

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Karel Fusek

Meiotický efekt mutace genu MutS homolog 6 (Msh6) u dvou myších poddruhů

Meiotic effect of MutS homolog 6 (Msh6) mutation in two mouse subspecies

Diplomová práce

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Forejt, DrSc.

Praha, 2021

Prohlášení

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

V Praze, 5.1.2021

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat celému týmu vědecké skupiny 21. Ing. Petrovi Jansovi, CSc za získané znalosti problematiky hybridní sterility.

Největší poděkování patří panu profesoru Jiřímu Forejtovi, který mi dal možnost být součástí tohoto projektu.

Abstrakt

Pro účely studia hybridní sterility byl v naší laboratoři vytvořen model založený na kmeni PWD/Ph (PWD) pocházejícího z divokých myší poddruhu *M. m. musculus* a běžně využívaném laboratorním kmeni C57BL/6J (B6) odvozených z více než 90% od poddruhu *M. m. domesticus*. Po křížení samice PWD a samce B6 získáme samčí potomky, kteří jsou sterilní. Hybridní samci F1 generace vykazují defekty v opravě asymetrických dvouvláknových DNA zlomů (DNA double-strand breaks, DSBs) iniciovaných společným působením proteinů SPO11 a PRDM9 v meiotické profázi I, přičemž dochází k poruchám synapse mezi homologními chromozomy vedoucí k zástavě spermatogeneze a samčí sterilitě. Tvorba dvouřetězcových zlomů a jejich následná oprava je předpokladem pro první meiotické dělení. Pracovní hypotéza vychází z poznatků založených na kvasinkovém modelu, kdy předpokládaný antirekombinační mechanismus mismatch repair genů *Msh6* a *Msh2* zamezuje opravu DSBs v místech DNA polymorfismů mezi homologními chromozomy během meiózy. Ačkoliv není znám přesný mechanismus antirekombinační funkce těchto dvou genů, na základě homologie systému oprav napříč organismy existuje silný předpoklad podobné funkce v myší meióze.

V této práci byla využita řada různých metod. Se záměrem studie účinku delece genu *Msh6* na meiotickou profázi I a zrání spermií byla navržena guide RNA pro CRISPR/Cas9 vytvoření delečního mutantu v myši B6. Ke genotypizaci bylo využito PCR metody pro amplifikaci úseku DNA v oblasti delece a následné Sangerovo sekvenování amplifikovaného produktu. Vyřazení proteinu u mutantních myší bylo potvrzeno metodou western blotu. Imunofluorescenční mikroskopie se specifickými proteinovými markery sloužila pro monitorování jednotlivých meiotických stadií. Homozygotní deleční linie *Msh6* byly úspěšně vedeny prozatím do páté generace zpětného křížení na kmen B6. Mutantní samci B6.*Msh6*^{-/-} vykazovali významně nižší hmotnost *testes* a počet zralých spermií, než tomu bylo v případě kontrolních B6 samců. Samci nesoucí deleci se vyznačovali symptomy neopravených dvouřetězcových zlomů ve stádiu pachytene. Vliv delece genu *Msh6* na frekvenci rekombinačních událostí nebyl u samců B6 prokázán.

Klíčová slova: mismatch repair, meiotická recombinační, hybridní sterilita, kongenní kmény

Abstract

To study hybrid sterility our laboratory uses mouse strains PWD/Ph (PWD), derived from *Mus musculus musculus* wild mice and the common laboratory strain C57BL/6J (B6) mostly of *Mus musculus domesticus* origin as a model. Crossing between PWD female and B6 male results in sterile male progeny. F1 hybrid males carry defects in the repair mechanisms of asymmetric double-strand DNA breaks (DSBs). Functional interplay of SPO11 and PRDM9 proteins in the meiotic prophase I is necessary for repairs. Its defect leads to incorrect synapse formation between homologous chromosomes, leading to halt in spermatogenesis and thus male sterility. The formation of DSBs and their subsequent repair is essential for first meiotic division. The working hypothesis stems from the findings in yeast model, where supposed antirecombinatorial mechanism of mismatch repair genes *Msh6* and *Msh2* prevents DSBs repairs during meiosis. Despite the functional mechanism of these two genes is not explicitly known, existence of similar repair system in mice is presumed.

Variety of methods was implemented in this thesis. The effects of *Msh6* deletion on meiotic prophase I and sperm maturation were performed by designing guide RNAs for CRISPR/Cas9 for creation of three knock-outs in B6 mice. The PCR was used to amplify regions adjacent to the deletion, run on agarose gel electrophoresis and, in the end followed by Sanger sequencing. The existence of the null mutant was verified by western blot. Immunofluorescent microscopy with specific protein markers served for monitoring of individual meiotic stages. As of now, homozygous knock-out *Msh6* lines have been successfully grown up to fifth backcross generation. The B6.*Msh6*^{-/-} males had significantly lower testes weight as well as number of mature sperm when compared to B6 wild-type control. Males carrying the deletion exhibited the symptoms of unrepaired DSBs at the pachytene stage. The effect of *Msh6* gene deletion in B6 males on the meiotic recombination rate has not been demonstrated.

Key words: mismatch repair, meiotic recombination, hybrid sterility, congenic strains

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Fylogenetický původ rodu <i>Mus</i>	10
2.1.1	Rozšíření a variabilita rodu <i>Mus musculus</i>	11
2.2	Reprodukční izolační bariéry.....	13
2.2.1	Hybridní sterilita.....	14
2.2.2	Metody studie hybridní sterility.....	16
2.2.3	Modelový systém <i>Mus musculus</i>	18
2.3	Objev genu hybridní sterility <i>Hst1</i> alias <i>Prdm9</i>	20
2.3.1	Role <i>Prdm9</i> v meiotické rekombinaci.....	22
2.4	Oprava malých chyb v párování bazí v DNA – DNA mismatch repair (MMR).....	24
2.4.1	Struktura a funkce eukaryotického komplexu MutS α	25
2.4.2	Role MutS α v meiotické rekombinaci.....	28
3	Cíle práce.....	30
4	Materiál a metody.....	31
4.1	Chemikálie.....	31
4.1.1	Enzymy.....	31
4.1.2	PCR reagensie.....	32
4.1.3	Roztoky a pufrý.....	32
4.1.4	Seznam komerčních kitů.....	33
4.1.5	Seznam primerů.....	33
4.1.6	Seznam gRNA.....	34
4.1.7	Primární protilátky.....	34
4.1.8	Sekundární protilátky.....	34
4.1.9	Biologický materiál.....	34
4.2	Experimentální metodika.....	35
4.2.1	Design primerů pro genotypizaci a sekvenování.....	35
4.2.2	Design guide RNA CRISPR/Cas9.....	35
4.2.3	Vytvoření delečních mutantů.....	35
4.2.4	Izolace celkové DNA NaOH metodou.....	36
4.2.5	Izolace čisté DNA pomocí Puregene Core Kit A firmy Qiagen.....	36
4.2.6	Izolace PCR produktů pomocí MinElute Gel Extraction Kit firmy Qiagen.....	37
4.2.7	Genotypizace na agarózovém gelu.....	38
4.2.8	Sangerovo sekvenování.....	39
4.2.9	Správa myší.....	40
4.2.10	Průběh pitvy.....	40

4.2.11	Zpětné křížení.....	40
4.2.12	Stanovení počtu spermií	41
4.2.13	Příprava imunocytologických preparátů.....	42
4.2.14	Způsob odečítání imunofluorescenčních preparátů	43
4.2.15	Příprava histologických preparátů	44
4.2.16	Western blot	46
4.2.17	Statistické metody	48
5	Výsledky.....	49
5.1	Vytvoření nulových mutantů genů <i>Msh2-Msh6</i>	49
5.2	Fenotyp základních parametrů fertility delečních linií genu <i>Msh6</i> a kontrol	52
5.2.1	Studie fenotypu meiotické profáze I pomocí imunofluorescenční značení	54
5.3	Histologické preparáty testis delečních linií B6. <i>Msh6^{null}</i> a kontrol	60
6	Diskuze.....	63
7	Závěr.....	67
8	Přílohy	68
9	Přehled literatury	70

Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
B6	zkratka pro kmen C57BL/6J
BSA	hovězí sérový albumin
C57BL/6J	inbrední laboratorní kmen
CO	crossover
CPP	České centrum pro fenogenomiku
DSBs	dvojřetězcové zlomy DNA
DSBs	dvouřetězcové DNA zlomy
DMC1	DNA meiotická rekombináza 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
gRNA	zkratka pro guideRNA
guideRNA	RNA pro CRISPR/Cas9 systém
HS	hybridní sterilita
HsMSH2	lidský homolog MSH2
HsRAD51	lidský homolog RAD51
HsRPA	lidský homolog RPA
<i>JYAlpha</i>	gen <i>JYalpha</i>
MGI	Mouse Genome Informatics
MLH1	mutL homolog 1
MMR	proteiny zodpovědné za opravu DNA
<i>Msh2</i>	gen <i>mutS</i> homolog 2
MSH2	protein <i>mutS</i> homolog 2
<i>Msh6</i>	gen <i>mutS</i> homolog 6
MSH6	protein <i>mutS</i> homolog 6
MutH	komplex s helikázovou aktivitou
MutL	komplex za opravu DBSs
MutS	proteinový komplex <i>Msh2</i> a <i>Msh6</i>
Mut α	homolog proteinového komplexu MutS
NCO	non-crossover
<i>OdsH</i>	gen <i>ods-site</i> homeobox
<i>Ovd</i>	gen <i>overdrive</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PRDM9	PR doména obsahující 9
PWD	zkratka pro kmen PWD/Ph
PWD/Ph	inbrední myši laboratorní kmen
QTL	lokalizace kvantitativních znaků
Rad51	RAD51 rekombináza
RIM	reprodukční izolační mechanismy
RNA	ribonukleová kyselina
Shs1	helikázový protein
SPO11	iniciátor meiotických dvouřetězcových zlomů
ssDNA	jednovláknová DNA
UvrD	<i>E.coli</i> DNA helikáza II
WB	western blot

1 Úvod

Po celá desetiletí se generace evolučních biologů a genetiků pokouší zjistit, jaká je příčina vzniku hybridní sterility (HS). Hybridní sterilita zabraňuje genovému toku mezi populacemi evolučně blízkých taxonů, kdy dva plně fertillní jedinci produkují sterilní potomky. Mechanismus HS poté vytvoří trvalou reprodukční izolační bariéru mezi sesterskými populace, jejíž důsledky vedou až ke vzniku dvou samostatně oddělených druhů.

Prvotní experimenty k účelu studia HS byly prováděny u různých druhů octomilek, pomocí nichž se podařilo stanovit její základní parametry. Později se dokonce podařilo objevit první gen, mající vliv na fenotyp sterility v modelu *Drosophila*. V laboratoři pod vedením prof. Jiřího Forejta se následně podařilo jako prvním odhalit gen *Prdm9* zodpovědný za sterilitu u laboratorních hybridních samců myši PWD/Ph x C57BL/6J. Určitým omezením tohoto objevu je fakt, že tento gen není univerzální pro všechny savce, u některých druhů dokonce není přítomný vůbec.

Geny *Msh2* a *Msh6* tvoří proteinový komplex MutS α , patřící do skupiny evolučně vysoce konzervovaných DNA mismatch repair proteinů (MMR) zodpovědných za korekturu chyb nacházející se v sekvenci DNA v době replikace a mitotické/meiotické fázi buňky. Pokud se v sekvenci nachází jakýkoliv nesoulad párů bází, delece či inserce je systém schopný zastavit proces meiotické rekombinace v době po vzniku dvouřetězcových DNA zlomů. Tyto geny tedy slouží jako „strážci“ správného průběhu homologní rekombinace mezi oběma řetězci. Studie založené na kvasinkovém modelu dvou rozdílných kmenů *Saccharomyces*, u kterých po procesu křížení vznikající pohlavně nedělicí se hybridní, se podařilo vyřazením genů *Msh2* a *Msh6* vyprodukovat hybridy vykazující výrazné zvýšení množství homologních rekombinací, schopných následného opakovaného křížení v procesu pohlavního dělení buňky. Tímto experimentem se tedy podařilo překonat reprodukční bariéru hybridní sterility u kvasinek.

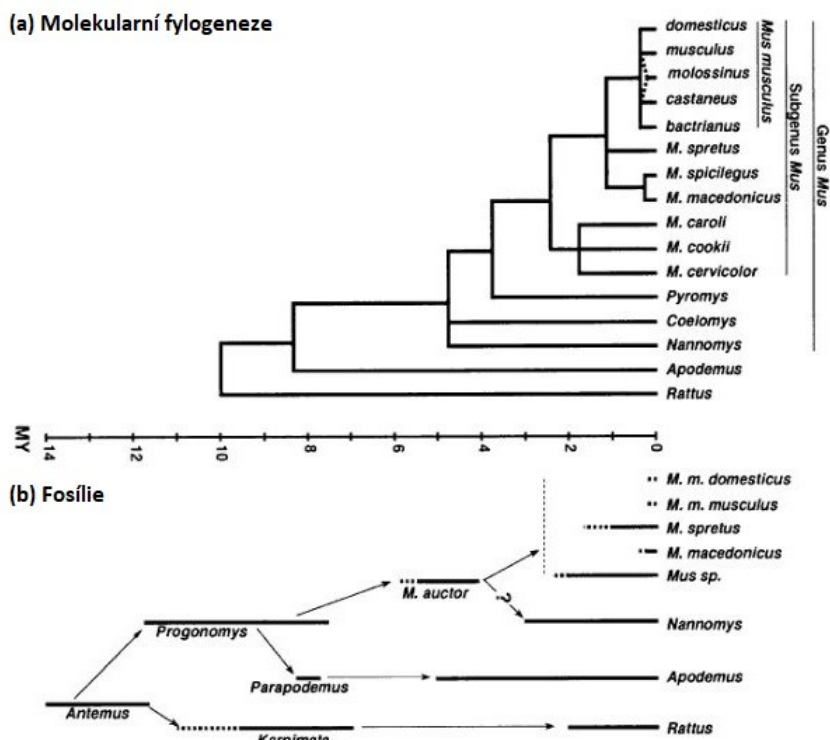
Ve své diplomové práci se po teoretické části věnuji vývoji rodu *Mus* a faktorům způsobujícím hybridní sterilitu. Experimentální část bude zaměřena především na fenotypový popis delečních mutant samců C57BL/6J postrádající gen *Msh6*. Výhodou případných zjištění, je právě již zmíněná vysoká konzervativnost systému s teoretickým přesahem do dalších skupin eukaryotických organismů.

2 Literární přehled

Generace evolučních vědců se snaží popsat, jaké mechanismy jsou zodpovědné za druhovou rozmanitost na planetě Zemi. Samotný proces vzniku nových druhů je nazýván speciace a zabýval se jím již v polovině 19. století Charles Darwin ve své knize „O původu druhů“, kde jako první přišel s teorií přirozeného výběru a za základní jednotku evoluce považoval jedince (Darwin, 1859). Další rozvoj jeho teorie umožnila až práce augustiniánského mnicha Johana Gregora Mendela. Svá křížení původně prováděl na myších, to se však nesetkalo s pochopením ostatních mnichů, kteří odmítali nocovat pod stejnou střechou, kde docházelo ke kopulaci živých tvorů (Paigen, 2003). Svůj zájem tedy přeorientoval na rostliny, a ty, ačkoliv se stále jedná o živé organismy, již nikoho nepohoršovaly, a tak na zahradě svého brněnského kláštera mohl provádět experimenty s křížením hrachu (*Pisum sativum*) současně i vinnou révou (*Vitis vinifera*), pomocí nichž formuloval základní principy teorie dědičnosti. Za základní jednotku zodpovědnou za biologickou dědičnost označil skupiny „částicových faktorů“, dnes nazývanými geny (Mendel, 1866). Mendel se tak stal „otcem“ zakladatelem vědního oboru genetiky a zároveň svými poznatky pomohl budoucím evolučním genetikům formulovat komplexnější a daleko sofistikovanější teorie o mechanismu speciace.

