

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Doktorský studijní program:  
Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Mgr. Barbora Vališková**

Genomická architektura a molekulární mechanismy hybridní sterility myši  
Genomic architecture and molecular mechanisms of hybrid sterility in mice

Dizertační práce

Vedoucí práce/Školitel:  
Prof. MUDr. Jiří Forejt, DrSc.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

### **Poděkování:**

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Jiřímu Forejtovi, DrSc., který mi dovolil být součástí skvělého vědeckého týmu, za jeho pomoc, vedení a trpělivost. Další dík patří lidem z laboratoře, jmenovitě Petrovi, Vladě, Dianě a Soně, za krásné roky strávené v laboratoři. Velice bych chtěla poděkovat svým rodičům Katce a Pavlovi za všechnu podporu a lásku během celého mého studijního, a nejen studijního života. Můj obrovský dík patří mé druhé mamce Dáše Vališkové, díky které mohla být tato dizertace napsána, protože se v době mého psaní postarala o mé děti. A nakonec bych chtěla moc poděkovat své skvělé rodině, manželovi Míšovi a dětem Majdě, Nikolce a Kubíkovi, za lásku a trpělivost, kterou se mnou během sepisování měli.

## Abstrakt

Hybridní sterilita je jedním z reprodukčně izolačních mechanismů, který zabráňuje genovému toku mezi příbuznými druhy a tím vede ke speciaci. *Prdm9* je zatím jediný známý gen hybridní sterility u obratlovců, jenž určuje místa DNA dvouřetězcových zlomů (DSBs), a tak specifikuje hotspot místa meiotické rekombinace, avšak u hybridů mezi dvěma myšimi poddruhy způsobuje selhání synapse meiotických chromozomů a samčí hybridní sterilitu.

V této studii na sterilních hybridech jsme zjistili, že nejvíce náchylných k asynapsi bylo pět nejmenších autozomů. Abychom mohli manipulovat s mírou synapse, začlenili jsme různě dlouhé konsubspecifické homologní úseky do vybraných autozomálních párů. Konsubspecifické úseky delší než 27 Mb dokázaly obnovit synapsi u daných chromozomů. Dále jsme zjistili, že alespoň dva symetrické DNA dvouřetězcové zlomy na chromozomu jsou nezbytné pro správnou synapsi. Navíc došlo k částečné nápravě samčí neplodnosti F<sub>1</sub> hybridů u jedinců s obnovenou synapsí tří ze čtyř segregujících chromozomů.

K ověření vlivu nedostatečného počtu symetrických DSBs u meiotických chromozomů sterilních hybridů byly generovány exogenní DNA DSBs s využitím chemoterapeutického léčiva cisplatinu. Jádra, která byla ošetřena cisplatinou o koncentraci 5 mg/kg a 10 mg/kg váhy těla, vykazovala zvýšený počet DSBs sledovaných pomocí imunobarvení RPA a DMC1 míst a zvýšený podíl spermatocytů s plně synapsovanými pachytenními chromozomy.

Gen *Prdm9* a lokus *Hstx2* jsou nezbytné komponenty kontrolující F<sub>1</sub> hybridní sterilitu. Hybridi nesoucí část genomu odvozenou od *Mus musculus castaneus* byli použiti k ověření hypotézy, že genotyp *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> a *Hstx2*<sup>PWD</sup> je důležitý pro asynapsi a meiotickou zástavu u těchto hybridů. Hybridi s *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> alelickou kombinací byli plně plodní, zatímco „sterilní“ genotyp *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> vykazoval celou škálu fenotypových projevů od úplné sterility s vysokou mírou asynapse po plodné samce s kvazi-normální meiotickou synapsí. Předběžné výsledky naznačují, že se v tomto křížení mimo gen *Prdm9* na hybridní sterilitě podílí dva nebo více modifikujících genů CAST původu. Alely *Hstx2*<sup>CAST</sup> a *Hstx2*<sup>PWD</sup> měly na plodnost hybridů stejný vliv, což naznačuje, že se gen *Prdm9* chová jako jediný gen hybridní sterility v těchto hybridech odvozených ze tří myších poddruhů *Mus musculus musculus*, *Mus musculus castaneus* a *Mus musculus domesticus*.

## Abstract

Hybrid sterility is one of the reproductive isolation mechanisms restricting gene flow between the related species and leading to speciation. PR domain containing 9 (*Prdm9*), the only known vertebrate hybrid sterility gene, determines the sites of programmed DNA double-strand breaks (DSBs) and thus specifies hotspots of meiotic recombination but in hybrids between two mouse subspecies causes failure of meiotic chromosome synapsis and hybrid male sterility.

In the present study on sterile hybrids, the five smallest autosomes were more prone to asynapsis. To manipulate with the synapsis rate, random stretches of consubspecific homology were inserted into several autosomal pairs. Twenty seven or more megabases of consubspecific sequence fully restore synapsis in a given autosome. Further, at least two symmetric DNA double-strand breaks per chromosome were necessary for successful synapsis. Moreover, F<sub>1</sub> hybrids had sperm when synapsis was rescued in at least three of four segregating chromosomes.

To verify the assumption of a lack of symmetric DSBs in meiotic chromosomes of sterile males the chemotherapeutic drug cisplatin was used to induce exogenous DNA DSBs. Cells treated with 5 mg/kg and 10 mg/kg of cisplatin showed increased number of DSBs monitored by immunostaining of RPA and DMC1 sites and increased proportion of spermatocytes with fully synapsed homologs at pachytene.

The *Prdm9* gene and *Hstx2* locus are the known necessary components controlling the F<sub>1</sub> hybrid sterility. Hybrids with the part of genome derived from *Mus musculus castaneus* were used to verify the hypothesis that genotype *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> and *Hstx2*<sup>PWD</sup> were important for asynapsis and meiotic arrest in these hybrids. Hybrids with *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> allelic combination were fully fertile while the „sterile“ genotype *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> showed a range of phenotypes from full sterility with a high rate of asynapsis to fertility and quasi-normal meiotic chromosome synapsis. Thus, besides *Prdm9*, two or more CAST modifying genes could play a role in this cross. The *Hstx2*<sup>CAST</sup> and *Hstx2*<sup>PWD</sup> alleles had the same effect on fertility of hybrids, indicating that *Prdm9* gene acts as the only one major hybrid sterility gene in these hybrids derived from three subspecies *Mus musculus musculus*, *Mus musculus castaneus* and *Mus musculus domesticus*.

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Současný stav problematiky .....	9
2.1	Speciace a postzygotické bariéry .....	9
2.1.1	Hybridní sterilita .....	10
2.1.1.1	Myš domácí jako modelový organismus hybridní sterility .....	12
2.2	Meióza.....	16
2.2.1	Meióza a její fáze .....	16
2.2.2	Profáze I. ....	18
3	Cíle práce .....	26
4	Materiál a metody .....	27
4.1	Myši.....	27
4.2	Izolace genomové DNA alkalickou extrakcí .....	27
4.3	Izolace vysokomolekulární DNA.....	28
4.4	Genotypizace pomocí polymerázové řetězové reakce .....	28
4.5	Elektroforéza .....	31
4.6	Váha těla a varlat.....	31
4.7	Počet spermií .....	31
4.8	Injikování cisplatiny.....	32
4.9	Analýza průběhu meiózy u samců a samic .....	32
4.10	Jednobuněčná suspenze.....	32
4.11	Imunobarvení .....	33
4.12	DNA Fluorescenční In-Situ Hybridizace (DNA FISH).....	36
4.13	Fluorescenční mikroskopie a analýza obrazu .....	37
4.14	Statistická analýza.....	37
5	Výsledky .....	38

5.1	Meiotické párování homologních chromozomů sterilních PWD/B6 F <sub>1</sub> hybridů. .....	38
5.1.1	Asynapse postihuje všechny autozomy .....	38
5.1.2	Minimální délka konsubspecifické sekvence nezbytná pro meiotickou synapsi .....	42
5.1.3	Obnova fertility sterilních hybridů .....	52
5.1.4	<i>Cis</i> a <i>trans</i> -efekt regulují míru asynapse .....	58
5.1.5	Vliv exogenních DNA dvouřetězcových zlomů na míru asynapse PWD/B6 F <sub>1</sub> hybridů .....	61
5.1.6	Detekce DNA DSBs po aplikaci cisplatiny .....	68
5.1.7	Cisplatinu podporuje synapsi meiotických chromozomů .....	76
5.2	<i>Prdm9-Hstx2</i> inkompatibilita mimo ( <i>M. m. musculus</i> x <i>M. m. domesticus</i> ) F <sub>1</sub> hybridy: Křížení ♀ (CAST x PWD) x ♂ B6 .....	79
5.2.1	Vliv genu <i>Prdm9</i> na parametry plodnosti samců (CAST x PWD) x B6 křížení .....	80
5.2.2	Vliv genu <i>Prdm9</i> na míru asynapse u (CAST x PWD) x B6 křížení .....	82
6	Diskuze .....	88
6.1	Jaký je mechanismus <i>Prdm9</i> kontrolované meiotické zástavy? .....	88
6.2	Nedostatek symetrických DSBs hotspotů ovlivňuje míru asynapse .....	90
6.3	PWD/PWD homozygotní úseky podporují meiotickou synapsi a potlačují neplodnost hybridů .....	92
6.4	Exogenní DNA DSBs snižují míru asynapse meiotických chromozomů .....	93
6.5	Role <i>Prdm9</i> v hybridech pocházejících ze tří myších poddruhů .....	94
6.6	Chromozomální a genová povaha hybridní sterility .....	95
7	Závěr .....	97
8	Seznam publikací .....	99
9	Seznam zkratk .....	100
10	Seznam použité literatury .....	103

# 1 Úvod

Rozmanitost druhů na naší planetě je způsobena evolučním procesem zvaným speciace, kdy z jednoho či více rodičovských druhů vznikne druh nový. V minulosti vzniklo mnoho teorií, modelů a metod, které se snažily proces speciace vysvětlit. Výhodnými modely pro studium diverzity druhů se stali bakterie, kvasinky a bezobratlí, kteří mají krátký generační čas a díky tomu lze snadněji zachytit jejich proces speciace. Tyto modely navíc vykazují menší počet fenotypových projevů, takže je u nich snazší hledat příčiny evolučního procesu. Avšak i mezi složitějšími organismy, jako jsou například savci, lze nalézt oddělené jasně definované poddruhy.

U pohlavně se rozmnožujících organismů hrají v procesu speciace významnou roli reprodukčně izolační mechanismy, které zabraňují toku genetické informace mezi příbuznými druhy. Jedním z těchto mechanismů je hybridní sterilita, která zapříčiňuje, že geneticky rozdílné plodné rodičovské druhy dají vzniknout neplodným potomkům. Dobzhansky-Muller model genové inkompatibility – model vysvětlující hybridní sterilitu na úrovni genů – navrhuje, že reprodukčně izolační bariéra vzniká díky epistatickým interakcím odlišně divergovaných genů (Dobzhansky 1937, Muller 1942). Studium hybridní sterility, genetických interakcí a mechanismů by mohlo vést k snadnějšímu pochopení procesu speciace.

Prvním savčím speciálním genem byl identifikován gen hybridní sterility *Prdm9* (Mihola et al. 2009). Hybridní sterilita je však pod kontrolou více genů, z nichž řada leží na chromozomu X, například lokusy hybridní sterility *Hstx1* a *Hstx2*. Interakce mezi genem *Prdm9* a lokusem *Hstx2* způsobuje u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů (hybridů mezi poddruhy *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*) asynapsi meiotických chromozomů, pachytenní zástavu a úplnou sterilitu.

Tato dizertační práce pomáhá objasnit vznik a příčinu asynapse chromozomů a meotické pachytenní zástavy, kdy záměrným včleněním různě dlouhých konspecifických (patřících stejnému poddruhu) PWD/PWD úseků do určitých chromozomů lze manipulovat s mírou asynapse daných chromozomů. Výsledky této práce jsou v souladu s nedávno navrženou teorií asymetrie DNA dvouřetězcových zlomů (Davies et al. 2016), která byla dále potvrzena i experimenty s cisplatinou indukovanými exogenními dvouřetězcovými zlomy DNA. Tato práce navíc vnáší vzhled do problematiky



hybridní sterility mezi hybridy vzniklými ze tří myších poddruhů – *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus musculus castaneus*.

## 2 Současný stav problematiky

### 2.1 Speciace a postzygotické bariéry

Speciace je klíčový evoluční proces, při kterém vznikají dva nebo více odlišných druhů a který vede k rozmanitosti druhů na naší planetě. Pochopit genetický základ speciace je hlavní cíl evolučních biologů. Od poloviny 19. století byl koncept speciace zkoumán mnoha evolučními biology. V té době si Charles Darwin, Alfred Russel Wallace a další uvědomili, že se druhy během evoluce mohou měnit a že nové druhy vznikají z již existujících druhů, které se dělí na dceřiné populace, jež se díky selekci od sebe oddělují.

Na teorii speciace měl hlavní vliv koncept reprodukční izolace, podle něhož existují reprodukční bariéry, které zabraňují křížení od sebe odlišných populací (Dobzhansky 1937). To lze vidět v Mayrově popisu biologických druhů (Mayr 1963), který říká, že druhy jsou skupiny přirozeně se křížících populací, jež jsou reprodukčně izolovány od jiných takových skupin. Mechanismy, které způsobují reprodukční izolaci a zabraňují toku genetické informace, lze rozdělit do dvou skupin – prezygotická, kdy dochází k zamezení vzniku hybridních zygot (časová a prostorová izolace, odlišné způsoby páření, neslučitelnost gamet), a postzygotická reprodukční bariéra, která snižuje pravděpodobnost vzniku plodného dospělého hybridu (Coyne & Orr 2004). V 1. polovině 20. století bylo vytvořen Dobzhansky-Muller model, který zdůrazňuje roli genové inkompatibility a epistatických interakcí při vzniku reprodukční izolace (Dobzhansky 1937, Muller, 1942). V 80. letech 20. století se s vývojem molekulárně genetických metod evoluční biologové zaměřili na zkoumání genetických základů reprodukční izolace, a to hlavně na studium hybridní sterility. Díky těmto metodám byly odhadnuty první počty genů účastnících se reprodukčně izolačních mechanismů a jejich poloha v genomu (Coyne & Orr 1989, Coyne 1992). V následujících letech byla vytvořena řada populačně genetických speciálních modelů, které pomáhaly předpovídat vznik a další evoluci reprodukčních bariér (Orr 1995, Gavrilets 1997, Turelli & Orr 2000, Barton et al. 2007). S dalším vývojem molekulárně genetických metod a se znalostí genomů různých organismů jsme poprvé schopni identifikovat jednotlivé geny, jejich transkripty a fenotypové projevy zodpovědné za genovou inkompatibilitu (Orr & Presgraves 2000, Maheshwari & Barbosh 2011, Mack & Nachman 2017).

Reprodukčně izolační bariéry zabraňují genové výměně mezi druhy, a tím udržují jejich integritu (Barton & Bengtsson 1986). Mezi vnitřní postzygotické bariéry patří

neživotaschopnost hybridů a hybridní sterilita (Coyne & Orr 2004). Evoluční biologové rozlišují tři příčiny způsobující problémy v reprodukční schopnosti hybridů – různé stupně ploidie, chromozomové přestavby nebo genovou inkompatibilitu. Polyploidie je běžná u rostlin a dále se jí nebudeme zabývat. Obecně se předpokládá, že u živočichů hraje genová inkompatibilita v hybridní sterilitě důležitější roli než strukturální rozdíly v chromozomech (Coyne & Orr 1998, viz dále Gregorova et al. 2018).

### 2.1.1 Hybridní sterilita

Hybridní sterilita je postzygotický reprodukčně izolační mechanismus, který zabraňuje toku genetické informace mezi příbuznými druhy. Hybridní sterilita je univerzální fenomén, v němž křížení mezi jednotlivci z geneticky odlišných (pod)druhů produkuje životaschopné, ale neplodné potomky. Můžeme ji pozorovat u mnoha eukaryotických mezidruhových hybridů, jako jsou kvasinky, rostliny, hmyz, ptáci a savci (Coyne & Orr 2004, Maheshwari & Barbash 2011). Přestože je hybridní sterilita dlouho zkoumaný jev, zůstávají genetika a molekulární mechanismy jejího účinku stále z velké části neobjasněné (Forejt 1996, Maheshwari & Barbash 2011, Mack & Nachman 2017, Payseur et al. 2018). Většina současných genetických znalostí hybridní sterility pochází z výzkumů na druhu *Drosophila* (Naveira & Maside 1998, Coyne & Orr 2004, Presgraves 2008, Maheshwari & Barbash 2011). Díky pozičnímu klonování bylo u drozofily odhaleno 5 genů hybridní sterility – OdsH, JYAlpha, Ovd, Hmr a Nup96 (Ting et al. 1998, Barbash et al. 2003, Presgraves et al. 2003, Masly et al. 2006, Phadnis & Orr 2009). U savců byl objeven zatím pouze jeden gen hybridní sterility, a to gen *Prdm9* (Mihola et al. 2009). Hybridní sterilita je pod kontrolou mnoha genů, z nichž se neúměrně velké množství nachází na X chromozomu (Presgraves 2008, Lu et al. 2010). Fenotypové projevy hybridní sterility mají oligogenní nebo polygenní povahu. Mezi těmito geny probíhají komplexní epistatické interakce (Sawamura et al. 2004), tyto interakce se navíc často projeví pouze po společném přenesení genů jednoho druhu na genetické pozadí jiného druhu (Palopoli & Wu, 1994), což ztěžuje jejich identifikaci.

## **I. Haldaneovo pravidlo**

Haldaneovo pravidlo je velmi rozšířený fenomén, který platí pro organismy s pohlavními chromozomy (Orr 1997, Laurie 1997). Haldaneovo pravidlo postuluje, že pokud jedno pohlaví  $F_1$  potomků dvou různých druhů chybí, je vzácné nebo je neplodné, jedná se o pohlaví heterogametické (Haldane 1922). Heterogametické pohlaví nese dva různé pohlavní chromozomy, u savců a drozofily jsou to samci s XY chromozomy a u ptáků jsou to samice s ZW chromozomy. Snaha vysvětlit Haldaneovo pravidlo vedla k návrhu několika možných teorií – teorie dominance, teorie rychlejších samců a teorie rychlejšího X.

Teorie dominance předpokládá, že interakce mezi recesivními geny ležícími na autozomech a na chromozomu X vedou ke vzniku nekompatibilit mezi rodičovskými genomy (Muller 1942, Turelli & Orr 2000, Coyne & Orr 2004). Tato nekompatibilita se může snáz projevit u heterogametického pohlaví, kdy vliv recesivní alely genu na chromozomu X nemůže kompenzovat její dominantní forma (Muller 1942, Turelli & Orr 1995, Turelli & Orr 2000).

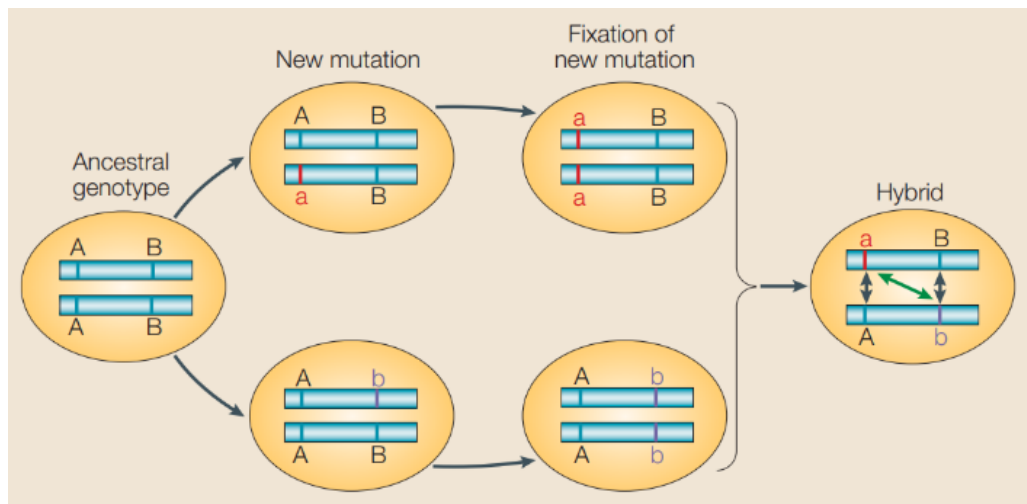
Teorie rychlejších samců předpokládá, že kvůli vyšší kompetici při pohlavním výběru dochází u samců k rychlejší kumulaci nekompatibilit (Wu & Davis 1993, Wu et al. 1996, Presgraves & Orr 1998, Tao et al. 2003). Hlavní omezení této hypotézy spočívá v tom, že nevysvětluje Haldaneovo pravidlo u heterogametických samic ZW, kdy by museli podle této teorie trpět stejnou mírou neplodnosti i samci (True et al. 1996, Tao et al. 2003).

Teorie rychlejšího X, známá též jako velký efekt chromozomu X, předpokládá, že geny vázané na X chromozom se vyvíjejí mnohem rychleji než na autozomech, což by mohlo být způsobené rychlejší fixací recesivních mutací na tomto chromozomu (Charlesworth et al. 1987).

## **II. Dobzhansky-Muller model genové inkompability**

Dobzhansky (1937) a Muller (1942) na sobě nezávisle navrhli model, který na úrovni genů vysvětluje hybridní sterilitu a neživotaschopnost hybridů. Podle tohoto modelu stojí za vznikem reprodukčně izolačních bariér epistatické interakce genů, kdy

po rozdělení populace na dvě dceřiné dochází k fixaci rozdílných mutací, takže jejich následná interakce po sekundárním kontaktu populací je škodlivá, neslučitelná s životaschopností nebo plodností. Mutace v dceřiné populaci je působením přírodního výběru kompatibilní se svým genetickým pozadím, avšak v kombinaci s alelami interagujícího genu z druhé dceřiné populace už slučitelná není (obr. 1).



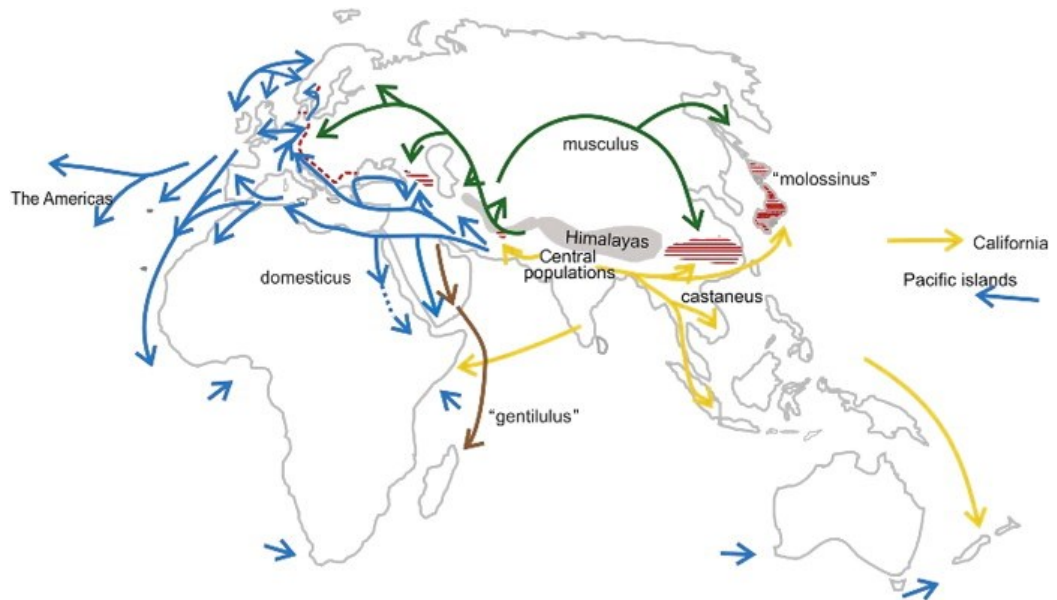
**Obr. 1. Dobzhansky-Muller model hybridní inkompatibility**

V původní populaci je genotyp AA BB. Po rozdělení populace na dvě dceřiné, se v jedné populaci A přemění mutací na a, ve druhé populaci se B změní na b. Protože a – b interakce není v původní populaci, mohou být a a b vzájemně nekompatibilní. Obrázek převzat z publikace Wu & Ting 2004.

### 2.1.1.1 Myš domácí jako modelový organismus hybridní sterility

Po drozofile je myš domácí nejčastěji používaným organismem pro studium hybridní sterility a speciace. Výzkum na myši domácí má značné výhody – krátký generační čas, velký počet mláďat, nízká cena, známá sekvence genomu, snadná dostupnost laboratorních kmenů i kmenů odvozených z divokých myší, velká škála různých komerčně vyráběných protilátek atd. Druh *Mus musculus* zahrnuje 3 poddruhy *Mus musculus musculus* (*M. m. musculus*), *Mus musculus domesticus* (*M. m. domesticus*) a *Mus musculus castaneus* (*M. m. castaneus*), které se před 350 000 lety oddělily od společného předka (She et al. 1990, Geraldés et al. 2011). *M. m. domesticus* osídlila jižní a západní Evropu, Ameriku, Afriku a Austrálii, *M. m. musculus* osídlila Asii a východní Evropu a *M. m. castaneus* kolonizovala jihovýchodní Asii a přilehlé ostrovy (Boursot et

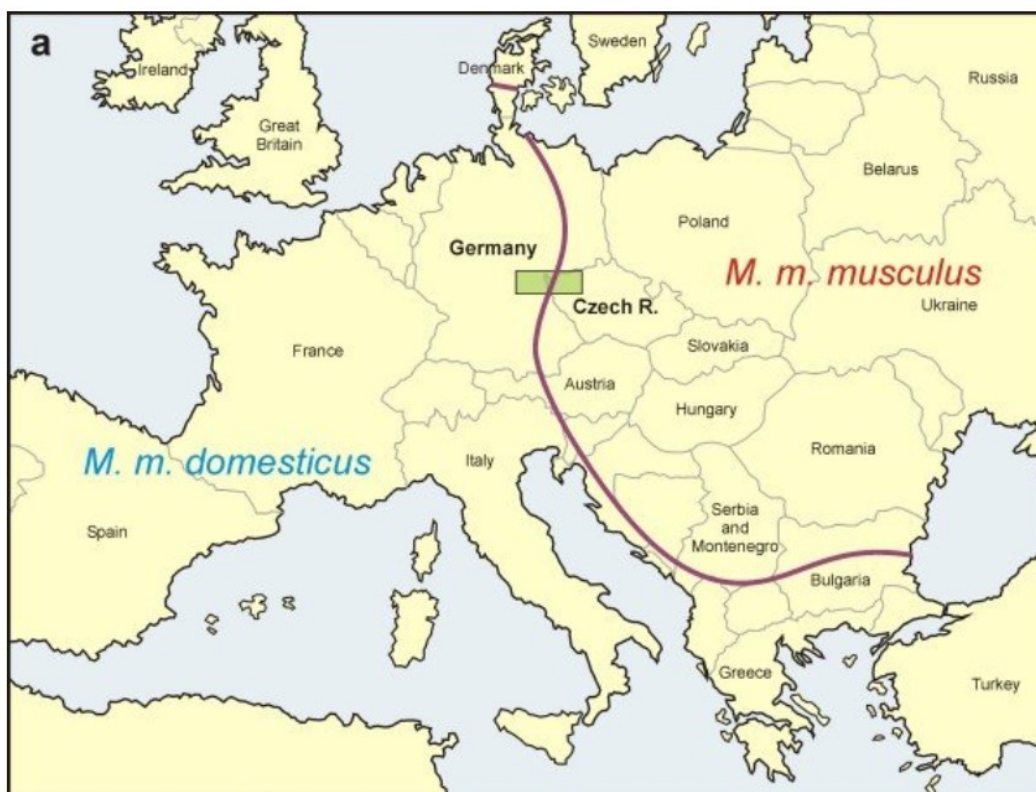
al. 1993, Guénet & Bonhomme 2003). V Japonsku můžeme nalézt *M. m. molossinus*, která vzešla z výrazného prokřížení *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* (Yonekawa et al. 1988).



**Obr. 2. Rozšíření jednotlivých poddruhů myši domácí na Zemi**

Geografické rozšíření myši domácí a znázornění jejích kolonizačních cest. Do Austrálie a Ameriky byla myš domácí zavlečena během osídlování. Obrázek převzat z Guenét et al. 2012.

Hybridní zóna je místo, kde dochází k sekundárnímu kontaktu jednotlivých poddruhů, které se mezi sebou kříží a vytváří hybridní potomstvo se sníženou plodností. Dobře popsanou hybridní zónou (obr. 3), vzniklou kontaktem mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, je úzká zóna procházející Evropou, která vede skrz Jutský poloostrov, od Baltského moře přes střední Evropu a Balkán až k Černému moři (Boursot et al. 1993, Sage et al. 1993, Macholan et al. 2003, Payseur et al. 2004). Další hybridní zóna mezi *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* byla popsána v Číně a Japonsku (Sage et al. 1993). Výzkum hybridní sterility u divokých myší odchycených v hybridní zóně (Payseur et al. 2004, Vyskocilova et al. 2005, Macholan et al. 2007, Teeter et al. 2010) ukázal významnou genetickou variaci, avšak nízkou reprodukovatelnost. Alternativou se stal výzkum hybridní sterility na inbredních myších laboratorních kmenech (Forejt & Ivanyi 1974, Forejt et al. 1991, Forejt 1996, Gregorova & Forejt 2000, Vyskocilova et al. 2005).



**Obr. 3. Hybridní zóna mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* procházející Evropou**

Hybridní zóna procházející skrz Evropu. Obrázek převzat z Macholan et al. 2008.

První genetický lokus hybridní sterility byl u obratlovců (u myši domácí – *Mus musculus*) identifikován v roce 1974 na chromozomu 17 a pojmenován *Hybrid Sterility 1 (Hst1)* (Forejt & Ivanyi 1974). Dlouholetý výzkum *Hst1* lokusu vedl k identifikaci prvního savčího genu hybridní sterility, genu *Prdm9* kódující trimethyltransferázu histonu 3 na lysinu 4 a 36 (H3K4 a H3K36) (Forejt 1985, 1996, Forejt et al. 1991, Gregorova et al. 1996, Trachtulec et al. 2005, Trachtulec et al. 2008, Mihola et al. 2009). V roce 2010 byla objevena funkce *Prdm9* genu v meiotické rekombinaci, kdy protein PRDM9 na alelicky specifických místech váže genomovou DNA a trimethyluje lysin 4 a lysin 36 histonu 3, tím určuje umístění (aktivaci) rekombinačních hotspotů (Baudat et al. 2010, Myers et al. 2010, Parvanov et al. 2010).

Další lokusy hybridní sterility leží na chromozomu X, jedná se o lokusy *Hstx1* a *Hstx2*. Lokus *Hstx1 (Hybrid Sterility X Chromosome 1)* je spojován s abnormalitami v morfologii spermií u mezidruhových myších hybridů (Storchova et al. 2004) a nese faktor *Meir1 (Meiotic Recombination 1)*, který kontroluje míru meiotické rekombinace (Balcova et al. 2016). Faktory na tomto lokusu zatím nebyly geneticky odlišeny, může se

tedy jednat i o pleiotropní účinek jediného genu. Lokus *Hstx2* (*Hybrid Sterility X Chromosome 2*) byl později mapován jako 4,7 Mb velká oblast ležící na chromozomu X (chr. X: 64,9-69,6 Mb) (Bhattacharyya et al. 2014), následně se tuto oblast podařilo zmenšit na 2,7 Mb (chr. X: 66,51-69,21 Mb) (Lustyk et al. 2019). Oba lokusy, *Hstx1* a *Hstx2*, byly v různých genetických kříženích mapovány do stejného úseku DNA a mohou, ale nemusí reflektovat totožný, dosud neurčený gen. Lokus *Hstx2* v interakci s *Prdm9* způsobuje u hybridů mezi *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 F<sub>1</sub> hybridních *M. m. musculus* (PWK/Ph; PWK) a *M. m. domesticus* (WSB/EiJ nebo LEWES/EiJ) prokázal, že podobně jako je tomu u F<sub>1</sub> hybridů PWD/B6, sterilita hybridů závisí na směru křížení (Good et al. 2008), tato asymetrie ve sterilitě hybridů byla prokázána i v dalších pracích (Forejt et al. 1991, Gregorova et al. 1996, Mihola et al. 2009, Good et al. 2010, White et al. 2011, Flachs et al. 2012). Hybridní PWD/B6 slouží jako geneticky dobře definovaný a snadno reprodukovatelný model pro hybridní sterilitu (Forejt 1996, Forejt et al. 2012). Protože v F<sub>1</sub> PWD/B6 hybridních je specifická alelická kombinace genu *Prdm9* (*Prdm9<sup>PWD/B6</sup>*) a lokusu *Hstx2* (*Hstx2<sup>PWD</sup>*) pro hybridní sterilitu nezbytná, ale nestačí k úplnému vysvětlení meiotické zástavy u hybridů, Dzur-Gejdošová et al. (2012) navrhuje tři a víc dalších genů hybridní sterility, které sice mají menší efekt, ale doplňují *Prdm9/Hstx2* interakci. Navíc v této práci objasňují asymetrii samčí neplodnosti. Důležitým fenotypem zástavy meiózy u F<sub>1</sub> hybridů je meiotická asynapse homologních chromozomů (Bhattacharyya et al. 2013, 2014). Toto selhání meiotické synapse je v průběhu evoluce pravděpodobně způsobeno postupnou mutací PRDM9 vazebných míst v každém poddruhu, což vede k asymetrii DNA DSBs hotspotů u jejich hybridů (Davies et al. 2016). Daviesova teorie o nedostatku symetrických DNA dvouřetězových zlomů (Davies et al. 2016) byla podpořena experimenty (Gregorova et al. 2018), kdy navýšením počtu symetrických DSBs pomocí náhodných úseků PWD/PWD sekvence u dvou až čtyř autozomů PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů došlo k významně zvýšené synapsi a částečnému zvrácení neplodnosti samců. Další zlepšení synapse pachytenních chromozomů bylo možné pozorovat u F<sub>1</sub> hybridů, kterým byla podána jednorázová dávka cisplatin, která způsobuje vznik exogenních dvouřetězových zlomů (Wang et al. 2018).

Pro podrobnější analýzu F<sub>1</sub> hybridní sterility byly vytvořeny chromozomálně substituční konzomické kmeny, kde byl v každém kmeni nahrazen jeden B6 chromozom



svým PWD homologem. Celkem bylo vytvořeno 18 konzomických kmenů, 9 subkonzomických kmenů a 1 konplastický kmen (Gregorova et al. 2008). Soubor subkonzomických kmenů byl navíc rozšířen o kmeny B6.PWD-Chr<sup>X1s</sup> (Bhattacharyya et al. 2013), B6.PWD-Chr<sup>X64-69</sup> a B6.PWD-Chr<sup>X66-69</sup> (Lustyk et al. 2019).

## 2.2 Meióza

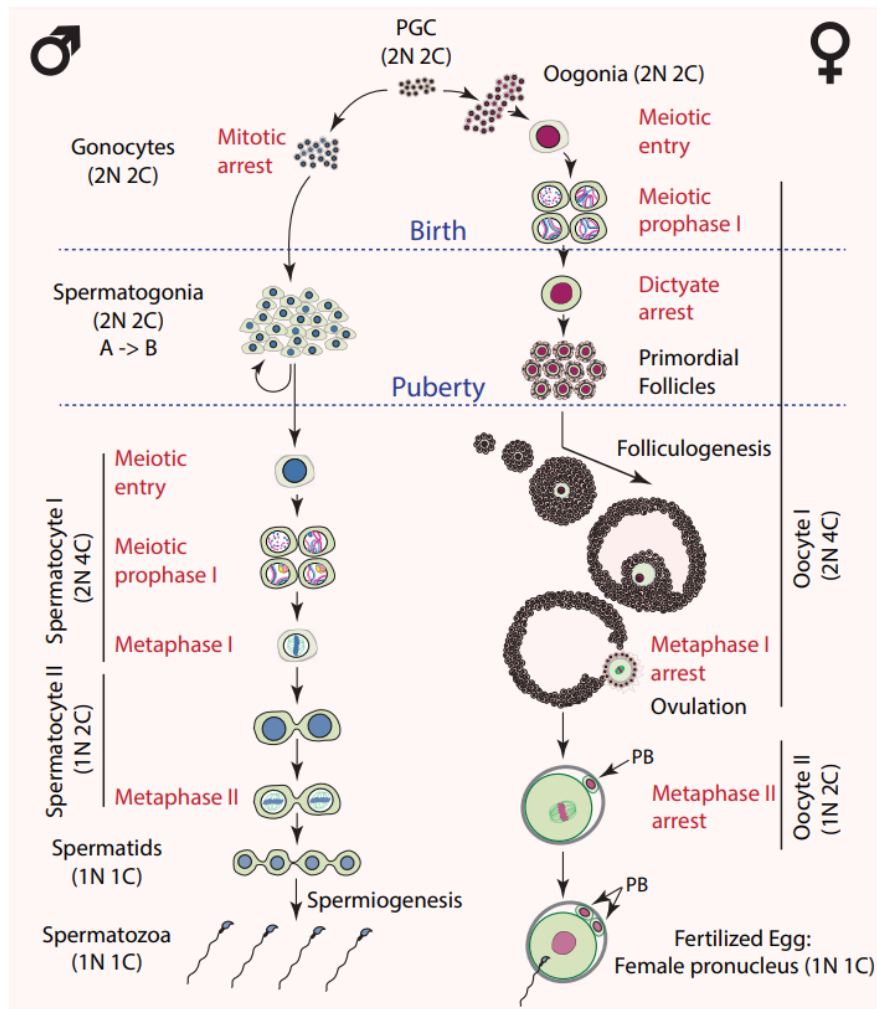
### 2.2.1 Meióza a její fáze

Abychom mohli sledovat molekulární příčiny poruch plodnosti, musíme se zaměřit na proces tvorby pohlavních buněk. Meióza je jednou z nejdůležitějších částí v procesu utváření gamet u pohlavně se rozmnožujících organismů. Meióza je speciální typ buněčného dělení, kdy na rozdíl od mitózy je jedna DNA replikace následována dvěma buněčnými děleními (meióza I. a meióza II.), čímž dochází v buňce ke snížení počtu chromozomů na polovinu a vede ke vzniku haploidních gamet – spermie a vajíčka (Bolcun-Filas & Schimenti 2012). První meiotické dělení je redukční, během něho se mateřské a otcovské chromozomy oddělují do dceřiných buněk. Během druhého meiotického dělení jsou odděleny sesterské chromatidy a to vede ke vzniku haploidních gamet. Z jedné mateřské buňky tedy vzniknou čtyři buňky dceřiné. Během meiózy dochází díky genetické rekombinaci k promíchání mateřských a otcovských genomů, což zapříčiňuje vznik nových alelických kombinací a tím i genetickou diverzitu. Navíc se díky meióze mezi generacemi udržuje správná ploidie (Zickler & Kleckner 1998, Bolcun-Filas & Schimenti 2012, Alberts et al. 2014).

