symonová, Ph.D.
Habilitační práce	Kompoziční evoluce genomu strunatců
Oponent	RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.
Pracoviště oponenta, instituce	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Předložená habilitační práce Dr. Symonové se zabývá obsahem GC a AT/GC heterogenitou. Práce má podobu souboru 19 publikovaných vědeckých prací doplněných komentářem a přináší nové poznatky o evoluci složení genomů strunatců.

V Úvodu autorka představuje historický vývoj studia složení genomu a představuje hypotézy vysvětlující AT/GC heterogenitu. Možná až příliš mnoho prostoru je věnováno překonaným isochorám prof. Bernardiho, který AT/GC heterogenitu považoval za adaptaci k teplokrevnosti. Více pozornosti by naopak zasloužily molekulární mechanismy, na kterých stojí další hypotézy. Např. mi z textu (kap. 1.3.5) není jasný rozdíl mezi „obecnou“ a „GC-vychýlenou“ genovou konverzí. Podobně mi v kap. 1.3.6 uniká souvislost mezi oxidativním stresem a obsahem GC. V závěru této kapitoly jsou stanoveny cíle, z nichž některé byly vyřešeny už v Úvodu samotném. Celkově lze říct, že má práce shrnout dosavadní poznatky o AT/GC heterogenitě a identifikovat faktory, které jí ovlivňují. Následuje stručné shrnutí používané metodologie, které klade důraz na sekvenování genomů a bioinformatické nástroje vyvinuté autorkou. V kap. 3, Výsledky a diskuse, by zřejmě měly být poznatky z příložených publikací dány do širšího kontextu. Přímou je však odkazováno jen na Přílohu 1 a 8, na další pak pouze skrze citovanou literaturu. Některé práce však nejsou dle mého do habilitace dobře zapracovány. GC obsahu a AT/GC heterogenity se přímo týkají pouze Přílohy 1-4 a 8. Ostatní zařazené práce se zaměřují na geny pro ribozomální RNA (rDNA) nebo jde o cytogenetické analýzy, kde bylo použito barvení chromomycinem A₃, které preferenčně detekuje GC bohaté oblasti, u ryb zpravidla pouze rDNA. Jak však autorka sama poznamenává (kap. 3.4), zásadní vliv rDNA na velikost genomu a obsah GC dosud nebyl prokázán a tyto práce tak k objasnění AT/GC heterogenity nijak nepřispívají. Také celá kap. 3.5 věnovaná selekci je s prací autorky spojená jen větou: „Avšak GC bohaté geny mají i ryby“.

Stručný komentář k jednotlivým přílohám je nakonec uveden v kap. 4, Závěry. Již zmiňované přílohy 1-4 a 8 ukazují, že AT/GC heterogenita není výsadou savců, ale byla zaznamenána i u kostlínů. Vztah mezi velikostí chromozomů, která by měla udávat míru genové konverze, a obsahem GC je značně variabilní. Různé skupiny repetitivních sekvencí se mohou značně lišit svým GC obsahem. A obsah GC v genomu je patrně do velké míry určen právě repetitivními sekvencemi. Autorka také nastiňuje další možné směřování svého výzkumu, které spočívá v analýze GC obsahu v genomových sekvencích dalších organismů. Obávám se však, že interpretace nových výsledků získaných napříč stromem života bude, vzhledem ke značným rozdílům v klíčových procesech jako je rozmnožování nebo metylace DNA, velmi obtížná.

Závěrem musím konstatovat, že mi předložená habilitační práce přijde šitá horkou jehlou. Přes výše uvedené výtky, však práce dle mého dokládá samostatný výzkum autorky, který staví AT/GC heterogenitu genomu do nového světla.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

Proč by se GC-vychýlená konverze neměla týkat většiny genů (kap. 1.3.5)? Geny pro hlavní ribozomální RNA jsou homogenizované genovou konverzí a mají vysoký obsah GC.

Jaká je tedy souvislost mezi oxidativním stresem a obsahem GC (kap. 1.3.6)? Nemůže různý obsah GC genů reflektovat spíše míru jejich exprese, při které může docházet k dvouřetězcovým zlomům a při jejich opravě ke genové konverzi?

Proč by měly „crossingovery“ být předpokladem pro GC-vychýlenou genovou konverzi (kap. 1.3.5)? V meióze dochází při párování homologních chromozomů k tvorbě stovek dvouřetězcových zlomů. Naprostá většina je opravena „non-crossover“ genovou konverzí se silnou preferencí pro GC, která nepodléhá interferenci.