2.1 Fylogenetický původ rodu *Mus*

Řád hlodavci zahrnuje velkou skupinu Myšovití (*Muridae*) s podskupinou „pravé myši“ *Mus*, kam patří myši a mimo ně jejich blízcí příbuzní křečci, potkani a krysy. Výskyt prvních primitivních hlodavců je předpokládán v době středního miocénu situovaných do oblasti dnešní Indie a jihovýchodní Asie. V těchto místech byla nalezena nejstarší a nejprimitivnější fosilie prapředka rodu *Antemus* s odhadovaným stářím 14 milionů let. Nález této fosilie zařazené do Pákistánské skupiny Siváliského pohoří, odkud také pochází její označení Siválijská fosilie, je považován za nejvýznamnější paleontologický záznam sloužící jako výchozí uzel fosilní kalibrace pro klasifikaci druhů do kladistických stromů (Jacobs a Downs et al., 1994; Jacobs a Pilbeam et al., 1980; Seiffert et al., 2006)



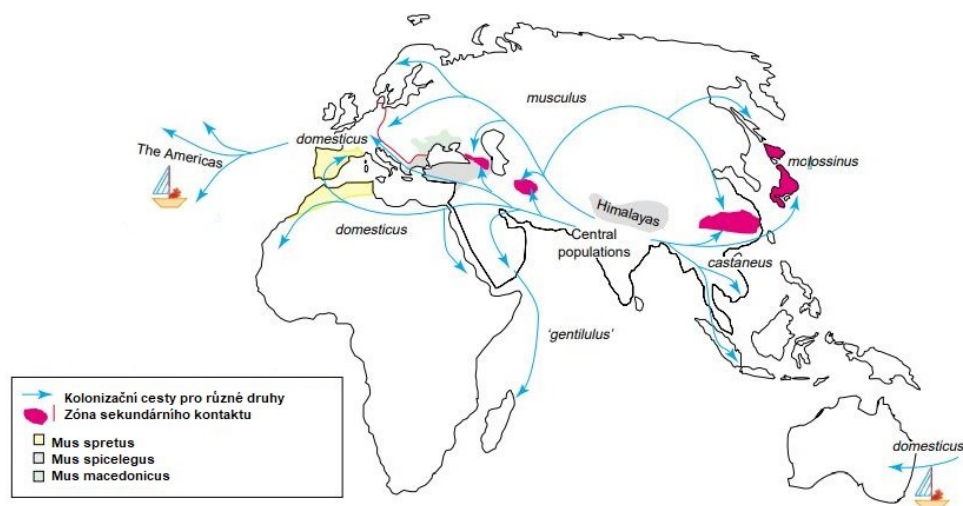
Obrázek 1. Kladistické rozdělení rodu *Mus*. Podélná čára označuje fylogenetickou vzdálenost v milionech let. (a) Zobrazuje taxonomické rozdělení rodu *Mus* pořázených z dat celogenomových studií. (b) Rozdělení na základě nálezů fosilií. Světlé a přerušované čáry znázorňují chybějící fosilní záznamy nutné pro úplné spojení taxonomických uzlů. Jednotlivé větve (klady) jsou členěny na základě fenotypického pozorování nalezených pozůstatků, zejména morfologických záznamů chrupu. Kladogram se s přibývajícím nálezem fosilií může měnit (použito z Boursot et al., 1993)

Předpokládá se, že dva podrody *Progonomys* a *Karnimata* vycházejí přímo z *Antemus*, kdy *Karnimata* dal později vzniknout rodu *Rattus* tedy krysám a *Progonomys* byl výchozí pro vznik myši *Mus*, kterým se později podařilo diverzifikovat do mnoho dalších druhů. Toto je obecně přijímána teorie vycházející z DNA sekvenační analýzy, dále s použitím metod detekce polymorfismů délky restričních fragmentů (RFLP) a studia mitochondriální DNA (mtDNA) (Chevret et al., 2005; Lecompte et al., 2008; Michaux et al., 2001). Některé studie za bod divergence mezi rody *Rattus* a *Progonomys* považují mezičlánek předka rodu *Phloeomys*, který dal postupně vzniknout rodu *Progonomys* (Kimura et al., 2015) a později i pravým myším zahrnující velkou skupinu *Mus*, kam patří i myši domácí *Mus musculus* v podobě, jak ji známe dnes. Teorie je postavena na základě důkladných genomových studií a silně podpořena fosilními nálezy.

2.1.1 Rozšíření a variabilita rodu *Mus musculus*

První velká expanze myši domácí se udála pravděpodobně před 10 000 lety, kdy následkem tání ledovců se podařilo dříve odděleným populacím postupně divergovat do čtyř

samostatných skupin, které obsadili navzájem se nepřekrývající oblasti v okolí indického subkontinentu. V současné době je odhadováno, že skupina *Domesticus* byla soustředěna podél stepí dnešního Pákistánu západně od Indie (Auffray et al., 1990). Skupina *Musculus* se nejspíš mohla nacházet v severní Indii, skupina *Castaneus* obsadila oblast dnešní Bangladěše a populace *Bactrianus* zůstala v Indii (Horiuchi et al., 1992). Pro rozšíření myši domácí se stal zásadní okamžik rozvoje zemědělství. *Domesticus* se dále šířil do vesnic a farem v oblasti dnešního Pákistánu, *Musculus* obsazují centra v Číně a konečně skupiny zvířat *Bactrianus* a *Castaneus* obývají centra zemědělských komunit v Indii a jihovýchodní Asii. Zhruba o 6000 let později se podařilo myši domácí dostat do Evropy. Zanesení bylo převážně zapříčiněno migrační vlnou zemědělců a obchodníků ze středního východu napříč jihovýchodní Evropou. Značnou roli pro kolonizaci sehrál rozvoj námořní dopravy, kdy s těmito mořeplavci se myším podařilo migrovat jako černí pasažéři společně s lidmi do všech částí světa, včetně subsaharské Afriky, Ameriky a mnoha dalších koutů na světě (Boursot et al., 1993; Silver, 1996)



Obrázek 2. Rozšíření rodu *Mus* po zemi. Modré čáry znázorňují trasu putujících myši. Fialová barva místa druhotných kontaktů mezi poddruhy. Ostatní barevné zóny značí místa výskytu sesterských druhů. Centrum původní populace se nacházelo v oblastech Indického poloostrova a na území dnešní Bangladěše. Procesem radiace došlo k postupnému rozšíření jednotlivých poddruhů *Mus musculus* do ostatních míst Euroasie. Na kontinenty Ameriky a Austrálie byly myši zaneseny uměle lodní dopravou (použito a upraveno z Guénet a Bonhomme, 2003).

Taxonomicky se *Mus musculus* dělí do čtyř samostatně figurujících skupin (*Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus*, *Mus mus bractrianus*, *Mus musculus castaneus*). Z pohledu evolučních vědců jsou skupiny definovány jako samostatné poddruhy, mezi nimiž existuje úzká hranice. Z toho důvodu definovat vztahy u těchto poddruhů, a to jak genetické, tak prostorové je velice obtížné, zejména v důsledku radičního procesu vzniku druhu. Taktéž mezi jednotlivými populacemi skupin dochází k neustále výměně genetické

informace, jsou tedy považovány za neustále se formující (Berry and Bronson et al., 1992; Marshall et al., 1981). V souladu s moderním pohledem na poddruhy je můžeme označit jako polytypické druhy, to znamená, že všichni členové druhu mohou být dále rozděleni na minimálně dva poddruhy. Uvedený způsob definice poddruhu, je do značné míry založen na rozdílné kombinaci alel nacházejících se v jaderné DNA v lokusech kódující proteiny. Značné rozdíly jsou však pozorovány i v oblastech nekódujících sekvencích na Y-chromozomu, či mimojaderné mitochondriální DNA (mtDNA). Podstatná část této mezidruhové variability je pozorována zejména mezi evropským a asijským *Mus musculus musculus* (zkráceně *M.m. musculus*) nebo severozápadním a jihovýchodním *Mus musculus domesticus* (zkráceně *M.m. domesticus*) (Frisman et al., 1990; Moriwaki et al., 1986). Mezi poddruhy je rozdíl nejvýznamnější u skupin *M.m. domesticus* a *M.m. musculus*, a to konkrétně na evropském kontinentu, kdy jsou tyto populace rozděleny tzv. hybridní zónou (Boursot et al., 1993). Další tři druhy *Mus spretus*, *Mus spicilegus* a *Mus macedonicus* jsou řazeny k blízkým taxonům myši domácí a můžeme je nelézt na několika málo stanovištích v Evropě, Africe a Asii (viz obr2).

2.2 Reprodukční izolační bariéry

Z genetického hlediska je nejčastěji používanou definicí druhu ta vycházející z Darwinových a Mendelových závěrů a zní takto: „Uzavřená pohlavně se rozmnožující populace organismů, jenž je reprodukčně izolovaná od ostatních takovýchto populací. Vznik populací přispívajících ke vzniku nových druhů, je pak zajištěn existencí reprodukčně izolačních mechanismů tzv. RIM“ (Mayr, 1942). Díky této definici jsme schopni vyvozovat závěry mechanismů speciace a separace.