Do gametogeneze vstupují zárodečné pohlavní buňky (PGC – primordial germ cells) v 7. dnu embryonálního vývoje, kdy kolonizují embryonální genitální brázdu (Saitou & Yamaji 2012). Jejich pozdější diferenciaci do spermatogonií nebo oogonií je regulována vnitřními buněčnými faktory i faktory z okolních tkání. Samci a samice mají rozdílné časování průběhu meiózy. Samičí meióza začíná už v období fetálního vývoje, kdy první meiotické dělení dojde do diplotenního stádia, ve kterém setrvává až do hormonální iniciace dalšího zrání. Samčí pohlavní buňky se naopak začínají vyvíjet až během postnatálního vývoje (Adams & McLaren 2002).

Meióza I. a II. se rozdělují na 4 fáze – profázi, metafázi, anafázi a telofázi. Meióza začíná po skončení poslední DNA replikace, kdy se ze spermatogonií nebo oogonií stanou

primární meiocyty. Následuje profáze I., která je nejdelší a zároveň nejkritičtější fází meiózy. Profázi I. rozdělujeme na leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakinezi. V této fázi dochází k párování homologních chromozomů, mezi kterými dochází k rekombinaci. V místě rekombinace vzniká fyzické propojení, chiasma, které je nezbytné pro správné rozdělení do dceřiných buněk, čímž končí meióza I. Sekundární meiocyty vstupují do meiózy II., která probíhá podobně jako mitóza (vyjma replikace DNA). Během meiózy II. dojde k rozchodu sesterských chromatid a výsledkem je, že z jedné zárodečné diploidní buňky vzniknou 4 dceřiné haploidní gamety. U samců vznikají 4 spermie, zatímco u samic vznikne 1 vajíčko a 3 pólová tělíska, a to pouze pokud dojde k oplodnění (Bolcun-Filas & Schimenti 2012, Alberts et al. 2014).



**Obr. 4. Gametogeneze a meióza**

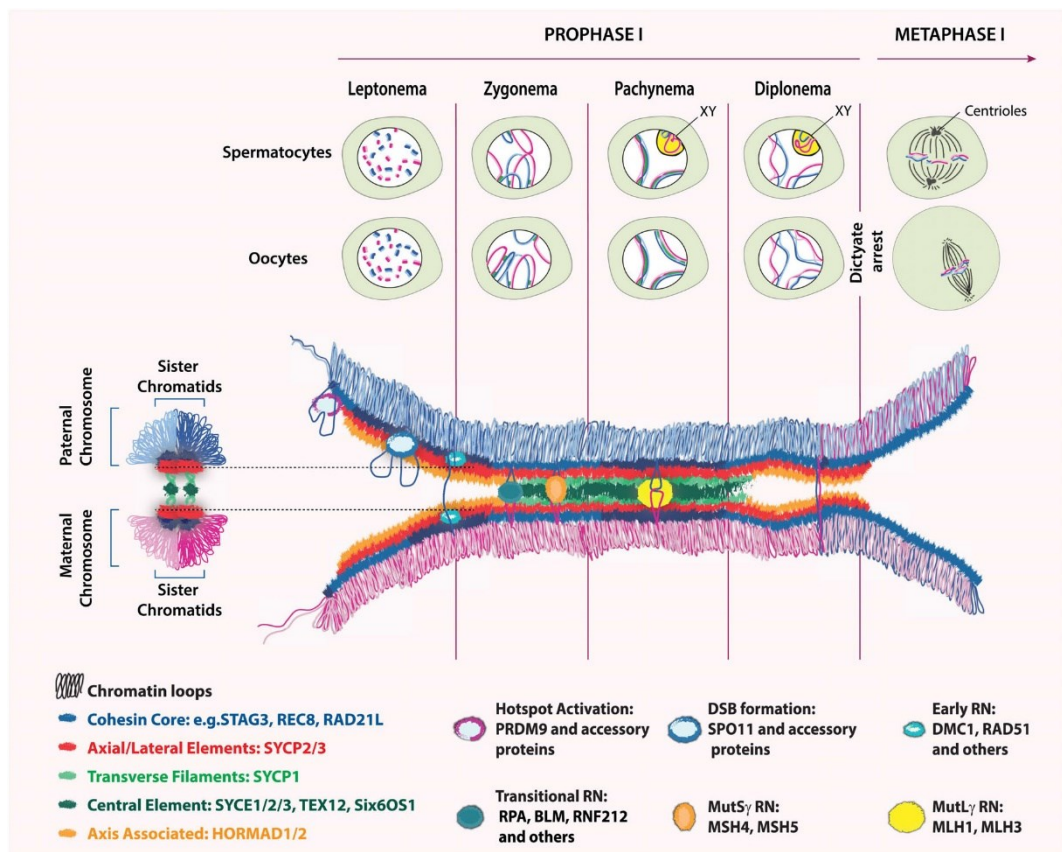
Toto schéma zobrazuje gametogenezi (černé písmo) a meiózu (tmavě červené písmo) v mužské (levé) a ženské (pravé) zárodečné linii. Čísla zdůrazňují obsah DNA (hodnota C) a počet sad chromozomů (hodnota N, ploidie) v zárodečných buňkách v různých stádiích. Obrázek převzat z Bolcun-Filas & Handel 2018.

## 2.2.2 Profáze I.

Profáze I. je nejdůležitější částí meiózy. Zároveň je to fáze, která odlišuje meiózu od mitózy. Během meiotické profáze I. dochází k párování homologních chromozomů a jejich vzájemné synapsi. Proces synapse homologů je završen formováním synaptonemálního komplexu.

Jednotlivá stádia meiotické profáze I. jsou definována strukturou a umístěním jednotlivých chromozomů (Handel & Schimenti 2010).

Během profáze I. jsou telomery důležité pro chromozomální a genomovou stabilitu. V profázi I. jsou telomery připojeny k jadernému obalu a vykazují dynamický pohyb, a to hlavně v přechodu mezi leptotenem a zygotenem, kdy se shromažďují v určitých místech a tvoří „buket“. Předpokládá se, že v buketu dochází k interakci homologních chromozomů a jejich párování (Bolcun-Filas & Schimenti 2012).



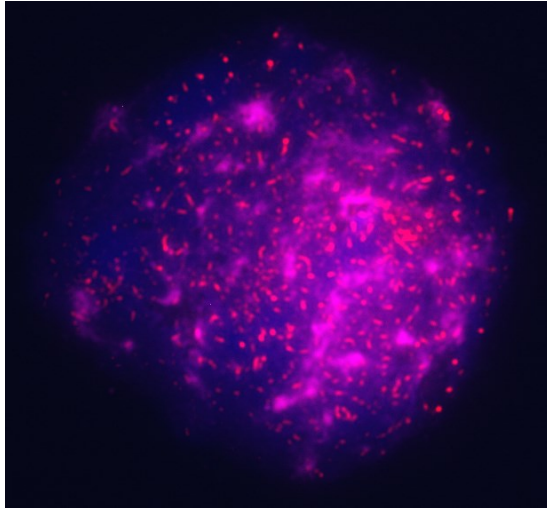
**Obr. 5. Formace synaptonemálního komplexu během profáze I.**

Synapse a desynapse během profáze I. u samců. Nahoře jsou zobrazeny meiocyty procházející profází I. Uprostřed je zobrazen řez osou chromozomu a synaptonemálním komplexem i s proteiny rekombinačního mechanismu. Obrázek převrat z Bolcun-Filas & Handel 2018.

## I. Leptotene

Chromozomy jsou v leptotenu dlouhé, tenké, dekondenzované a vypadají jako vlákno (Zickler & Kleckner 1998).

V tomto stádiu se mezi sesterskými chromatidami začíná tvořit „lešení“ vzniklé ze spojení axiálních elementů (AEs) a proteinů synaptonemálního komplexu. Axiální elementy jsou tvořeny jádrovými proteiny zvanými koheziny. Koheziny specifické pro meiózu jsou STAG3, SMC1 $\beta$  a REC8 (Prieto et al. 2001, Revenkova et al. 2001, Eijpe et al. 2003). Společně s koheziny, kondenziny I a II hrají klíčovou roli při utváření a segregaci meiotických chromozomů (Lee 2013). Spojení pomocí AEs udržuje sesterské chromatidy spojené až do druhého meiotického dělení. Homologní chromozomy se k sobě začínají rovnat, ale zatím nedochází k jejich párování. V této fázi dochází ke vzniku programovaných dvouřetězcových zlomů (DSBs) vyvolaných DNA topoisomérázou *Spo11* (Keeney 2008). Bez těchto zlomů by nemohlo dojít k rekombinaci (Baudat et al. 2013, Bolcun-Filas & Handel 2018). Vzniklé DSBs je nutné opravit, ale na rozdíl od mitózy jsou DSBs opravovány podle homologní chromatidy, a ne podle sesterské chromatidy (Lao & Hunter 2010). Místa DSBs jsou určena genem *Prdm9*, který se specificky váže na DNA a trimethyluje lysin 4 nebo lysinu 36 na histonu 3 (Hayashi et al. 2005, Wu et al. 2013, Baker et al. 2014, Powers et al. 2016). Vznik DSBs vede k fosforylaci histonu H2AX na  $\gamma$ H2AX, do míst DSBs se váží proteiny DMC1 a RAD51, které stabilizují meziproducty výměny vláken (Neale & Keeney 2006, Handel & Schimenti 2010, Bolcun-Filas & Schimenti 2012). Vznik a oprava DSBs jsou nezbytné pro vytvoření synaptonemálního komplexu podél celé délky homologních chromozomů (Kauppi et al. 2013). V leptotene se AEs formují nejprve v krátkých úsecích, které se postupně prodlužují (Handel & Schimenti 2010, Bolcun-Filas & Schimenti 2012).



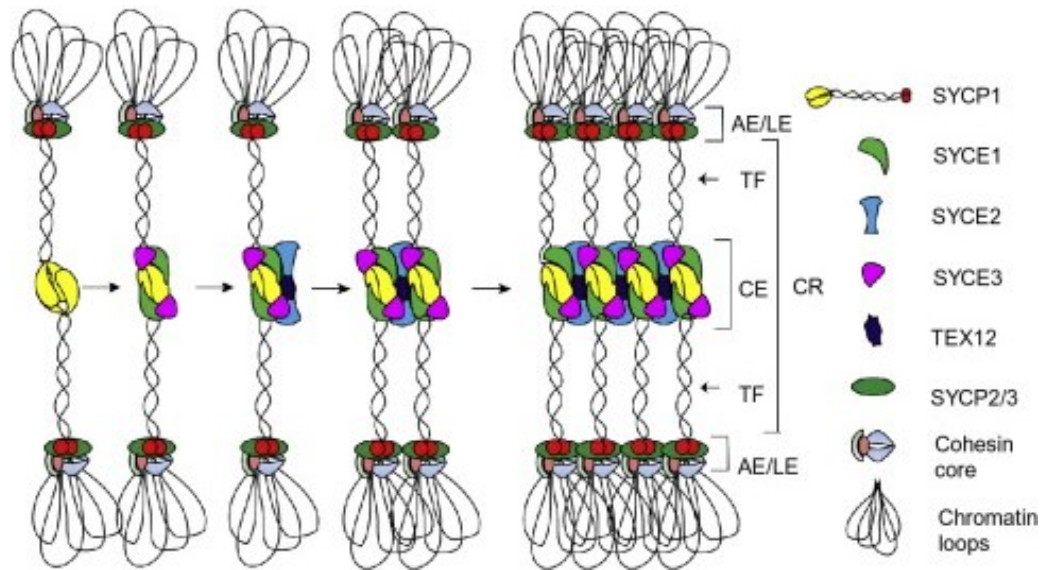
**Obr. 6. Leptotenní jádro**

Jádro leptotenního spermatocyty. Červeně je značen protein synaptonemálního komplexu SYCP3, fialově je značena forforylovaná varianta histonu  $\gamma$ H2AX, modře je značeno jádro.

## II. Zygotene

V zygotenu se chromozomy zkracují a ztlušťují, což značí, že se homologní chromozomy dostávají do těsné blízkosti (Zickler & Kleckner 1998).

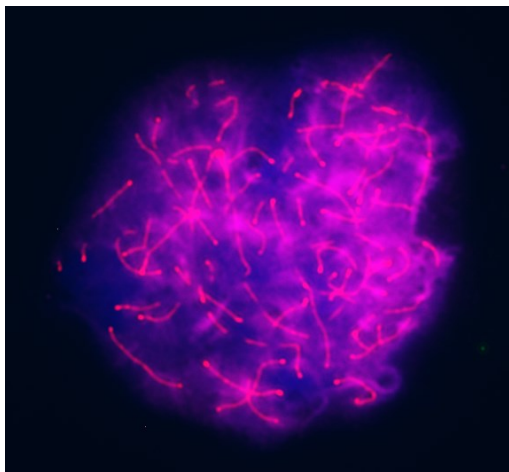
Párování homologních chromozomů se prodlužuje, dochází k zahájení synapse, formuje se synaptonemální komplex. Synaptonemální komplex (obr. 7) je proteinová struktura, která se mezi dvěma homologními chromozomy postupně tvoří a následně zaniká. Axiální elementy se začínají propojovat pomocí struktury, která je zvaná centrální element (CE), a tím se vytváří laterální elementy (LEs) synaptonemálního komplexu. Laterální elementy jsou s centrálním elementem spojeny pomocí příčných vláken (Handel & Schimenti 2010, Bolcun-Filas & Schimenti 2012).



**Obr. 7. Utváření synaptonemálního komplexu**

Proteiny SYCP1 se svými C-konci váží k axiálnímu elementu (SYCP2 a 3) a svými N-konci se spojují mezi sebou. Tato N-koncová propojení jsou stabilizována proteinem SYCE1. Vznikají krátké úseky, které jsou mezi sebou propojovány SYCE2, tím dochází k prodlužování a utváří se synaptonemální komplex podél celého chromozomu. Obrázek převzat z Bolcun-Filas & Schimenti 2012.

Na začátku zygotenu už mají homologní chromozomy nalezeny svoje správné protějšky a v místě axiálních elementů dochází k propojování a vytváření sypanse (Mahadevaiah et al. 2001). Během tohoto procesu se z axiálních elementů (obsahující proteiny SYCP2 a SYCP3 – Synaptonemal Complex Protein 2 a 3, HORMAD1 a HORMAD2 – HORMA containing-domain protein 1 a 2) stávají laterální elementy a proteiny centrálního elementu (SYCP1 – Synaptonemal Complex Protein 1, SYCE1 a 2 – Synaptonemal Complex Central Element Protein 1 a 2, TEX12 – Testis-expressed Protein 12) formují centrální zónu synapsovaných homologů (de Vries et al. 2005, Hamer et al. 2006, Bolcun-Filas et al. 2007, 2009, Handel & Schimenti 2010, Bolcun-Filas & Schimenti 2012). V zygotenu začíná i proces opravy DSBs. Nejčastější způsoby opravy jsou SDSA (synthesis-dependent strand annealing) cesta, kdy dochází k opravě pomocí non-crossoverů, která má za výsledek genovou konverzi (Paques & Haber 1999, Allers & Lichten 2001) a DSBR (double-strand break repair) cesta, která může vést jak ke vzniku crossoverů, tak ke vzniku noncrossoverů a genové konverzi (Szostak et al. 1983).



**Obr. 8. Zygotenní jádro**

Jádro zygotenního spermatocyty. Červeně je značen protein synaptonemálního komplexu SYCP3, fialově je značena forforylovaná varianta histonu  $\gamma$ H2AX, modře je značeno jádro.

### III. Pachytene

V pachytenu jsou chromozomy kratší, silnější, kondenzované a jsou těsněji spojeny. Nicméně na konci tohoto stádia je toto uspořádání ztraceno a konce chromozomů jsou rovnoměrně rozmístěny podél vnitřního povrchu jaderného obalu (Zickler & Kleckner 1998).

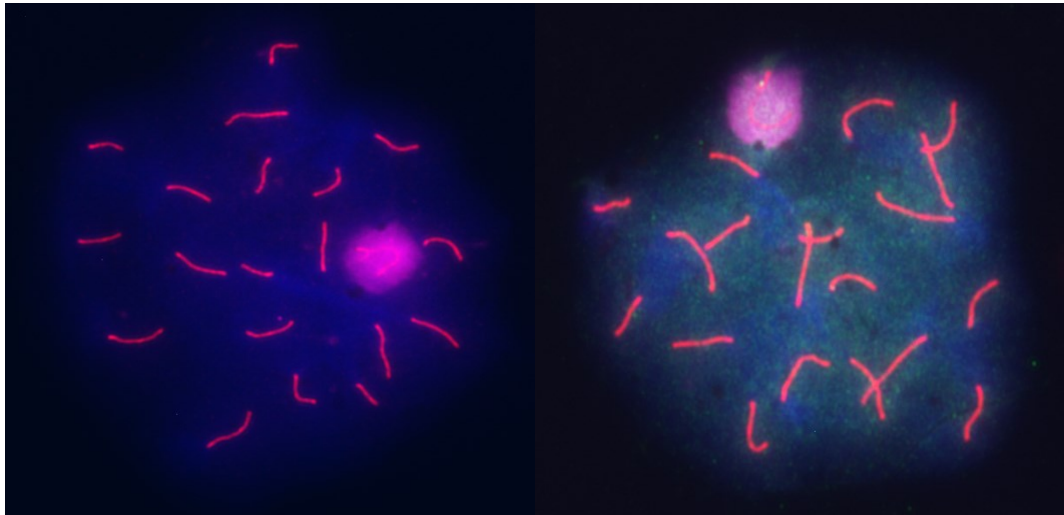
Hlavním úkolem pachytenního stádia je dokončení synapse, ke kterému dochází vytvořením všech tří částí synaptonemálního komplexu podél celé délky chromozomu. V tomto stádiu je zřetelná centrální zóna synaptonemálního komplexu, která je tvořena proteiny SYCP1, SYCE1 a SYCE2.

Pachytenní fáze je velmi dlouhá (u myši cca 6 dní) a zahrnuje zrání určitých rekombinačních míst na „crossing-over“ (CO), které jsou označeny pomocí proteinů MLH1 (MutL protein homolog 1) a MLH3 (MutL protein homolog 3) (Edelmann et al. 1996, Holloway et al. 2008).

Meiotická rekombinace generuje genetickou rozmanitost a vede k vazbě mezi homologními chromozomy, což zajišťuje správnou segregaci chromozomů (Bolcun-Filas & Schimenti 2012). Homologní meiotická rekombinace a synapse je zahájena vznikem geneticky programovaných dvouřetězcových zlomů DNA, a to jak u savců, tak u kvasinek. Tyto zlomy jsou opraveny pomocí crossoverů (CO) nebo noncrossoverů

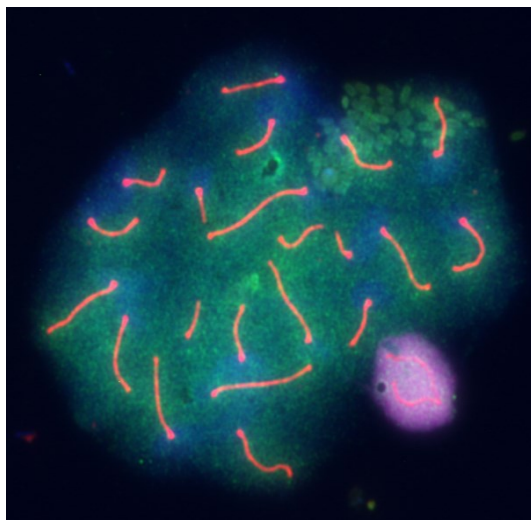
(NCO). CO tvoří pouze 10 % z opravených DSBs (Cole et al. 2012), zbylých 90 % je opraveno pomocí NCO. Rozložení CO či NCO v genomu není náhodné. Byla zjištěna místa zvaná hotspots, kde častěji dochází ke vzniku DSBs a coldspots, kde naopak k této události dochází zřídka. U myši jsou potenciální hotspots rekombinace označeny methylovací histonu H3 na lysinu 4 a 36 PRDM9 proteinem (Powers et al. 2016). Vznik CO je přísně regulován. Za první, každý chromozomový pár musí mít alespoň jeden CO (Cole et al. 2012). Za druhé, je znám jev zvaný CO interference, kdy společný výskyt dvou CO v těsné blízkosti je vysoce nepravděpodobný (Petkov et al. 2007). Za třetí, celkový počet CO je určený geneticky, což vede ke srovnatelnému počtu CO bez ohledu na počet předcházejících DSBs (Cole et al. 2012, Balcova et al. 2016). Vznik CO vede k následnému utvoření chiasmat, která jsou nezbytná pro správné spárování a segregaci homologních chromozomů (Bolcun-Filas & Schimenti 2012).





Časný pachytene

Střední pachytene



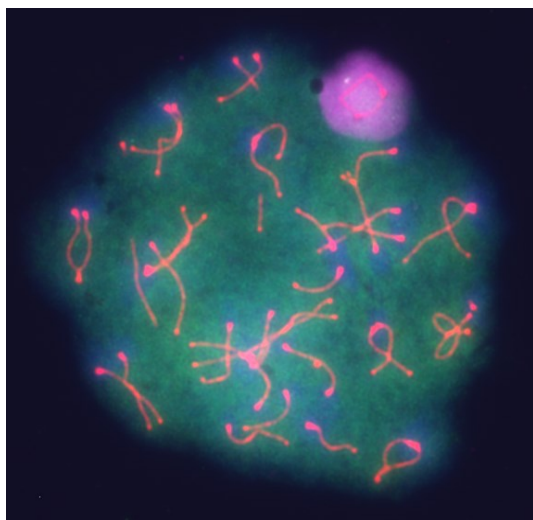
Pozdní pachytene

### Obr. 9. Pachytenní jádra

Jádra pachytenních spermatocytů. Červeně je značen protein synaptonemálního komplexu SYCP3, fialově je značena forforylovaná varianta histonu  $\gamma$ H2AX, zeleně je značen histon H1t linker, modře je značeno jádro. Pomocí H1t linkeru lze odlišit stádia meiocytů od pachytene dál, v časném pachytene se H1t neváže nebo velmi slabě, s postupující profází I. síla zbarvení roste.

## IV. Diplotene

V diplotenu je chromatin difúzní a dochází ke ztrátě části synaptonemálního komplexu. Chromozomy podléhají desynapsi, kdy dochází k odstranění příčných vláken a centrálních elementů, homology jsou od sebe částečně odděleny, zůstávají však spojeny pomocí chiasmát (Zickler & Kleckner 1998, Handel & Schimenti 2010).



**Obr. 10. Diplotenní jádro**

Jádro diplotenního spermatocytu. Červeně je značen protein synaptonemálního komplexu SYCP3, fialově je značena forforylovaná varianta histonu  $\gamma$ H2AX, zeleně je značen histon H1t linker, modře je značeno jádro. Na obrázku lze pozorovat chiasmata spojující homologní chromozomy.

## V. Diakineze

Diakineze je konečnou fází profáze I., během této fáze dochází ke zmenšování bivalentů, které mění svoji velikost až do metafáze I., kde jsou srovnatelně velké s jejich mitotickými metafázními protějšky (Zickler & Kleckner 1998).

### 3 Cíle práce

Tato práce má za cíl svými poznatky přispět k porozumění jevu hybridní sterility jako jednoho z postzygotických izolačních reprodukčních mechanismů přispívajícího k procesu speciace. V práci byly jako model savčí hybridní sterility použity inbrední myši kmeny pocházející ze tří poddruhů myši domácí, *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus musculus castaneus*.

#### 1. Objasnění mechanismu asynapse u sterilních hybridů

Cílem této části projektu bylo prozkoumat vztah mezi *Prdm9*-kontrolovanou meiotickou zástavou a asynapsí u sterilních hybridů začleněním náhodně dlouhých konsubspecifických homologních úseků do několika autozomálních párů, u kterých jsme analyzovali jejich schopnost vytvářet synaptonemální komplexy a vliv na fertilitu. Navíc jsme chtěli objasnit vztah nedostatečného počtu správně opravených PRDM9-dependentních dvouřetězcových zlomů DNA k asynapsi a meiotické zástavě.

#### 2. Ověření vlivu exogenních dvouřetězcových zlomů DNA na párování chromozomů sterilních hybridů

Cílem tohoto projektu bylo ověřit zjištění objevená v bodě 1 (Gregorova et al. 2018), tedy že nedostatek správně opravených dvouřetězcových zlomů je zodpovědný za vznik asynapse. Zjišťovali jsme, zda zvýšený počet dvouřetězcových zlomů DNA po aplikaci cisplatin povede k zlepšení meiotické synapse chromozomů.

#### 3. Ověření úlohy genu *Prdm9* v samčí plodnosti hybridů s genomem pocházejícím ze tří myších poddruhů

Mezipoddrhová heterozygotita genomu je důležitou složkou hybridní sterility (Bhattacharyya et al. 2013), kdy jsou za F<sub>1</sub> hybridní sterilitu zodpovědní gen *Prdm9* a lokus *Hstx2*. Cílem tohoto projektu bylo ověřit hypotézu, zda genotyp *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup>, *Hstx2*<sup>PWD</sup> bude dominantní pro asynapsi chromozomů a meiotickou zástavu i v genomu pocházejícím z 25 % z třetího myšího poddruhu, *Mus musculus castaneus*.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Myši

Inbrední laboratorní kmen C57BL/6J (dále jen B6) odvozen z myšího poddruhu *Mus musculus domesticus* pocházel z The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA), inbrední laboratorní kmen CAST/EiJ (dále jen CAST) odvozen z poddruhu *Mus musculus castaneus* byl dovezen z University of Oxford (Oxford, Velká Británie), myší kmen PWD/Ph (Prague Wild D) byl odvozen z divokých myší poddruhu *Mus musculus musculus* (Gregorova & Forejt 2000) v Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky (ÚMG AV ČR), kde jsou od té doby tyto kmény udržovány pomocí inbredního křížení. Konzomické kmény C57BL/6JChr<sup>#PWD</sup> (dále v textu popsané B6.PWD-Chr<sup>#</sup>) byly též připraveny na ÚMG AV ČR (Gregorova et al. 2008).

Všechny kmény byly ustájeny v SPF (Specific Pathogen Free) chovech na Ústavu molekulární genetiky AV ČR s cyklem 12 hod. světlo/12 hod. tma. Myši měly neustálý přístup k čisté vodě a potravě (VELAZ, ST-1, 3,4 % tuku).

Při práci s myšmi byly dodržovány zákony České republiky na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb).

### 4.2 Izolace genomové DNA alkalickou extrakcí

Izolace genomové DNA byla připravována podle protokolu (Truett *et al.* 2000). K izolaci genomové DNA byla použita část odstřiženého ocásku nebo ucha (cca 2 mm), která byla přidána do 600  $\mu$ l 50 mM NaOH. Tkáň s roztokem byla po dobu 90 minut zahřívána v pícce na 95 °C. Vzorek byl následně zchlazen a neutralizován 50  $\mu$ l 1M Tris (pH 8) s lehkým promícháním roztoku pomocí převrácení zkumavky. Poté byl vzorek 6 min stáčen na stolní centrifuze na maximální otáčky 16900xg. Takto vyizolovanou DNA bylo možné okamžitě použít na genotypizaci, případně DNA uložit do 4 °C (na dobu 2 týdnů).

### 4.3 Izolace vysokomolekulární DNA

K této izolaci byly použity Kity Gentra® Puregene® Core Kit A od firmy Qiagen. Kousek sleziny, případně ocásku byl rozstříhán v 300 µl roztoku „Cell lysis solution“, poté bylo do zkumavky přidáno 1,5 µl proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml. Vzorek byl jemně promíchán převrácením zkumavky 25x a byl inkubován přes noc na mini-rotátoru RS-24 Biosan v termostatu při 55 °C. Následně byl vzorek při pokojové teplotě zcentrifugován 1 min při 1400xg, poté z něj byl odebrán supernatant do nových 1,5ml zkumavek. Poté bylo 1,5 µl Rnázy A přidáno k supernatantu a zkumavka s roztokem byla opatrně 25x převrácena. Dále byl vzorek 1 hod. při 37 °C mírně protřepáván v termomixéru Comfort Eppendorf. Ihned po inkubaci byl vzorek přesunut na 1 min na led, kde do něj bylo přidáno 100 µl roztoku „Protein precipitation solution“. Následně byl vzorek míchán po dobu 20 s a při pokojové teplotě centrifugován 3 min na maximální otáčky 16900xg, zde došlo k vysrážení proteinů. Supernatant byl přenesen do nových 1,5ml zkumavek a bylo k němu přidáno 300 µl isopropanolu. Vzorek byl jemně 25-50x převrácen, díky čemuž došlo k vysrážení DNA, poté byl při pokojové teplotě centrifugován 1 min na maximální otáčky 16900xg. Supernatant byl opatrně odsát a DNA ve formě pelety byla promyta 300 µl 70% ethanolu. Následovala centrifugace 1 min na maximální otáčky 16900xg, supernatant byl opět odsát a peleta byla při pokojové teplotě 5 min sušena. K peletě bylo přidáno 25 µl roztoku „Hydratation solution“, vzorek byl 5 s promícháván a 1 hod. inkubován v termomixéru při 65 °C, kdy došlo k částečnému rozpuštění DNA. Pro dokonalé rozpuštění DNA byl vzorek při pokojové teplotě mírně přes noc protřepáván v termomixéru. Další den byla koncentrace a kvalita DNA změřena pomocí poměru A260/A280, A260/A230 na spektrofotometru. Vzorek DNA byl následně uskladněn při 4 °C.

### 4.4 Genotypizace pomocí polymerázové řetězové reakce

Základní genotypizační reakce obecně probíhala v 20 µl reakční směsi.

Pro tuto práci byly nejčastěji využívány tyto primery:

- Chromozom 5 – D5Mit346, D5Mit49, D5Mit178, D5Mit349, D5Mit386, D5Mit106, D5Mit302, D5Mit303, D5Mit277, D5Mit136, D5Mit138, D5Mit140, D5Mit59, D5Mit63, D5Mit326, D5Mit102
- Chromozom 7 – D7Mit21, D7Mit191, D7Mit180, D7Mit265, D7Mit246, D7Mit31, D7Mit66, D7Mit71, D7Mit259
- Chromozom 12 – D12Mit37, D12Mit215, D12Mit49, D12Mit11, D12Mit136, D12Mit147, D12Mit285, D12Mit118, D12Mit7, D12Mit20
- Chromozom 15 – D15Mit175, D15Mit130, D15Mit9, D15Mit138, D15Mit113, D15Mit270, D15Mit234, D15Mit67, D15Mit215, D15Mit161, D15Mit43, D15Mit97, D15Mit40, D15Mit16, D15Mit79
- Chromozom 16 – D16Mit55, D16Mit165, D16Mit29, D16Mit57, D16Mit12, D16Mit83, D16Mit76, D16Mit71
- Chromozom 17 – D17Mit19, D17M334, D17M634, D17Mit81, D17Mit33, D17Mit50, D17Mit139, D17Mit152, D17Mit93, D17Mit122, D17Mit155, D17Mit123
- Chromozom 18 – D18Mit66, D18Mit22, D18Mit84, D18Mit70, D18Mit149, D18Mit53, D18Mit55, D18Mit54, D18Mit124, D18Mit184, D18Mit209, D18Mit185, D18Mit7, D18Mit25
- Chromozom 19 – D19Mit32, D19Mit61, D19Mit128, D19Mit96, D19Mit46, D19Mit11, D19Mit71
- Chromozom X – SR51

Zdroj primerů: Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>

**Tab. 1. Reakční směs pro amplifikaci markerů u křížení (CAST x PWD) x B6**

Směs	Množství (μl)
10x Taq pufr s KCl	2
MgCl <sub>2</sub>	0,8
Primery (10mM)	0,25 (každý)
dNTP (10mM každý)	0,4
Taq Polymeráza	0,15
H <sub>2</sub> O	14,15
DNA	2

**Tab. 2. PCR cyklus pro SNP D17M634**

Cyklus	Teplota (°C)	Čas (s)
1	95,0	120
2c	94,0	35
3c	53,5	40
4c	72,0	40
5	72,0	180
6	8,0	∞

Cykly 2c-4c byly opakovány 39x

**Tab. 3. PCR cyklus pro SNP SR51**

Cyklus	Teplota (°C)	Čas (s)
1	95,0	120
2c	94,0	35
3c	55,0	40
4c	72,0	40
5	72,0	180
6	8,0	∞

Cykly 2c-4c byly opakovány 39x

## 4.5 Elektroforéza

PCR amplikony byly rozděleny na horizontální gelové elektroforéze za pomoci 2% (w/v; fragmenty větší než 250 bp), 4% (w/v; fragmenty 150 až 250 bp ) nebo 5% (w/v; fragmenty menší než 150 bp) agarózových gelů. Interkalační látka ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml) či roztok fluorescenční barvy Midori Green (Nippon Genetics) sloužily k zviditelnění DNA pomocí UV světla. Oba tyto roztoky byly přidány přímo do gelu před jeho ztuhnutím a to v množství 10  $\mu$ l EtBr nebo 2  $\mu$ l Midori green na 100 ml gelu. Vzorek se nanášel na gel společně s nanášecí barvou Orange G s glycerolem. Při elektroforéze byl použit 0,5x TBE pufr. Elektroforéza byla puštěna pod napětím 8,4 V/cm.

## 4.6 Váha těla a varlat

Před pitvou byli jednotliví samci zváženi (BW – body weight – hmotnost těla v gramech), následně jim během pitvy byla zvážena i jejich varlata (TW – testes weight – hmotnost varlat v miligramech). Tyto dva fenotypy sloužily k první orientaci plodnosti samců.

## 4.7 Počet spermií

Samcům byla během pitvy odebrána nadvarlata (*epididymis*), která sloužila k určení počtu spermií. Celá nadvarlata byla přidána do 0,5 ml vychlazeného 1x PBS, následně byla nůžkami rozstříhána a vzorkem bylo silně zatřepáno, aby došlo k uvolnění spermií. Vzorek byl cca 2 min ponechán na stole, poté bylo z mezivrstvy s uvolněnými spermii odebráno 10  $\mu$ l vzorku. Vzorek byl podle potřeby naředěn či rovnou nanesen do Bürkerovy počítací komůrky. Spermie byly pod světelným mikroskopem spočítány ve 25 čtvercích (obě diagonály Bürkerovy komůrky + 1 čtverec). Koncentrace spermií v 1 ml se rovná počtu spermií v 25 čtvercích x 10 000 x zředění.



## 4.8 Injikování cisplatiny

Pro injikování cisplatiny byli použiti samci ve věku 6-12 týdnů. Cisplatina (cisPt) byla vždy čerstvě rozpuštěna v 0,9% NaCl v koncentraci 1 mg/ml a intraperitoneálně injektována v koncentraci 1 mg/kg, 5 mg/kg nebo 10 mg/kg hmotnosti těla.

## 4.9 Analýza průběhu meiózy u samců a samic

Protokol pro přípravu a pozorování imunocytochemických preparátů pomocí hypotonického roztoku (Anderson et al. 1999) byl upraven a optimalizován pro naše využití.

K analýze průběhu samčí meiózy byli použiti samci ve věku 8–12 týdnů.