V kap. 3.7 je uvedeno: „Pokud by i repetitivní sekvence měly při své velikosti být GC bohaté, tak by znamenaly obrovskou zátěž a riziko pro celý genom vzhledem k jejich hypermutabilitě.“ Jakou zátěž?

Není možné vysoký obsah GC v oblastech bohatých na geny vysvětlit purifikující selekcí proti deaminaci metylcytosinu? Na rozdíl od mutací v repetitivních sekvencích mutace v genech a jejich regulačních oblastech často škodlivé jsou.

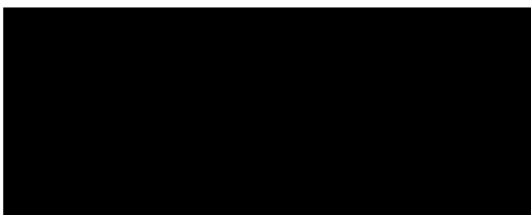
Obr. 2 v kap. 3.1 (a Fig. 4 Přílohy 3) ukazuje, že se lososovití od jiných ryb liší v závislosti obsahu GC na velikosti genomu. Není tento rozdíl daný pouze sílem *Coregonus lavaretus*? Při pohledu do citované databáze je sekvence jeho genomu dlouhá 0.86 Mb, což je 2-3x méně než genomy jiných druhů r. *Coregonus*. Jde o nepublikovaná data a dle mého o artefakt skládání polyploidního genomu. Záznam by šlo patrně nezávisle ověřit srovnáním velikostí genomů určených na základě analýzy k-merů z Illumina dat.

Pokud obsah GC v genomu závisí na složení a GC obsahu jeho repetitivní frakce, není na místě nejdříve vyloučit, že AT/GC heterogenita je výsledkem do značné míry náhodných procesů, které určují množství a složení repetitivních sekvencí?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Radky Symonové, Ph.D. „Kompoziční evoluce genomu strunatců“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Levíně dne 15. září 2021



podpis oponenta

Posudek oponenta habilitační práce

Uchazeč	Mgr. Radka Symonová, Ph.D.
Habilitační práce	Kompoziční evoluce genomu strunatců
Oponent	Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.
Pracoviště oponenta, instituce	Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, Viničná 7, 128 43, Praha 2

Předložená habilitační práce je založená 19 impaktovaných publikacích, které jsou její součástí a dále pak 6 článků je uvedeno jako nezahrnutých a pouze doplňují seznam publikační aktivity habilitantky. Tématem habilitační práce je kompoziční evoluce genomu savců, respektive studium potenciálních mechanismů zodpovědných za heterogenní uspořádání GC% bohatých oblastí v rámci savčích a ptačích genomů a jejich homogenní rozložení u většiny druhů ryb, obojživelníků a plazů. Úvodní kapitoly habilitační práce jsou zaměřené na popis publikovaných hypotéz snažících se tuto heterogenitu vysvětlit na základě vyšší teplotní a torzní rezistence GC bohatých chromozomových oblastí (metabolická hypotéza) či GC-vychýlená genová konverze (gBGC), založená na preferenčním začlenění GC bohatších alel v případě nesprávného párování bazí při meióze. Autorka se pak dále věnuje strukturálním a funkčním rozdílům rozložení GC a AT bohatých chromozomových oblastí v rámci interfázního jádra a selekčně neutrální, neadaptivní hypotéze mutačního vychýlení v rámci kompoziční evoluce genomu. Závěrečná část úvodu je zaměřená na studie zkoumající vztah mezi velikostí genomu a jednotlivých chromozómů a procentického obsahu GC párů. Na tomto místě zmiňuje nepřímou úměru, tzn. čím menší genom tím větší obsah GC párů. Dále pak fakt, že v souladu s gBGC hypotézou se obsah GC zvyšuje se zvyšujícím se počtem chromozomových ramen a tím i počtem rekombinantních událostí, při kterých může dojít ke GC vychýlené genové konverzi. Autorka pak zmiňuje značný vliv transpozibilních elementů na porušení výše uvedeného pravidla.

Cíle habilitační práce jsou definovány jasně, a kromě zevrubné literární rešerše mající snahu pojmout všechny dosud publikované hypotézy autorka deklaruje názorový rozpor s prof. Bernardi, jehož neoselekcionistická argumentace nebere v potaz ostatní hypotézy a habilitantka se zde staví do syntetizující role s důrazem na kompenzaci velkého množství studií zastánců selekčně neutrálních mechanismů v kompoziční biologii.