Reprodukční bariéra zabráňující přenosu genetické informace mezi populacemi je zaručena vícero způsoby. Vnější mechanismy rozdělují populace nejčastěji geografickou bariérou, například přítomnost pohoří, či oddělení řekou nebo časově, kdy jsou jednotliví členové populace aktivní v jinou dobu. Dále to jsou mechanismy vnitřní prezygotické, jenž snižují pravděpodobnost vzniku hybridních zygot a postzygotické, které ovlivňují fertilitu jedinců, či přímo zamezí vývoji hybridních zygot. Mezi významné faktory postzygotické bariéry je uváděná hybridní sterilita a neživotaschopnost F1 hybridů (Coyne and Orr, 2004).

2.2.1 Hybridní sterilita

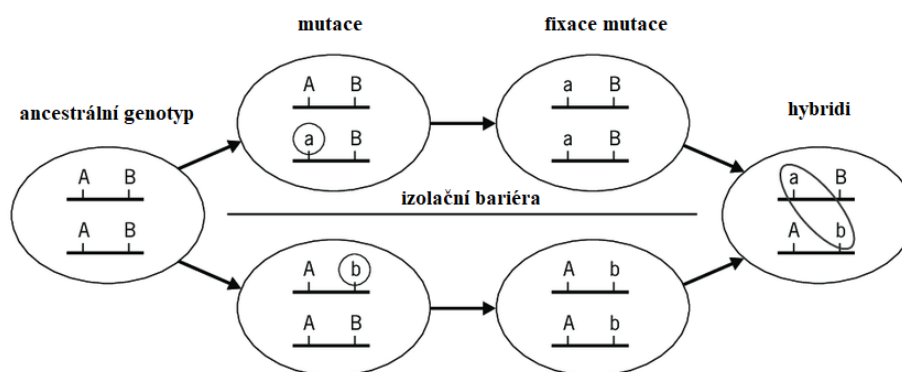
Problému neplodnosti hybridů si všiml již před více než dvěma tisíci lety Aristoteles, kdy ve své práci „O původu zvířat“ popisuje neplodnost mezků. Ve francouzštině se první zabýval rozdílným stupněm plodnosti hybridů získaných ze stejného páru rodičů přírodovědec J. Buffon (Buffon, 1797). Podle Darwina je neplodnost výsledkem řady mezidruhových rozdílů ve struktuře reprodukčního systému, mezi které řadí i sexuální instinkty, či délku březosti. Nově vzniklé druhy tak nejsou formovány pod tlakem přirozeného výběru, ale jsou přímo předurčeny mnoha fyziologickými a morfologickými odchylkami způsobující neplodnost, zapříčiněné rozdílnou evoluční divergencí mezi populacemi (Darwin, 1859). Hybridní sterilitu lze jednoduše definovat jako situaci, kdy dvě zcela plodné rodičovské formy vyprodukují hybridní potomstvo, jenž je sterilní (Dobzhansky, 1937). Za sterilitou hybridů či jejich neživotaschopnost stojí tři typy genetických defektů: rozdílná ploidita rodičů, chromozomové aberace a v neposlední řadě odlišnost rodičovských alel, které kvůli genové inkompatibilitě nefungují správně u hybridů (Coyne and Allen Orr, 1998).

Genová i chromozomální sterilita se projeví aberantním průběhem meiózy. Genová sterilita je běžná u zvířecích hybridů a chromozomální sterilita v rostlinných hybridech, kdy u některých druhů rostlin se může jednat o kombinaci obou zmíněných faktorů.

Pohledy a definice na téma hybridní sterility se v průběhu času a se získáváním nových poznatků zejména v oblasti molekulární biologie a genetiky neustále vyvíjejí, obecné principy však již byly postulovány v první polovině dvacátého století. V roce 1922 J.B. Haldane díky mnoha pozorováním hybridizačních pokusů u různých organismů formuloval pravidlo, dnes označované jako Haldanovo pravidlo. To říká, že sterilitou či neživotaschopností je u mezidruhových hybridů F1 generace přednostně postiženo pohlaví heterogametické (XY nebo ZW), zatímco pohlaví homogametické (XX nebo ZZ) často bývá fertilmí (Haldane, 1922). Tento jev je pozorován napříč živočišnými druhy (Haldane, 1922), doposud je však popsáno jen několik málo genů regulujících hybridní sterilitu. Takové geny byly dosud nalezeny jen u dvou modelových živočišných organismů *Drosophila* a *Mus musculus*. Molekulární podstata Haldanova pravidla není zatím uspokojivě vysvětlena. Sterilní fenotyp heterogametického pohlaví je pravděpodobně odrazem několika skrytých příčin, včetně akumulace nekompatibility recesivních genů v chromozomech X a Z, což vede k vyšší rychlosti vývoje hybridních genů sterility u samců než u samic (Masly and Presgraves, 2007; Wu and Davis, 1993). Mnohé provedené studie prokázaly, že s větší pravděpodobností se u hybridů bude vyskytovat samčí

sterilita, protože spermatogeneze, proces vzniků spermií, je daleko citlivější k poruchám než proces oogeneze, poskytující zralá vajíčka. Existují vzácné výjimky, například hybridy rodu *Xenopus* mají své heterogametické samice WZ fertillní, naopak homogametičtí ZZ hybridní samci jsou sterilní (Malone a Michalak, 2008).

Jaké jsou původní faktory zodpovědné za vývoj hybridní nekompatibility se nezávisle na sobě snažili vysvětlit pánové Dobzhansky a Muller. Ti přišli s řešením, že za hybridní nekompatibilitu je zodpovědná interakce mnoha genetických lokusů, kdy v nejjednodušším případě jsou nutné takové geny dva. Na začátku máme původní populaci, která je rozdělena geograficky, například pohořím, což vede ke vzniku dvou dceřiných populací, u kterých dochází ke kumulaci rozdílných mutací a fixaci odlišných alel. Nově vzniklé alely jsou sice stále kompatibilní s genetickým pozadím původní populace, avšak některé jsou již nekompatibilní s pozadím druhé populace dceřiné. Zkřížením geneticky odlišných dceřiných populací vznikne sterilní nebo neživotaschopný hybrid. Příčinou této sterility jsou nově vzniklé alely, mezi nimiž dochází k negativní epistatické interakci (Dobzhansky, 1937; Muller, 1942) (viz obrázek 3). Znamená to tedy, že dvě časově dostatečně dlouho geograficky oddělené populace vedou k vytvoření diverzifikovaných genomů, které mohou způsobit sterilitu F1 hybridů. Aby došlo k úplné postzygotické izolaci je nutná přítomnost několika kombinací genových inkompatibilit, jednotlivé inkompatibility většinou přispívají k efektu kumulativním a velice slabým způsobem (Coyne a Orr, 2004).



Obrázek 3. Schéma Dobzhanský-Mullerova modelu inkompatibilit (D-M model). Model popisuje situaci oddělení původní populace izolační bariérou na dvě dceřiné. V zakládající populaci s genotypem AABB vlivem nespécifikovaných vlivů dojde k mutaci alely „A“ na alelu „a“ a v případě alely „B“ na „b“. Tímto nám vzniknou dvě dceřiné populace „AaBB“ a „AABb“. Izolační reprodukční mechanismy zamezí možnost přenosu alel. Po dostatečně dlouhé době může dojít k fixaci mutovaných alel „aaBB“ a „AAbb“. V populacích s fixovanými alely mohou dále fungovat normálně, díky oddělenému pozadí bariérou. Inkompatibilita nastává až v případě křížení dceřiných alel. Výsledný hybridní potomek s nežádoucími interakcemi způsobené novými alelami je buďto sterilní nebo neživotaschopný (použito a upraveno z Veen, 2008).