## 4.10 Jednobuněčná suspenze

Pro přípravu jednobuněčné suspenze byly použity tyto roztoky:

- fixační roztok 1% PFA – 50mM borát sodný (pH 9,2), 32% PFA, 15% triton X-100, 7x inhibitory proteáz (Roche, #1836153)
- 0,1 M sacharóza – 1 M sacharóza, millipore voda, 7x inhibitory proteáz (Roche, #1836153)
- RPMI (Sigma, R8758)
- 1x PBS

Pro přípravu imunocytochemických preparátů bylo nutné zhotovit jednobuněčnou suspenzi. Pro přípravu suspenze bylo potřebné nejprve protřepáním rozvolnit semenotvorné kanálky varlete, staženého z tuniky, v 1 ml vychlazeného roztoku RPMI. Supernatant byl odebrán a ke vzorku doplněn nový 1 ml roztoku RPMI, roztok s kanálky byl opět řádně promíchán. Tento krok je možné opakovat vícekrát. Poté byl vzorek centrifugován při otáčkách 435xg po dobu 30 s a supernatant odebrán. Do zkumavky bylo přidáno 100  $\mu$ l RPMI a testikulární kanálky byly pečlivě rozstříhány, RPMI doplněno do objemu 1 ml. Roztok byl pomocí ustřížené Eppendorf špičky a pipety nasát 10x tam

a zpět, poté byl přefiltrován přes sítko BD Falcon 40 µm cell strainer (Corning, #352340) do nové zkumavky. Z přefiltrovaných vzorků byl pomocí Bürkerovy komůrky spočítán z 25 čtverců počet buněk na 1 ml. Následně byl podle zjištěného počtu buněk na 1 ml odebrán příslušný objem vzorku, který byl dále centrifugován při otáčkách 435xg po dobu 30 s a byl odebrán přebytečný supernatant. Ke stočeným buňkám byla přidána 0,1M sacharóza s roztokem inhibitorů proteáz (co sklo, to 100 µl). Roztok sacharózy s buňkami byl následně rozkapán pomocí pipety na předem připravená sklíčka s 100 µl fixačního roztoku 1% PFA temperovaných ve vlhkých komůrkách při 4 °C. Skla se vzorky byla inkubována po dobu 3 hod. při 4 °C. Následně se skla opláchla pomocí superčisté millipore vody a nechala se na vzduchu oschnout. Po tomto kroku mohly být preparáty dále zpracovány, případně uloženy v 1x PBS při 4 °C (na několik dnů) nebo suché při -20 °C (na delší dobu).

#### 4.11 Imunobarvení

Pro imunobarvení byly potřeba tyto roztoky:

- 0,5x MAH pufr – 1,5% BSA, 5% kozí sérum, 0,05% triton X-100, 0,2x inhibitory proteáz (Roche, #1836153), 1x PBS
- 1x PBS
- montovací medium s DAPI (Vector Laboratories, H1200-10)
  
- Použité primární protilátky  
myší monoklonální anti-SYCP3 (Santa Cruz, sc74569), králičí polyklonální anti-SYCP1 (Abcam, ab15087), králičí polyklonální anti-HORMAD2 (získáno od Attila Toth), lidská autoprotilátka anti-centroméra (Antibodies-Incorporated, 15-235), morčecí anti-histon linker H1t (Inselman et al. 2003), králičí polyklonální anti-RAD51 (Santa Cruz, sc8349), králičí polyklonální anti-DMC1 (Santa Cruz, sc22768), myší monoklonální anti-MLH1 (Abcam, ab14206), myší monoklonální anti-γH2AX (Millipore 05-636)

- Použité sekundární protilátky:

Alexa Fluor 488 (kozy anti-králičí IgG, Molecular Probes A-11034), Alexa Fluor 568 (kozy anti-myší, Molecular Probes A-11031), Alexa Fluor 568 (kozy anti-králičí, Molecular Probes A-11036), Alexa Fluor 647 (kozy anti-myší, Molecular Probes A-21236), Alexa Fluor 647 (kozy anti-lidská, Molecular Probes A-21445), kozí anti-morčecí IgG-Cy3 (Chemicon, AP108C)

Skla s jednobuněčnou suspenzí byla 2x za sebou opláchnuta při pokojové teplotě v roztoku 1x PBS po dobu 10 min. Na skla bylo nanášeno 200  $\mu$ l 0,5x MAH, skla byla zakryta krycím sklem a blokována 1 hod. při pokojové teplotě. Následně byla odstraněna krycí skla a na preparáty byl přidán roztok primárních protilátek naředěných v 0,5x MAH. Skla byla přikryta krycím sklem a inkubována přes noc při 4 °C. Následující den byly preparáty při 4 °C opláchnuty 3x v 1x PBS po dobu 10 min. Poté byly na skla nanášeny sekundární protilátky naředěné v 0,5x MAH (100  $\mu$ l) a skla byla zakryta krycím sklem, následovala inkubace v temnu při 4 °C po dobu 90 min. Skla byla v temnu při pokojové teplotě opláchnuta 3x v 1x PBS po dobu 10 min, následoval rychlý oplach v millipore vodě a poté byla skla na vzduchu usušena. Na suchá skla bylo nanášeno montovací médium obsahující DAPI (Vector Laboratories, H1200-10) pro zvýraznění jader (DNA). Výsledná skla byla zakryta krycím sklíčkem a následně mohla být pozorována pod fluorescenčním mikroskopem či být uložena při -20 °C po dobu několika týdnů.

Při imunobarvení pro určování stádií meiotických buněk byly použity dvě myší monoklonální protilátky. Barvení tedy muselo probíhat ve dvou krocích, kdy byly nejprve použity myší monoklonální protilátka anti-SYCP3 a morčecí anti-histon linker H1t s následným přidáním sekundárních protilátek a druhá myší monoklonální protilátka anti- $\gamma$ H2AY byla nanášena až druhý den, inkubace trvala 2 hodiny a poté byla přidána sekundární protilátka.

**Tabulka 4. Seznam použitých protilátek s optimalizovaným ředěním**

Primární protilátky		Sekundární protilátky	
Název	Ředění	Název	Ředění
<u>Zjišťování míry asynapse</u>			
myší- $\alpha$ -SYCP3	1:100	kozí- $\alpha$ -mIgG 568	1:400
králičí- $\alpha$ -HORMAD2	1:300	kozí- $\alpha$ -rIgG 488	1:400
lidská- $\alpha$ -CEN	1:300	kozí- $\alpha$ -hIgG 647	1:400
<u>Určování stádií meiotických buněk</u>			
myší- $\alpha$ -SYCP3	1:100	kozí- $\alpha$ -mIgG 568	1:400
myší- $\alpha$ - $\gamma$ H2AX	1:500	kozí- $\alpha$ -mIgG 647	1:400
morčecí- $\alpha$ -H1t linker	1:700	kozí anti-morčecí IgG-Cy3	1:400
<u>Zjišťování počtu dvouřetězcových zlomů</u>			
myší- $\alpha$ -SYCP3	1:100	kozí- $\alpha$ -mIgG 568	1:400
králičí- $\alpha$ -RAD51	1:300	kozí- $\alpha$ -rIgG 488	1:400
králičí- $\alpha$ -DMC1	1:300	kozí- $\alpha$ -rIgG 488	1:400
lidská- $\alpha$ -CEN	1:300	kozí- $\alpha$ -hIgG 647	1:400
<u>Zjišťování počtu rekombinačních míst</u>			
králičí- $\alpha$ -SYCP1	1:500	kozí- $\alpha$ -rIgG 488	1:400
myší- $\alpha$ -MLH1	1:20	kozí- $\alpha$ -mIgG 568	1:400
lidská- $\alpha$ -CEN	1:300	kozí- $\alpha$ -hIgG 647	1:400

## 4.12 DNA Fluorescenční In-Situ Hybridizace (DNA FISH)

Roztoky pro DNA FISH:

- 70%, 90% a 100% ethanol
- 70% formamid
- 4x SSC
- 1x PBS
- DNA FISH próby (MetaSystems a Cambio)
- montovací medium s DAPI (Vector Laboratories, H1200-10)

Příprava preparátů pro DNA FISH je shodná s přípravou preparátů pro imunobarvení. Takto připravená skla byla použita k DNA FISH. Všechny kroky byly dělány ve tmě s co nejmenším přístupem světla.

Hotové imunocytochemické preparáty byly 3x omyty v 1x PBS po dobu 5 min. Po prvním oplachu bylo z preparátu opatrně sejmuto krycí sklo. Následovala postupná třiminutová dehydratace preparátů pomocí 70%, 90% a 100% ethanolu. Skla byla ponechána ve tmě na vzduchu při pokojové teplotě, dokud nedošlo k jejich uschnutí. Poté byla inkubována v pícce při 65 °C po dobu 1 hod. Následovala sedmiminutová denaturace skel v 70% formamidu v 0,6x SSC, jehož teplota byla 73 °C. Poté byla skla zchlazena v 70% ethanolu (-20 °C) po dobu 3 min, s následnou třiminutovou dehydratací v 70%, 90% a 100% ethanolu. Próby byly zavčas připraveny podle instrukce získané z MetaSystems. K 10 µl próby bylo přidáno 1,1 µl cot1 DNA. Próba byla umístěna do PCR cykléru s programem – 60 s při 25 °C, 330 s při 75 °C, 30 s při 10 °C a 30-60 min při 37 °C. Následně bylo 10 µl připravené próby nanášeno na sklo a zakryto krycím sklíčkem, které bylo oblepeno gumou, aby nedošlo k proniknutí vzduchu do preparátu. Skla byla hybridizována v pícce ve vlhké komůrce po dobu 3 dnů při 37 °C. Poté byla skla 3x omyta v 4x SSC při teplotě 42 °C po dobu 5 min. Na skla bylo přidáno montovací medium s DAPI (Vector Laboratories, H1200-10) a byla zakryta krycím sklíčkem. Takto připravená skla se mohla pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem, případně mohla být uložena při -20 °C po dobu několika týdnů.

### **4.13 Fluorescenční mikroskopie a analýza obrazu**

K pozorování preparátů byl použit fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 400 s 40x či 60x Plan fluor objektivem. Pořizování, úpravy a analýza obrazového materiálu byly zhotoveny pomocí programu NIS-Elements BR (Nikon).

### **4.14 Statistická analýza**

Welschův t-test byl použit pro zjištění signifikantních hodnot pro hmotnost těla, hmotnost varlat. Z dalších analytických testů byly použity QTL analýza, GLMM a GLM modely.

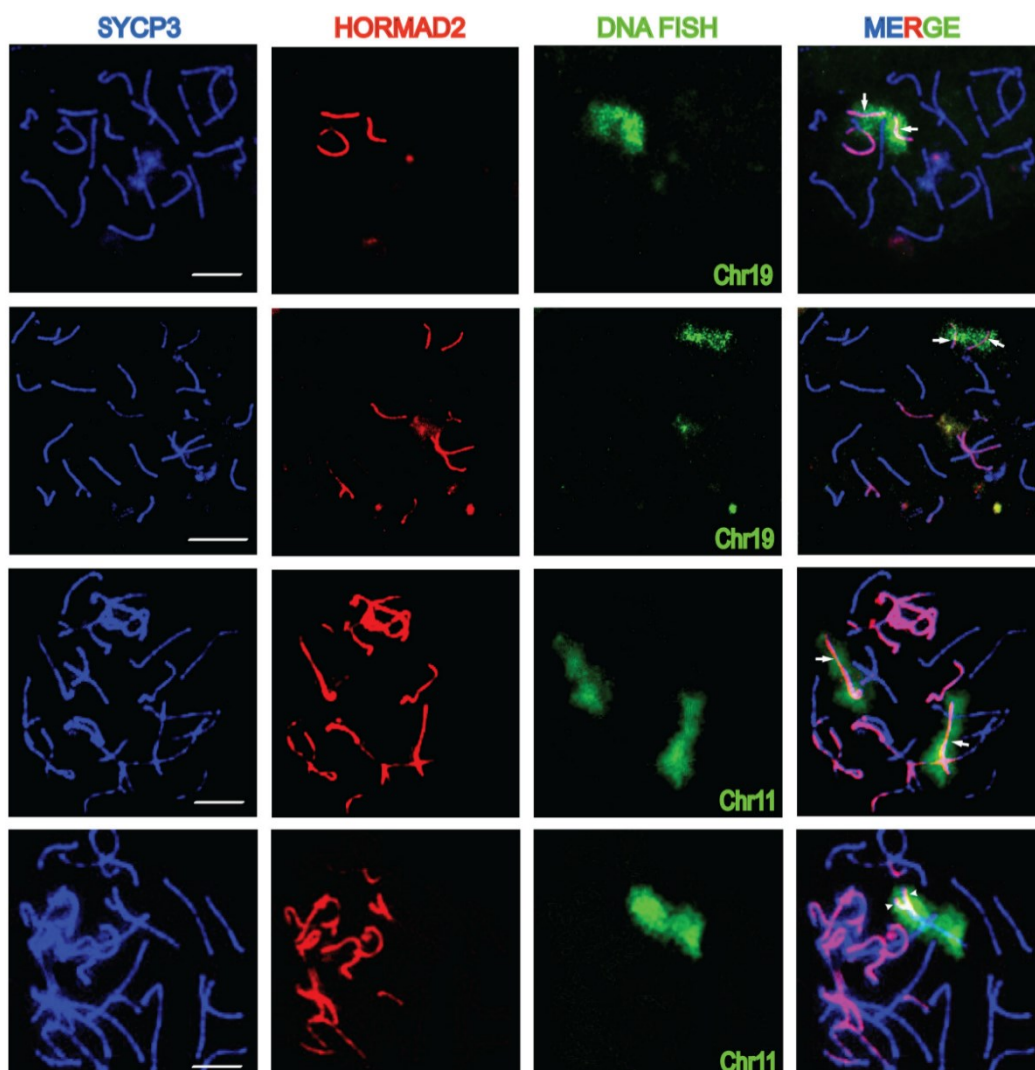
## 5 Výsledky

### 5.1 Meiotické párování homologních chromozomů sterilních PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů

Synapse homologních chromozomů je důležitá pro další průběh meiózy a vývoj pohlavních buněk. U F<sub>1</sub> hybridů vzniklých křížením poddruhů *Mus musculus musculus* (zastoupený kmenem PWD/Ph, dále jen PWD) a *Mus musculus domesticus* (C57BL/6J, dále jen B6) dochází k různému stupni asynapse, která může být klasifikována jako úplná, částečná či smíšená (v jednom označeném chromatinovém oblaku se překrývají více než dva univalenty).

#### 5.1.1 Asynapse postihuje všechny autozomy

Nejprve jsme provedli rozsáhlou analýzu asynapse jednotlivých meiotických chromozomů PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů imunobarvením proteinu SYCP3 ke zviditelnění synaptonemálního komplexu, dále imunobarvením proteinu s HORMA doménou (HORMAD2) k určení axiálních elementů nesynapsovaných chromozomů a fluorescenční in-situ hybridizací (FISH) k označení chromatinu jednotlivých chromozomů (obr. 11).

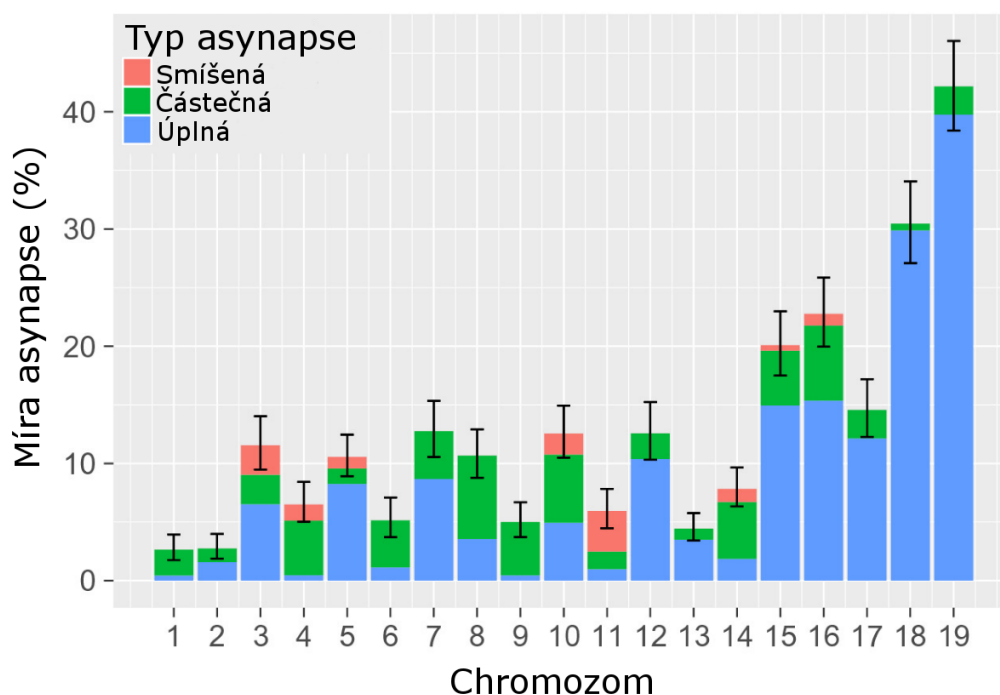


**Obr. 11. Asynapse heterosubspecifických homologů v pachytenních jádrech u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů**

Na obrázcích jsou jádra primárních spermatocytů v pachytenním stádiu meiotické profáze I. z PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridního samce. Protein synaptonemálního komplexu SYCP3 (modrá), protein obsahující HORMA doménu HORMAD2 (červená) jsou značeny imunofluorescenční metodou a příslušný chromozom je značený hybridizací FISH sondou (zelená). V obrázku můžeme pozorovat úplnou (znázorněnou šipkami) a částečnou (znázorněnou hroty šipek) asynapsi chromozomu 11 a 19. Chromozomy s poruchou synapse často tvoří změř díky nehomolognímu párování.

Celkem jsme analyzovali 4168 pachytenních jader ze 40 PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridních samců a zjistili jsme, že míra asynapse měla vzrůstající frekvenci (obr. 12), kdy pět nejkratších chromozomů vykazovalo nejvyšší tendenci ke vzniku asynapse.





**Obr. 12. Míra asynapse jednotlivých autozomů v PWD/B6 F<sub>1</sub> hybriděch**

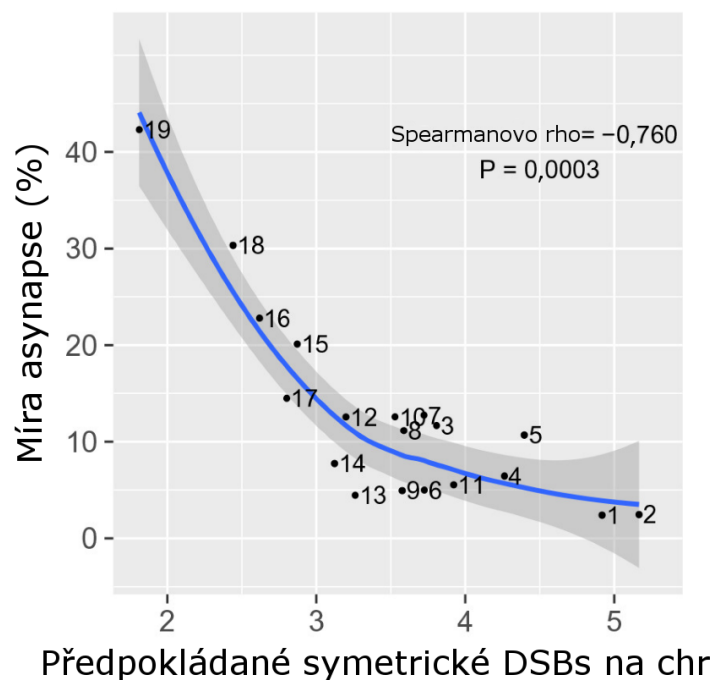
Na grafu je znázorněna průměrná asynapse  $\pm$  směrodatná odchylka (SE). Smíšená asynapse označuje 2 a více zamotaných univalentů v jednom DNA FISH označeném chromatinovém oblaku. Nejvyšší míru asynapse vykazují pět nejmenších chromozomů. Navíc chromozomy postižené vyšší mírou asynapse měly častěji tuto asynapsi úplnou nežli částečnou.

Díky objevu asymetrických hotspotů dvouřetězcových zlomů DNA u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů (Davies et al. 2016, Smagulova et al. 2016) a informacím získaným ze sekvenování, mapování a kvantifikace SPO11 oligonukleotidů uvolněných během vzniku dvouřetězcových zlomů (dále DSBs) (Lange et al. 2016) jsme byli schopni vypočítat korelaci mezi počtem DSBs v rámci symetrických hotspotů (dále jen symetrické DSBs) na chromozomu a buňku a synapsí mezi intersubspecifickými homology. Výpočet byl založen a limitován následujícími předpoklady:

- celková hustota DSBs na jednotlivých chromozomech B6 a PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů je stejná
- v jádře, nacházejícím se ve stádiu leptotene/zygotene se vytvoří přibližně 250 DSBs (Kauppi a kol. 2013)
- podíl 0,28/0,72 symetrických a asymetrických DSBs v PWD/B6 F<sub>1</sub> hybriděch je konstantní na všech autozomech (Davies et al. 2016)

Za těchto podmínek můžeme pozorovat silnou negativní korelaci (Spearmanovo  $\rho = -0,760$ ,  $p = 0,0003$ ) mezi mírou asynapse a předpokládaným počtem symetrických

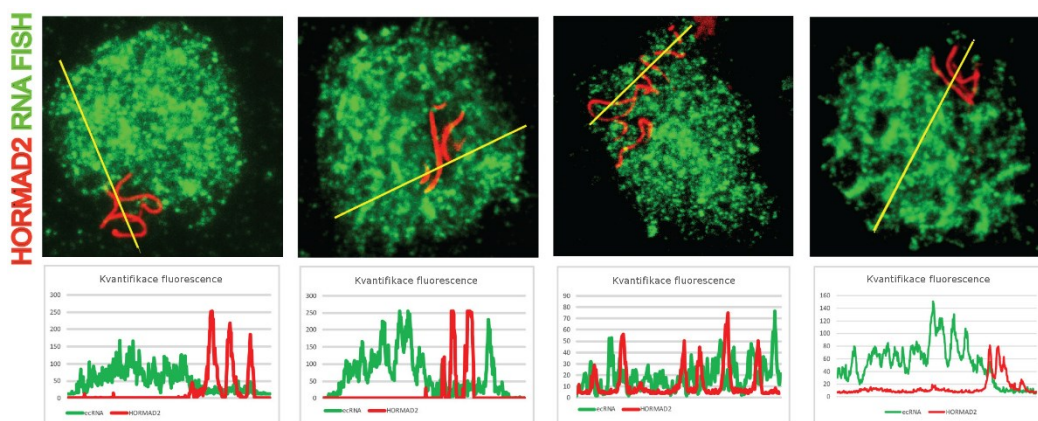
DSBs (Davies et al. 2016) založených na distribuci SPO11 oligonukleotidů u plodných B6 samců (Lange et al. 2016) (obr. 13). Tato korelace je dokonce silnější než korelace mezi mírou asynapse a délkou chromozomu (Spearmanovo  $\rho = -0,681$ ,  $p = 0,0013$ ), i když délka chromozomů a očekávaný počet symetrických DSBs rovněž silně koreluje (Spearmanovo  $\rho = 0,916$ ,  $p = 1,1 \times 10^{-7}$ ). Zjistili jsme, že to jsou symetrické DSBs, které ovlivňují míru asynapse, a že synapse páru homologních chromozomů závisí na přítomnosti určitého minimálního počtu symetrických DSBs.



**Obr. 13. Negativní korelace mezi mírou asynapse a průměrným předpokládaným počtem symetrických DSBs**

Obrázek znázorňuje negativní korelaci mezi mírou asynapse a průměrným předpokládaným počtem symetrických DSBs (Davies et al. 2016) založenou na distribuci SPO11 oligonukleotidů u plodných B6 samců (Lange et al. 2016).

Navíc jsme zjistili, že na rozdíl od jiných oblastí pachytenních jader, subnukleární oblasti asynapsovaných chromozomů skládající se z pohlavních chromozomů a/nebo autozomálních univalentů postrádají aktivní euchromatin (obr. 14). 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).

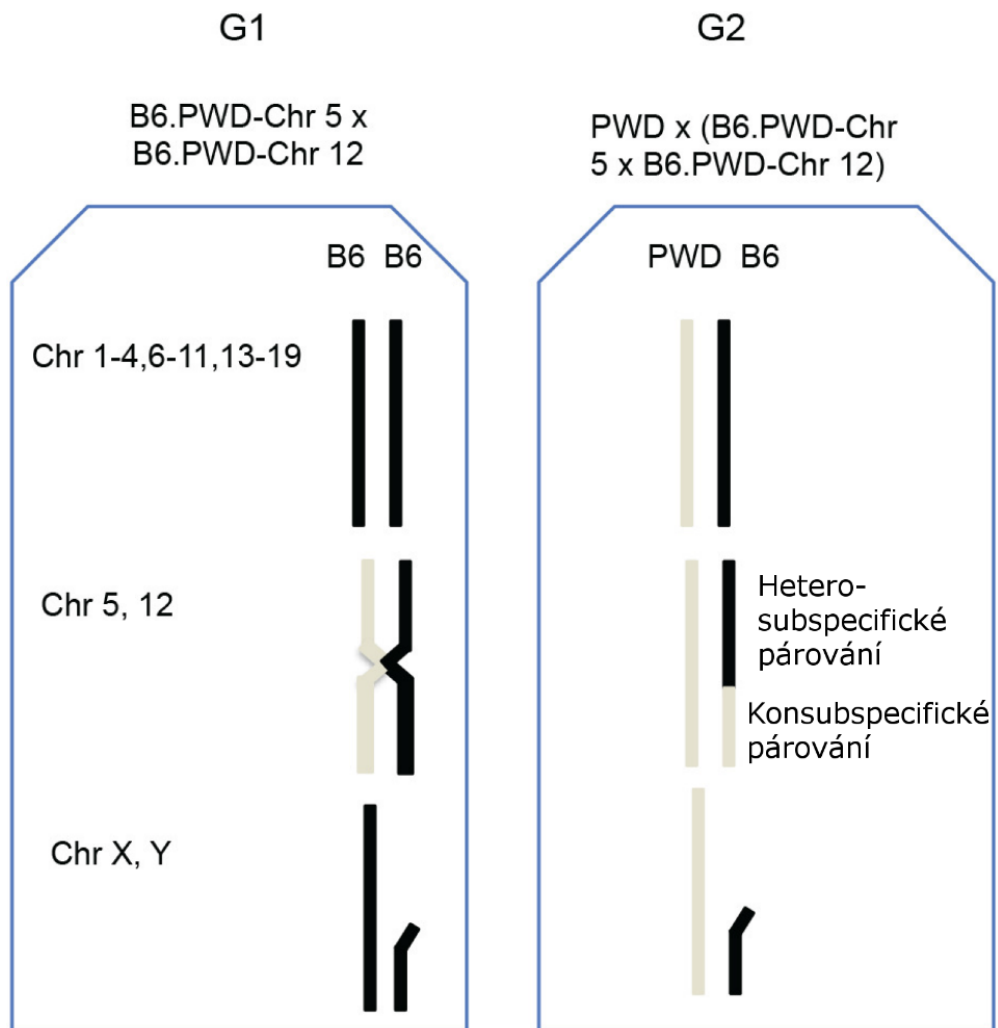


**Obr. 14. Asynapované chromozomy postrádají aktivní euchromatin**

K prozkoumání umístění aktivního euchromatinu u asynapovaných chromozomů PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů jsme použili konfokální fluorescenční mikroskopii po značení HORMAD2 (červená) a Cot-1 RNA FISH (zelená). Asynapované chromozomy jsou uloženy v transkripčně umlčeném chromatinu vizualizovaném nedostatkem extra-kódující RNA (ecRNA) detekované Cot-1 RNA FISH.

### 5.1.2 Minimální délka konsubspecifické sekvence nezbytná pro meiotickou synapsi

V předchozích pracích (Gregorova et al. 2008, Bhattacharyya et al. 2013, 2014) jsme ukázali, že u sterilních hybridů křížení PWD x B6.PWD-Chr<sup>#</sup> jsou konsubspecifické (patřící stejnému poddruhu) PWD/PWD homologní bivalenty asynapse ušetřeny. Asynapse se tedy jevila jako chromozomálně-autonomní. Proto jsme se rozhodli nalézt nejmenší délku PWD/PWD konsubspecifické sekvence, která by byla schopná zajistit synapsi konkrétního chromozomu a případně obnovit plodnost hybridů. Místo abychom nahradili celý B6 chromozom jeho PWD homologem, jsme pomocí křížení samčích hybridů (vzniklých z křížení dvou B6.PWD-Chr<sup>#</sup> konzomických kmenů) a PWD samice (dále je v textu toto křížení pojmenováno jako dvou-chromozomové křížení) vytvořili rekombinantní PWD/B6 a B6/PWD chromozomy (obr. 15). Díky tomu jsme mohli odhadnout minimální délku a umístění konsubspecifických PWD/PWD úseků potřebných pro obnovení synapse. Efekt PWD/PWD úseků na míru asynapse jsme sledovali u tří různých křížení popsaných výše, a to na chromozomech 5 a 12, chromozomech 7 a 15 a chromozomech 17 a 18 (tab. 5-10).



**Obr. 15. Dvou-chromozomové křížení**

F<sub>1</sub> hybridní samci vzniklí z křížení dvou konzomických kmenů (generace 1 – G<sub>1</sub>, na tomto obrázku je zobrazené křížení pro konzomiky na 5 a 12 chromozomu) byli připuštěni k PWD samicí, čímž vznikla generace 2 – G<sub>2</sub> neplodných F<sub>1</sub> hybridů s náhodnou rekombinací na konzomických chromozomech 5 a 12.

**Tab. 5. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspicifických úseků na asynapsi chromozomu 5 a na parametry plodnosti u dvou-chromozomového křížení**

ID samce	Vzdálenost od centromery Chr 5 (celková délka 151,8 Mb)																	PWD/PWD délka	Asynapse Chr 5			Počet jader	Váha varlat	Počet spermií
	4,9	5,2	9,8	24,5	28,1	45,0	61,4	64,1	107,0	119,0	125,4	127,0	127,7	132,1	137,7	151,0	Mb, rozsah		%	95 % CI	N			
69064	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	151,8; 151,8	2,0	0,3; 6,0	100	54,0	0,0	
69133	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	151,8; 151,9	2,0	0,3; 6,0	100	64,0	0,0	
67974	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	106,8; 123,7	0,0	0,0; 2,4	83	69,0	0,0	
69083	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	90,4; 106,8	1,0	0,1; 4,3	100	63,0	0,0	
67730	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	90,4; 106,8	0,0	0,0; 2,0	99	57,0	0,0	
67878	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	87,7; 90,4	1,0	0,1; 4,3	100	58,0	0,0	
67882	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	44,8; 87,7	2,0	0,3; 6,0	100	59,0	0,0	
67876	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	54,9; 64,0	0,0	0,0; 2,0	100	69,0	0,0		
69062	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	44,8; 87,7	1,0	0,1; 4,3	100	58,0	0,0	
67973	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	32,8; 44,8	3,0	0,8; 7,6	100	67,0	0,0	
69137	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	19,7; 24,1	1,0	0,1; 4,3	100	55,0	0,0	
69846	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	14,1; 19,7	3,0	0,8; 7,6	100	NA	NA	
69328	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	0,8; 14,1	12,0	6,6; 19,3	100	82,0	0,0	
69186	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	0,8; 14,1	5,0	1,8; 10,4	100	66,0	0,0	
69138	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	19,0	12,1; 27,4	100	55,0	0,0	
69184	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	9,0	4,4; 15,6	100	74,0	0,0	
69281	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	11,0	5,9; 18,1	100	71,0	0,0	
69331	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	11,0	5,9; 18,1	100	63,0	0,0	
69440	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	12,0	6,6; 19,3	100	68,0	0,0	
69441	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	10,0	5,1; 16,9	100	71,0	0,0	
69136	PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	9,8; 24,5	4,0	1,3; 9,0	100	61,0	0,0	
69847	PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	9,8; 24,5	0,0	0,0; 2,0	100	NA	NA	
67877	PP	PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	24,5; 28,1	1,0	0,1; 4,3	100	65,0	0,0	
69082	PP	PP	PP	PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	45,0; 61,4	0,0	0,0; 2,0	100	71,0	0,0	
67883	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	64,1; 107,0	0,0	0,0; 2,0	100	62,0	0,0	
67977	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	137,7; 151,0	1,0	0,1; 4,3	100	67,0	0,0	

Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech v mil/ml, váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech.

**Tab. 6. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspecifických úseků na asynapsi chromozomu 12 a na parametry plodnosti u dvou-chromozomového křížení**

ID samce	Vzdálenost od centromery Chr 12 (celková délka 120,1 Mb)										PWD/PWD délka Mb, rozsah	Asynapse Chr 12		Počet jader N	Váha varlat mg	Počet spermií 10 <sup>6</sup>
	5,4	7,6	15,7	19,8	30,8	35,0	54,6	91,0	103,4	113,8		%	95% CI			
69064	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PB	91,0; 103,4	0,0	0,0; 2,0	100	54,0	0,0
67977	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	48,8; 78,8	0,0	0,0; 2,0	100	67,0	0,0
67876	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	35,0; 54,6	1,0	0,1; 4,3	100	69,0	0,0
69144	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PP	PP	36,5; 59,9	1,0	0,1; 4,3	100	66,0	0,0
69760	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	19,8; 30,8	1,0	0,1; 4,3	100	65,0	0,0
69133	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	19,8; 30,8	3,0	0,8; 7,6	100	64,0	0,0
67973	PB	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	12,2; 25,4	6,0	2,4; 11,8	100	67,0	0,0
69281	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	7,6; 15,7	4,0	1,3; 9,0	100	71,0	0,0
67974	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	10,0	5,1; 16,9	100	69,0	0,0
69136	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	9,0	4,4; 15,6	100	61,0	0,0
69138	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	9,0	4,4; 15,6	100	55,0	0,0
69184	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	8,0	3,7; 14,4	100	71,0	0,0
69282	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	6,0	2,4; 11,8	100	67,0	0,0
69328	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	12,0	6,6; 19,3	100	66,0	0,0
69331	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	5,0	1,8; 10,4	100	63,0	0,0
69441	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	8,0	3,7; 14,4	100	68,0	0,0
69663	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	4,0	1,3; 9,0	100	70,0	0,0
69664	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	8,0	3,7; 14,4	100	71,0	0,0
69847	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	5,0	1,8; 10,4	100	63,0	0,0
69186	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	6,3; 16,7	10,0	5,1; 16,9	100	82,0	0,0
69763	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	6,3; 16,7	3,0	0,8; 7,6	100	68,0	0,0
69427	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	6,3; 16,7	0,0	0,0; 2,0	100	68,0	0,0
69082	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	6,3; 16,7	0,0	0,0; 2,0	100	71,0	0,0
69062	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	PP	29,1; 65,5	2,0	0,3; 6,0	100	59,0	0,0
69083	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	PP	29,1; 65,5	1,0	0,1; 4,3	100	57,0	0,0

Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech v mil/ml, váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech.

**Tab. 7. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspicifických úseků na asynapsi chromozomu 7 a na parametry plodnosti u dvou-chromozomového křížení**

ID samce	Vzdálenost od centromery Chr 7 (celková délka 145,4 Mb)									PWD/PWD délka		Asynapse Chr 7		Počet jader	Váha varlat	Počet spermií
	3,3	18,0	24,6	25,7	30,3	87,5	119,7	131,0	144,7	Mb, rozsah	%	95% CI	N	mg	10 <sup>6</sup>	
69468	PP	PP	PP	PP		PB	PB		PP	26,4; 44,7	4,0	1,3; 9,0	100	56,0	0,0	
69745	PP	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	24,6; 25,7	11,0	5,9; 18,1	100	64,0	0,0	
69744	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	18,0; 24,6	8,0	3,7; 14,4	100	65,0	0,0	
69934	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	10,0	5,1; 16,9	100	68,0	0,0	
69935	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	9,0	4,4; 15,6	100	64,0	0,0	
69878	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	8,0	3,7; 14,4	100	65,0	0,0	
69627	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	8,0	3,7; 14,4	100	64,0	0,0	
69467	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	7,0	3,1; 13,1	100	58,0	0,0	
69626	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	3,0	0,8; 7,6	100	63,0	0,0	
69780	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	1,0	0,1; 4,3	100	60,0	0,0	
69572	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	0,7; 14,4	8,0	3,7; 14,4	100	57,0	0,0	
37007	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	0,7; 14,4	4,0	1,2; 9,1	98	69,0	0,0	
69625	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	0,7; 14,4	1,0	0,1; 4,3	100	65,0	0,0	
69877	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	14,4; 25,7	1,0	0,1; 4,3	100	56,0	0,0	
69781	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP		100,7; 119,0	3,0	0,8; 7,6	100	62,0	0,0	

Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech v mil/ml, váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech.