V další části habilitační práce autorka rozebírá relevantní metody v rámci studia kompoziční biologie, které sama ve svém výzkumu využívala. Jedná se o fluorescenční barvení GC či AT bohatých chromozomových oblastí pomocí chromomycinu A resp. DAPI, dále pak průtokovou cytometrii a

vizualizaci rDNA oblastí, které patří mezi extrémně GC% bohaté. Významnou část autorčina metodického portfolia tvoří bioinformatické zpracování dat z veřejně dostupných databází jako jsou NCBI a Ensembl a příprava vlastních skriptů v jazyce Python.

V kapitole Výsledky a diskuse habilitantka rozebírá svá získaná data z publikací. Jedná se o analýzy GC% u genomů napříč strunatci s důrazem na kostnaté ryby. U bazálních strunatců jsou poměry mezi velikostí genomu a procentickým obsahem GC párů nejednoznačné. Jistá nepřímá úměra je pak patrná u genomů kostnatých ryb, i zde je však výjimka v podobě lososovitých ryb, které podstoupily další WGD, a přesto je GC obsah u nich velmi vysoký. Toto zjištění habilitantka připisuje roli transpozibilních elementů, jak z pohledu funkčního, tak sekvenčního, kdy u většiny z nich se jedná o GC% bohaté elementy. Tyto studie však na druhou stranu přispěly k nabourání gBGC hypotézy, která, jak se zdá, není univerzálně platnou. Na tomto místě rád souhlasím s autorkou, že si studium takto komplexního fenoménu, jakým je kompoziční evoluce, žádá přístup otevřený všem dosud publikovaným hypotézám a místo rigidního „trvání si na svém“ je klíčový syntetický přístup a nadhled. Potvrzením správnosti tohoto přístupu je analýza genomu kostlínů (*L. oculatus*), kdy autorka zjistila výraznou heterogenitu GC a AT oblastí, která je typická pro teplotokrevné živočichy jako jsou ptáci a savci. Právě vyšší tělesné teplotě byl prof. Bernardi připisován klíčový význam. Habilitantka se pak ale sama dostává do rozporu se závěry svých studií, kdy připouští, že neabsolutní rozdíl v tělesných teplotách studenokrevných a teplotokrevných živočichů, ale fakt stabilní teploty u teplotokrevných obratlovců by mohl být vysvětlujícím pro GC/AT heterogenitu. Na tomto místě se nelze nezeptat, jak je toto tvrzení obhajitelné ve světle právě analyzovaného genomu kostlína (*L. oculatus*), který ač studenokrevný, vykazuje heterogenní uspořádání GC a AT bohatých oblastí.

Závěr habilitační práce je pak věnován stručnému shrnutí přiložených publikací a nástinu výhledů další experimentální práce. Poslední dvě kapitoly pak shrnují význam dosažených výsledků při výuce a v praxi. V první oblasti je zřejmé, že habilitantka není jen vyzrálou osobností na poli vědeckém, ale i pedagogickém, kdy kromě vedení bakalářských, diplomových a disertačních prací připravila či se podílela na přípravě dvou předmětů, Evoluce genomu na Univerzitě Hradec Králové a Genomevolution na Univerzitě Innsbruck. Praktický dopad výše uvedených studií je logicky minoritní, a jak autorka uvádí, je možné je spatřovat ve studiu rDNAomu, kdy například počet transkripčně aktivních rDNA kopií může být důležitým faktorem stojícím za rozvojem některých psychiatrických (schizofrenie) či autoimunitních onemocnění, jako například revmatická artritida. Autorka pak dále uvádí význam studia kompoziční evoluce v rámci virologického výzkumu s aktuálním přesahem do problematiky SARS-CoV-2.

Dotazy oponenta k obhajobě habilitační práce

- 1) Jaké má habilitantka vysvětlení pro svou hypotézu GC/AT heterogenity genomu v rámci teplotně stabilních teplokrevných živočichů (ptáci a savci) ve světle jejího nálezu podobného uspořádání genomu studenokrevných kostlínů?
- 2) Jakou roli, pokud vůbec, by mohly v rámci heterogenního uspořádání GC/AT oblastí či obecně GC% genomu hrát Piwi interagující RNA odpovědné za post transkripční umlčení transpozibilních elementů?
- 3) Co je známo o GC/AT hetero/homogenitě virových genomů a existuje nějaká evoluční souvislost mezi nimi a jedno a vícebuněčnými organismy?

Závěr

Habilitační práce Mgr. Radky Symonové, Ph.D. „Kompoziční evoluce genomu strunatců“ **splňuje** požadavky standardně kladené na habilitační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie a genetika.

V Praze dne 10.10.2021



podpis oponenta