Genetická populační teorie předpokládá, že pohlavní chromozomy disponují jedinečnou vývojovou dynamikou, která se diametrálně liší od autozomů (Haldane, 1922). Jako příklad můžou sloužit nově vzniklé mutace nacházející se na chromozomu X. Ty za předpokladu, že se nacházejí v recesivní formě, jsou podrobeny silnější selekci, než mutace autozomální a působí účinněji na pohlaví heterogametické (Charlesworth et al., 1987). Pokud dojde v prostředí k náhle nevratné změně, pak u dříve škodlivých akumulovaných mutací může dojít k opačnému efektu. Mutace se jednoduše přizpůsobí změnám prostředí, pod účinky selekce se postupně mutace fixují a stanou se prospěšnými. Za tohoto předpokladu se X-vázané geny vyvíjejí pomaleji než geny autozomální, a to bez ohledu na jejich formu dominance (Orr a Betancourt, 2001). Pokud se lokusy vázané na chromozomem X opravdu vyvíjejí rychleji než lokusy autozomální, mezidruhové rozdíly ve vlastnostech by se měly v nejvyšší míře nacházet na chromozomu X. Tento jev je znám jako efekt „velkého X“ a říká, že geny mající největší vliv na hybridní sterilitu a inviabilitu jsou spojeny s chromozomem X. Tato definice velkého efektu chromozomu X, vykazující nepřiměřený příspěvek k hybridní nekompatibilitě, vyplývá z analýzy klasických zpětných křížení (Dobzhansky, 1936). Jelikož se v tomto experimentu nachází chromozom X v hemizygotní formě, jsou výsledky pozorování zpochybňovány. Ačkoliv se opravdu zdá, že na chromozomu X se nachází nepřiměřeně velké množství mutací hybridní nekompatibility, může být ve skutečnosti tento rozdíl způsoben „maskováním“ recesivních forem faktorů nekompatibility ležících na autozomech (Wu a Davis, 1993). Aby došlo ke smysluplnému srovnání příspěvků chromozomu X a sadě autozomů, musí být experiment navrhnut tak, aby se předcházelo matoucímu účinku dominance a zároveň poskytl dostatečné rozlišení pro detekci kvantitativních rozdílů v hustotě genetických faktorů ovlivňující danou vlastnost.

2.2.2 *Metody studie hybridní sterility*

Hybridní sterilitu, jakožto jeden z hlavních procesů reprodukční izolace mezi nově vznikajícími druhy, nalezneme napříč všemi pohlavně se rozmnožujícími eukaryotickými organismy. První experimenty, probíhající již od doby Dobzanského, byly prováděny na rodech druhu *Drosophila*. Ta pro svou druhovou rozmanitost, nenáročnost a krátkou generační dobou se stala na dlouho dobu jediným modelovým organismem vhodným pro studium hybridní sterility. Systematická genetická studie *Drosophily* začala na počátku dvacátého století, kdy Quackenbush po Morganovi uvedl, že křížení mezi některými kmeny *D. melanogaster* produkovalo (unisex) jednopohlavní potomky (Quackenbush, 1910). Sturverant tuto skutečnost potvrdil a poukázal na zjevnou možnost existence dvou odlišných forem *D.*

melanogaster. Pečlivým zkoumáním založeným především na rozdílné morfologii samčích genitálií, byl popsán nový druh *D. simulans*. Skutečnost navíc potvrdila přítomnost postzygotické reprodukční izolace, kdy u hybridních potomků byla pozorována hybridní neživotoschopnost a sterilita (Sturtevant, 1920; Sawamura, 2000). Většina jeho úsilí byla věnována vytvoření genetické mapy *D. simulans* za účelem srovnání s mapou *D. melanogaster*. Na základě genetických dat předpovídal druhově specifickou chromozomální inverzi, které byla později potvrzena cytologií (Horton, 1939; Klaus Pxtau a Einleitung, 1935). Ve skutečnosti byl Sturtevant schopen přímo provádět alelické testování mezidruhových mutantů, avšak druhově hybridní páry generace F1 nebyly schopné produkovat potomstvo, což je bohužel nezbytné k provedení dalších genetických analýz (Sawamura, 2000). Proto se evoluční genetici vybrali pro své studie jiné páry druhů *Drosophila*, tehdy známe jako rasa A a rasa B, později nazývané *Drosophila pseudoobscura* a *Drosophila persimilis* (Dobzhansky, 1936; Sawamura, 2000).

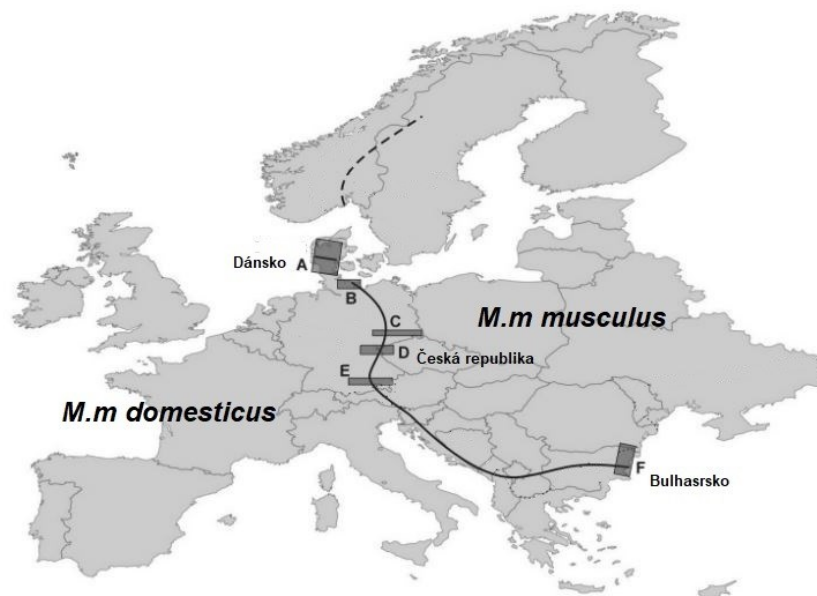
Po delší odmlce se J. Coyne a jeho kolegové zaměřili na tři druhy octomilky, které mezi sebou mají úzké spojení. *Drosophila melanogaster*, jakožto nejběžnější zástupce nacházející se na většině míst po celém světě a další dva druhy, *Drosophila mauritiana* a *Drosophila sechellia* vyskytující se na malých ostrovech blízko Madagaskaru (Coyne and Charlesworth, 1986). Dlouho trvající časová i geografická izolovanost zaručuje dostatečnou genetickou vzdálenost obou druhů. Divergence třech zmíněných druhů od společného předka je odhadována na dobu 2-3 milionů let (Lachaise et al., 1988). Křížením mezi těmito druhy vede v první generaci F1 k získání hybridních sterilních samců, avšak samice získané tímto křížením zůstávají plodné, což umožňuje snadné zpětné křížení. Postupným zpětným křížením se tak podařilo zúžit rozsah na tři „hlavní“ faktory přispívající k hybridní sterilitě na malý region nacházející se uvnitř X chromozomu ve vzdálenosti jednoho centimorganu (Coyne and Charlesworth, 1986). Každý z těchto tří faktorů souvisel s jediným viditelným fenotypovým markerem, kdy hlavní faktor je definován jako lokus nebo shluk úzce propojených lokusů, které mohou vést k úplné sterilitě. Studie založené na opakovaném zpětném křížení, taktéž známé pod pojmem introgresní metoda, slouží k přenosu genetického materiálu mezi druhy vedoucí zpět k rodičovským druhům a stala se základní metodou v pro studium hybridní sterility (Anderson a Hubricht, 1938). V systému *Drosophila simulans* a *D. Mauritiana* je introgresní metoda brána jako paradigma pro studiu genetiky speciace a je dodnes intenzivně používána k mapování hybridních samčích genů na chromozomu X (Sawamura, 2000).

Teprve až studie založené na celogenomové QTL (Quantitative trait locus) analýze, sloužící k detekci kvantitativních znaků napomohly k detekci markerů obklopujících „hlavní“ faktory způsobující úplnou sterilitu. Tento způsob detekce kandidátních lokusů, jenž je založen na statistické metodě prováděné na souhrnných datech kvantitativních znaků -určitých fenotypů sterility - vázaných s definovanými genotypy získaných z řady experimentů, odhalil tři regiony obklopující hlavní faktory pokrývají 60 % chromozomu X (Cabot et al., 1994; Davis and Wu, 1996; Perez et al., 1993). Následnou analýzou se zmenšil rozsah lokusů na 40% chromozomu X, díky čemuž se podařilo zmapovat devět menších faktorů (Wu a Hollocher, 1998). Použitím stejné metody byla postupně detekovaná sada 19 menších faktorů nacházejících se na 3. chromozomu. Analýza QTL se stala cenným nástrojem nejen pro studium hybridní sterility vedoucí ke speciaci, ale také doposud hraje významnou roli k identifikaci specifických genů hrající úlohu v procesech manifestovaných v polygenní dědičnosti. Získaná data výrazně přispěla k identifikaci konkrétních genů hrajících důležitou roli v projevu hybridní sterility v systému *Drosophila*. Doposud se podařilo nalézt tři konkrétní geny u druhu *Drosophila* a jeden v modelu *Mus musculus*. Prvním z nich byl gen *Odysseus* (*OdsH*), posléze následovaly geny *JYAlpha* a *Overdrive* (*Ovd*) (Masly et al., 2006; Phadnis, 2011; Sun et al., 2004). U nulových mutantů pro každý z jmenovaných genů, byl pozorován mírný fenotypový projev sterility, zejména jemný pokles produkce spermií v případě mladých samců. Důsledky slabého účinku přímo korelují s definicí Haldenového pravidla a Dobzanského alelové teorie negativní epistatické interakce.