**Tab. 8. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspecifických úseků na asynapsi chromozomu 15 a na parametry plodnosti u dvou-chromozomového křížení**

ID samce	Vzdálenost od centromery Chr 15 (celková délka 104,0 Mb)											PWD/PWD délka		Asynapse Chr 15		Počet jader	Váha varlat	Počet spermií
	9,3	40,0	63,0	70,2	97,0	97,8	100,6	101,9	102,8	103,4	Mb, rozsah	%	95% CI	N	mg	10 <sup>6</sup>		
69571	PP	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	40,0; 63,0	2,0	0,3; 6,0	100	69,0	0,0		
69623	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	9,3; 40,0	2,0	0,3; 6,0	100	65,0	0,0		
69783	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	3,0	0,8; 7,6	100	56,0	0,0		
69784	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	11,0	5,9; 18,1	100	60,0	0,0		
69566	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	13,0	7,4; 20,5	100	72,0	0,0		
69469	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	16,0	9,7; 24,0	100	56,0	0,0		
69565	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	16,0	9,7; 24,0	100	68,0	0,0		
69625	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	16,0	9,7; 24,0	100	65,0	0,0		
69624	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	19,0	12,1; 27,4	100	59,0	0,0		
69746	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	21,0	13,8; 29,7	100	62,0	0,0		
69743	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	21,0	13,8; 29,7	100	65,0	0,0		
69781	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	1,2; 2,1	24,0	16,4; 33,0	100	62,0	0,0		
69878	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	1,2; 2,1	23,0	15,5; 31,9	100	65,0	0,0		
69782	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	1,2; 2,1	16,0	9,7; 24,0	100	58,0	0,0		
69879	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	PP	6,2; 7,0	0,0	0,0; 2,0	100	58,0	0,0		

Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech v mil/ml, váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech.



**Tab. 9. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspecifických úseků na asynapsi chromozomu 17 a na parametry plodnosti u dvou-chromozomového křížení**

ID samce	Vzdálenost od centromery Chr 17 (celková délka 95,0 Mb)										PWD/PWD délka		Asynapse Chr 17		Počet jader	Váha varlat	Počet spermií
	4,8	15	15,6	30,9	34,7	45,4	52,7	65,3	73,8	93,2	Mb, rozsah	%	95% CI	N	mg	10 <sup>6</sup>	
64979	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	18,8	12,0; 27,1	101	72,0	0,0	
66707	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	14,9	8,9; 22,7	101	63,0	0,0	
64855	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	14,9	8,9; 22,7	101	73,0	0,0	
66954	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	14,6	8,7; 22,3	103	71,0	0,0	
64574	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	11,7	6,5; 18,8	103	68,0	0,0	
64977	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	11,2	6,3; 17,8	116	63,0	0,0	
64718	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	12,5	6,9; 20,1	96	68,0	0,0	
64849	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	7,0	3,1; 13,0	102	76,0	0,0	
66515	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	1,8; 21,2	16,0	9,5; 24,4	92	75,0	0,0	
66514	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	1,8; 21,2	14,0	8,1; 21,7	100	71,0	0,0	
64851	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	1,8; 21,2	10,5	5,6; 17,3	105	69,0	0,0	
64719	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	1,8; 21,2	5,8	2,4; 11,3	106	62,0	0,0	
66819	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB		PP	1,8; 21,2	3,4	0,9; 8,2	100	72,0	0,0	
66813	PB	PB	PB	PB	PB	PB			PP	PP	21,2; 29,7	1,0	0,1; 4,2	104	68,0	0,0	
66876	PB	PB	PB	PB	PB			PP	PP	PP	29,7; 42,3	0,0	0,0; 2,0	97	58,0	0,0	
64575	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	42,3; 49,6	0,0	0,0; 1,9	103	73,0	0,0	
64922	PB	PB	PB	PB	PB		PP	PP	PP	PP	42,3; 49,6	2,8	0,7; 7,1	108	69,0	0,0	
64975	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	4,8; 15,0	7,9	3,7; 14,2	101	80,0	0,0	
66532	PP		PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	4,8; 15,0	6,0	2,4; 11,8	100	72,0	0,0	

Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech v mil/ml, váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech.

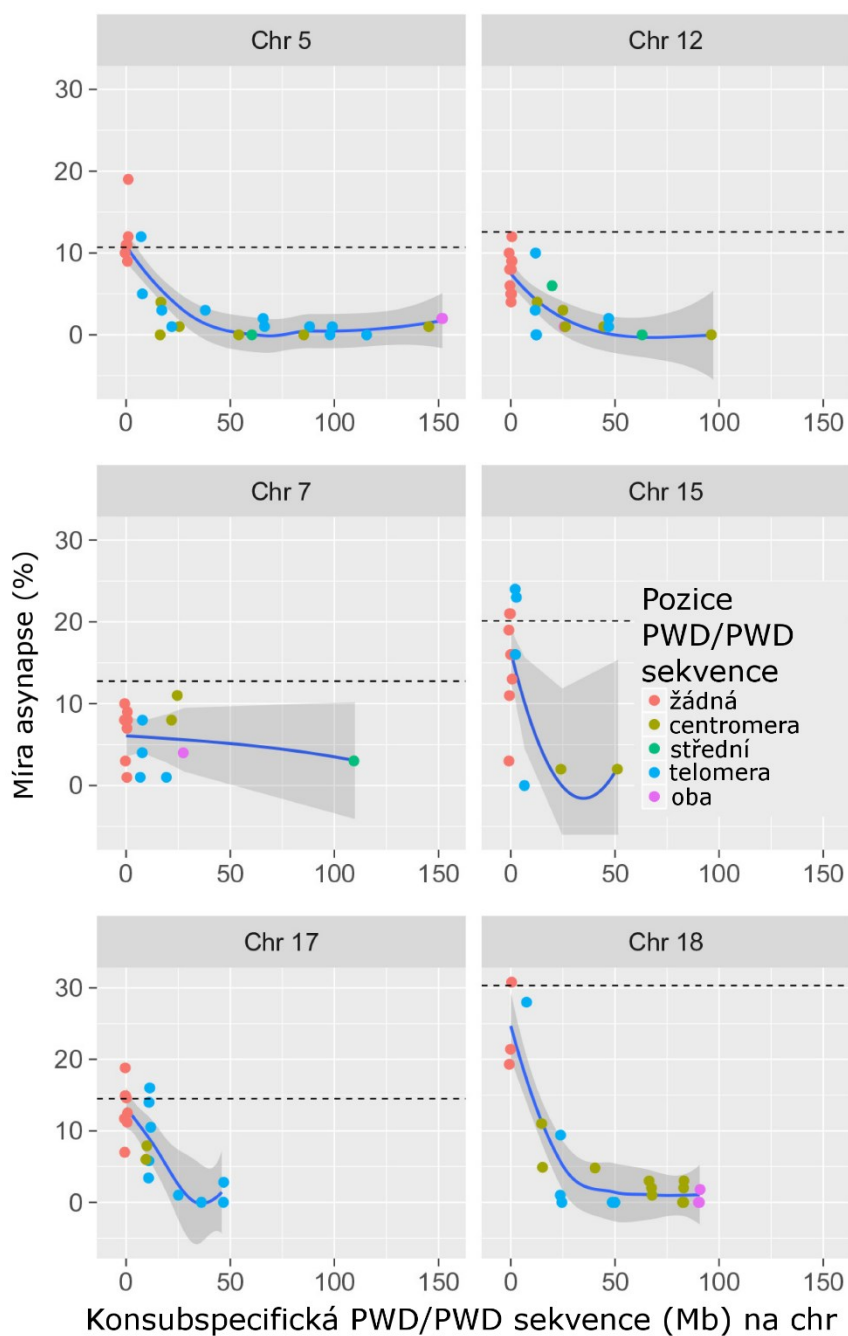
**Tab. 10. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspecifických úseků na asynapsi chromozomu 18 a na parametry plodnosti u dvou-chromozomového křížení**

ID samce	vzdálenost od centromery Chr 18 (90,7 Mb)					PWD/PWD délka Mb, rozsah	Asynapse Chr 18		Počet jader N	Váha varlat mg	Počet spermií 10 <sup>6</sup>
	3,8	25,0	57,4	76,9	89,6		%	95% CI			
64574	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	30,8	22,5; 40,1	104	68,0	0,0
64851	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	21,4	14,2; 30,0	103	69,0	0,0
64719	PB	PB	PB	PB	PB	0,0; 0,0	19,3	12,7; 27,4	109	62,0	0,0
64976	PB	PB	PB		PP	1,1; 13,8	28,0	19,8; 37,3	100	71,0	0,0
66876	PB	PB		PP	PP	13,8; 33,3	9,4	3,9; 18,1	64	58,0	0,0
66877	PB	PB		PP	PP	13,8; 33,3	1,0	0,1; 4,3	101	64,0	0,0
66532	PB	PB		PP	PP	13,8; 33,3	0,0	0,0; 2,5	78	72,0	0,0
66954	PB		PP	PP	PP	33,3; 65,7	0,0	0,0; 1,9	102	71,0	0,0
66813	PB		PP	PP	PP	33,3; 65,7	0,0	0,0; 1,7	113	68,0	0,0
64922	PP	PP	PP	PP	PP	90,7; 90,7	1,8	0,3; 5,5	109	69,0	0,0
64718	PP	PP	PP	PP	PP	90,7; 90,7	0,0	0,0; 2,0	100	68,0	0,0
64975	PP	PP	PP	PP	PP	90,7; 90,7	0,0	0,0; 2,0	100	80,0	0,0
64855	PP	PP	PP	PP		76,9; 89,6	0,0	0,0; 1,9	103	73,0	0,0
64849	PP	PP	PP	PP		76,9; 89,6	0,0	0,0; 2,0	100	76,0	0,0
64575	PP	PP	PP	PP		76,9; 89,6	2,0	0,3; 6,0	101	73,0	0,0
64968	PP	PP	PP	PP		76,9; 89,6	3,0	0,8; 7,6	101	73,0	0,0
64979	PP	PP	PP		PB	57,4; 76,9	1,0	0,1; 4,3	100	72,0	0,0
66872	PP	PP	PP		PB	57,4; 76,9	2,0	0,3; 6,0	103	73,0	0,0
66514	PP	PP	PP		PB	57,4; 76,9	3,0	0,8; 7,6	100	71,0	0,0
64977	PP	PP		PB	PB	25,0; 57,4	4,8	1,7; 10,0	104	63,0	0,0
66707	PP		PB	PB	PB	3,8; 25,0	4,9	1,8; 10,2	103	NA	0,0
66815	PP		PB	PB	PB	3,8; 25,0	11,0	6,0; 17,8	109	75,0	0,0

Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech v mil/ml, váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech.

Všichni samci vzniklí z těchto dvou-chromozomových křížení byli plně sterilní, s nízkou váhou varlat a žádnými spermiiemi v nadvarlatech. Celkem bylo analyzováno přes 122 potenciálně rekombinantních chromozomů ve 12 000 pachytenních jádrech. Výsledkem bylo zjištění, že konsubspecifický úsek  $\geq 27$  Mb, který je začleněný do intersubspecifického pozadí, je schopen snížit míru asynapse pod základní úroveň 5 %, a to ve všech šesti zkoumaných chromozomech. Účinnost obnovy synapse byla postupná se zřejmým bodem změny (obr. 16). Z našich výsledků také vyplývá, že nezáleží na umístění PWD/PWD úseku na chromozomu, pokud má dostatečnou délku. Tyto PWD/PWD úseky dokázaly obnovit synapsi, ať už byly umístěné v centromerické (14 případů), prostřední (3 případy) či v telomerické části (14 případů).



**Obr. 16. Efekt konsubspecifických PWD/PWD úseků v genomové sekvenci na synapsi pachytenních jader u dvou-chromozomového křížení**

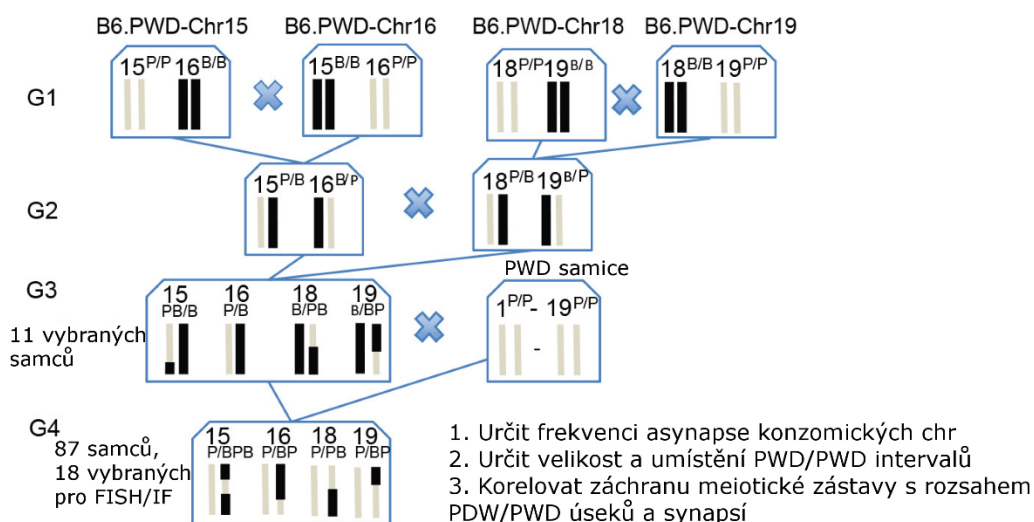
U každého experimentu byla vytvořena kombinace dvou chromozomů (5 + 12, 7 + 15 a 17 + 18). Umístění homozygotní PWD sekvence je barevně odlišeno vzhledem k centromere, intersticiální části chromozomu nebo telomeře nebo na obou koncích (viz obr. F a tab. A-F). Průměrná délka mezi minimem a maximem konsubspecifické sekvence je vyznačena. Průměrná míra asynapse daného chromozomu je vyšší u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů (znázorněná přerušovanou čarou) než u dvou-chromozomového křížení.

### 5.1.3 Obnova fertility sterilních hybridů

Davies se spolupracovníky (2016) dokázali zvrátit neplodnost PWD/B6 hybridních samců záměnou myšího PRDM9 ZnF minisatelitu za lidský, čímž prokázali úlohu DNA vazebné části PRDM9 proteinu v zástavě spermatogeneze hybridů. Abychom ověřili naši představu, že podmínkou PRDM9-determinované zástavy spermatogeneze je mezipoddrhová PWD/B6 heterozygotnost autozomů, zkonstruovali jsme postupně genotypy se stejnou „sterilní“ kombinací *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> a *Hstx2*<sup>PWD</sup>, kde dva až čtyři autozomy byly částečně nebo úplně PWD/PWD homozygotní.

Z našich předchozích výsledků víme, že konsubspecifický PWD/PWD úsek velikosti  $\geq 27$  Mb náhodně začleněný do jinak intersubspecifického pozadí PWD/B6 je schopný u daného autozomálního páru obnovit synapsi. Testovali jsme proto souvislost mezi asynapsí chromozomů a hybridní sterilitou snížením asynapse čtyř autozomů, které byly nejvíce náchylné ke vzniku asynapse. Abychom se vyhnuli výsledkům ovlivněných genotypem *Prdm9*<sup>PWD/PWD</sup>, neprováděli jsme analýzu meiotické asynapse na chromozomu 17. Za předpokladu, že samčí neplodnost je přímo závislá na synapsi chromozomů, by úplné potlačení asynapse u čtyř nejkratších (tím i k asynapsi nejnáchylnějších) autozomálních chromozomů mohlo zvýšit podíl primárních spermatocytů bez asynapse až na 26,7 %, což by mohlo zabránit apoptóze těchto buněk a zajistit okolo 5 milionů spermií v nadvarletech hybridních samců.

Pro experimentální ověření našeho předpokladu jsme vytvořili čtyř-generační křížení, ve kterém byly náhodně dlouhé úseky konzomických chromozomů 15<sup>PWD</sup>, 16<sup>PWD</sup>, 18<sup>PWD</sup> a 19<sup>PWD</sup> začleněny do B6 genetického pozadí (obr. 17).



**Obr. 17. Schéma čtyř-generačního křížení**

Schéma čtyř-generačního křížení, ze kterého vznikli F1 hybridní se čtyřmi rekombinantními konzomickými chromozomy.

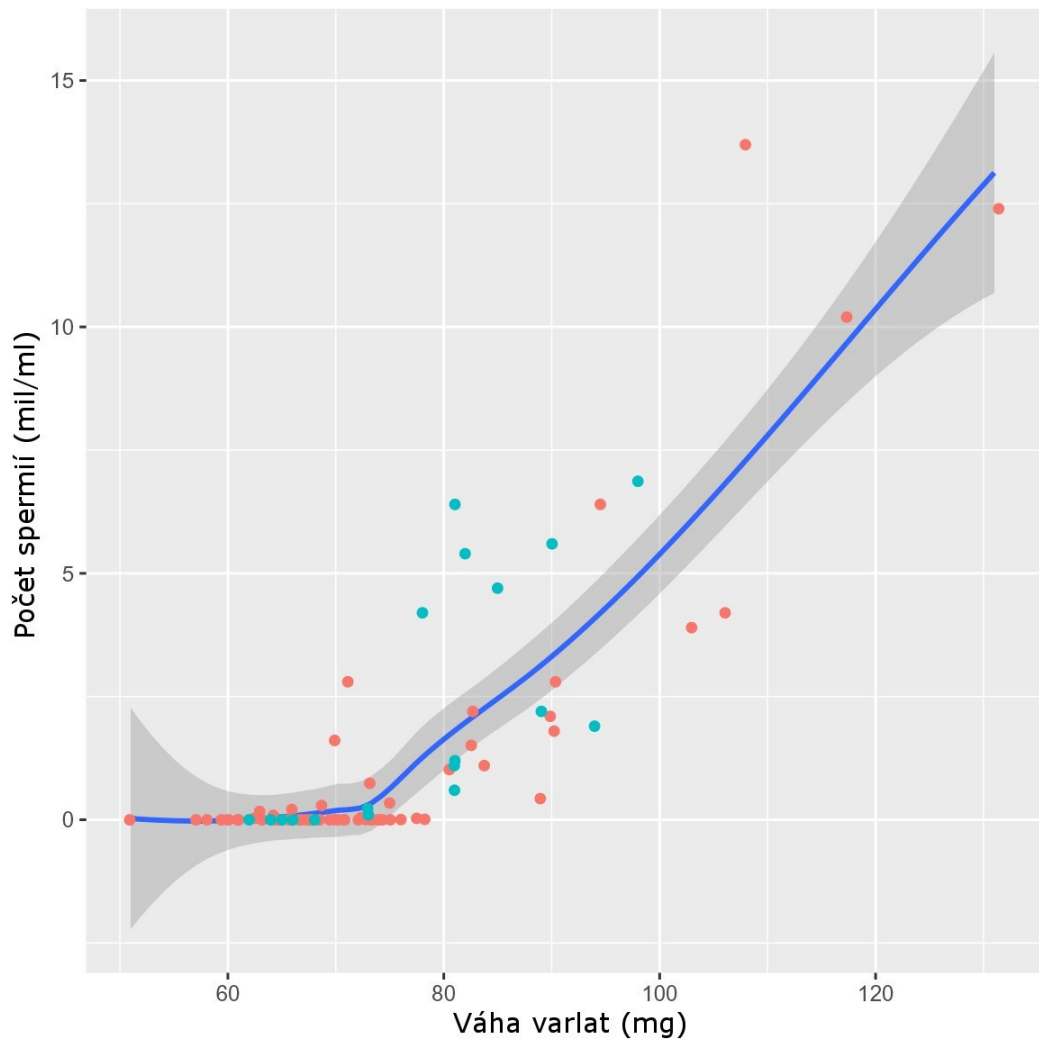
Následně jsme vybrali 11 G<sub>3</sub> samců s maximální délkou PWD sekvence na těchto autozomech a ty jsme křížili s PWD samicemi (tab. 11).

**Tab. 11. G<sub>3</sub> samci vybrání pro čtyř-chromozomové křížení**

ID samce	Chr 15 (104 Mb)					Chr 16 (98,2 Mb)					Chr 18 (90,7 Mb)					Chr 19 (61,4 Mb)					
	9,3	39,9	63,3	70,0	103,3	6,2	20,2	29,3	42,7	67,6	97,0	3,8	34,0	45,1	57,6	89,7	3,3	21,9	33,0	42,4	59,7
37487	PB	PB	PB	PB	PB	B	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
37504	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB
37507	B	B	PB	PB	PB	PB	PB	B	B	B	B	PB	PB	B	B	B	PB	PB	PB	PB	PB
37715	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
37852	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB
37871	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
37746	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB
37634	B	B	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
37616	PB	PB	PB	PB	PB	B	PB	PB	PB	PB	PB	B	B	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
37709	B	B	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
37862	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B	B	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	B

Růžové úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), bílé úseky představují homozygotní B6/B6 (B) interval.

Výslední G<sub>4</sub> hybridní potomci vykazovali na námi studovaných konzomických autozomech na jinak interspecifickém PWD/B6 genetickém pozadí různý stupeň PWD homozygotity. Ve shodě s naším očekáváním, významná část hybridních samců vykazovala částečnou obnovu spermatogeneze. Oproti PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridním samcům, kteří nemají žádné spermie v nadvarlatech, bylo pouze 51,7 % G<sub>4</sub> samců bez jediné spermie, 19,5 % mělo 0,01-0,74 x 10<sup>6</sup> spermií a 28,7 % mělo dokonce 1,0-13,7 x 10<sup>6</sup> spermií (obr. 18 a tab. 12).



**Obr. 18. Parametry plodnosti u G4 samců z čtyř-chromozomového křížení**

Potlačení meiotické zástavy hybridní sterility samců s váhou varlat  $> 70$  mg a  $> 0,1 \times 10^6$  spermíí v nadvarlatech. Samci vybraní pro analýzu pomocí HORMAD2 a DNA FISH barvení jsou zvýrazněny tyrkysově. Všichni samci mají stejnou alelickou kombinaci *Prdm9<sup>PWD/B6</sup>* a *Hstx2<sup>PWD</sup>*, která podmiňuje neplodnost.

**Tab. 12. Parametry plodnosti u hybridů čtyř-chromozomového křížení**

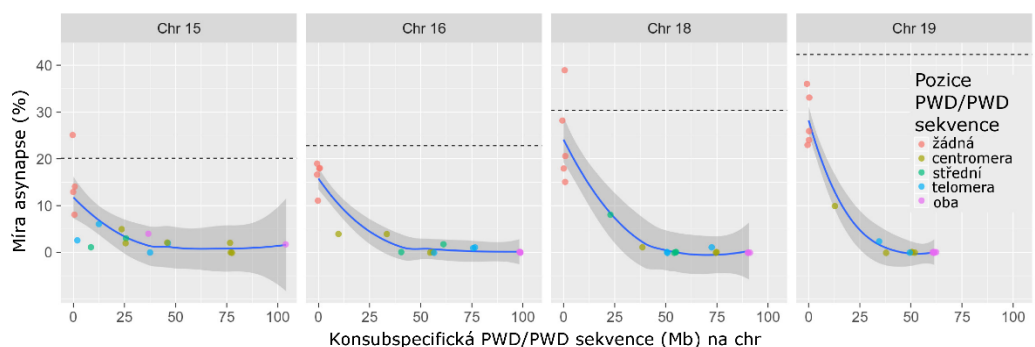
ID samce	TW (mg)	SC (mil/ml)	ID samce	TW (mg)	SC (mil/ml)
38754	51	0,00	38712	76	0,00
38428	57	0,00	38733	73	0,01
38735	58	0,00	38732	63	0,01
38088	59	0,00	38561	78	0,01
38089	60	0,00	38713	77	0,03
38753	60	0,00	38727	62	0,03
38726	61	0,00	38757	72	0,04
38751	61	0,00	38427	64	0,06
38755	61	0,00	38429	64	0,09
38435	62	0,00	38425	73	0,10
38090	63	0,00	38566	63	0,17
38085	64	0,00	38734	66	0,21
38087	64	0,00	38086	73	0,23
38448	64	0,00	38725	69	0,29
38738	65	0,00	38852	75	0,34
38739	65	0,00	38842	89	0,43
38711	65	0,00	38759	81	0,60
38728	65	0,00	38858	73	0,74
38822	65	0,00	38763	81	1,02
38430	66	0,00	38736	81	1,10
38432	66	0,00	38764	84	1,10
38710	66	0,00	38741	81	1,20
38084	67	0,00	38801	83	1,51
38434	67	0,00	38565	70	1,61
38814	67	0,00	38794	90	1,80
38752	68	0,00	38737	94	1,90
38783	68	0,00	75889	90	2,10
38817	68	0,00	38692	89	2,20
38758	69	0,00	79415	83	2,20
38821	69	0,00	38724	71	2,80
38740	70	0,00	79417	90	2,80
38766	70	0,00	79412	103	3,90
38813	70	0,00	38433	78	4,20
38426	71	0,00	38816	106	4,20
38468	71	0,00	38756	85	4,70
38765	72	0,00	38650	82	5,40
38767	73	0,00	38652	90	5,60
38819	73	0,00	38431	81	6,40
38792	74	0,00	79416	95	6,40
38818	74	0,00	38555	98	6,87
38820	74	0,00	38793	117	10,20
38815	75	0,00	75891	131	12,40
75890	68	0,00	79413	108	13,70
79414	65	0,00			

TW – váha varlat odpovídá mokré váze obou varlat, a to v miligramech

SC – odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech a je uváděn v mil/ml



Dále nás zajímalo, jestli délka PWD/PWD konsubspecifických úseků námi vybraných autozomů a obnova jejich meiotické synapse souvisí se zvratem v meiotické zástavě. Vybrali jsme tudíž podle parametrů plodnosti 18 G<sub>4</sub> samců, z nichž 5 byli aspermatické kontroly a 13 prokazovalo částečnou obnovu fertility s  $0,1 \times 10^6 - 6,9 \times 10^6$  spermiiemi v nadvarlatech. Náš předpoklad vycházející z výsledků měření u předchozího dvou-chromozomového křížení byl potvrzen díky analýze, která čítala přes 6 500 pachytenních jader G<sub>4</sub> samců. Nerekombinantní PWD/B6 intersubspecifické páry vykazovaly nejvyšší míru asynapse, na rozdíl od nerekombinantní PWD/PWD konsubspecifických bivalentů, které byly vždy plně synapsované. U všech rekombinantních autozomů, které obsahovaly konsubspecifický úsek dostatečné délky (27 Mb a víc), byla synapse obnovena (obr. 19). A co víc, přítomnost spermií odpovídala obnově synapse konzomických chromozomů. Hybridi měli spermie, pokud byla synapse obnovena alespoň u tří ze čtyř segregujících chromozomů a kdy pravděpodobnost, že všechny čtyři chromozomy budou synapsované, byla  $> 0,7$  ( $p = 0,0014$ , Mann-Whitneyův test). Nejsilnější účinek vykazovaly chromozomy 16, 18 a 19 (tab. 13).



**Obr. 19. Efekt konsubspecifických PWD/PWD úseků v genomové sekvenci na pachytenní synapsi u čtyř-chromozomového křížení**

Na obrázcích je znázorněna míra asynapse závislá na délce a pozici konsubspecifických PWD/PWD úseků u čtyř konzomických chromozomů (chromozom 15, 16, 18 a 19). Umístění PWD/PWD homozygotní sekvence vzhledem k centroměře, intersticiální části chromozomu, teloměře nebo oběma koncům je odlišeno barvami.

**Tab. 13. Efekt velikosti a umístění PWD/PWD konspecifických úseků na asynapsi chromozomů 15, 16, 18 a 19 a na parametry plodnosti u čtyř-chromozomového křížení**

ID samce	Vzdálenost od centromery Chr 15 <sup>1</sup> (celková délka 104,0 Mb)										Asynapse Chr 15					Vzdálenost od centromery Chr 16 (celková délka 98,2 Mb)					Asynapse Chr 16					Vzdálenost od centromery Chr 18 (celková délka 90,7 Mb)					Asynapse Chr 18					Vzdálenost od centromery Chr 19 (celková délka 61,4 Mb)					Asynapse Chr 19					Počet spermií <sup>2</sup> 10 <sup>6</sup>	Počet jader Chr 15, 16, 18, 19 N	PWD/PWD délka <sup>3</sup> na Chr 15, 16, 18, 19 Mb, střední délka
	9,3	39,9	50,4	63,3	65,1	70,0	83,9	100,9	103,3	%	95% CI	6,2	14,0	29,3	39,1	42,7	67,8	97,0	%	95% CI	3,8	34,0	45,1	57,6	89,7	%	95% CI	3,0	21,9	33,0	42,4	59,7	%	95% CI														
	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB											
75890	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	1,7	0,1; 7,3	PB	PB	PP	PP	PP	PP	1,7	0,1; 8,5	PB	PB	PB	PB	PB	20,6	13,7; 28,9	PB	PB	PB	PB	PB	24,1	14,2; 36,3	0,0	59; 45; 107; 56	104,0; 60,6; 0,0; 0,0												
79414	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	2,1	0,3; 6,4	PB	PB	PB	PB	PB	PB	16,7	10,5; 24,5	PB	PB	PB	PB	PB	28,1	17,6; 40,6	PB	PB	PB	PB	PB	26,0	17,9; 35,3	0,0	94; 108; 57; 96	77,0; 0,0; 0,0; 0,0												
38435	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	25,0	17,2; 34,0	PP	PP	PP	PB	PB	PB	4,0	1,3; 9,0	PB	PB	PB	PB	PB	39,0	29,8; 48,7	PB	PB	PB	PB	PB	33,0	24,3; 42,6	0,0	100; 100; 100; 100	0,0; 34,2; 0,0; 0,0												
38087	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	14,0	8,1; 21,7	PB	PB	PB	PB	PB	PB	11,0	5,9; 18,1	PB	PB	PB	PB	PB	18,0	11,3; 26,3	PP	PB	PB	PB	PB	10,0	4,9; 17,3	0,0	100; 100; 100; 90	0,0; 0,0; 0,0; 12,5												
38432	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PB	PB	PB	PB	PB	PB	19,0	12,1; 27,4	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PB	PB	PB	PB	PB	36,0	27,0; 45,7	0,0	100; 100; 100; 100	36,5; 0,0; 90,7; 0,0												
38425	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	PB	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	1,0	0,1; 4,3	PB	PB	PB	PB	PB	23,0	15,5; 31,9	0,1	100; 100; 100; 100	77,0; 55,1; 71,7; 0,0												
38086	PB	PB	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	2,0	0,3; 6,0	PP	PB	PB	PB	PB	PB	4,0	1,3; 9,0	PP	PP	PP	PB	PB	1,0	0,1; 4,3	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	0,2	100; 100; 100; 100	47,2; 10,1; 39,5; 61,4												
38759	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	2,6	0,4; 7,8	PB	PB	PB	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PB	PB	PB	PB	PB	15,0	8,9; 22,8	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	0,6	78; 100; 100; 100	1,9; 57,3; 0,0; 61,4												
38736	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	4,0	1,3; 9,0	PB	PB	PB	PB	PB	PB	18,0	11,3; 26,3	PB	PB	PB	PP	PP	8,0	3,7; 14,4	PP	PP	PP	PP	PB	0,0	0,0; 3,0	1,1	100; 100; 100; 65	36,2; 0,0; 22,8; 37,5												
38741	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	5,0	1,8; 10,4	PB	PP	PP	PP	PP	PP	1,0	0,1; 4,3	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PB	PP	PP	PP	PP	2,3	0,4; 6,5	1,2	100; 100; 100; 100	24,6; 76,6; 74,0; 33,9												
38737	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PB	PB	PB	1,0	0,1; 4,3	PB	PB	PB	PB	PB	PB	18,0	11,3; 26,3	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	1,9	100; 100; 100; 100	9,4; 0,0; 90,7; 61,4												
38692	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	8,0	3,7; 14,4	PB	PB	PB	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PB	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	2,2	100; 100; 100; 100	0,0; 41,4; 51,2; 61,4												
38433	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PB	PB	PB	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	4,2	100; 100; 100; 100	77,0; 98,2; 55,0; 51,0												
38756	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	13,0	7,4; 20,5	PP	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	4,7	100; 100; 100; 100	0,0; 98,2; 74,0; 48,9												
38650	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB	2,0	0,3; 6,0	PP	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	5,4	100; 100; 100; 100	24,6; 98,2; 55,0; 51,0												
38652	PB	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	6,0	2,4; 11,8	PP	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	5,6	100; 100; 91; 100	11,6; 98,2; 55,0; 61,4												
38431	PB	PB	PB	PB	PB	PP	PP	PP	PB	3,0	0,8; 7,6	PP	PP	PP	PP	PP	PB	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	6,4	100; 100; 100; 100	24,9; 55,1; 90,7; 61,4												
38555	PP	PP	PP	PB	PB	PB	PB	PB	PB	2,0	0,3; 6,0	PB	PP	PP	PP	PP	PP	1,0	0,1; 4,3	PB	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	PP	PP	PP	PP	PP	0,0	0,0; 2,0	6,9	100; 100; 100; 100	45,1; 76,6; 51,2; 51,0												

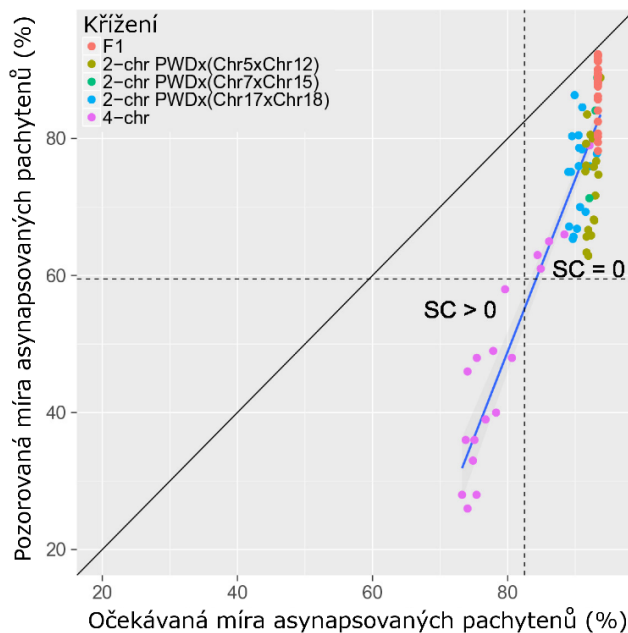
<sup>1</sup> Minimální a maximální délky PWD/PWD úseků byly určeny pomocí umístění DNA markerů použitých pro genotypování. Bílé úseky představují heterozygotní interval PWD/B6 (PB), oranžové úseky představují homozygotní PWD/PWD (PP) interval. Místo rekombinace je vyobrazeno šedou barvou.

<sup>2</sup> Počet spermií odpovídá počtu spermií v obou nadvarlatech, a to v mil/ml.

<sup>3</sup> Průměr mezi minimální a maximální délkou PWD/PWD konspecifické sekvence.

### 5.1.4 *Cis* a *trans*-efekt regulují míru asynapse

Pokud by pravděpodobnost, že dojde k selhání synapse daného chromozomu, byla úplně nezávislá na zbytku hybridního genomu (*cis*-efekt), potom míra asynapse nerekombinantních intersubspecifických chromozomových párů by byla stejná u F<sub>1</sub> hybridů, dvou-chromozomových i čtyř-chromozomových křížení. Podíl pachytenních jader, která mají všechny chromozomy synapsované, by mohl být předpovězen pomocí znásobení pozorované četnosti synapse u jednotlivých chromozomů. Takto předpokládané hodnoty by byly blízké hodnotám pocházejícím z meiotických analýz a ležely by na diagonále (viz obr. 20). Oba typy analýz však odhalily, že míra asynapse určitého chromozomu závisí i na stavu synapse jiných chromozomů (*trans*-efekt).



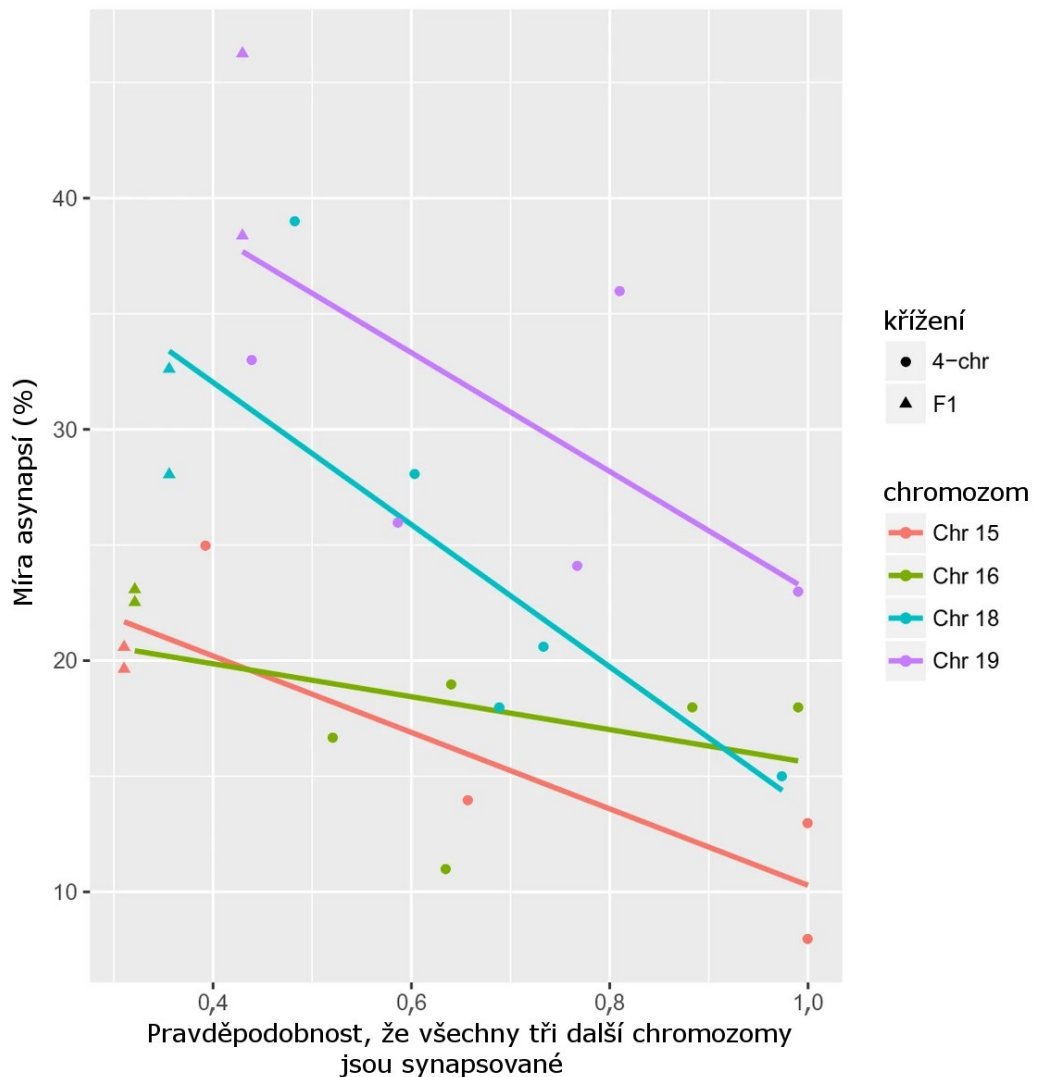
**Obr. 20. *Trans*-efekt konsubspecifických PWD/PWD úseků zvyšuje pravděpodobnost úplné synapse intersubspecifických PWD/B6 homologů u dvou a čtyř-chromozomového křížení**

Předpokládaná míra synapse pachytenních jader byla vypočítána pro každou myš z dvou a čtyř-chromozomového křížení pomocí znásobení pozorované míry synapse FISH značených chromozomů (chromozomy 15, 16, 18, 19) a pozorované míry synapse zbylých autozomů u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů. Míra asynapse byla vypočítána jako doplnění míry synapse. Rozdíl mezi předpokládanou a pozorovanou asynapsí je nejvíce patrný u samic pocházejících ze čtyř-chromozomového křížení s nejnižší předpokládanou mírou asynapse. Záchrana spermatogeneze vyjádřená přítomností spermií v nadvarlatech se objevovala, pokud bylo více než 40 % pachytenních jader plně synapsováno. SC – počet spermií v ml/ml.

Za první, pozorovaný podíl synapsovaných pachytenních jader u F<sub>1</sub> hybridů byl 13,1 % (11,4-14,9 %) (95% CI), byl tedy dvakrát tak vyšší než předpokládaný podíl 6,6 % vypočítaný znásobením četnosti synapse jednotlivých chromozomů. Toto pozorování naznačuje *trans*-efekt synapsovaných autozomů vůči pravděpodobnosti asynapse jiných PWD/B6 chromozomových párů. U dvou a čtyř-chromozomových křížení byl tento *trans*-efekt ještě výraznější.

Za druhé, na úrovni jednotlivých chromozomů bylo nejpřímější srovnání mezi nerekombinantními PWD/B6 chromozomy, kde byla míra asynapse, v porovnání s F<sub>1</sub> hybridy, výrazně snížena u dvou a čtyř-chromozomových křížení. *Trans*-efekt jsme u F<sub>1</sub> hybridů a čtyř-chromozomového křížení dále analyzovali na chromozomech 15, 16, 18 a 19 porovnáním míry asynapse daného nerekombinantního PWD/B6 páru s ostatními třemi analyzovanými chromozomy. Obrázek 21 ukazuje zápornou korelaci od  $r = -0,45$  pro chromozom 16 k  $r = -0,88$  pro chromozom 15. Průměrně, pokud je předpokládaná synapse tří chromozomů zvýšena o 10 %, můžeme očekávat 4,18% (2,72-5,34%) (95% CI) pokles míry asynapse u čtvrtého chromozomu.

*Trans*-efekt je druhým negenovým účinkem, který primárně ovlivňuje míru asynapse. Jeho mechanismus je nejasný.



**Obr. 21. Negativní korelace míry asynapsy pro daný chromozom**

Míra asynapsy u jednotlivých nerekombinantních konzomických chromozomů PWD/B6 modifikovaných v *trans* pomocí pravděpodobnosti synapsy zbývajících tří konzomických chromozomů u jednotlivých samců čtyř-chromozomového křížení ve srovnání s PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridy.

Míra asynapsy daného chromozomu je v negativní korelaci ( $r = -0,88, -0,45, -0,80, -0,67$  pro chromozomy 15, 16, 18, 19, v uvedeném pořadí) s pravděpodobnostmi, že všechny ostatní tři analyzované chromozomy jsou synapsovány.

### 5.1.5 Vliv exogenních DNA dvouřetězcových zlomů na míru asynapse PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů

Pro správný vývoj pohlavních buněk je důležitá synapse homologních chromozomů. Aby mohla synapse proběhnout, musí nejprve v leptotenních jádrech dojít k programovaným DNA dvouřetězcovým zlomům (DSBs) vyvolaným DNA topoisomerázou *Spo11* (Keeney et al. 1997, Keeney 2008). *Spo11* topoisomeráza štěpí DNA v místech zvaných rekombinační „hotspoty“. Tato místa jsou určována pomocí proteinu PRDM9, který trimethyluje histon H3 v místě lysinu 4 nebo lysinu 36 (Buard et al. 2009, Powers et al. 2016). U PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů však *Prdm9* gen navíc reaguje jako jeden z hlavních genů hybridní sterility (Mihola et al. 2009, Forejt et al. 2012). Protože se nám v předchozí práci (Gregorova et al. 2018) podařilo odstranit PRDM9 hotspot asymetrii přidáním náhodných chromozomových PWD/PWD úseků delších než 27 Mb a tím i obnovit synapsi homologních chromozomů u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů, chtěli jsme zjistit, zda k synapsi meiotických chromozomů přispějí uměle vytvořené dvouřetězcové zlomy. K vytvoření těchto exogenních zlomů jsme využili cisplatinu, což je chemoterapeutické léčivo působící na rakovinové buňky (Basu & Krishnamurthy 2010). Cisplatina (cis-diamin-dichloridplatina, dále jen cisPt) vytváří kovalentní vazby mezi purinovými bázemi, a to převážně uvnitř řetězce, může však vytvářet i vazby mezi řetězci. Odstraněním kovalentních vazeb mezi řetězci vznikají DSBs, které mohou být opraveny nehomologním spojováním koncových částí nebo homologní rekombinací (Hanneman et al. 1997, Lawrence et al. 2016). Z prací (Hanneman et al. 1997, Romanienko & Camerini-Otero 2000) jsme věděli, že cisPt zvýšila počet rekombinačních míst a zlepšila synapsi chromozomů u SPO11 knockoutovaných myší, což by naznačovalo, že v párování homologních chromozomů mohou exogenní DSBs částečně nahradit DSBs vytvořené SPO11.

Nejprve jsme provedli pilotní experiment, kdy byla neplodným PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridním samcům injikována cisPt v dávce 10 mg/kg váhy, kontrolnímu samci byl injikován pouze roztok 0,9% NaCl, samci byli následně po 4, 5, 7 a 8 dnech usmrceni. Pro sledování jednotlivých stádií meiotické profáze I. bylo použito značení proteinu synaptonemálního komplexu (SYCP3) pro zvýraznění chromozomů, značení fosforylované varianty histonu  $\gamma$ H2AX k rozlišení stádií jader a značení proteinu H1t k určení stádií od středního pachytenu dál. Už po 4 dnech od injikování cisPt bylo možné

sledovat změnu v rozložení jader pro jednotlivá stádia profáze I., tato změna byla ještě znatelnější u samců usmrcených 7. a 8. den po injekci (tab. 14). Nejvýraznější posun bylo možné pozorovat u samců 7. a 8. den po injekci cisPt, kdy jsme mohli v meiotických preparátech sledovat i diplotenní jádra, která se kvůli meiotické pachytenní zástavě u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů normálně nenacházejí, zároveň i procentuální zastoupení středních a pozdních pachytenů bylo zřetelně vyšší.

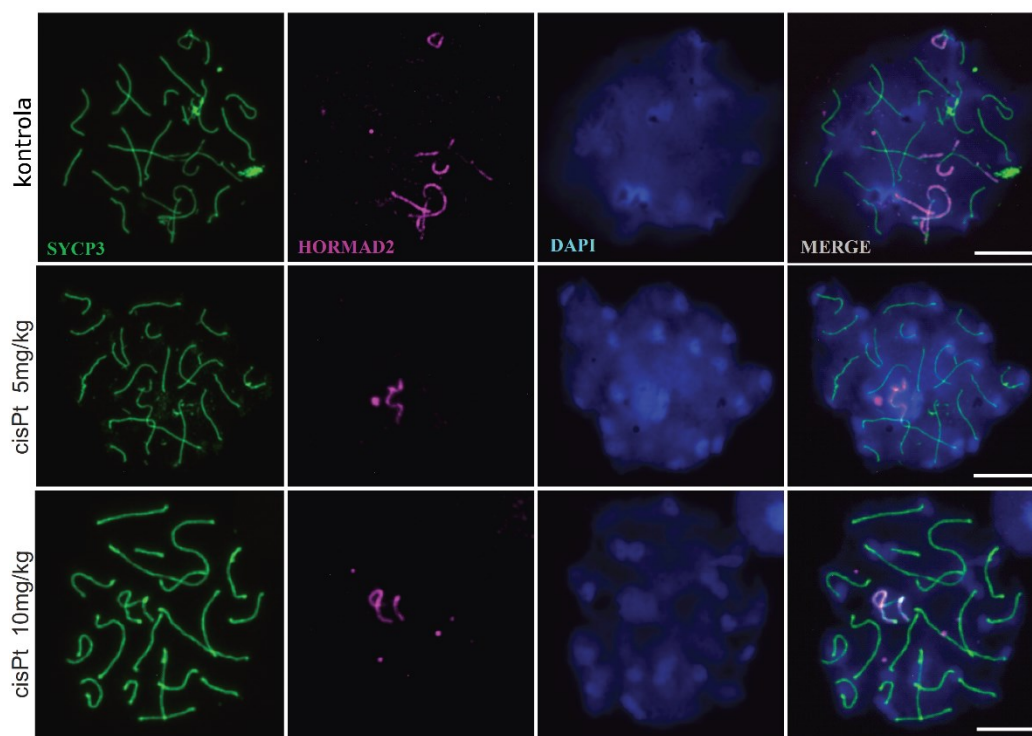
**Tab. 14. Rozložení jader meiotické profáze I. u PWD/B6 F1 hybridních samců ovlivněných cisPt**

cisplatina	leptotene (%)	lepto/zygo (%)	zygotene (%)	zygo/pachy (%)	časný pachytene (%)	střední pachytene (%)	pozdní pachytene (%)	diplotene (%)
kontrola	10,3	4,1	29,7	12,8	4,0	1,5	1,5	0
4 dny	0	0,8	27,5	26,7	41	2,6	1,3	0
7 dní	0	0	16,8	12,1	39,3	10,3	19,6	1,9
7 dní	0	0,05	28,2	23,6	23,2	12,3	9,1	3,2
8 dní	0	0	9,0	10,8	29,6	12,1	34,1	4,9

V tabulce je znázorněn procentuální posun jednotlivých stádií meiotické profáze I. Nejvýraznější posun je vidět u samců 7. a 8. den po injikování cisPt. U těchto samců, na rozdíl od PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů, byla zastoupena i diplotenní jádra, zároveň došlo k výraznému navýšení středních a pozdních pachytenních jader.



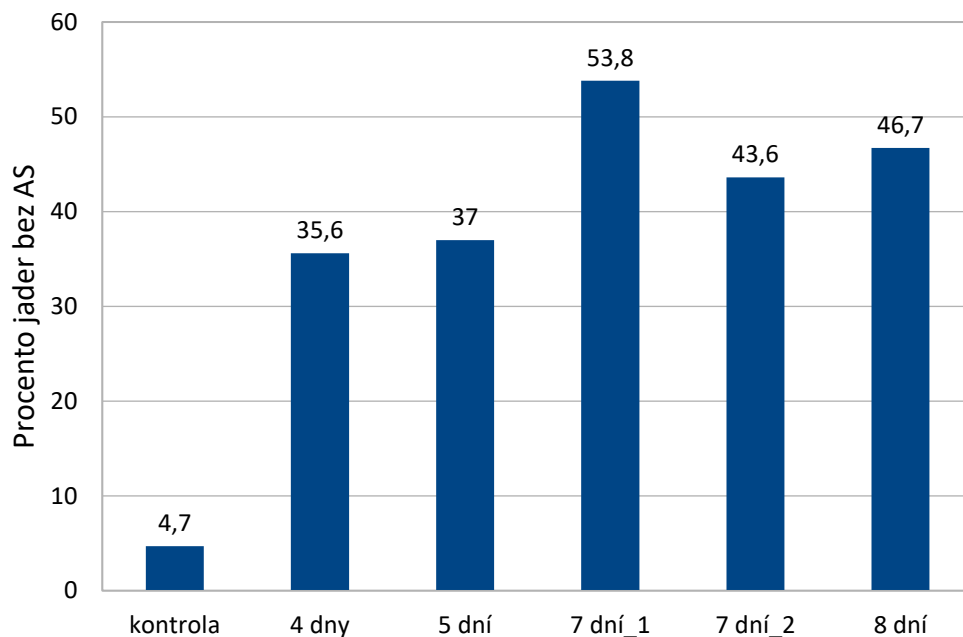
K vizualizaci chromozomů pomocí proteinů synaptonemálního komplexu jsme použili anti-SYCP3 protilátku (zelená), nesynapsované části chromozomů byly nabarveny anti-HORMAD2 protilátkou (fialová), DNA byla značena pomocí DAPI (modrá) (obr. 22).



**Obr. 22. Imunobarvení asynapsí v pachytenních jádrech**

Efekt cisPt je viditelný u cisPt (8 dní po injekci) ovlivněných pachytenních jader. Ukázané spermatoocyty jsou pro kontrolu a cisPt 5 mg/kg v časném stádiu pachytenu a pro cisPt 10 mg/kg v pozdním stádiu pachytenu. Měřítka 10  $\mu$ m.

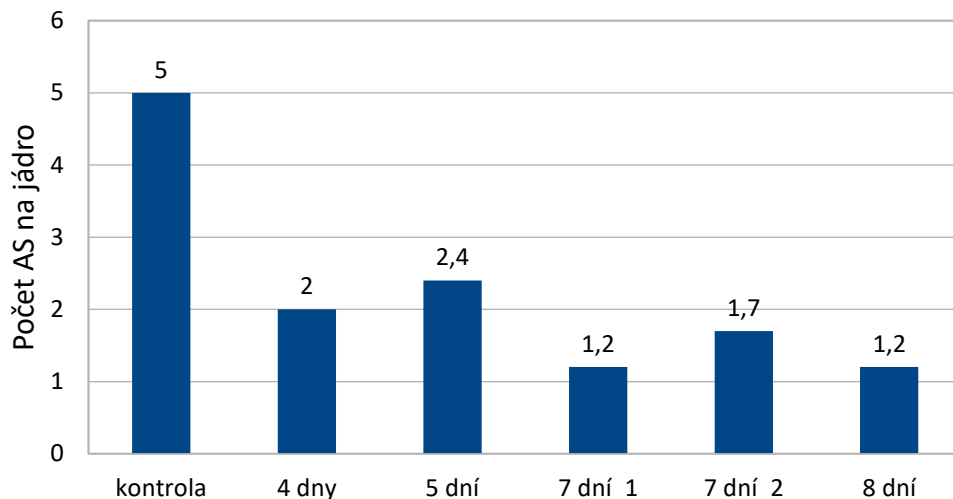
Procentuální zastoupení pachytenních jader se všemi plně synapsovanými chromozomy dramaticky vzrostlo z pouhých 4,7 % u kontrolního samce na 48,8 % (53,8 % a 43,6 %) pro samce 7 dní po injekci a 46,7 % pro samce 8 dní po injekci (obr. 23).



**Obr. 23. Nárůst jader s plně synapsovanými chromozomy**

Samcům byla injikována cisPt v koncentraci 10 mg/kg váhy těla. Každý sloupec reprezentuje jednoho samce. U injikovaných samců došlo k významnému nárůstu synapsovaných jader na 48,8 % (53,8 % a 43,6 %) pro samce 7 dní po injekci a 46,7 % pro samce 8 dní po injekci, oproti kontrolnímu samci s pouze 4,7 % synapsovaných jader.

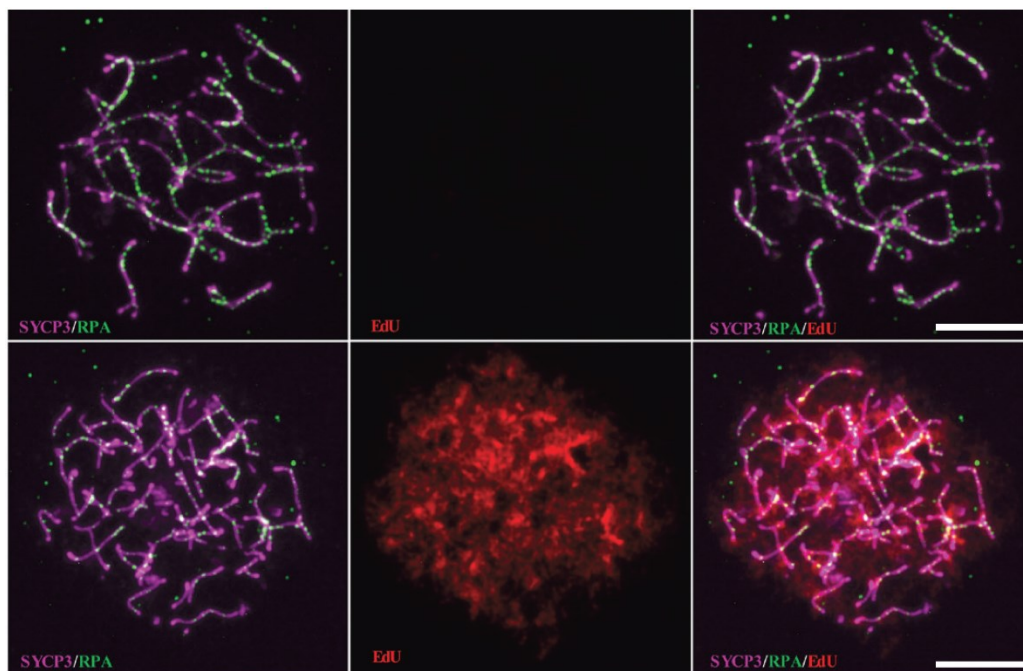
Navíc došlo i výraznému snížení počtu asynapsovaných univalentů v jádře, kdy u kontrolního samce vycházelo v průměru 5 asynapsovaných univalentů na jádro, oproti 1,5 (1,7 a 1,2) pro samce 7 dní po injekci a 1,2 pro samce 8 dní po injekci (obr. 24).



**Obr. 24. Snížení počtu asynapsovaných univalentů na jádro**

U samců injikovaných cisPt v dávce 10 mg/kg váhy těla došlo ke zřetelnému snížení počtu asynapsovaných univalentů na jádro, z 5 u kontroly na 1,5 (1,2 a 1,7) u samců 7 dnů po aplikaci a 1,2 u samce 8 dní po aplikaci.

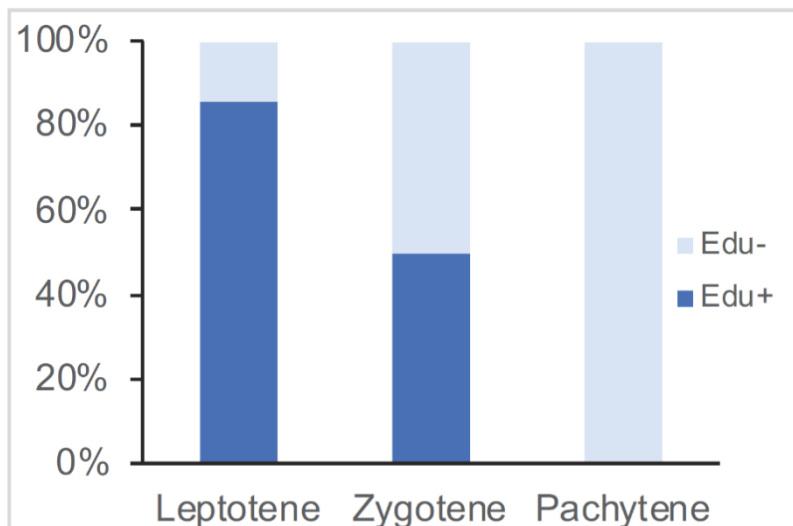
Abychom rozšířili výsledky z pilotního experimentu, rozhodli jsme se navíc k cisPt injikovat i 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU). EdU jako analog thyminu (Salic & Mitchison 2008) nám sloužil k rozlišení spermatogenních jader replikující jejich DNA v momentě aplikace cisPt (obr. 25). Samcům byla do peritoneálního prostoru injikována jedna dávka cisPt v koncentraci 1 mg/kg, 5 mg/kg nebo 10 mg/kg váhy společně s 50 mg/kg EdU. Samci byli usmrceni 40 hodin po aplikaci, což umožnilo stanovit počet DSBs v meiotické profázi I. nebo 8 dní po aplikaci pro analyzování míry synapse v pachytenních jádrech. Tato časová rozmezí byla stanovena podle dříve publikovaných časových odhadů trvání meiotické S-fáze (20 hodin), leptotenu (24-48 hodin), zygotenu (24-32 hodin) a pachytenu (160 hodin) (Oakberg 1956, Oud et al. 1979, Goetz et al. 1984).



**Obr. 25. Rozlišení zygotenů na EdU-pozitivní a EdU-negativní**

EdU-negativní a EdU-pozitivní zygoteny představují jádra před premeiotickou S-fází a po ní v době aplikace cisPt (40 hodin po aplikaci cisPt a EdU). Fialově jsou imunobarvením anti-SYCP3 protilátkou nabarvené chromozomy, zeleně RPA místa spojená s endogenními SPO11-vyvolanými a s exogenními cisPt-vyvolanými DSBs, červeně je značené EdU. Měřítko 10  $\mu$ m.

Čtyřicet hodin po injekci cisPt a EdU bylo  $84,1 \pm 3,3$  % (průměr  $\pm$  SE) leptotenů a  $49,3 \pm 2,2$  % zygotenů pozitivních na EdU, což znamená, že byly v době injekce nebo krátce poté v S-fázi. Zbýlých 15,9 % EdU-negativních leptotenů pravděpodobně zahájilo svou S-fázi až po předpokládaném vyčerpání volného EdU (20 hodin nebo více po injekci), zatímco EdU-negativní zygoteny dokončily replikaci DNA před injekcí CisPt a EdU. Všechny pachyteny dokončily replikaci DNA před aplikací, a byly tedy EdU-negativní (obr. 26). Časové rozložení jader pozitivních na EdU lépe odpovídalo kratším publikovaným odhadům doby trvání stádia leptotenu a zygotenu.

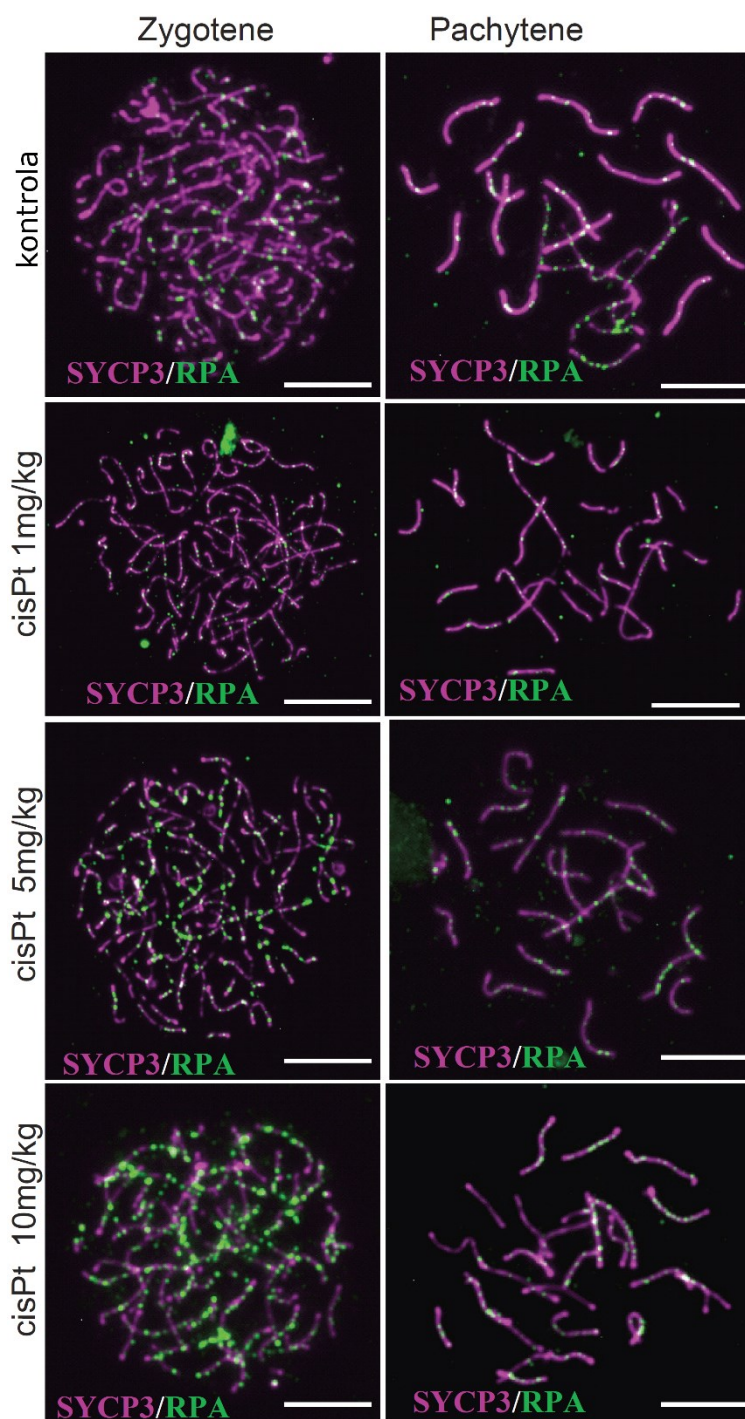


**Obr. 26. Poměr EdU-pozitivních a EdU-negativních jader**

Osm samců bylo po 40 hodinách od aplikace cisPt a EdU analyzováno na rozložení EdU-pozitivních a EdU-negativních jader pro tři stádía meiotické profáze I. Počet analyzovaných jader: leptoteny 126, zygoteny 507, pachyteny 473.

### 5.1.6 Detekce DNA DSBs po aplikaci cisplatiny

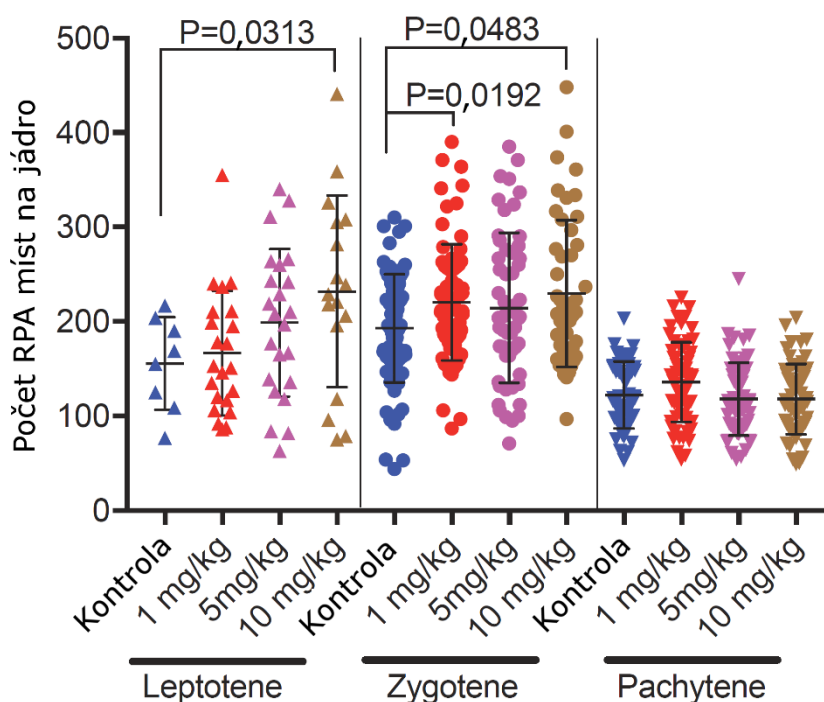
Jako marker DSBs jsme použili imunobarvení RPA proteinu (obr. 27), který se v mitotických i meiotických buňkách váže na jednořetězcovou DNA brzy po rozštěpení DSBs (Ribeiro et al. 2016, Pacheco et al. 2018).



**Obr. 27. Imunobarvení RPA míst v zygotenních a pachytenních jádrech**

RPA místa (zelená) znázorňují místa DSBs, chromozomy jsou viditelné díky imunobarvení anti-SYCP3 protilátky (fialová). Měřítka 10  $\mu$ m. Aplikace cisPt výrazně přispěla k navýšení počtu RPA míst v zygotenních jádrech. Čím vyšší koncentrace cisPt, tím větší byl nárůst RPA míst. Měřítka 10  $\mu$ m.

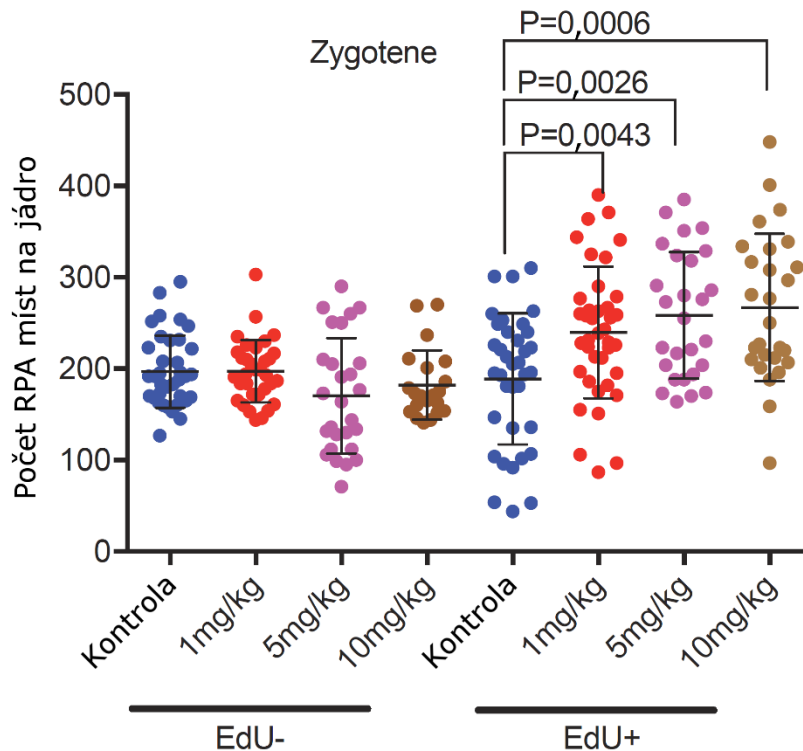
Zjistili jsme, že i přes velké rozdíly v počtu RPA míst v jednotlivých leptotenních i zygotenních jádrech, jádra ovlivněná cisPt v koncentraci 10 mg/kg vykazovala podstatný nárůst RPA míst v leptotenní i zygotenní fázi. Nárůst mediánu RPA míst v leptotenních jádrech byl z počtu 162 RPA u kontrolního samce na 229 RPA míst u samce s injikovanou dávkou 10 mg/kg cisPt, v zygotenních jádrech medián vzrostl z 194 RPA u kontroly na 210,5 RPA u samce ovlivněného 10 mg/kg cisPt. V době 40 hodin po injekci CisPt neovlivnila počet RPA míst v pachytenních jádrech (obr. 28).



**Obr. 28. Počet RPA míst na jádro po 40 hodinách od aplikace cisPt**

Navzdory velké variabilitě v počtu RPA míst mezi jednotlivými buňkami stejné fáze došlo po aplikaci cisPt k významnému zvýšení ( $p < 0,05$ ) těchto RPA míst, a to ve stádiích leptotenu a zygotenu. Není patrný žádný údaj o zvýšení RPA míst v pachytenních spermatocytech.

Překvapivě, rozdělení zygotenu na EdU-pozitivní a EdU-negativní ukázalo významné zvýšení RPA míst závislých na cisPt dávce, a to pouze u EdU-pozitivních jader. Dávky 1 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg injikované cisPt zvýšily medián RPA míst z 200,5 u kontrolních samců na 239, 255 a 250 ( $p = 0,0043$ ,  $0,0026$  a  $0,0006$ , Mann-Whitney U test) (obr. 29).

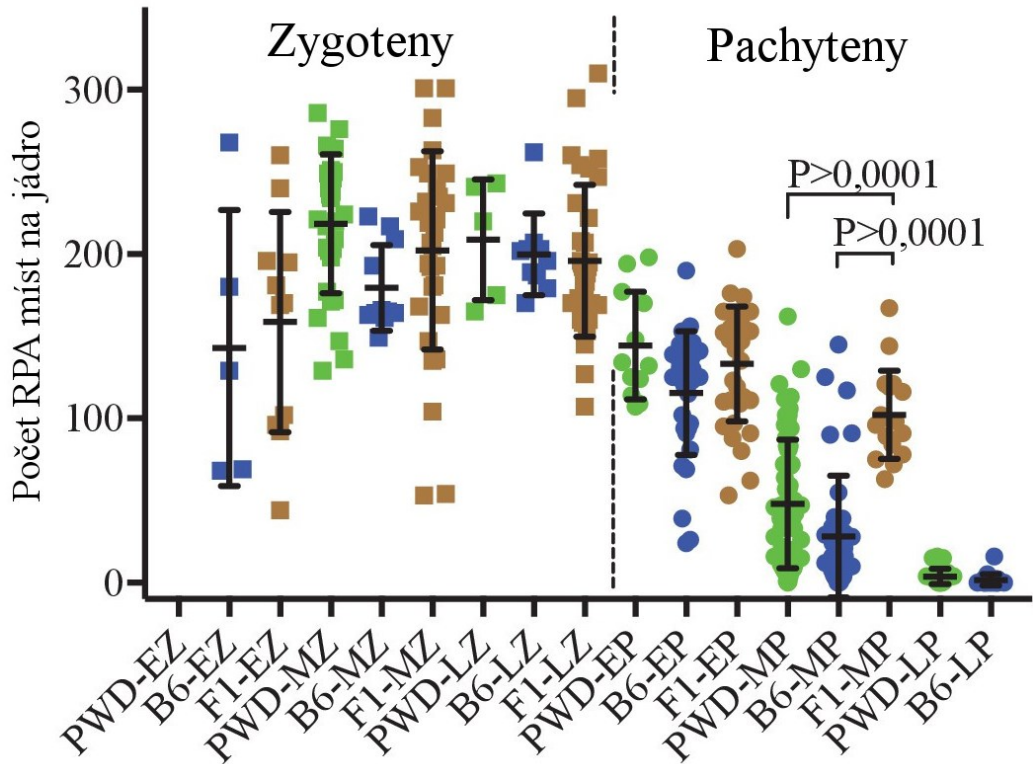


**Obr. 29. Analýza RPA míst v EdU-pozitivních a Edu-negativních zygotenech**

Oddělenou analýzou EdU-pozitivních a EdU-negativních zygotenních spermatocytů byl dokázán zesilující účinek cisPt na počet RPA míst. Tento účinek byl omezen na EdU-pozitivní buňky. Na obrázku je ukázána významná závislost počtu RPA míst na dávce cisPt.

Protože je známé, že kromě asynapse i neopravené DSBs mohou způsobit apoptózu buněk, rozhodli jsme se vyhodnotit dopad RPA míst v pachytenních spermatocytech porovnáním počtu těchto míst v časných, středních a pozdních pachytenech u kontrolních sterilních PWD/B6 F<sub>1</sub> samců a plodných samců PWD a B6 pocházejících z rodičovských kmenů. Nečekaně, ale v souladu s Moensem a kolegy (2007), RPA místa u plodných kontrol přetrvávala v časných pachytenech, ale významně poklesla ve středních pachytenech (medián 38 RPA u PWD a 14 RPA u B6 ve srovnání s 98 RPA u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů,  $p < 0,0001$ ) a prakticky zmizela v pozdním pachytenu (obr. 30).