2.2.3 Modelový systém *Mus musculus*

Po 80 letech intenzivních studiích hybridní sterility probíhajících dodnes na druhu *Drosophila*, jenž je svou podstatou vhodným systémem spíše pro hmyz, se současně hledal modelový systém, který by měl svou biologickou podstatou blíže k savcům. Myš domácí (*Mus musculus*) má dlouholetou historii jako modelový systém v genetickém a biomedicínském výzkumu a disponuje mnoha klasickými inbredními kmeny, které lze zakoupit po celém světě (Schwahn et al., 2018). Není tak divu, že *Mus musculus* je hojně používaná pro účely studia hybridní sterility. U myši domácí rozlišujeme tři poddruhy. *M. m. musculus*, jenž se nachází ve východní Evropě a severní Asii, *M. m. castaneus* nacházející se v jihovýchodní Asii a části Španělska a *M. m. domesticus* původem z Blízkého východu, který byl zavlečen do západní Evropy, Ameriky, Afriky a do mnoha oceánských ostrovů (viz obrázek 4). Divergence poddruhů od společného předka je odhadována na období přibližně před 350 000 let (Boursot et al., 1993; Duvaux et al., 2011; Geraldès et al., 2011). Poddruhy vznikly procesem

parapatrické speciace a vykazují částečnou reprodukční izolaci. V přírodě můžeme nalézt regiony, kde se poddruhy běžně setkávají, mohou se omezeně křížit a produkovat hybridní potomky. Nejlépe definovaným regionem je úzká hybridní zóna procházející středem Evropy od Dánska po Černé moře, která od sebe odděluje dva poddruhy myší, v západní části Evropy *Mus musculus domesticus* a východní části Evropy *Mus musculus musculus* (Alibert et al., 1997; Britton-Davidian et al., 2005; Forejt a Iványi, 1974; Turner et al., 2012). Velice krátké časové období divergence a existence částečné reprodukční bariéry, jenž ne zcela zamezuje genovému toku, nám teoreticky dovoluje studovat prvotní příčiny HS v přírodě. U evolučně déle oddělených druhů vyznačujících se úplnou reprodukční bariérou způsobující reprodukční izolaci, může být prvotní příčina maskována sekundárními inkompatibilitami, které jsou důsledkem a ne příčinou speciace a proto hybridní potomstvo získané z jejich křížení není pro identifikaci genů HS příliš vhodné (Larson et al., 2018).



Obrázek 4. Průběh hybridní zóny v Evropě. Hybridní zóna je vyobrazená tučně, orientační pozice v Norsku je značena přerušovanou čarou. Obdeníky A-F označují lokality častého sběru hybridů vhodných pro studie. Definovaná zóna prochází napříč střední Evropou, začíná v Dánsku, protíná západní výběžek České republiky a skrze Alpy a balkánské státy směřuje až k západnímu cípu Bulharska na okraji Černého moře. Hybridní myši můžeme nalézt až ve vzdálenosti 50-100 km od zóny (použito z Baird and Macholán, 2012).

Polygenní podstata hybridní sterility a podmíněnost epistatických interakcí mezi vícero geny, a taktéž značné alelické rozdíly u divokých druhů, omezují genetický výzkum genů HS u divokých myší z míst přírodou vytvořené hybridní zóny. Pro laboratorní pokusy byly proto vytvořeny postupným křížením sourozenců inbrední kmen odvozený od divokých zvířat *Mus m. musculus* (kmen PWD/Ph, dále PWD) a jako zástupce *Mus m. domesticus* byl použit laboratorní kmen C57BL/6J, dále B6) (Gregorová a Forejt, 2000). Hybridní samci (PWD x B6)

F1 jsou zcela sterilní, zatímco hybridi PWD s jiným klasickým kmenem *Mus m. domesticus* C3H jsou zcela plodní. Skupina tvořená kolem J.Forejta využila tento polymorfismus k identifikaci prvního genu pro hybridní sterilitu u obratlovců (Forejt and Iványi, 1974; Forejt et al., 1991; Mihola et al., 2009; Trachtulec et al., 2005).

2.3 Objev genu hybridní sterility *Hst1* alias *Prdm9*

Na počátku tohoto přelomového objevu stálo křížení inbredních kmenů myši odvozených z poddruhu *M. m. domesticus* C57BL/10J (zkráceně B10) a C57BL/C3HJ (zkráceně C3H), společně s divokými myšmi poddruhu *M. m. musculus* (PWD). Při cytogenetickém pozorování chromozomů sterilních samců nebyly spatřeny žádné nehomologní struktury. Poznatky vedly k závěru, že fenotyp sterility má podstatu čistě genovou. Gen odpovědný za sterilitu byl autory studií pojmenován jako první gen hybridní sterility *Hst1* (*Hybrid sterility 1*). *Hst1* existuje ve dvou formách *Hst1^s* (index S jako sterilní) a *Hst1^f* (index F jako fertilní). Většina inbredních kmenů *M. m. domesticus* (včetně B10) nese alelu *Hst1^s* (sterilní), odvozený kmen C3H je nositelem alely *Hst1^f* (fertilní). Podobně je tomu i v případě *M. m. musculus* (PWD), sterilní alela *Hst^{ws}* (index WS sterilní) a fertilní *Hst^{wf}* (index WF fertilní). Hybrid získaný křížením B10 (alela *Hst1^s*-sterilní) x PWD (alela *Hst1^{ws}*-sterilní) F₁ vykazuje díky interakci alel (*Hst^{ws}/Hst1^s*) zcela sterilní fenotyp (vývoj spermií je zastaven v první fázi meiotického dělení). Ostatní kombinace alel u hybridních potomků nemají na průběh zrání spermií žádný vliv a jsou fertilní (Forejt and Iványi, 1974).

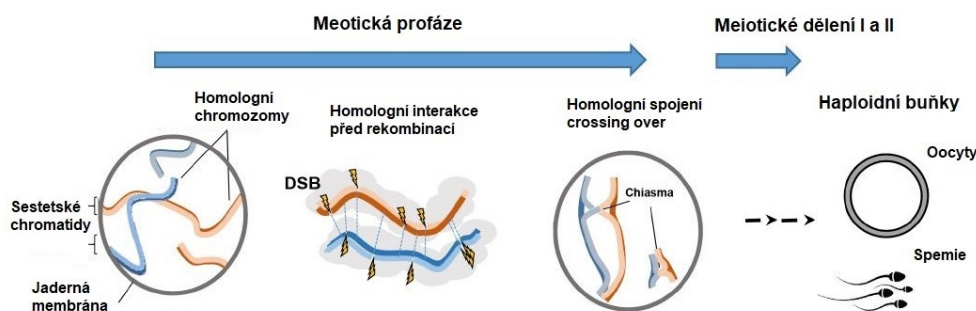
Pro identifikaci byla použito genetické mapování díky které se v kombinaci se sledováním fenotypových znaků hybridů váhy testes, či počet zralých spermií v kombinaci s ověřením genotypu na základě mikrosatelitních MIT markerů (Massachusetts Institute of Technology) za pomoci dalších SSLP (simple sequence length polymorphism) podařilo na chromozomu 17 lokalizovat kritickou oblast nesoucí gen *Hst1* a dalších šest genů kódujících protein a šest pseudogenů (Forejt, 1996). Tímto způsobem byla připravena genetická mapa, od které byla následně odvozená mapa fyzikální za použití sady YAC (Yeast artificial chromosome) klonů obsahujících genomovou myši DNA překlenující oblast genu *Hst1*. Z dat získaných kombinací genetického a fyzikálního mapování byl izolován konkrétní YAC klon, jenž nesl gen *Hst1* (Gregorová et al., 1996). Kandidátní geny hybridní sterility byly z této oblasti identifikovány pomocí BAC (z ang. Bacterial artificial chromosome) klonů myši genomové DNA. Přípravou transgenních myši nesoucích odlišné BAC klony z kritické oblasti byl definován BAC-*Hst1^f*-DNA interval 15,9 kb dlouhý odpovědný za obnovení fertility u

hybridů nesoucích endogenní alelely *Hst1^S/ Hst1^{WS}*. V této oblasti se již nachází jediný gen, jímž je *Prdm9*, a ten je dodnes považován za jediný známý gen způsobující úplnou samčí hybridní sterilitu u obratlovců (Mihola et al., 2009). Druhá oblast nutná pro fenotyp hybridní sterility byla pomocí QTL analýzy lokalizována na chromozomu X a je označena jako *Hstx2*, sama však není pro jeho celkovou manifestaci dostačující (Dzur-Gejdosova et al., 2012).