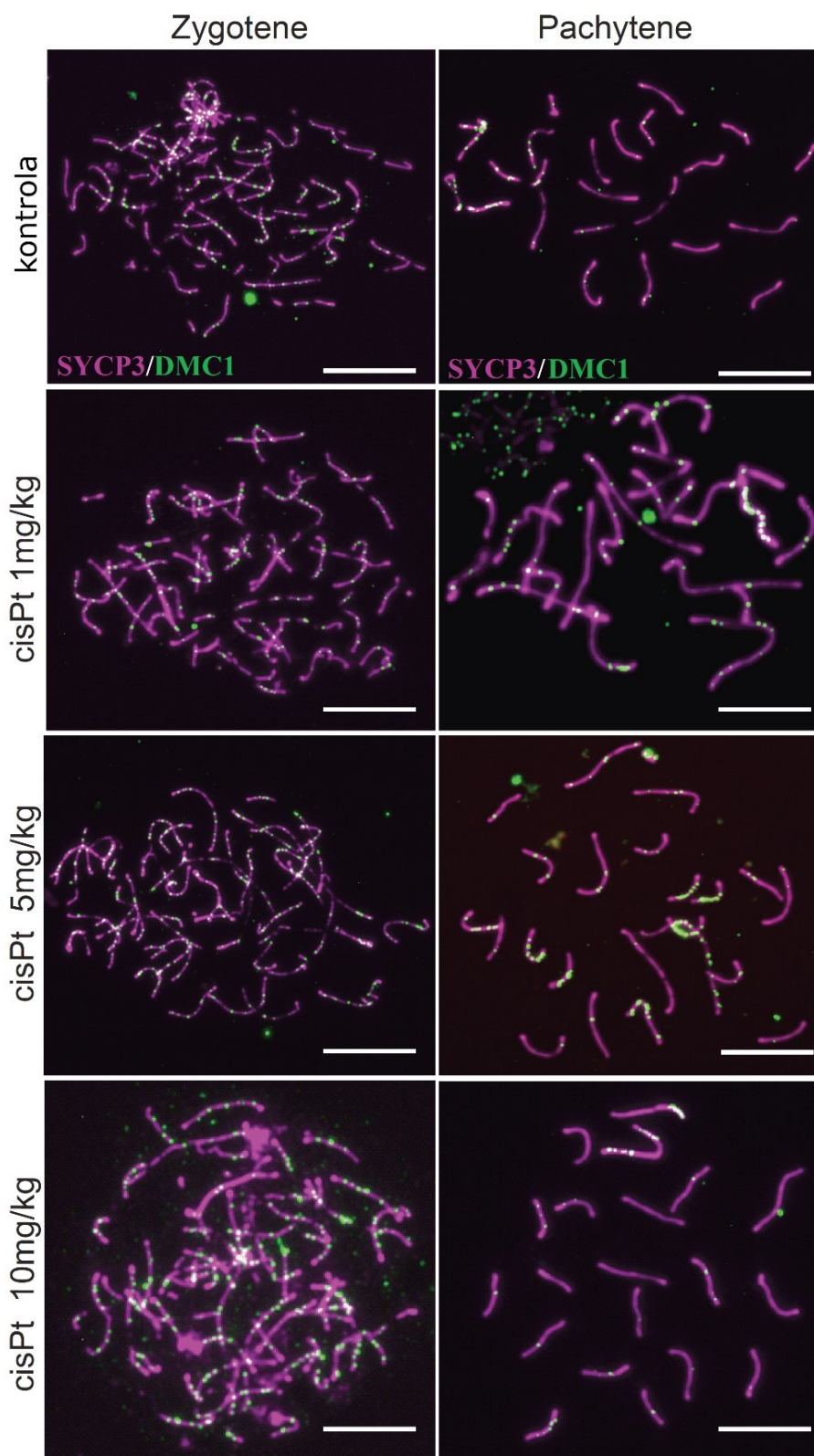




**Obr. 30. Počty RPA míst v pachytenních spermatocytech u PWD, B6 a PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů**

Počty RPA míst na jádro u samců neošetřených cisPt nevykazují významné rozdíly v časném (EZ), středním (MZ) a pozdním (LZ) stádiu zygotenu. Rozsah selhání opravy DSBs v pachytenních jádrech u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů se odráží ve vyšším počtu RPA míst ve srovnání s oběma rodičovskými kmeny ve střední fázi pachytenu. Časný pachytene (EP), střední pachytene (MP), pozdní pachytene (LP).

Protože protein RPA se váže na jednořetězcovou DNA a mohl by zachycovat i jiné formy poškození DNA, než jsou DSBs (Wang et al. 2005), rozhodli jsme se spočítat i místa označená DMC1 proteinem, jenž je specifický pro výměnu meiotických řetězců, která je zapojená do DSBs vytvořených SPO11 (obr. 31).

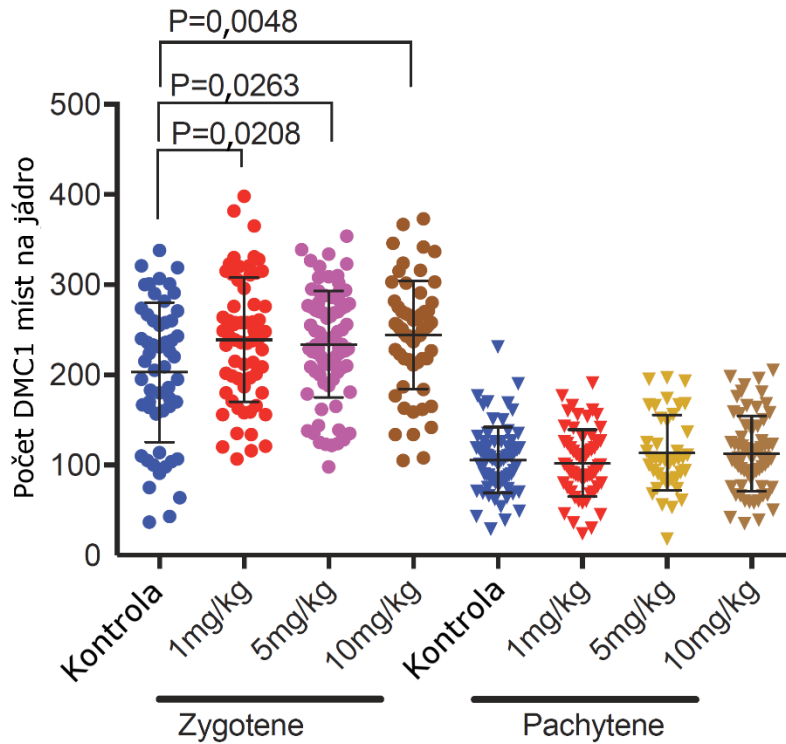


**Obr. 31. Imunobarvení DMC1 v zygotenních a pachytenních jádrech**

DMC1 (zelená) označují místo DSBs, SYCP3 (fialová) zvýrazňuje chromozomy. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

CisPt zvyšuje počet DMC1 míst, která znázorňují exogenní DSBs.

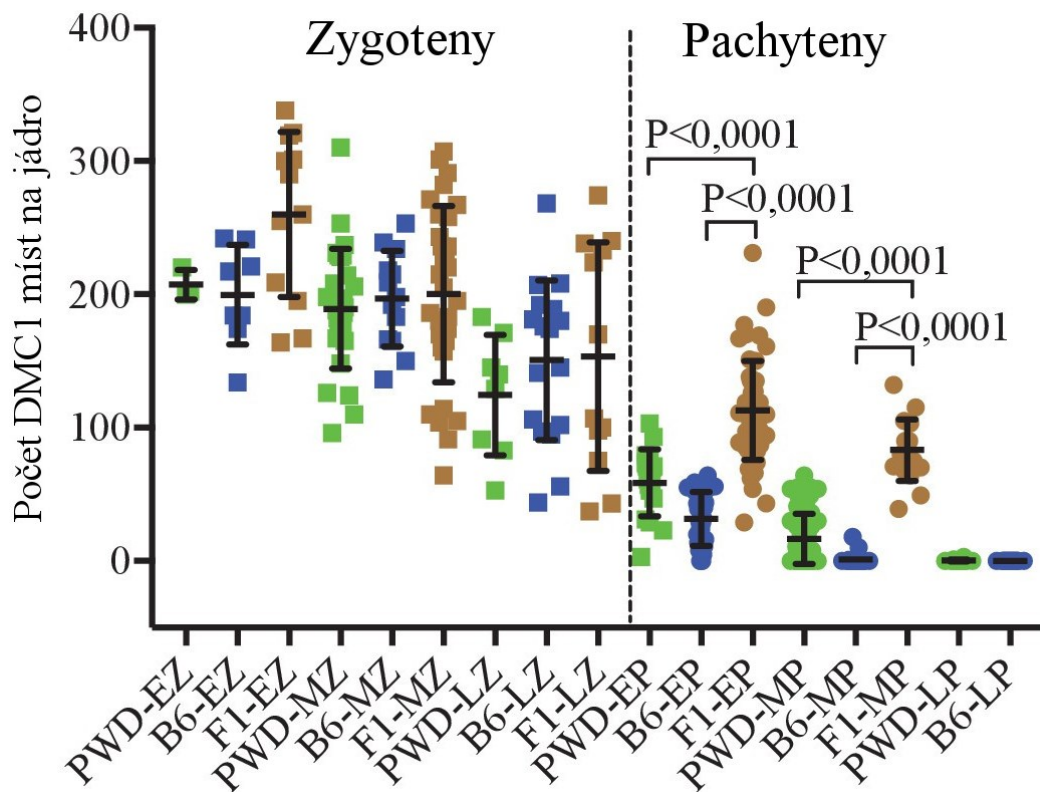
Zvýšení počtu DMC1 míst po aplikaci cisPt odpovídala zvýšení počtu RPA. Medián DMC1 míst u zygotenů vzrostl z 215 na 241 (u cisPt 1 mg/kg), 233 (u cisPt 5 mg/kg) a 251 (u cisPt 10 mg/kg), avšak u pachytenních jader cisPt nezměnila frekvenci DMC1 (obr. 32).



**Obr. 32. Analýza DMC1 u zygotenů a pachytenů**

Počet DMC1 se 40 hodin po injekci CisPt u zygotenních jader zvyšuje v závislosti na dávce cisPt, ale nemění se v pachytenních spermatocytech.

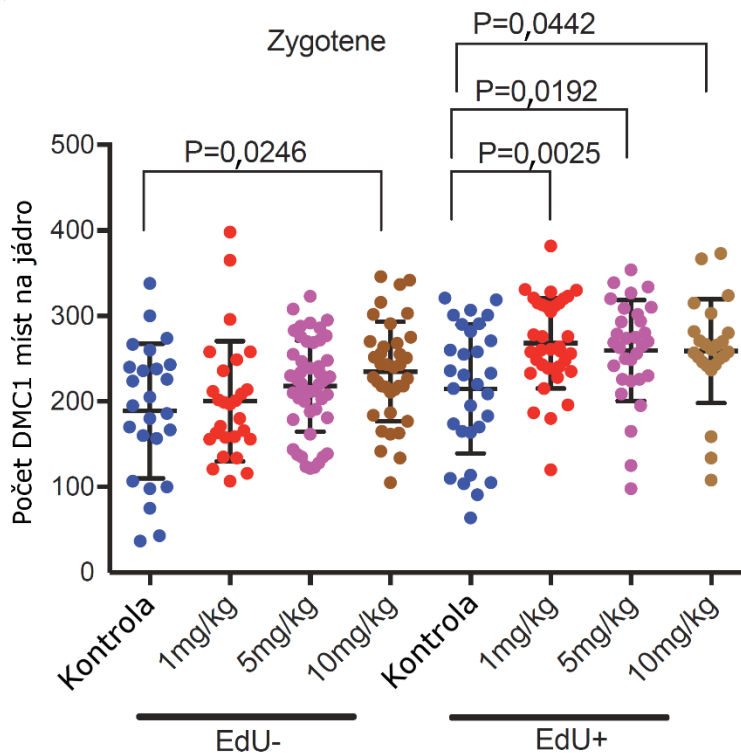
Na rozdíl od RPA, počet DMC1 míst významně poklesl u časných pachytenů plodných PWD (medián 60) a B6 (medián 31) kontrol ve srovnání se 111 ložisky u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů a prakticky zmizel ve středním pachytenu (medián 10 DMC1 u PWD a 0 DMC1 u B6 ve srovnání s 85 ohnisky v PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridy) (obr. 33).



**Obr. 33. Počty DMC1 míst v pachytenních spermatocytech u PWD, B6 a PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů**

Počty DMC1 míst na jádro u samic nešetřených cisPt nevykazují významné rozdíly ve fázi zygotenu. Rozsah selhání opravy DSBs v časných a středních pachytenech PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů se odráží ve významném udržení DMC1 míst ve srovnání s oběma rodičovskými kmeny.

CisPt zvyšovala počty DMC1 míst jak u EdU-pozitivních, tak u EdU-negativních zygotenních jader. U EdU-negativních zygotenu se jednalo o s těžší významné navýšení, významným se stalo až při dávce 10 mg/kg cisPt ( $p = 0,0246$ ). Avšak u EdU-pozitivních zygotenních jader bylo toto zvýšení detekovatelné ve všech třech dávkách z 225,5 u kontroly na 260,5 (u 1 mg/kg cisPt), 269 (5mg/kg cisPt) a 259,5 DMC1 míst (10mg/kg cisPt) ( $p = 0,0025, 0,0192$  a  $0,0442$ , Mann-Whitneyův U test) (obr. 34).



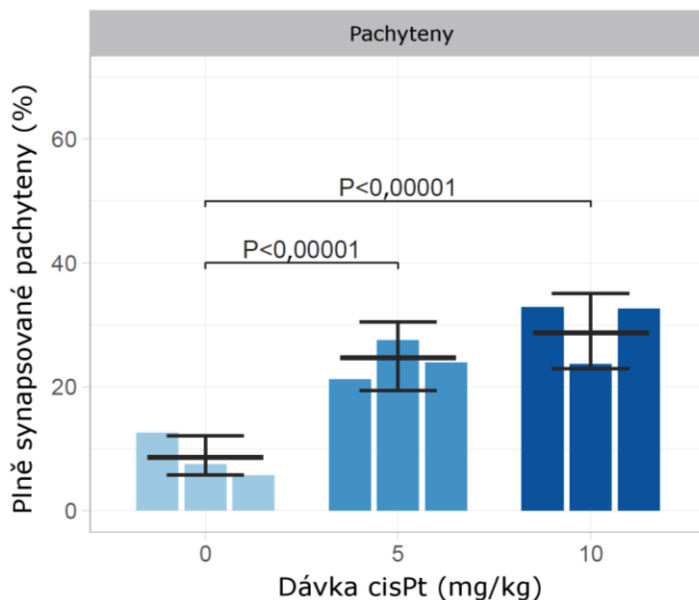
**Obr. 34. Analýza DMC1 míst v EdU-pozitivních a EdU-negativních zygotenech**

Zvýšení počtu DMC1 míst u EdU-negativních a EdU-pozitivních zygotenních jader. U EdU-pozitivních jader je zvýšení počtu DMC1 detekovatelné ve všech třech koncentracích cisPt.

### 5.1.7 Cisplatina podporuje synapsi meiotických chromozomů

Za předpokladu, že nedostatek symetrických DSBs hotspotů je skutečně hlavní příčinou selhání meiotické synapse (Davies et al. 2016, Gregorova et al. 2018) a že zvýšená frekvence DMC1 míst odráží DSBs vyvolané cisPt, pak by exogenní DSBs měly zlepšit synapsi homologních chromozomů u PWD/B6 F1 hybridů. Díky získaným výsledkům z pilotního experimentu jsme se rozhodli aplikovat cisPt (v koncentraci 5 mg/kg a 10 mg/kg) společně s EdU (50 mg/kg) ke snazšímu odlišení jader replikujících svoji DNA v době injekce cisPt. Pro každou dávku cisPt byli 8. den po injekci usmrceni tři samci. Výsledky potvrdily pozitivní účinek cisPt na meiotickou synapsi pozorovanou v pilotním experimentu. Kontrolní samci vykazovali průměrnou frekvenci 8,61 % (5,80; 12,12) (95% CI) plně synapsovaných pachytenních jader, na rozdíl od samců s aplikovanou dávkou 5 mg/kg a 10 mg/kg cisPt, u kterých byl nárůst plně synapsovaných

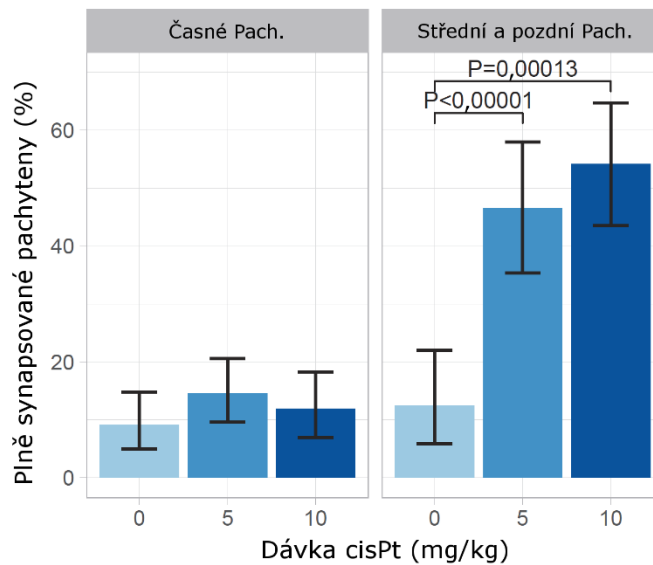
pachytenních jader trojnásobný, a to na 24,68 % (19,41; 30,49) ( $p = 1,6 \times 10^{-9}$ , Tukeyho post-hoc test) pro dávku 5 mg/kg cisplatinu a na 28,71 % (22,86; 35,08) ( $p = 7,3 \times 10^{-13}$ ) pro dávku 10 mg/kg cisPt (obr. 35).



**Obr. 35. Zlepšení synapse v pachytenních jádrech po injekci cisPt**

Osm dní po injekci cisPt se procento plně synapsovaných pachytenů významně zvýšilo (na základě modelu GLMM a Tukeyho post-hoc testu).

Synapsi homologních chromozomů jsme analyzovali v časném, středním a pozdním stadiu pachytenu, avšak pro statistické vyhodnocení musela být střední a pozdní pachytenní jádra sloučena kvůli nedostatku pozdních pachytenů. U časných pachytenů nezpůsobila cisPt výrazný nárůst plně synapsovaných jader, ale u středních a pozdních pachytenů bylo zvýšení synapsovaných jader významné (obr. 36).



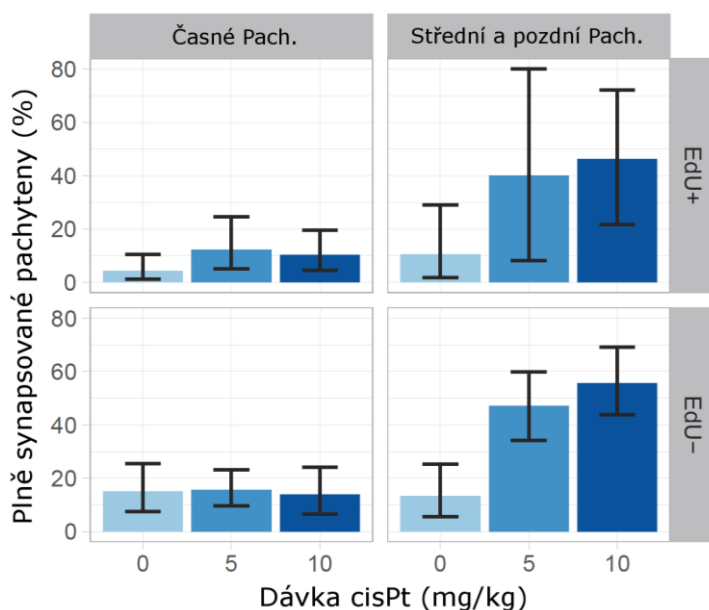
**Obr. 36. Zvýšení procenta synapsovaných jader u středních a pozdních pachytenů**

Účinek cisPt je zřejmý u středních a pozdních pachytenů jader, a to pro obě koncentrace.

Synapse byla nepatrně častější v EdU-negativních, v průměru 1,69 krát (1,02; 2,84) (95% CI), než v EdU-pozitivních pachytenech (obr. 37). Z části jader s exogenními DSBs generovanými v leptotenu/časném zygotenu v době injekce cisPt by mohly vzniknout EdU-negativní plně synapsované pachyteny.

Kromě toho, že účinek cisPt zvýšil frekvenci plně synapsovaných pachytenních jader, byl zřejmý i krátkodobý účinek na zvýšený výskyt pozdních pachytenů. Zatímco v kontrolních PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridních byly zastoupeny pozdní pachyteny pouze ze 2,03 % ze všech pachytenů analyzovaných z meiotických imunopreparátů, vzrostla jejich frekvence na 12,12 % u samců s cisPt v dávce 5 mg/kg a 13,10 % u samců s dávkou 10 mg/kg.

U samců usmrcených 30 dnů po aplikaci cisPt nebyly v nadvarlatech nalezeny žádné spermie. Atrofie semenných tubulů způsobená letálním účinkem cisPt na proliferaci spermatogonií a somatických buněk semenných tubulů bylo možné sledovat v histologických řezech varlat.



**Obr. 37. Účinnost různé koncentrace cisPt na synapsi EdU-pozitivních a Edu-negativních pachytenních jader**

Synapse pachytenních jader byla mírně zvýšena u EdU-negativních buněk.

## 5.2 *Prdm9-Hstx2* inkompatibilita mimo (*M. m. musculus* x *M. m. domesticus*) F<sub>1</sub> hybridy: Křížení ♀ (CAST x PWD) x ♂ B6

Výsledky tohoto projektu zatím nejsou publikované. V průběhu tří let jsem získala velké množství dat, ale práce na projektu byla pozastavena kvůli mému nástupu na mateřskou dovolenou.

Cílem projektu je ověřit hypotézu o významu *Prdm9* genu v neplodnosti mezi(pod)druhových F<sub>1</sub> hybridů v genetické architektuře hybridní sterility mimo *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* poddruhy myši domácí. Dosavadní genetická analýza probíhala na F<sub>1</sub> hybridech, jejichž genom pocházel z inbredních kmenů PWD a B6 reprezentujících oba poddruhy. Nedávno byla funkce *Prdm9* potvrzena i u hybridů dalších inbredních kmenů připravených z divokých myší stejných poddruhů (Mukaj et al. 2020). V tomto projektu jsme připravili hybridní myši s genomem pocházejícím ze tří poddruhů *Mus musculus* křížením samic (CAST x PWD) se samci B6. Takto připravené myši měly 25 % genomu pocházejícího z *M. m. castaneus* (CAST/EiJ, dále jen CAST), který je evolučně od obou dalších poddruhů přibližně stejně vzdálen. Zjišťovali jsme, jak obecná je funkce *Prdm9* jako genu hybridní sterility, zda genom poddruhu



*M. m. castaneus* omezí či zruší interakce mezi *Prdm9* a *Hstx2*, které jsou dominantní pro fertilitu PWD/B6 hybridů.

### 5.2.1 Vliv genu *Prdm9* na parametry plodnosti samců (CAST x PWD) x B6 křížení

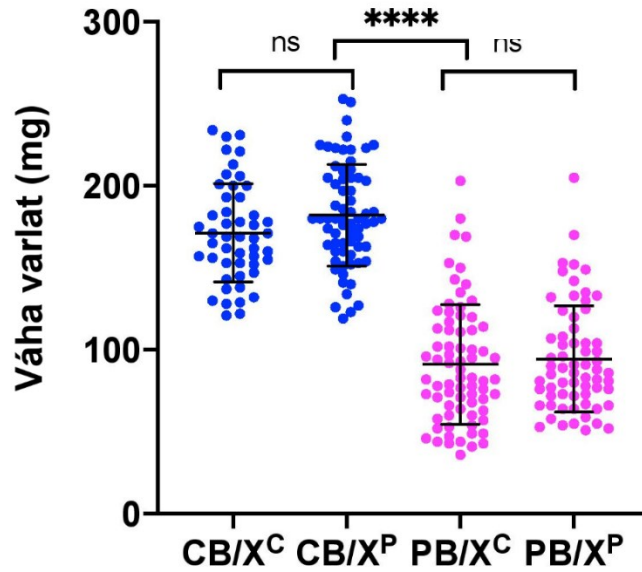
Ze znalostí, že PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů jsou plně sterilní, byly jako první určeny počty spermií, váha varlat a míra asynapse u recipročných F<sub>1</sub> hybridů CAST/PWD a PWD/CAST. U všech F<sub>1</sub> samců byly v nadvarlatech nalezeny spermie. Avšak samci pocházející z křížení CAST/PWD měli nižší váhu varlat, menší počet spermií a vyšší míru asynapse, než tomu bylo u samců vzniklých z opačného křížení PWD/CAST (tab. 15).

**Tab. 15. Parametry plodnosti a míry asynapse u F<sub>1</sub> hybridů CAST/PWD a PWD/CAST**

ID samce	kmen	HstX2	Prdm9	Váha varlat	Počet spermií	Asynapse (%)
29965	CAST x PWD	<i>Hstx2</i> <sup>CAST</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>CAST/PWD</sup>	95	12,5	10,3
29966	CAST x PWD	<i>Hstx2</i> <sup>CAST</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>CAST/PWD</sup>	98	13	16,3
36932	CAST x PWD	<i>Hstx2</i> <sup>CAST</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>CAST/PWD</sup>	97	11,2	X
36933	CAST x PWD	<i>Hstx2</i> <sup>CAST</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>CAST/PWD</sup>	110	12,8	X
29620	PWD x CAST	<i>Hstx2</i> <sup>PWD</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>PWD/CAST</sup>	141	36,0	4,2
29621	PWD x CAST	<i>Hstx2</i> <sup>PWD</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>PWD/CAST</sup>	139	22,8	1,8
29622	PWD x CAST	<i>Hstx2</i> <sup>PWD</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>PWD/CAST</sup>	135	32,6	5,1
29635	PWD x CAST	<i>Hstx2</i> <sup>PWD</sup>	<i>Prdm9</i> <sup>PWD/CAST</sup>	141	37	3,6

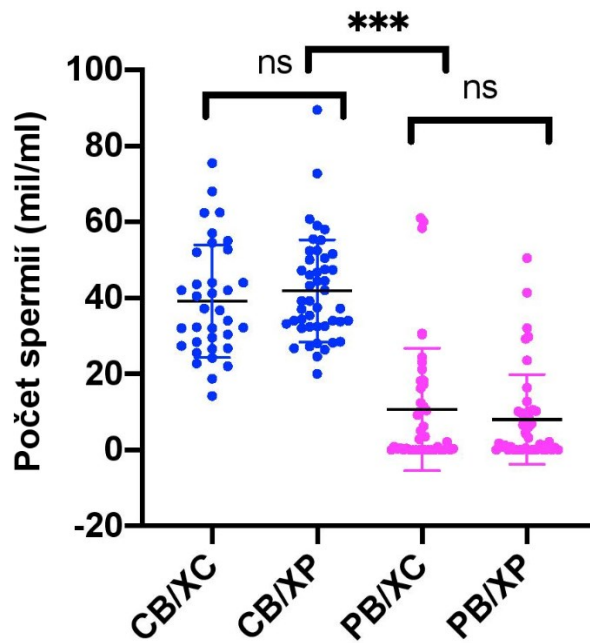
Váha varlat je uváděna v mg, počet spermií v mil/ml, asynapse značí procento jader s alespoň jedním asynapsovaným chromozomem.

Abychom ověřili význam genů *Prdm9* a *Hstx2*, bylo nejprve nutné rozdělit samce do čtyř skupin podle genotypu. Celkem bylo připraveno 208 myší, z nichž 124 bylo dále použito na analýzu asynapse pachytenních chromozomů a část z nich byla navíc genotypována pomocí GigaMUGA (Mouse Universal Genotyping Array). Zjistili jsme, že samci s *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> genotypem, na rozdíl od samců *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup>, byli plodní s velkou váhou varlat a vysokým počtem spermií v nadvarlatech. Na rozdíl od genu *Prdm9*, alely CAST nebo PWD lokusu *Hstx2* nevykázaly žádný rozdíl pro váhu varlat (obr. 38). Stejný vliv genu *Prdm9* se dal pozorovat i pro počet spermií v nadvarlatech (obr. 39).



**Obr. 38. Porovnání jednotlivých skupin myši podle váhy varlat**

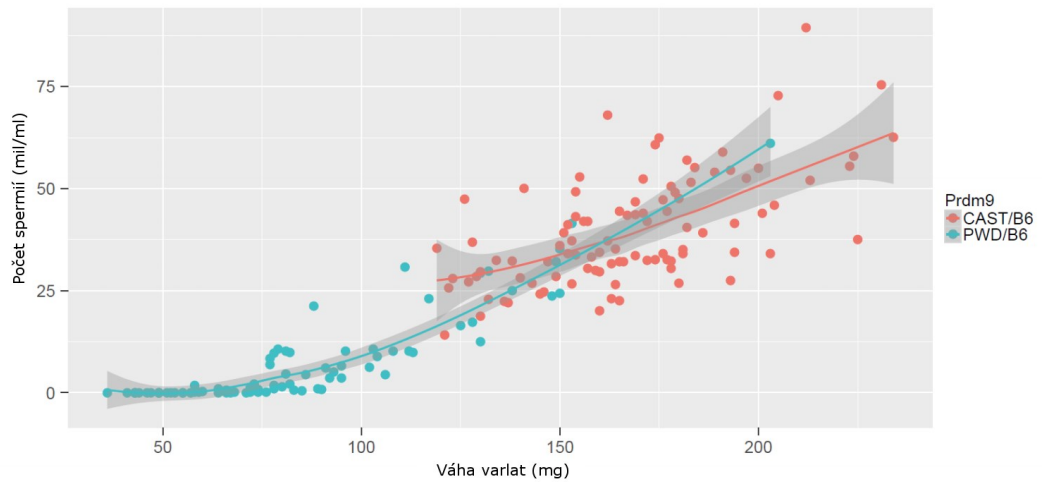
*Prdm9* má zřejmý účinek na váhu varlat, kdy samci nesoucí *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> (značeno CB) vykazovali vysokou váhu varlat, na rozdíl od myši s genotypem *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> (značeno PB) avšak vliv genu *Hstx2*, ať už se jednalo o alelu CAST (X<sup>C</sup>) či PWD (X<sup>P</sup>) nijak významně váhu varlat nezměnil. Každý bod představuje jednoho samce daného genotypu. Váha varlat je uvedena v mg. \*\*\* značí statistickou významnost, ns – statisticky nevýznamný vztah.



**Obr. 39. Srovnání jednotlivých skupin podle počtu spermií**

Účinnost vlivu *Prdm9* na počet spermií v nadvarlatech. *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> způsobuje významně vyšší počet spermií, opět gen *Hstx2* nevykazuje žádný vliv. \*\*\* značí statistickou významnost, ns – statisticky nevýznamný vztah.

U samců bylo možné sledovat vysokou korelaci mezi váhou varlat a počtem spermií (obr. 40).



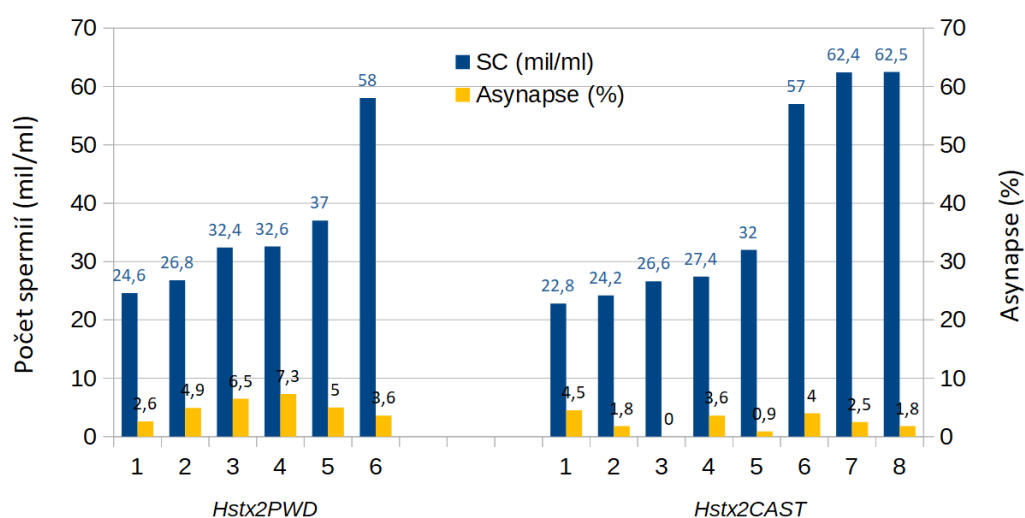
**Obr. 40. Porovnání parametrů plodnosti**

Na obrázku je možné sledovat vysokou korelaci mezi váhou varlat a počtem spermií, a to pro oba genotypy  $Prdm9^{CAST/B6}$  a  $Prdm9^{PWD/B6}$ .

Počet spermií je uveden v milionech na ml, váha varlat v mg.

### 5.2.2 Vliv genu *Prdm9* na míru asynapse u (CAST x PWD) x B6 křížení

Podobně jako tomu bylo u váhy varlat a počtu spermií v nadvarlatech, gen *Prdm9* ovlivňoval i úspěšné párování pachytenních chromozomů. Samci s genotypem  $Prdm9^{CAST/B6}$  vykazovali nízkou míru asynapse pachytenních chromozomů, a to mezi 0-7,3 % (obr. 41).

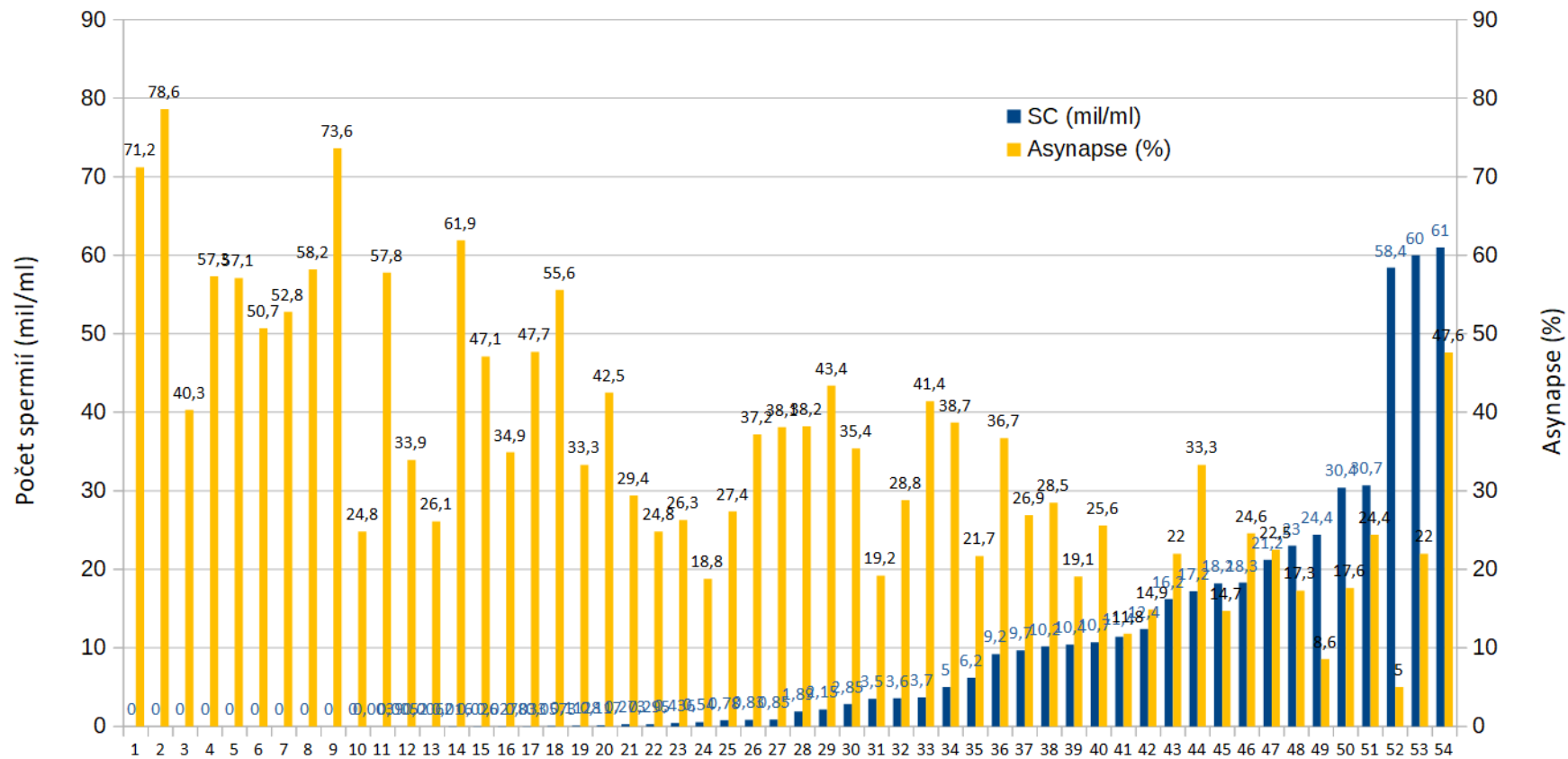


**Obr. 41. Počet spermií a míra asynapse u samců nesoucích *Prdm9<sup>CAST/B6</sup>* genotyp**

Samci nesoucí genotyp *Prdm9<sup>CAST/B6</sup>* jsou plodní s malou mírou asynapse.