Prdm9 gen koduje histonovou metyltransferázu se specifitou jak pro trimetylaci lysinu 4, tak i lysinu 36 na histonu 3 (H3K4me3, H3K36me3) a navíc nesoucí DNA vazebnou „zinc finger“ doménu. Protein PRDM9 na samém počátku meiozy distribuuje tyto dvě epigenetické značky do specifických míst po celém genomu do tzv. rekombinačních hotspotů, aby se některé z nich pak staly cílem pro generování dvouřezcových zlomů DNA (DSBs z ang. DNA double strand breaks) esenciálních pro párování, rekombinaci, synapsi, naposled i segregaci homologních chromozomů v průběhu úspěšné meiotické profáze I (Baudat et al., 2010; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010; Sandor et al., 2012). Naproti tomu v F1 hybridních mezi poddruhy *M.m musculus* a *M.m domesticus* sterilní alely *Prdm9* přispívají ke genové inkompatibilitě a k meiotické zástavě spermatogeneze ve stadiu pachytenního spermatocyty (Mihola et al., 2009). Tato zástava, vyznačující se velkým množstvím chromozomových asynapsí a neopravených DSBs zlomů je způsobená nekompatibilitou mezi heterozygotním genotypem *Prmd9* a alel v lokusu *Hstx2* na chromozomu X u *M.m. musculus*. Absence PRDM9 proteinu v případě nulových mutantů *Prmd9* *-/-* způsobuje u inbredních laboratorních kmenů C57BL/6 (*M.m domesticus*) a PWD (*M.m musculus*) meiotickou zástavu u obou pohlaví (Hayashi et al., 2005). Studie hybridní sterility probíhají na potomcích získaných z křížení C57BL/6 (B6) nesoucí alelu *Prdm9^{dom2}* (index dom2) a PWD nesoucí alelu *Prdm9^{msc}* (index msc) (Bhattacharyya et al., 2013). Samčí hybridní (B6 x PWD) F1 nesoucí chromozom X^{B6} jsou plodní, ale reciproční samci (PWD x B6) F1 nesoucí chromozom X^{PWD} jsou sterilní. Samice obou kříženců jsou plodné, ale v meióze se objevují problémy se synapsí. Plodnost je alespoň částečně obnovena, pokud hybridní F1 nesou nulovou mutaci alely *Dom2*. Přítomnost jakékoliv jiné alely *Prmd9* nenaznačuje vliv na meiotickou zástavu (Flachs et al., 2013). Epistatický lokus *Hstx2* byl lokalizován do středu chromozomu X (X:66-69Mb) (Lustyk et al., 2019). Současně byla vyloučena alternativní vysvětlení zahrnující vliv chromozomu Y, či existenci imprintovaných genů nebo vliv mitochondriální DNA (Dzur-Gejdosova et al., 2012)

2.3.1 Role *Prdm9* v meiotické rekombinaci

Velká část pohlavně se rozmnožujících živočichů má ve svých somatických buňkách diploidní sadu chromozomů, tedy dvě kopie sady chromozomů, přičemž každá kopie je zděděná od jednoho z rodičů. Výjimku tvoří pohlavní buňky, jako jsou spermie a vajíčka, ty obsahují pouze haploidní sadu chromozomů. Tyto chromozomy v gametách nejsou přesnou kopií rodičovských chromozomů, ale kombinací obou z nich, generovanou procesem zvaným meiotická rekombinace. Meiotická rekombinace začíná generováním DSBs specifickou meiotickou nukleázou SPO11 a následným párováním homologů, jejich rekombinací a synapsí spráženou s opravou zlomů v segmentech DNA mezi homologními chromozomy. Proces míchaní genetické informace je nazýván rekombinace (Baker et al., 2017). Meiotická rekombinace je základním procesem v genetice, na který může působit přirozený výběr a u většiny pohlavně se rozmnožujících organismů hraje kritickou roli při správném párování a segregaci homologních chromozomů během meiózy (Coop a Przeworski, 2007; Lam a Keeney, 2015; De Massy, 2013). Rekombinace je přísně kontrolovaná a redukována mnoha faktory, její iniciace je vyvolána souborem cíleně způsobených DSBs v celém genomu, jejichž oprava vede ke crossoveru (zkráceně CO) anebo k non-crossoveru (zkráceně NCO) (Lam a Keeney, 2015). Většina molekulárních mechanismů zapojených do tohoto procesu je u obratlovců zachována od dob společného předka zvířat, rostlin a hub (De Massy, 2013). Nukleáza SPO11 je cílena do míst podél genomu do tzv. hotspotů (Baker et al., 2017). Hotspoty jsou krátké intervaly s délkou stovky až tisíce páru bází a vyznačující se přítomností chromatinových epigenetických značek v podobě trimetylace lysinu 4 a lysinu 36 na histonu H3 (zkráceně H3K4me3 a H3K36me3) iniciované proteinem PRDM9, u kterých dochází k většímu počtu rekombinací mnohem pravděpodobněji (až 1000x), než v jiných neoznačených oblastech v genomu. Takovýchto hotspotů existuje celé řada (mezi 20-50 tisíci v ohledu na velikosti genomu) a ne všechny jsou využity pro tvorbu DSBs (Coutton et al., 2013; Lesecque et al., 2014; Úbeda and Wilkins, 2011). Mechanismus, který činí některé hotspoty intenzivněji používané (více „hot“) pro tvorbu DSBs není doposud známý. Druhy postrádající gen *Prdm9* jako kvasinky, rostliny a některé skupiny obratlovců, generují centra hotspotů do míst iniciace transkripce, konkrétně promotorů, která jsou ve formě otevřeného euchromatinu s přítomností H3K4me3 epigenetického markeru. Výjimku tvoří například mouchy nebo červi, kde rekombinační oblast se zdá být náhodná a postrádá jakékoliv hotspoty (Baker et al., 2017; Rockman and Kruglyak, 2009).



Obrázek 5. Průběh meiotické profáze. Během meiotické profáze dochází k rekombinační interakci vedoucí k propojení homologních chromozomů prostřednictvím chiasmat. Chromozomy hledají svého partnera na základě podobnosti v interakci s proteinovými komplexy (modré a červené čáry pro otcovské a mateřské chromozomy). Rekombinace je zprostředkována vytvořením několika dvouřetězcových zlomů DNA (DSB žluté blesky). Oprava DSB podporuje interakce mezi homology (tenká modrá tečkovaná čára). Malá podmnožina opravených DSB (alespoň jedna na homologní pár) vede ke tvorbě chiasmat, která navozují topologické spojení. Tato spojení jsou nezbytná pro správnou segregaci chromozomů v prvním meiotickém dělení (meióza I). Následující druhé meiotické dělení (meióza II) dávají vzniku haploidním oocytům a spermii (použito a upraveno z Grey et al., 2018).

Gen *Prdm9*, jehož expresi pozorujeme pouze v oocytech a spermatocytech, je členem velké rodiny PRDM transkripčních faktorů. U všech studovaných savčích druhů (lidé, opice, myši a patrně i skot) je sestaven ze čtyř hlavních funkčních domén: N terminální domény KRAB, SSXRD a PR/SET (zkráceně SET), za níž následuje C-terminální doména tvořena polem C2H2 zinkových prstů (ZF z ang. zinc finger) (Baudat et al., 2010; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010; Sandor et al., 2012). C-terminální doména je DNA vazebnou doménou zodpovědnou za do jisté míry specifické vyhledávání sekvencí sloužících jako hotspot. Je tvořena zinkovými prsty se dvěma cysteino-histidinovými zinkovými prsty v tandemovém uspořádání, kterých může být takto řazeno od osmi až po více než dvacet. Ve společné asociaci s PR/SET doménou zodpovědnou za vytváření epigenetických značek charakterizuje PRDM rodinu (Hohenauer a Moore, 2012). Centrální oblast sestávající se PR/SET doménou pojmenovanou podle pozitivní vazby s regulačním faktor 1, také nazývaným PRDM1 (PRDI-BF1) a interagující s proteinem retinoblastomu 1, taktéž je vzdáleně spjata s rodinou supresorů Trithorax (SET) nacházejících se ve společnosti mnoha jiných histonových methyltransferáz (Dillon et al., 2005). KRAB N-terminální koncová doména je pravděpodobně zodpovědná za protein-proteinové interakce. Proteinová struktura PRDM9 je vysoce konzervativní napříč druhy s výjimkou vysoce polymorfní oblasti přítomných zinkových prstů (ZNF), a to jak v počtu prstů, tak ve složení tří aminokyselin v každém prstu přicházejících do styku s DNA, což určuje specifitu vazby PRDM9 (Grey et al., 2018). Původ těchto extrémních polymorfismů ZNF domény, které jsou napříč druhy univerzální, s největší pravděpodobností spočívá v procesu opravy DNA během genetické rekombinace, které pod tlakem evolučního výběru nutí měnit parametry alel kódující protein PRDM9 se změnami vazebnými specifitami.