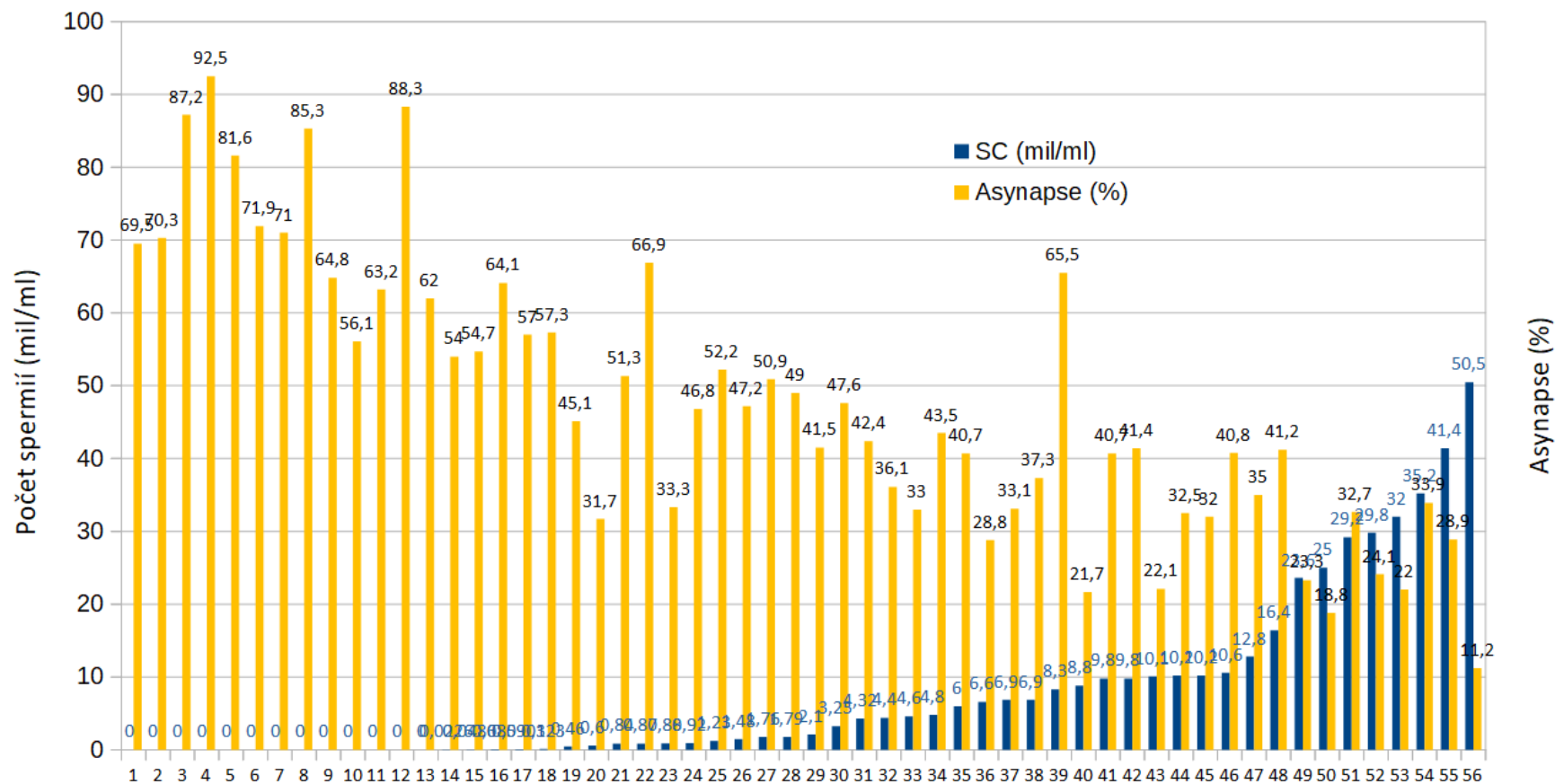
SC – počet spermií v nadvarlatech (mil/ml), Asynapse – procento asynapsovaných chromozomů

Zatímco samci *Prdm9<sup>CAST/B6</sup>* jsou plodní s nízkou mírou asynapse, samci *Prdm9<sup>PWD/B6</sup>* vykazují rozsáhlou škálu fenotypů – od plodných s malým počtem asynapsovaných jader po neplodné s vysokou mírou asynapse. U těchto samců se míra asynapse pohybuje od 8-92 %. Pro snazší přehlednost jsou samci rozděleni do dvou grafů podle genotypu *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>CAST</sup>* a *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>PWD</sup>* (obr. 42 a 43). Stejně jako tomu bylo u váhy varlat a počtu spermií, CAST ani PWD alela genu *Hstx2* neovlivňuje efekt na synapsi pachytenních chromozomů.



**Obr. 42. Počet spermií a míra asynapse u samečů nesoucích *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>CAST</sup>* genotyp**

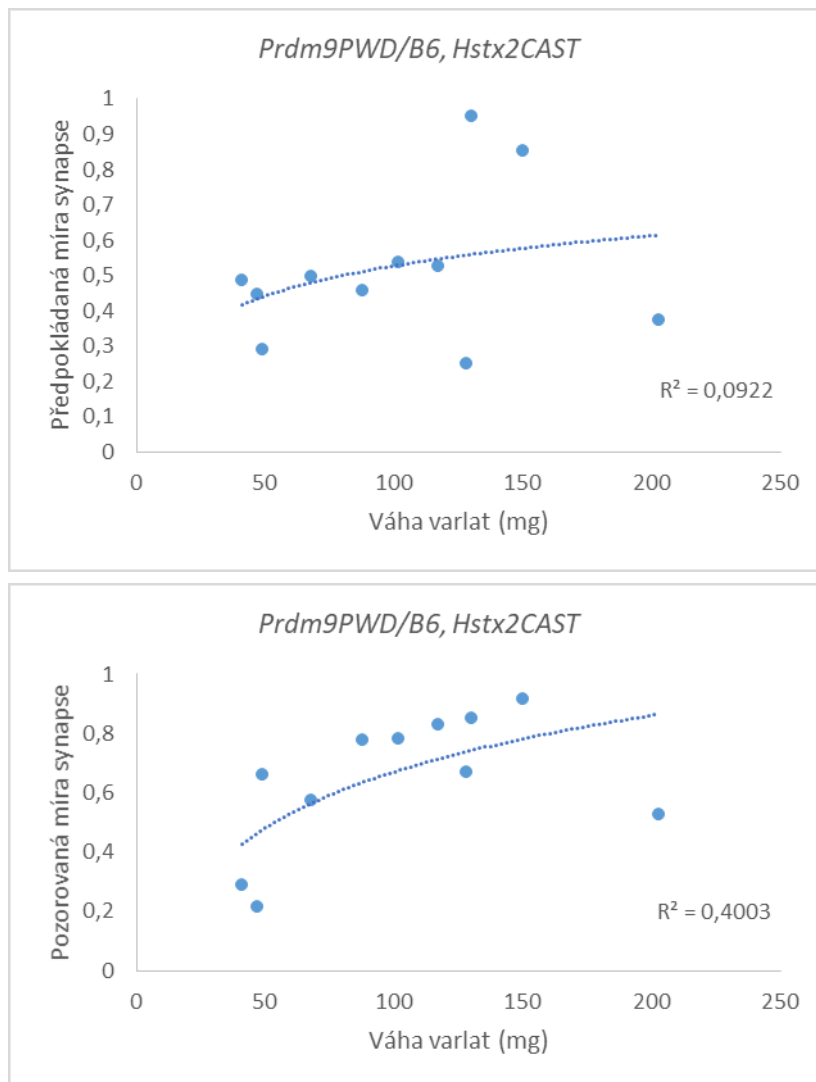
Samci *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>CAST</sup>* vykazují celou škálu fenotypů od neplodných po plodné. SC – počet spermií v nadvarlatech (mil/ml), asynapse – procento jader s asynapsovanými chromozomy (%)



**Obr. 43. Počet spermií a míra asynapse u samců nesoucích *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>PWD</sup>* genotyp**

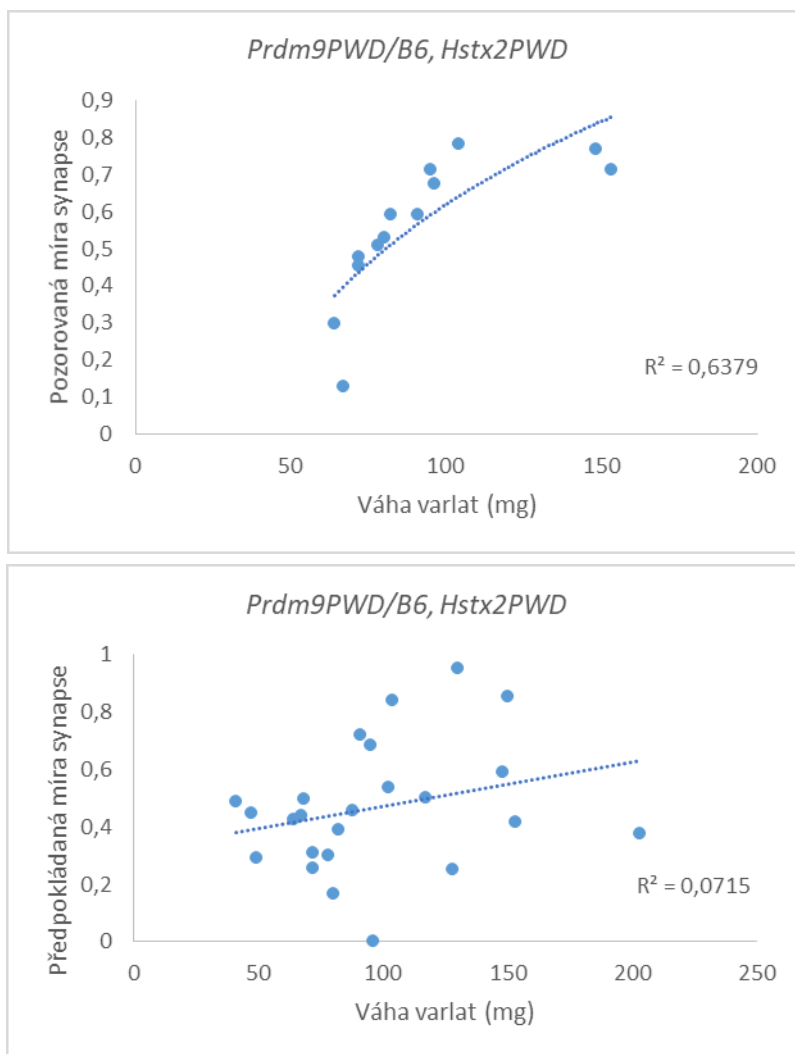
Samci *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>PWD</sup>* vykazují celou škálu fenotypů od neplodných po plodné. SC – počet spermií v nadvarletech (mil/ml), asynapse – procento jader s asynapovanými chromozomy (%)

Z výsledků vyplývá, že gen *Prdm9* se chová jako gen hybridní sterility i v hybridech zahrnujících *M. m. castaneus* genom, je tedy účinný i mimo *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* interakce. Na rozdíl od našich předchozích nálezů (Gregorova et al. 2018) založených na interakcích PWD a B6 genomů, genotyp *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> v tomto křížení vykazuje sice korelaci fenotypů a míry asynapse, ale podíl PWD/B6 interakce na jednotlivých autozomech je nejasný. Námi pozorovaná míra asynapse neodpovídá očekávané asynapsi, která byla určena pomocí GigaMUGA genotypů (obr. 44 a 45). Předpokládáme, že v tomto křížení mají velký vliv zatím nezjištěné modifikující geny CAST původu. Tento předpoklad je v současné době testován na rozsáhlejší panelu hybridních myší.



**Obr. 44. Pozorovaná a očekávaná míra synapse u *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> *Hstx2*<sup>CAST</sup>**

Pozorovaná míra synapse neodpovídá očekávané míře.



**Obr. 45. Očekávaná a pozorovaná míra synapse u *Prdm9<sup>PWD/B6</sup> Hstx2<sup>PWD</sup>***

Pozorovaná míra synapse neodpovídá očekávané míře.



## 6 Diskuze

Hybridní sterilita je jedním z mechanismů, které zajišťují reprodukční bariéry mezi blízkými druhy. K hlavním modelům pro studium postzygotických reprodukčních bariér patří drozofila (Sawamura et al. 1993a, b, Barbash & Ashburner 2003, Brideau et al. 2006, Phadnis & Orr 2009, Tang & Presgraves, 2009, Morán & Fontdevila 2014, Kotov et al. 2019) a nejlépe prozkoumaným savčím modelem je myš domácí (*Mus musculus*). Jedním z přístupů pro pochopení genetické kontroly vzniku reprodukčních bariér je studium volně žijících jedinců v místech hybridní zóny (Dod et al. 1993, Payseur et al. 2004, Vyskocilova et al. 2005, Macholan et al. 2007, Teeter et al. 2010, Macholan et al. 2011). Problémem tohoto přístupu je však vysoká variabilita, složitost nestandardizovaných systémů a obtížná reprodukovatelnost získaných dat. Výhodným kompromisem pro genetická studia se proto jeví výzkum na inbredních laboratorních myších kmenech pocházejících z jednotlivých myších poddruhů *M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus* a *M. m. molossinus* (Forejt & Ivanyi 1974, Forejt et al. 1991, Gregorova & Forejt 2000, Oka et al. 2004, Storchova et al. 2004, Good et al. 2008, Dzur-Gejdosova et al. 2012, White et al. 2012, Wang et al. 2015). Výzkum na hybridech ukázal, že reprodukční izolace je způsobena interakcí více genových lokusů (Duvaux et al. 2011, White et al. 2011, Campbell et al. 2012, Dzur-Gejdosova et al. 2012). První savčí gen hybridní sterility byl objeven nejprve jako *Hybrid sterility 1* lokus (*Hst1*) na chromozomu 17 (Forejt & Ivanyi 1974), který byl pozičním klonováním ztotožněn s genem PR domain containing 9, *Prdm9* (Mihola et al. 2009), kódujícím methyltransferázu histonu H3K4 a H3K36 a odpovědným za rekombinační hotspoty (Baudat et al. 2010, Berg et al. 2010, Myers et al. 2010, Parvanov et al. 2010, Powers et al. 2016, Diagouraga et al. 2018). Další silné lokusy hybridní sterility *Hstx1* a *Hstx2* byly mapovány na chromozomu X (Storchova et al. 2004, Dzur-Gejdosova et al. 2012, Bhattacharyya et al. 2014, Balcova et al. 2016).

### 6.1 Jaký je mechanismus *Prdm9* kontrolované meiotické zástavy?

Genetické mapování genů hybridní sterility, jejich možné epistatické nekompatibility a jejich evolucí pozměněná struktura či projev jsou hlavními složkami

výzkumu genetického mechanismu neplodnosti u intersubspecifických hybridů (Presgraves 2010, Maheshwari & Barbash 2011, Civetta 2016, Mack & Nachman 2017). Jako podmínky způsobující neúplnou synapsi homologních chromozomů, časnou meiotickou zástavu a samčí sterilitu myších intersubspecifických PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů byly určeny heterozygotnost genu *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> (Mihola et al. 2009), PWD alela lokusu *Hstx2* na chromozomu X (Storchova et al. 2004, Forejt et al. 2012, Bhattacharyya et al. 2014) a autozomální PWD/B6 heterozygotnost (Dzur-Gejdosova et al. 2012, Gregorova et al. 2018). Molekulární mechanismus působení *Hstx2* je zatím stále nejasný, pro meiotickou zástavu kontrolovanou PRDM9 jsme navrhli následující vzájemně se nevylučující vysvětlení.

Nejprve jsme předpokládali, že divergence rychle se vyvíjejících nekódujících DNA a/nebo RNA sekvencí může zasahovat do synapse chromozomů kvůli možné interferenci při hledání homologie na templátu (Bhattacharyya et al. 2014). Naše hypotéza však nenabídla vysvětlení role *Prdm9* v předpokládaném mechanismu. Davies a kolegové (2016) zjistili, že PRDM9<sup>PWD</sup> varianta označila silné hotspoty preferenčně na chromozomu B6, a naopak PRDM9<sup>B6</sup> preferenčně aktivovala silná vazebná místa na PWD chromozomu, a to zhruba v 70 % případů. DSBs v těchto hotspotech se obtížně opravují nebo se opravují příliš pozdě, například použitím sesterské chromatidy jako templátu (Faieta et al. 2016, Li et al. 2019). Míra asynapse konkrétního chromozomu závisela na rozložení asymetrických DSB hotspotů (Davies et al. 2016, Gregorova et al. 2018) a na nedostatečném počtu DSBs generovaných v symetrických hotspotech. Tím by mohlo dojít k poruše párování chromozomů a normálního průběhu spermatogeneze. Takové vysvětlení je v souladu se zjištěním, že indukované exogenní DSBs výrazně zlepšily synapsi homologních chromozomů (Wang et al. 2018).

Alternativní vysvětlení je založeno na nálezů významně zvýšených „defaultních“ („toxických“) DSBs hotspotů nezávislých na PRDM9 ve spermatocytech PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů (Smagulova et al. 2016). Takovéto hotspoty jsou přednostně umístěny v promotorech a jiných regulačních sekvencích. Protože byly tyto „defaultní“ hotspoty pozorovány u knockoutovaných *Prdm9*<sup>-/-</sup> sterilních samců, u hybridních samců by toto pozorování mohlo ukazovat na funkční nedostatek PRDM9, například neúčinné PRDM9 multimery (Baker et al. 2015b, Altemose et al. 2017). Tento mechanismus by však obtížně vysvětlil naše zjištění významu konsubspecifických úseků a exogenních DNA DSBs pro párování a fertilitu hybridů (Gregorova et al. 2018, Wang et al. 2018).

Třetí možný mechanismus navrhli Yamada a spolupracovníci (2017), kteří zjistili, že přibližně 30 % DSBs určených PRDM9 se nachází v repetitivních sekvencích včetně transpozonů, což by mohlo být škodlivé pro homologní synapsi u intersubspecifických hybridů z důvodu možných nehomologních interakcí mezi nehomologními oblastmi nebo absencí alelického PRDM9 vazebného místa v genomu poddruhů. Tyto DSBs by mohly destabilizovat integritu genomu a interferovat s opravným mechanismem DNA dvouřetězcových zlomů. Takovýto mechanismus by mohl pracovat nezávisle na asymetrii DSBs navržené Daviesem a spoluautory (2016) a zároveň souběžně s touto asymetrií.

## 6.2 Nedostatek symetrických DSBs hotspotů ovlivňuje míru asynapse

Kritickým krokem pro úspěšnou spermatogenezi je vytvoření DNA dvouřetězcových zlomů (DSBs) pomocí SPO11 topoizomerázy (Keeney 2008). DSBs jsou nezbytné pro meiotickou rekombinaci a homologní synapsi (Baudat et al. 2013, Bolcun-Filas & Handel 2018). Produkt genu *Prdm9* určuje umístění DSBs tím, že se k DNA specificky váže doménou zinkového prstu (ZnF) a aktivuje potenciální místa meiotické rekombinace methylací histonu H3 na lysinu 4 a 36 (Baudat et al. 2010, Myers et al. 2010, Parvanov et al. 2010). Davies a spolupracovníci (2016) prokázali, že pro sterilitu PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů je rozhodující PRDM9 doména zinkového prstu. V meióze jsou k opravě dvouřetězcových zlomů využity homologní chromatidy. Pokud se na jednom homologu nachází sekvence silnějšího (méně mutovaného) hotspotu, vytvoří se dvouřetězcový zlom častěji na tomto místě, čímž však dojde v rámci opravy zlomu k nahrazení sekvencí se slabším hotspotem pocházejícím z homologní chromatidy (Baker et al. 2015a, Tiemann-Boege et al. 2017). Tento mechanismus vedl k formulaci hotspot paradoxu (Boulton et al. 1997), podle kterého by měla výše uvedeným způsobem během evoluce vymizet všechna hotspot místa. K vysvětlení, proč k tomu nedochází (tj. hotspot paradox), by mohla vést extrémně zrychlená evoluce PRDM9 domény zinkového prstu, kdy vymizení PRDM9 hotspot vazebných míst může upřednostnit selekci nové *Prdm9* alely, která vede ke vzniku zcela nových hotspotů (Myers et al. 2010).

Na základě hotspot paradoxu Davies a kolegové (2016) navrhli teorii asymetrie rekombinačních hotspotů hybridů jako vysvětlení sterility PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů. Autoři zjistili, že u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridních samců PRDM9<sup>PWD</sup> označila silné hotpoty na

chromozomu B6 a naopak. Tím vznikají dvouřetězcové zlomy, které lze z homologní chromatidy opravit obtížně nebo je nejde opravit vůbec, protože se zde nachází alelické místo, které špatně váže nebo neváže PRDM9 protein. Neopravené asymetrické DSBs ztěžují synapsi a spermatocyt nakonec podléhá apoptóze. Autoři navrhnou pozorovanou PRDM9 vazebnou asymetrii jako hlavní molekulární základ hybridní sterility. Teorii asymetrie podporuje skutečnost, že asynapse sterilních F<sub>1</sub> hybridů lépe koreluje s hustotou SPO11-odvozených DSBs než s délkou chromozomu. Teorie asymetrie však plně nevysvětluje rozdílné fenotypové projevy hybridní sterility. Přestože jsou asymetrická PRDM9 vazebná místa srovnatelná u reciprokových hybridů B6/PWD (první rodič, zde B6, je vždy samice), jsou PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridní samci plně sterilní s vysokou mírou asynapse až 90 %, oproti B6/PWD F<sub>1</sub> samcům, kteří jsou semifertilní s mírou asynapse pouze do 45 %. Lokus *Hstx2* zde zřejmě hraje klíčovou, avšak zatím stále neúplně prostudovanou roli. Zajímavé je, že přestože B6 alela *Hstx2* lokusu dramaticky zvyšuje účinnost párování, na změnu v profilu asymetrických DSBs hotspotů má efekt malý, pokud k němu vůbec dojde (Davies et al. 2016, Smagulova et al. 2016).

Asymetrické DSBs by mohly mít vliv na meiotické párování, protože mohou bránit opravě při hledání templátu, například kvůli nevhodné konformaci chromatinu způsobené nedostatečnou trimethylací lysinu 4 a lysinu 36 na histonu H3, případně změnou PRDM9 vazebného motivu, která vyvolá antirekombinační aktivitu opravného systému MMR (mismatch repair) (Chakraborty & Alani 2016). Některé DSBs by také mohly být opraveny atypicky pomocí DNA templátu ze sesterské chromatidy (Kauppi et al. 2013). Takováto rekombinace mezi sesterskými chromatidami se však na homologní synapsi nepodílí.

Abychom u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů odhadli počet DSBs potřebných pro správnou synapsi daného chromozomu, porovnali jsme očekávané rozdělení symetrických DSBs hotspotů na všech autozomech s jejich mírou asynapse. Pomocí pravděpodobnostního modelu založeného na teorii asymetrie rekombinačních hotspotů (Davies et al. 2016) jsme se pokusili odhadnout minimální počet symetrických DSBs na chromozom, který je dostatečný pro úplnou meiotickou synapsi. Náš model pro PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridy předpovídá, že v přibližně 25 % případů je chromozom asynapsován, protože obsahuje jenom asymetrické DSBs a neobsahuje tedy žádné symetrické. Ve zbývajících 75 % případů má asynapsováný chromozom jeden symetrický DSB a zbylé DSBs asymetrické. Odhadujeme tedy, že minimálně dva symetrické DSBs na chromozom by mohly být

dostatečné pro úplné vytvoření synaptonemálního komplexu a tím docílení správné synapse chromozomu.

### 6.3 PWD/PWD homozygotní úseky podporují meiotickou synapsi a potlačují neplodnost hybridů

Heterozygotní *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> gen a *Hstx2*<sup>PWD</sup> lokus byly identifikovány jako nezbytné faktory hybridní sterility u sterilních F<sub>1</sub> PWD/B6 hybridů. Toto tvrzení bylo potvrzeno úplnou obnovou fertility u F<sub>1</sub> PWD/B6 samců s genotypem *Prdm9*<sup>PWD/PWD</sup> (Bhattacharyya et al. 2013) či s jednou alelou genu *Prdm9* nahrazenou alelou lidskou – *Prdm9*<sup>PWD/H</sup> (Davies et al. 2016). V raných studiích PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů byly univalenty v primárních spermatocytech brány jako sekundární důsledek meiotické zástavy způsobené genovou nekompatibilitou (Forejt a Iványi 1974, Forejt 1996). Bhattacharyya a kolegové (2013) zjistili, že 90 % primárních spermatocytů u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů obsahuje jeden nebo i více asynapsovaných chromozomů. S využitím konzomických kmenů B6.PWD-Chr<sup>#</sup> (Gregorova et al. 2008) autoři navíc vnesli do PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů konkrétní pár PWD/PWD konsubspecifických homologů, a přestože tyto hybridy zůstali sterilní, došlo ke správné synapsi konkrétního konsubspecifického páru. Tento náález naznačil, že heterozygotnost genu *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> 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).

V naší práci (Gregorova et al. 2018) jsme odhalili první přímou souvislost mezi *Prdm9*-kontrolovanou asynapsí a meiotickou zástavou PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridních samců. Zjistili jsme, že kratší chromozomy vykazují významně vyšší sklon k asynapsi, než je tomu u chromozomů delších. K podobným výsledkům došli i Kauppi a kolegové (2013), kdy byla u myši s nižší genovou dávkou *Spo11* pozorována vyšší citlivost krátkých autozomálních chromozomů k asynapsi a zároveň byl snížen i počet dvouřetězcových zlomů. Abychom ověřili vliv autozomální heterozygotity a související asymetrie rekombinačních hotpotů na míru plodnosti, vnesli jsme různě dlouhé homozygotní PWD/PWD úseky do dvou až čtyř chromozomů PWD/B6 hybridů. Zjistili jsme, že pro zajištění úplné synapse chromozomu musí minimální délka konsubspecifického

PWD/PWD úseku dosahovat 27 Mb. Se vzrůstající délkou těchto homozygotních PWD/PWD úseků jsme mohli pozorovat plynulou změnu míry asynapse. Tato zjištění podporují předpoklad, že autozomální synapse je *cis*-regulovaná a chromozomově-autonomní. V souladu se zjištěním, že se synaptonemální komplexy na každém chromozomu začínají formovat na mnoha rekombinačních místech (Zickler & Kleckner 2015, Finsterbusch et al. 2016), byl náš nález, že pro záchranu synapse nezáleží na umístění konsubspecifického PWD/PWD úseku v chromozomu.

U PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů *trans*-efekt konsubspecifických PWD/PWD úseků zvyšuje pravděpodobnost synapse nezávislého intersubspecifického homologního páru. Mechanismus *trans*-efektu není zatím znám. Kauppi a kolegové (2013) zkoumali u samců s nižší dávkou SPO11 vliv této nižší dávky na tvorbu DSBs a následnou homologní synapsi. Díky svým zjištěním navrhli, že asynapse je řetězovou reakcí, kdy jeden nebo více asynapsovaných chromozomů zvyšuje pravděpodobnost asynapse dalších chromozomů, která může být způsobena jejich zapojením do nehomologní synapse mezi sebou nebo synapse s částí chromozomu X ležící mimo pseudoautozomální oblast.

#### **6.4 Exogenní DNA DSBs snižují míru asynapse meiotických chromozomů**

Pokud platí, že asynapse a následná zástava spermatogeneze jsou důsledkem nedostatku symetrických DSBs (Davies et al. 2016), pak by zvýšení jejich počtu mohlo alespoň částečně chromozomální synapsi obnovit. Pokusili jsme se proto testovat tento předpoklad a indukovat náhodné DSBs v germinálních buňkách sterilních PWD/B6 F<sub>1</sub> samců pomocí jedné injekce cisplatin, což je protinádorové chemoterapeutikum používané u některých onkologických pacientů.

Cisplatina (dále jen cisPt) vytváří vazby mezi bázemi a odstranění těchto vazeb způsobí vznik DNA DSBs (Basu & Krishnamurthy 2010). V klidových somatických buňkách však bylo prokázáno i odstranění cisPt-DNA vazeb bez vytvoření DSBs (Frankenberg-Schwager et al. 2005). Protože je zatím málo známo o načasování enzymatického odstraňování cisplatinou způsobených vazeb mezi řetězci (Johnsson et al. 1995), nelze s ohledem na konec replikace DNA přesně specifikovat tvorbu DSBs.

Cisplatinou vytvořené DSBs mohou vzniknout kdykoliv během meiotické S-fáze nebo na začátku leptotenu.

Hanneman a spolupracovníci (1997) prokázali, že cisPt zvyšovala počet rekombinačních míst. V návaznosti na jejich objev Romanienko a Camerini-Otero (2000) testovali účinky cisPt na knockoutovaných *Spo11*<sup>-/-</sup> myších, u kterých se netvoří žádné DNA DSBs a dochází k meiotické zástavě ještě před pachytenním stádiem. Autoři u *Spo11*<sup>-/-</sup> myši ovlivněných cisPt pozorovali tvorbu DSBs a zlepšení synapse meiotických chromozomů, což může být podpořeno i naším pozorováním, kdy u PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridů ovlivněných jednou dávkou cisPt došlo k výraznému vzrůstu počtu DNA DSBs, zvýšení synapse a nárůstu pozdějších stádií pachytenních jader (Wang et al. 2018).

Protože je ale účinnost opravy cisplatinou vyvolaných DSBs pomocí homologní rekombinace obecně nízká, významný podíl spermatocytů zanikne ještě před stádiem časného pachytenu. Navíc Bhattacharyya a spolupracovníci (2013) zjistili, že spermatocyty s více nespárovanými autozomy, které postoupily do stádia časného pachytenu, jsou většinou odstraněny ještě před dosažením stádia pozdního pachytenu. Tento mnohonásobný eliminační efekt tak může zvýšit zdánlivou účinnost cisPt sledovanou jako podíl plně synapsovaných středních a pozdních pachytenních jader.

## 6.5 Role *Prdm9* v hybridech pocházejících ze tří myších poddruhů

Výzkum na hybridních myších je z velké míry prováděn na kříženích mezi *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* (Forejt 1996, Payseur et al. 2004, Good et al. 2008, Trachtulec et al. 2008, Mihola et al. 2009, Good et al. 2010, White et al. 2011, Flachs et al. 2012, Bhattacharyya et al. 2013, Davies et al. 2016, Gregorova et al. 2018, Wang et al. 2018, Mukaj et al. 2020) nebo dále *M. m. domesticus* a *M. m. castaneus* (Orth et al. 1998, White et al. 2012, Baker et al. 2015a, Dumont 2017) či *M. m. domesticus* a *M. m. molossinus* (Imai et al. 1981, Niwa & Wakasugi 1988, Oka et al. 2007, Nishino et al. 2019). Naše laboratoř se už dlouhá léta zaměřuje na studium hybridní sterility mezi poddruhy *M. m. musculus* (zastoupený kmenem PWD) a *M. m. domesticus* (zastoupený kmenem B6). Poté, co byl lokus *Hst1* (Forejt & Iványi 1974) identifikován jako gen PR domain containing 9, *Prdm9* (Mihola et al. 2009), se výzkum zaměřil na pochopení

intertakce tohoto genu s dalším lokusem hybridní sterility *Hstx2*. Sterilní PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridní samci mají heterozygotní *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> a nesou PWD alelu *Hstx2* lokusu (Dzur-Gejdosova et al. 2012, Bhattacharyya et al. 2013). Ostatní alelické kombinace těchto dvou faktorů produkují plodné nebo částečně plodné hybridní samce (Dzur-Gejdosova et al. 2012, Flachs et al. 2012).

Abychom ověřili hypotézu, zda je heterozygotní *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> a *Hstx2*<sup>PWD</sup> zásadní pro vznik asynapse a následné meiotické pachytenní zástavy mimo genetické pozadí kmenů PWD a B6, vytvořili jsme samčí hybridy mezi poddruhy *M. m. domesticus*, *M. m. musculus* a *M. m. castaneus*. Nejprve jsme připravili CAST/PWD F<sub>1</sub> hybridní samice, které jsme následně připustili s B6 samcem. Dostali jsme hybridy, jejichž genom pocházel z 50 % z poddruhu *M. m. domesticus* a z 25 % od každého poddruhu *M. m. musculus* a *M. m. castaneus*. Námi vytvořené hybridy jsme rozdělili do čtyř skupin podle genotypu *Prdm9* a *Hstx2*. Stejně jako tomu bylo u CAST/B6 F<sub>1</sub> hybridů (Baker et al. 2015a), samci nesoucí *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> byli plodní bez ohledu na alelu *Hstx2*. Samci nesoucí „sterilní“ *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> genotyp vykazovali rozdílné fenotypové projevy od úplné sterility až po úplnou plodnost. Locus *Hstx2* zde neměl rozhodující vliv. Míra asynapse dobře korelovala s počtem spermií. Díky rozdílům mezi pozorovanou a očekávanou mírou synapse se však domníváme, že v našem hybridním modelu hrají navíc roli jeden nebo více zatím blíže neurčených CAST-modifikujících genů.

## 6.6 Chromozomální a genová povaha hybridní sterility

Hybridní sterilita je biologický fenomén s univerzální platností od kvasinek až po savce. Většina dosavadních genetických studií této formy reprodukční izolace byla zaměřena na mapování genů kontrolujících epistatické inkompatibility vedoucí k neplodnosti hybridů (Presgraves 2010, Maheshwari & Barbash 2011, Civetta 2016, Mack & Nachman 2017). Naproti tomu genem *Prdm9* podmíněná inkompatibilita se týká nekódujících sekvencí PRDM9 vazebných míst spojených s poruchou párování meiotických chromozomů. Podle výkladu založeném na asymetrii rekombinačních hotspotů dojde k zabránění rekombinace v případě, že homologní sekvence PRDM9 vazebných míst blízce souvisejících populací se během evoluce dostatečně odlišily. 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. Mezidruhová bariéra zabraňující homologní rekombinaci byla popsána u prokaryot mezi druhy *Escherichia coli* a *Salmonella typhiimurium* (Rayssiguier et al. 1989, Stambuk & Radman 1998) a u eukaryot u hybridů druhů *Saccharomyces*, kde byla prokázaná role opravného mechanismu MMR (Hunter et al. 1996, Greig et al. 2003, Liti et al. 2006). Antirekombinační mechanismus by tak mohl sloužit jako obecný speciální nástroj, který dokáže postupně omezovat tok genů mezi příbuznými populacemi (Gregorova et al. 2018).

## 7 Závěr

### 1. Objasnění mechanismu meiotické asynapse u sterilních hybridů

Zjistili jsme, že míra asynapse jednotlivých autozomů sterilních PWD/B6 F<sub>1</sub> hybridních sameců je významně vyšší u pěti nejkratších chromozomů a má chromozomově-autonomní povahu. Dále jsme zjistili, že náhodně umístěný konsubspecifický (patřící stejnému poddruhu) PWD/PWD úsek obnoví synapsi daného autozomálního páru, pokud je delší než 27 Mb. Z našich výsledků vyplývá, že k obnově synapse daného chromozomu dochází bez ohledu na umístění konsubspecifického úseku vzhledem k centroměře a telomeře. Srovnáním našich výsledků s očekávanou distribucí symetrických a asymetrických DNA DSBs na chromozomu jsme předpověděli, že pro úspěšnou synapsi chromozomu jsou nezbytné minimálně dva symetrické DSBs. Následně jsme potvrdili příčinný vztah mezi asynapsí a neplodností částečnou obnovou plodnosti F<sub>1</sub> hybridů, u nichž jsme pomocí konsubspecifických úseků obnovili synapsi alespoň ve třech ze čtyř nejkratších segregujících chromozomů, jmenovitě chromozomů 15, 16, 18 a 19.

### 2. Ověření vlivu exogenních dvouřetězcových zlomů DNA na párování chromozomů sterilních hybridů

Zjistili jsme, že ve shodě s předpokládaným nedostatkem symetrických DSBs na meiotických chromozomech sterilních hybridů je možné je částečně kompenzovat indukci exogenních DNA DSBs injekcí chemoterapeutika cisplatiny. Zjistili jsme, že jádra ovlivněná koncentrací 5 mg/kg a 10 mg/kg cisplatiny vykazovala významný nárůst DSBs monitorovaných imunobarvením RPA a DMC1 míst na leptotenních a zygotenních chromozomech. Cisplatina významně zvýšila četnost synapse v pachytenních jádrech. Zvýšení četnosti DSBs a chromozomální synapse bylo pozorováno především u jader, která byla v době aplikace cisplatiny v S-fázi a integrovala 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), analog thymidinu. Vysvětlením může být, že homologní rekombinací jsou lépe opravitelné exogenní dvouřetězcové zlomy indukované v S-fázi než v leptotene/zygotene, kdy vznikají SPO11 indukované zlomy. Pravděpodobnější je, že k excizi cisplatinových aduktů vzniklých v S-fázi a ke vzniku DSBs dochází až ve stádiu leptotene.

3. Ověření úlohy genu *Prdm9* v samčí plodnosti hybridů mimo modelový hybridní genom (PWD x B6)

Většina studií *Prdm9* jako genu hybridní sterility využívala hybridy inbredních kmenů PWD a B6 a jejich konzomických a kongenních derivátů. Zjistili jsme, že se gen *Prdm9* chová jako hlavní gen hybridní sterility i u hybridů pocházejících ze tří poddruhů *M. m. musculus*, *M. m. castaneus* a *M. m. domesticus*. Fertilitu hybridů v tomto křížení převážně určoval genotyp *Prdm9*, zatímco PWD ani CAST alela *Hstx2* neměla rozhodující vliv. Samci s genotypem *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup> byli plodní s nízkou mírou asynapse, oproti tomu genotyp *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> vykazoval celou škálu fenotypových projevů od neplodných samců s vysokou mírou asynapse po samce plodné s nízkou mírou asynapse. Navíc se námi pozorovaná míra asynapse lišila od asynapse očekávané. Předpokládáme, že v tomto křížení hrají roli, mimo asymetrických DNA DSBs, zatím nemapované CAST-modifikující geny.

## 8 Seznam publikací

1. Gregorova S., Gergelits V., Chvatalova I., Bhattacharyya T., Valiskova B., Fotopulošova V., Jansa P., Wiatrowska D., Forejt J. (2018): Modulation of Prdm9-controlled meiotic chromosome asynapsis overrides hybrid sterility in mice. *Elife*. 7:e34282

Barbora Vališková prováděla přípravu preparátů, mikroskopii a následnou analýzu, diskutovala manuskript publikace.

2. Wang L.<sup>1</sup>, Valiskova B.<sup>1</sup>, Forejt J. (2018): Cisplatin-induced DNA double-strand breaks promote meiotic chromosome synapsis in PRDM9-controlled mouse hybrid sterility. *Elife*. 7:e42511

<sup>1</sup> Autoři mají na publikaci stejný podíl

Barbora Vališková, jako sdílený první autor, vedla chov kmenů, provedla pilotní experiment, dále přípravu preparátů, mikroskopii a analýzu, podílela se na sepsání publikace.

3. Balcova M., Faltusova B., Gergelits V., Bhattacharyya T., Mihola O., Trachtulec Z., Knopf C., Fotopulošova V., Chvatalova I., Gregorova S., Forejt J. (2016): Hybrid Sterility Locus on Chromosome X Controls Meiotic Recombination Rate in Mouse. *PLoS Genet*. 12(4):e1005906.

Barbora Vališková provedla přípravu preparátů, mikroskopii a analýzu RAD51 a DMC1 míst, diskutovala manuskript publikace.

## 9 Seznam zkratek

AEs – axiální elementy

B – B6/B6 homozygotní úsek

B6 – C57BL/6J – inbrední myš kmen z poddruhu *Mus musculus domesticus*

B6.PWD-Chr<sup>#</sup> – C57BL/6JChr<sup>#</sup>PWD – konzomický kmen s daným chromozomem PWD na B6 pozadí

BW – body weight – hmotnost těla

C – hodnota C – obsah DNA

CAST – CAST/EiJ – inbrední myš kmen z poddruhu *Mus musculus castaneus*

CB – *Prdm9*<sup>CAST/B6</sup>

CE – centrální element

CEN – centromerické proteiny

CI – confidence interval – interval spolehlivosti

cisPt – cisplatina

CO – crossing over – rekombinační výměna části chromatidových ramen

DMC1 – dosage suppressor of Mck1 – protein shromažďující se v místech DSBs

dNTPs – deoxyribonukleotid trifosfát

DSBs – double-strand breaks – dvouřetězcové zlomy

EdU – 5-ethynyl-2'-deoxyuridin – analog thyminu

EP – early pachytene – časný pachytene

EtBr – ethidiumbromid

EZ – early zygotene – časný zygotene

F<sub>1</sub> – první filiální generace

FISH – fluorescenční in-situ hybridizace

G<sub>1/2/3/4</sub> – generace 1/2/3/4

GigaMUGA – The Giga Mouse Universal Genotyping Array – celogenomový čip myších SNP založený na platformě Illumina® Infinium

H1t – H1t linker – testikulární histon H1

H3 – histon 3

H3K4 – lysin v pozici 4 na histonu 3

H3K36 – lysin v pozici 36 na histonu 3

HORMAD1/2 – HORMA containing-domain protein 1/2 – protein obsahující doménu HORMA 1/2

*Hst1* – gen hybridní sterility 1  
*Hstx1* – lokus hybridní sterility X chromozomu 1  
*Hstx2* – lokus hybridní sterility X chromozomu 2  
 $\gamma$ H2AX – fosforylace serinu v pozici 139 na histonu H2AX  
ID – identifikační číslo  
LEs – laterální elementy  
LP – late pachytene – pozdní pachytene  
LZ – late zygotene – pozdní zygotene  
*M. m. castaneus* – *Mus musculus castaneus* – poddruh myši domácí  
*M. m. domesticus* – *Mus musculus domesticus* – poddruh myši domácí  
*M. m. molossinus* – *Mus musculus molossinus* – poddruh myši domácí  
*M. m. musculus* – *Mus musculus musculus* – poddruh myši domácí  
Mit marker – mikrosatelitový marker  
MMR – mismatch repair – systém opravného mechanismu  
MP – mid pachytene – střední pachytene  
MZ – mid zygotene – střední zygotene  
N – hodnota N, ploidie – počet sad chromozomů  
NCO – non-crossing over – rekombinace bez výměny chromatidových ramen  
PB – PWD/B6 heterozygotní úsek (viz. kontext)  
PB – *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> (viz. kontext)  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
PGC – primordial germ cells – zárodečné pohlavní buňky  
PP – PWD/PWD homozygotní úsek  
*Prdm9* – PR domain containing 9 – gen obsahující PR doménu 9  
PWD – inbrední myši kmen z poddruhu *Mus musculus musculus*  
RAD51 – radiation sensitive 51 – protein účastnící se opravy DNA DSBs  
RPA – replication protein A – protein vázající se k jednořetězcové DNA  
SC – sperm count – počet spermií  
SE – směrodatná odchylka  
SNP – jednonukleotidový polymorfismus  
SPO11 – Homologní protein ke kvasinkovému proteinu 11 uplatňujícím se ve sporulaci  
SYCE1/2 – Synaptonemal Complex Central Element Protein 1/2 – protein centrálního elementu synaptonemálního komplexu 1/2

SYCP1/2/3 – Synaptonemal Complex Protein 1/2/3 – protein synaptonemálního komplexu 1/2/3

TEX12 – Testis-expressed Protein 12 – protein specifický pro samčí pohlavní buňky účastní se utváření synaptonemálního komplexu

TW – testes weight – hmotnost varlat

ÚMG AV ČR – Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky

$X^C$  – XC – *Hstx2*<sup>CAST</sup>

$X^P$  – XP – *Hstx2*<sup>PWD</sup>

ZnF – zinc finger domain – doména zinkového prstu

## 10 Seznam použité literatury

- Adams I.R., McLaren A. (2002): Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129: 1155-1164.
- Alberts B., Johnson A.D., Lewis J., Morgan D., Raff M. et al., (2014) *Molecular Biology of the Cell: Sixth International Student Edition*. Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Allers T., Lichten M. (2001): Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106: 47-57.
- Altomose N., Noor N., Bitoun E., Tumian A., Imbeault M., Chapman J.R., Aricescu A.R., Myers S.R. (2017): A map of human PRDM9 binding provides evidence for novel behaviors of PRDM9 and other zinc-finger proteins in meiosis. *eLife* 6:e28383.
- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M., Ashley T. (1999): Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151:1569-1579.
- Baker C.L., Kajita S., Walker M., Saxl R.L., Raghupathy N., Choi K., Petkov P.M., Paigen K. (2015a): PRDM9 drives evolutionary erosion of hotspots in *Mus musculus* through haplotypespecific initiation of meiotic recombination. *PLoS Genet* 11: e1004916.
- Baker C.L., Petkova P., Walker M., Flachs P., Mihola O., Trachtulec Z., Petkov P.M., Paigen K. (2015b): Multimer formation explains allelic suppression of prdm9 recombination hotspots. *PLoS Genet* 11:e1005512.
- Baker C.L., Walker M., Kajita S., Petkov P.M., Paigen K. (2014): PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Res* 24: 724-732.
- Balcova M., Faltusova B., Gergelits V., Bhattacharyya T., Mihola O., Trachtulec Z., Knopf C., Fotopulosova V., Chvatalova I., Gregorova S., Forejt J. (2016): Hybrid Sterility Locus on Chromosome X Controls Meiotic Recombination Rate in Mouse. *PLoS Genet.* 12(4):e1005906.
- Barbash D.A., Ashburner M. (2003): A novel system of fertility rescue in *Drosophila* hybrids reveals a link between hybrid lethality and female sterility. *Genetics* 163:217-226.
- Barbash D.A., Siino D.F., Tarone A.M., Roote J. (2003): A rapidly evolving MYB-related protein causes species isolation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(9):5302–5307.
- Barton N., Bengtsson B. O. (1986): The barrier to genetic exchange between hybridising populations. *Heredity* 56: 357—376.



- Barton N.H., Briggs D.E.G., Eisen J.A., Goldstein D.B., Patel N.H. (2007): Evolution. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Basu A., Krishnamurthy S. (2010): Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*: 1-16.
- Baudat F., Buard J., Grey C., Fledel-Alon A., Ober C., Przeworski M., Coop G., de Massy B. (2010): PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 327(5967):836-40.
- Baudat F., Imai Y., de Massy B. (2013): Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* 14: 794-806.
- Berg I.L., Neumann R., Lam K.W., Sarbajna S., Odenthal-Hesse L., May C.A., Jeffreys A.J. (2010): PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat Genet* 42:859-863.
- Bhattacharyya T., Gregorova S., Mihola O., Anger M., Sebestova J., Denny P., Simecek P., Forejt J. (2013): Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *PNAS* 110:E468-E477.
- Bhattacharyya T., Reifova R., Gregorova S., Simecek P., Gergelits V., Mistrik M., Martincova I., Pialek J., Forejt J. (2014): X chromosome control of meiotic chromosome synapsis in mouse inter-subspecific hybrids. *PLoS Genet*. 10(2):e1004088.
- Bolcun-Filas E., Costa Y., Speed R., Taggart M., Benavente R., De Rooij D.G., Cooke H.J. (2007): SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *J Cell Biol* 176:741-747.
- Bolcun-Filas E., Hall E., Speed R., Taggart M., Grey C., de Massy B., Benavente R., Cooke H.J. (2009): Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* 5:e1000393.
- Bolcun-Filas E., Handel M.A. (2018): Meiosis: the chromosomal foundation of reproduction. *Biology of reproduction* 99: 112-126.
- Bolcun-Filas E., Schimenti J. C. (2012): Genetics of meiosis and recombination in mice. *Int Rev Mol Biol*. 298; 179-227.
- Boulton A., Myers R.S., Redfield R.J. (1997): The hotspot conversion paradox and the evolution of meiotic recombination. *PNAS* 94:8058-8063.
- Boursot P., Auffray J.C., Britton-Davidian J., Bonhomme F. (1993): The evolution of house mice. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 119-152.
- Brideau N.J., Flores H.A., Wang J., Maheshwari S., Wang X., Barbash D.A. (2006): Two Dobzhansky-Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science* 314:1292-1295.

- Buard J., Barthes P., Grey C., de Massy B. (2009): Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* 28:2616-2624.
- Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. (2009): The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics* 10:207-216.
- Campbell P., Good J.M., Dean M.D., Tucker P.K., Nachman M.W. (2012): The contribution of the Y chromosome to hybrid male sterility in house mice. *Genetics* 191:1271-1281.
- Civetta A. (2016): Misregulation of gene expression and sterility in interspecies hybrids: causal links and alternative hypotheses. *Journal of Molecular Evolution* 82:176-182.
- Cole F., Kauppi L., Lange J., Roig I., Wang R., Keeney S., Jasin M. (2012): Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat Cell Biol.* 14(4):424-30.
- Coyne J.A. (1992): Genetics and speciation. *Nature* 355, 511-5.
- Coyne J.A., Orr H.A. (1989): Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* 43: 362-381.
- Coyne J.A., Orr H.A. (1998): The evolutionary genetics of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 287-305.
- Coyne J.A., Orr H.A. (2004): *Speciation*. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
- Davies B., Hatton E., Altemose N., Hussin J.G., Pratto F., Zhang G., Hinch A.G., Moralli D., Biggs D., Diaz R., Preece C., Li R., Bitoun E., Brick K., Green C.M., Camerini-Otero R.D., Myers S.R., Donnelly P. (2016): Re-engineering the zinc fingers of PRDM9 reverses hybrid sterility in mice. *Nature* 530:171-176.
- De Vries F.A., de Boer E., van den Bosch M., Baarends W.M., Ooms M., Yuan L., Liu J.G., van Zeeland A.A., Heyting C., Pastink A. (2005): Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19:1376-1389.
- Diagouraga B., Clément J.A.J., Duret L., Kadlec J., de Massy B., Baudat F. (2018): PRDM9 Methyltransferase Activity Is Essential for Meiotic DNA Double-Strand Break Formation at Its Binding Sites. *Mol Cell.* 69(5):853-865.
- Dobzhansky T. (1937): *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Dod B., Jermiin L.S., Boursot P., Chapman V.H., Nielsen J.T., Bonhomme F. (1993): Counterselection on Sex-Chromosomes in the *Mus-Musculus* European Hybrid Zone. *Journal of Evolutionary Biology* 6:529-546.
- Dumont B.L. (2017): Meiotic Consequences of Genetic Divergence Across the Murine Pseudoautosomal Region. *Genetics* 205(3):1089-1100.

- Duvaux L., Belkhir K., Boulesteix M., Boursot P. (2011): Isolation and gene flow: inferring the speciation history of European house mice. *Mol Ecol.* 20(24):5248-64.
- Dzur-Gejdosova M., Simecek P., Gregorova S., Bhattacharyya T., Forejt J., (2012): Dissecting the genetic architecture of F<sub>1</sub> hybrid sterility in house mice. *Evolution* 66: 3321-3335.
- Edelmann W., Cohen P.E., Kane M., Lau K., Morrow B., Bennett S., Umar A., Kunkel T., Cattoretti G., Chaganti R., Pollard J.W., Kolodner R.D., Kucherlapati R. (1996): Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85:1125-1134.
- Eijpe M., Offenbergh H., Jessberger R., Revenkova E., Heyting C. (2003): Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol.* 160(5):657-70.
- Faieta M., Di Cecca S., de Rooij D.G., Luchetti A., Murdocca M., Di Giacomo M., Di Siena S., Pellegrini M., Rossi P., Barchi M. (2016): A surge of late-occurring meiotic double-strand breaks rescues synapsis abnormalities in spermatocytes of mice with hypomorphic expression of SPO11. *Chromosoma* 125:189-203.
- Finsterbusch F., Ravindranathan R., Dereli I., Stanzione M., Tränkner D., Tóth A. (2016): Alignment of Homologous Chromosomes and Effective Repair of Programmed DNA Double-Strand Breaks during Mouse Meiosis Require the Minichromosome Maintenance Domain Containing 2 (MCMDC2) Protein. *PLoS Genet.* 12(10):e1006393.
- Flachs P., Mihola O., Simecek P., Gregorova S., Schimenti J.C., Matsui Y., Baudat F., de Massy B., Pialek J., Forejt J., Trachtulec Z. (2012): Interallelic and intergenic incompatibilities of the Prdm9 (Hst1) gene in mouse hybrid sterility. *PLoS Genet* 8:e1003044.
- Frankenberg-Schwager M., Kirchermeier D., Greif G., Baer K., Becker M., Frankenberg D. (2005): Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology* 212:175-184.
- Forejt J. (1985): Chromosomal and genic sterility of hybrid type in mice and men. *Experimental and Clinical Immunogenetics* 2: 106-119.
- Forejt J. (1996): Hybrid sterility in the mouse. *Trends Genet* 12: 412-417.
- Forejt J., Ivanyi P. (1974): Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genet Res* 24:189-206.
- Forejt J., Pialek J., Trachtulec Z. (2012): Hybrid Male Sterility Genes in the Mouse Subspecific Crosses. *In: Macholan M., Baird S. J. E., Muclinger P., Pialek J. (Eds): Evolution of the House Mouse. Cambridge University Press, Cambridge United Kingdom, 482-503.*

- Forejt J., Vincek V., Klein J., Lehrach H., Loudova-Mickova M. (1991): Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mamm Genome* 1:84-91.
- Gavrilets S. (1997): Evolution and speciation on holey adaptive landscapes. *Trends Ecol. Evol.* 12: 307-312.
- Geraldes A., Basset P., Smith K.L., Nachman M.W. (2011): Higher differentiation among subspecies of the house mouse (*Mus musculus*) in genomic regions with low recombination. *Mol Ecol* 20: 4722-4736.
- Goetz P., Chandley A.C., Speed R.M. (1984): Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse. *Journal of Cell Science* 65:249-263.
- Good J.M., Giger T., Dean M.D., Nachman M.W. (2010): Widespread over-expression of the X chromosome in sterile F(1)hybrid mice. *PLoS Genet* 6(9):e10011.
- Good J. M., Handel M. A., Nachman M. W. (2008): Asymmetry and polymorphism of hybrid male sterility during the early stages of speciation in house mice. *Evolution*, 62: 50-65.
- Gregorova S., Divina P., Storchova R., Trachtulec Z., Fotopulosova V., Svenson K.L., Donahue L.R., Paigen B., Forejt J. (2008): Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Res* 18:509-515.
- Gregorova S., Forejt J. (2000): PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies--a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biol (Praha)* 46:31-41.
- Gregorova S., Gergelits V., Chvatalova I., Bhattacharyya T., Valiskova B., Fotopulosova V., Jansa P., Wiatrowska D., Forejt J. (2018): Modulation of Prdm9-controlled meiotic chromosome asynapsis overrides hybrid sterility in mice. *Elife* 7:pii e34282.
- Gregorova S., Mnukova-Fajdelova M., Trachtulec Z., Capkova J., Loudova M., Hoglund M., Hamvas R., Lehrach H., Vincek V., Klein J., Forejt J. (1996): Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse Chromosome 17 including the hybrid sterility 1 gene. *Mamm Genome* 7:107-113.
- Greig D., Travisano M., Louis E.J., Borts R.H. (2003): A role for the mismatch repair system during incipient speciation in *Saccharomyces*. *Journal of Evolutionary Biology* 16:429-437.
- Guénet J.L., Bonhomme F. (2003): Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* 19: 24-31.
- Guénet J.L., Orth A., Bonhomme F. (2012), *The Laboratory Mouse*, Chapter 1.1 Origins and Phylogenetic Relationships of the Laboratory Mouse, Elsevier, p.: 3-20.

- Haldane J.B.S. (1922): Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12: 101-109.
- Hamer G., Gell K., Kouznetsova A., Novak I., Benavente R., Hoog C. (2006): Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 119:4025-4032.
- Handel M.A., Schimenti J.C. (2010): Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11:124-136.
- Hanneman W.H., Legare M.E., Sweeney S., Schimenti J.C. (1997): Cisplatin increases meiotic crossing-over in mice. *PNAS* 94:8681-8685.
- Hayashi K., Yoshida K., Matsui Y. (2005): A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438:374-378.
- Holloway J.K., Booth J., Edelman W., McGowan C.H., Cohen P.E. (2008:) MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genet* 4:e1000186.
- Hunter N., Chambers S.R., Louis E.J., Borts R.H. (1996): The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *The EMBO Journal* 15:1726-1733.
- Chakraborty U., Alani E. (2016): Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/antirecombination decision. *FEMS Yeast Research* 16:fow071.
- Charlesworth B., Coyne J.A., Barton N.H. (1987): The Relative Rates of Evolution of Sex-Chromosomes and Autosomes. *American Naturalist* 130: 113-146.
- Imai H.T., Matsuda Y., Shiroishi T., Moriwaki K. (1981): High frequency of X-Y chromosome dissociation in primary spermatocytes of F1 hybrids between Japanese wild mice (*Mus musculus molossinus*) and inbred laboratory mice. *Cytogenet Cell Genet.* 29(3):166-75.
- Johnsson A., Olsson C., Nygren O., Nilsson M., Seiving B., Cavallin-Stahl E. (1995): Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 37:23-31.
- Kauppi L., Barchi M., Lange J., Baudat F., Jasin M., Keeney S. (2013): Numerical constraints and feedback control of double-strand breaks in mouse meiosis. *Genes & Development* 27:873-886.
- Keeney S. (2008): Spo11 and the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genome Dyn. Stab.* 2, 81-123.
- Keeney S., Giroux C.N., Kleckner N. (1997): Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-384.

- Kotov A.A., Adashev V.E., Godneeva B.K., Ninova M., Shatskikh A.S., Bazylev S.S., Aravin A.A., Olenina L.V. (2019): piRNA silencing contributes to interspecies hybrid sterility and reproductive isolation in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 47(8):4255-4271.
- Lange J., Yamada S., Tischfield S.E., Pan J., Kim S., Zhu X., Socci N.D., Jasin M., Keeney S. (2016): The landscape of mouse meiotic double-strand break formation, processing, and repair. *Cell* 167:695-708.
- Lao J.P., Hunter N. (2010): Trying to avoid your sister. *PLoS Biol.* 8(10):e1000519.
- Larson E.L., Keeble S., Vanderpool D., Dean M.D., Good J.M. (2016): The composite regulatory basis of the large X-effect in mouse speciation. *Molecular Biology and Evolution* 34:msw243.
- Laurie C.C. (1997): The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane's rule. *Genetics* 147, 937-51.
- Lawrence K.S., Tapley E.C., Cruz V.E., Li Q., Aung K., Hart K.C., Schwartz T.U., Starr D.A., Engebrecht J. (2016): LINC complexes promote homologous recombination in part through inhibition of nonhomologous end joining. *The Journal of Cell Biology* 215:801-821.
- Lee J. (2013): Roles of cohesin and condensin in chromosome dynamics during mammalian meiosis. *J Reprod Dev.* 59(5):431-6.
- Li R., Bitoun E., Altemose N., Davies R.W., Davies B., Myers S.R. (2019): A high-resolution map of non-crossover events reveals impacts of genetic diversity on mammalian meiotic recombination. *Nat Commun.* 10(1):3900.
- Liti G., Barton D.B., Louis E.J. (2006): Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics* 174:839-850.
- Lu X., Shapiro J.A., Ting C.T., Li Y., Li C., Xu J., Huang H., Cheng Y.J., Greenberg A.J., Li S.H., Wu M.L., Shen Y., Wu C.I. (2010): Genome-wide misexpression of X-linked versus autosomal genes associated with hybrid male sterility. *Genome Res.* 20(8):1097-102.
- Lustyk D., Kinsky S., Ullrich K.K., Yancoskie M., Kasikova L., Gergelits V., Sedlacek R., Chan Y.F., Odenthal-Hesse L., Forejt J., Jansa P. (2019): Genomic Structure of Hstx2 Modifier of Prdm9-Dependent Hybrid Male Sterility in Mice. *Genetics* 213(3):1047-1063.
- Mack K.L., Nachman M.W. (2017): Gene regulation and speciation. *Trends in Genetics* 33:68-80.
- Mahadevaiah S.K., Turner J.M., Baudat F., Rogakou E.P., de Boer P., Blanco-Rodriguez J., Jasin M., Keeney S., Bonner W.M., Burgoyne P.S. (2001): Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27:271-276.

- Maheshwari S., Barbash D.A. (2011): The genetics of hybrid incompatibilities. *Annual Review of Genetics* 45:331-355.
- Macholan M., Baird S.J., Dufkova P., Munclinger P., Bimova B.V., Pialek J. (2011): Assessing multilocus introgression patterns: a case study on the mouse X chromosome in central Europe. *Evolution* 65:1428-1446.
- Macholan M., Baird S.J., Munclinger P., Dufkova P., Bimova B., Pialek J. (2008): Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *BMC Evol Biol.* 8:271.
- Macholan M., Krystufek B., Vohralik V. (2003): The location of the *Mus musculus*/*M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: Clues from morphology. *Acta Theriol.* 48: 177-188.
- Macholan M., Munclinger P., Sugerikova M., Dufkova P., Bimova B., Bozikova E., Zima J., Pialek J. (2007): Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* 61:746-771.
- Masly J.P., Jones C.D., Noor M.A., Locke J., Orr H.A. (2006): Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science* 313(5792):1448-1450.
- Mayr E. (1963): *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- Mihola O., Trachtulec Z., Vlcek C., Schimenti J.C., Forejt J. (2009): A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* 323:373-375.
- Moens P.B., Marcon E., Shore J.S., Kochakpour N., Spyropoulos B. (2007): Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *Journal of Cell Science* 120:1017-1027.
- Morán T., Fontdevila A. (2014): Genome-wide dissection of hybrid sterility in *Drosophila* confirms a polygenic threshold architecture. *J Hered.* 105(3):381-96.
- Mukaj A., Piálek J., Fotopulosova V., Morgan A.P., Odenthal-Hesse L., Parvanov E.D., Forejt J. (2020): Prdm9 inter-subspecific interactions in hybrid male sterility of house mouse. *Mol Biol Evol.* msaa167
- Muller H.J. (1942): Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol. Symp.* 6: 71-125.
- Myers S., Bowden R., Tumian A., Bontrop R.E., Freeman C., MacFie T.S., McVean G., Donnelly P. (2010): Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* 327: 876-879.
- Naveira H., Maside X. (1998): The genetics of hybrid male sterility in *Drosophila*. *In: Howard D., Berlocher S. (Eds). Endless forms.* Oxford: Oxford University. p. 330-338.

- Neale M. J., Keeney S. (2006): Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* 442: 153-158.
- Nishino R., Petri S., Handel M.A., Kunieda T., Fujiwara Y. (2019): Hybrid Sterility with Meiotic Metaphase Arrest in Intersubspecific Mouse Crosses. *J Hered.* 110(2):183-193.
- Niwa M., Wakasugi N. (1988): Fertility in intersubspecific hybrids of laboratory mice (*Mus musculus domesticus*) and molossinus mice (*M. m. molossinus*). *Jikken Dobutsu* 37(4):387-92.
- Oakberg E.F. (1956): Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy* 99:507-516.
- Oka A., Aoto T., Totsuka Y., Takahashi R., Ueda M., Mita A., Sakurai-Yamatani N., Yamamoto H., Kuriki S., Takagi N., Moriwaki K., Shiroishi T. (2007): Disruption of genetic interaction between two autosomal regions and the X chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies. *Genetics* 175(1):185-97.
- Oka A., Mita A., Sakurai-Yamatani N., Yamamoto H., Takagi N., Takano-Shimizu T., Toshimori K., Moriwaki K., Shiroishi T. (2004): Hybrid breakdown caused by substitution of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics* 166:913-924.
- Orr H.A. (1995): The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics* 139: 1805-1813.
- Orr H.A. (1997): Haldane's rule. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 195-218.
- Orr H.A., Presgraves D.C. (2000): Speciation by postzygotic isolation: forces, genes and molecules. *Bioessays* 22, 1085-1094.
- Orth A., Adama T., Din W., Bonhomme F. (1998): Hybridation naturelle entre deux sous-espèces de souris domestique, *Mus musculus domesticus* et *Mus musculus castaneus*, près du lac Casitas (Californie) [Natural hybridization between two subspecies of the house mouse, *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus castaneus*, near Lake Casitas, California]. *Genome* 41(1):104-10. [In French].
- Oud J.L., de Jong J.H., de Rooij D.G. (1979): A sequential analysis of meiosis in the male mouse using a restricted spermatocyte population obtained by a hydroxyurea/triaziquone treatment. *Chromosoma* 71:237-248.
- Pacheco S., Maldonado-Linares A., Marcet-Ortega M., Rojas C., Martínez-Marchal A., Fuentes-Lazaro J., Lange J., Jasin M., Keeney S., Fernández-Capetillo O., Garcia-Caldés M., Roig I. (2018): ATR is required to complete meiotic recombination in mice. *Nat Commun.* 9(1):2622.



- Palopoli M.F., Wu C.I. (1994): Genetics of hybrid male sterility between drosophila sibling species: a complex web of epistasis is revealed in interspecific studies. *Genetics* 138: 329-341.
- Paques F., Haber J.E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349-404.
- Parvanov E.D., Petkov P.M., Paigen K. (2010): Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* 327: 835.
- Payseur B.A., Krenz J.G., Nachman M.W. (2004): Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution Int J Org Evolution* 58, 2064-78.
- Payseur B.A., Presgraves D.C., Filatov D.A. (2018): Introduction: sex chromosomes and speciation. *Mol Ecol.* 27(19):3745-3748.
- Petkov P.M., Broman K.W., Szatkiewicz J.P., Paigen K. (2007): Crossover interference underlies sex differences in recombination rates. *Trends in Genetics* 23: 539-542.
- Phadnis N., Orr H.A. (2009): A single gene causes both male sterility and segregation distortion in *Drosophila* hybrids. *Science* 323:376-379.
- Powers N.R., Parvanov E.D., Baker C.L., Walker M., Petkov P.M., Paigen K. (2016): The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo. *PLoS Genet.* 12(6):e1006146.
- Presgraves D.C. (2008): Sex chromosomes and speciation in *Drosophila*. *Trends Genet* 24(7):336-343.
- Presgraves D.C. (2010): Darwin and the origin of interspecific genetic incompatibilities. *The American Naturalist* 176:S45-S60.
- Presgraves D.C., Balagopalan L., Abmayr S.M., Orr H.A. (2003): Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. *Nature* 423(6941):715-719.
- Presgraves D.C., Orr H.A. (1998): Haldane's rule in taxa lacking a hemizygous X. *Science* 282:952-954.
- Prieto I., Suja J.A., Pezzi N., Kremer L., Martínez-A.C., Rufas J.S., Barbero J.L. (2001): Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol.* 3(8):761-6.
- Rayssiguier C., Thaler D.S., Radman M. (1989): The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342:396-401.

- Revenkova E., Eijpe M., Heyting C., Gross B., Jessberger R. (2001): Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol.* 21(20):6984-98.
- Ribeiro J., Abby E., Livera G., Martini E. (2016): RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* 125:265-276.
- Romanienko P.J., Camerini-Otero R.D. (2000): The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell.* 6(5):975-87.
- Sage R.D., Atchley W.R., Capanna E. (1993): House mice as models in systematic biology. *Syst. Biol.* 42: 523-561.
- Saitou M., Yamaji M. (2012): Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(11):a008375.
- Salic A., Mitchison T.J. (2008): A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *PNAS* 105:2415-2420.
- Sawamura K., Roote J., Wu C.I., Yamamoto M.T. (2004): Genetic complexity underlying hybrid male sterility in *Drosophila*. *Genetics* 166: 789-796.
- Sawamura K., Taira T., Watanabe T.K. (1993a): Hybrid lethal systems in the *Drosophila melanogaster* species complex. I. The maternal hybrid rescue (mhr) gene of *Drosophila simulans*. *Genetics* 133:299-305.
- Sawamura K., Yamamoto M.T., Watanabe T.K. (1993b): Hybrid lethal systems in the *Drosophila melanogaster* species complex. II. The Zygotic hybrid rescue (Zhr) gene of *D. melanogaster*. *Genetics* 133:307-313.
- She J.X., Bonhomme F., Boursot P., Thaler L., Catzeflis F. (1990): Molecular Phylogenies in the Genus *Mus* – Comparative-Analysis of Electrophoretic, Sndna Hybridization, and Mtdna Rflp Data. *Biol J Linn Soc* 41: 83-103.
- Smagulova F., Brick K., Pu Y., Camerini-Otero R.D., Petukhova G.V. (2016): The evolutionary turnover of recombination hot spots contributes to speciation in mice. *Genes & Development* 30:266-280.
- Stambuk S., Radman M. (1998): Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. *Genetics* 150:533-542.
- Storchova R., Gregorova S., Buckiova D., Kyselova V., Divina P., Forejt J. (2004): Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mamm Genome* 15:515-524.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J., Stahl F.W. (1983): The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.
- Tang S., Presgraves D.C. (2009): Evolution of the *Drosophila* nuclear pore complex results in multiple hybrid incompatibilities. *Science* 323:779-782.

- Tao Y., Chen S., Hartl D.L., Laure C.C. (2003): Genetic dissection of hybrid incompatibilities between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. I. Differential accumulation of hybrid male sterility effects on the X and autosomes. *Genetics* 164: 1383-1397.
- Teeter K.C., Thibodeau L.M., Gompert Z., Buerkle C.A., Nachman M.W., Tucker P.K. (2010): The variable genomic architecture of isolation between hybridizing species of house mice. *Evolution* 64(2):472-85.
- Tiemann-Boege I., Schwarz T., Striedner Y., Heissl A. (2017): The consequences of sequence erosion in the evolution of recombination hotspots. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372: 20160462.
- Ting C.T., Tsaur S.C., Wu M.L., Wu C.I. (1998): A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* 282(5393):1501-1504.
- Trachtulec Z., Mihola O., Vlcek C., Himmelbauer H., Paces V., Forejt J. (2005): Positional cloning of the hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 637-641.
- Trachtulec Z., Vlcek C., Mihola O., Gregorova S., Fotopulosova V., Forejt J. (2008): Fine haplotype structure of a chromosome 17 region in the laboratory and wild mouse. *Genetics* 178:1777-1784.
- True J.R., Weir B.S., Laure C.C. (1996): A genome-wide survey of hybrid incompatibility factors by the introgression of marked segments of *Drosophila mauritiana* chromosomes into *Drosophila simulans*. *Genetics* 142: 819-837.
- Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., Warman M.L. (2000): Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29(1):52, 54.
- Turelli M., Orr H.A. (1995): The dominance theory of Haldane's rule. *Genetics* 140: 389-402.
- Turelli M., Orr H.A. (2000): Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* 154: 1663-1679.
- Vyskocilova M., Trachtulec Z., Forejt J., Pialek J. (2005): Does geography matter in hybrid sterility in house mice? *Biological Journal of the Linnean Society* 84:663-674.
- Wang L., Valiskova B., Forejt J. (2018): Cisplatin-induced DNA double-strand breaks promote meiotic chromosome synapsis in PRDM9-controlled mouse hybrid sterility. *Elife* 7:e42511.
- Wang R.J., White M.A., Payseur B.A. (2015): The Pace of Hybrid Incompatibility Evolution in House Mice. *Genetics*. 201(1):229-42.

- Wang Y., Putnam C.D., Kane M.F., Zhang W., Edelman L., Russell R., Carrión D.V., Chin L., Kucherlapati R., Kolodner R.D., Edelman W. (2005): Mutation in Rpa1 results in defective DNA double-strand break repair, chromosomal instability and cancer in mice. *Nature Genetics* 37:750-755.
- White M.A., Steffy B., Wiltshire T., Payseur, B.A. (2011): Genetic dissection of a key reproductive barrier between nascent species of house mice. *Genetics* 189:289-304.
- White M.A., Stubbings M., Dumont B.L., Payseur B.A. (2012): Genetics and evolution of hybrid male sterility in house mice. *Genetics* 191:917-934.
- Wu C.I., Davis A.W. (1993): Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am Nat* 142:187-212.
- Wu C.I., Johnson N.A., Palopoli M.F. (1996): Haldane's rule and its legacy: Why are there so many sterile males? *Trends Ecol Evol* 11:281-284.
- Wu C.I., Ting C.T. (2004): Genes and speciation. *Nat Rev Genet* 5:114-122.
- Wu H., Mathioudakis N., Diagouraga B., Dong A., Dombrovski L., Baudat F., Cusack S., de Massy B., Kadlec J. (2013): Molecular basis for the regulation of the H3K4 methyltransferase activity of PRDM9. *Cell Rep.* 5(1):13-20.
- Yamada S., Kim S., Tischfield S.E., Jasin M., Lange J., Keeney S. (2017): Genomic and chromatin features shaping meiotic double-strand break formation and repair in mice. *Cell Cycle* 16:1870-1884.
- Yonekawa H., Moriwaki K., Gotoh O., Miyashita N., Matsushima Y., Shi L.M., Cho W.S., Zhen X.L., Tagashira Y. (1988): Hybrid Origin of Japanese Mice *Mus Musculus-Molossinus* – Evidence from Restriction Analysis of Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 5, 63-78.
- Zickler D., Kleckner N. (2015): Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7:a016626.