Během procesu opravy DSBs, je větší část zlomů opravena genovou konverzí jako noncrossovers, kdy je pro opravu používá jako templát sekvenci chromatid z homologního chromozomu. Důsledkem tohoto typu oprav může být zanesení mutace (polymorfismu homologního chromozomu) do původní sekvence, kdy tyto mutace pod silným tlakem pozitivního výběru mohou vést k případné inaktivaci stávajícího hotspotu a tedy jeho vymizení v následujících generacích, což by nakonec mělo vést k úplné ztrátě rekombinace a tedy i plodnosti (Boulton et al., 1997). Fakt, že k tomu nedochází je znám jako „paradox hotspotů“ a je vysvětlován vysokou mutační rychlostí ZNF domény. Teprve až objev PRMD9 nabídl možné řešení, který díky své vysoce variabilní oblasti ZNF prstů je schopen vytvořit zcela nová centra hotspotů a tím zamezit vzniku budoucí sterility. To, že k evoluční erozi opravdu dochází a to, že jejím následkům předchází PRMD9 tvorbou nových alel bylo experimentálně potvrzeno v myším modelu. Zároveň tyto experimenty přikládají zodpovědnost zmíněného jevu za výjimečnou rozmanitost PRDM9 alel pozorovaných u různých druhů (Paigen a Petkov, 2018).



Obrázek 6. Schéma organizace domén PRDM9. N-terminální oblast KRAB doména (oranžově) je zodpovědná za proteinové interakce. U některých druhů může chybět. V centrální oblasti je významná PR/SET methyltransferázová doména (tmavě zeleně) zodpovědná za tvorbu specifických epigenetických značek ($H3K4me3$, $H3K36me3$) vedoucí k rozvolněnému stavu chromatinu. C-terminální oblast C_2H_2 ZF (šedá a černá) je variabilní doména tvořená sadou následujících zinkových prstů (ZF) hrající úlohu v nalezení DNA sekvencí určených k tvorbě DSB (použito z Grey et al., 2018).

2.4 Oprava malých chyb v párování bazí v DNA – DNA mismatch repair (MMR)

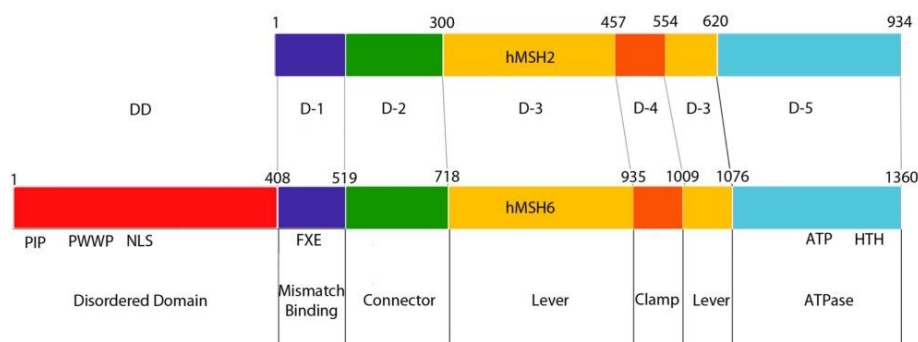
DNA mismatch repair (MMR) je evolučně vysoce konzervovaný proces hrající klíčovou roli při udržování genomové stability, který identifikuje a opravuje páry bazí, které jsou v nesouladu s Watson-Crickovými A-T, C-T dvojicemi bazí. MMRs je skupina proteinů zodpovědná za korekturu chyb nacházejících se v DNA. Primárně jsou MMRs specifické pro malé defekty, jakými jsou zejména neshody (angl. mismatch) v párech bazí, inserce nebo delece vznikající v procesu replikace, ale taktéž během mitotické a meiotické rekombinace. V poslední době se ukázalo, že MMR mohou potlačovat homologní rekombinaci, a že hrají významnou roli v signalizačních dráze při poškození a opravě DNA v eukaryotických buňkách. Klíčovými hráči na poli genomových oprav jsou proteinové komplexy MutS a MutL, jež nalezneme u bakterie *Escherichia coli* a MutSa a MutLa nacházející se u *Saccharomyces cerevisiae* a u

dalších eukaryotických organismů. Správná funkce MMR komplexů je závislá na dalších faktorech, kterými mohou být například PCNA/RPA a RecA/RAD51 účastnících se kontrol DNA v buněčné signalizaci. Defekty v MMR opravách stojí za nestabilitou celého genomu. Existuje silná predispozice k určitým typům dědičných chorob zejména nepolypózního kolorektálního karcinomu známého jako Lynchův syndrom a abnormalitám narušující průběh meiózy v savčích systému vedoucím až ke sterilitě (Kunkel and Erie, 2005; Li, 2008). Studium procesů MMR oprav je v současné době v centru intenzivního zájmu, čemuž nasvědčuje i udělení Nobelovy ceny v roce 2015, kterou získal Paul Modrich spolu s T. Lindahlem a A. Sancarem za objasnění mechanismů oprav – editaci chyb, které s nízkou frekvencí vznikají chybami DNA polymerázy při replikaci DNA a tím udržují maximální věrnost DNA kopií.

2.4.1 *Struktura a funkce eukaryotického komplexu MutSa*

K pochopení obecného fungování systému MMR slouží jako modelový organismus bakterie *Escherichia coli*. Současně je nejlépe popsanou drahou post-replikační oprava v *E.coli* zahrnující kaskádu následných procesů, kdy nejprve MutS komplex rozpozná a naváže se na místo nesouladu v DNA. Navázání adenosintrifosfátu (ATP) dává komplexu impuls ke konformačním změnám za vzniku „posuvné svorky „(z ang. sliding clamp) (Acharya et al., 2003; Drotschmann et al., 1998; Grilley et al., 1989). Formovaná posuvná svorka slouží k navázání dalších komplexů, kdy první z nich je MutL, která aktivuje endonukleázu MutH. MutH je na základně přítomnosti či nepřítomnosti methylovaného adeninu v oblasti d(GATC) v místech nově syntetizované DNA schopen rozlišit mezi rodičovským a dceřiným řetězcem DNA tím, že iniciuje opravu řízenou endonukleázovou aktivitou hemi-methylované sekvence dceřiného řetězce vyštípnutím (z ang nick) místa chybného párování a jeho následnou opravou. Konkrétně, komplex MutL následně aktivuje helikázu UvrD, která napomáhá k uvolnění dvoušroubovice DNA od počátků zlomů. Za přítomnosti exonukleázy dojde k odstranění nenavázaného řetězce, čímž dojde k odstranění chybně zařazeného nukleotidu v dceřiném vlákně. Komplex DNA polymeráza III pak provede syntézu nového vlákna, a DNA ligáza kovalentně spojí přerušené vlákno (Pluciennik et al., 2009). V polovině 90. let byly identifikované kvasinkové a lidské homology bakteriálních MutS a MutL, které ve své podstatě sdílejí stejné iniciační kroky. Mezi bakteriálními a eukaryotickými MMR existují rozdíly. Zatímco bakteriální komplexy fungují jako homodimerní proteiny, eukaryotické proteiny se vyvinuly v heterodimery složené ze tří příbuzných proteinových podjednotek MutSa (MSH2+MSH6), MutSβ (MSH2+MSH3) a MutLa (MLH1+PMS2) (Alani, 1996; Fishel and Wilson, 1997; Palombo et al., 1996). Eukaryota nedisponují přítomnosti hemi-methylovaného

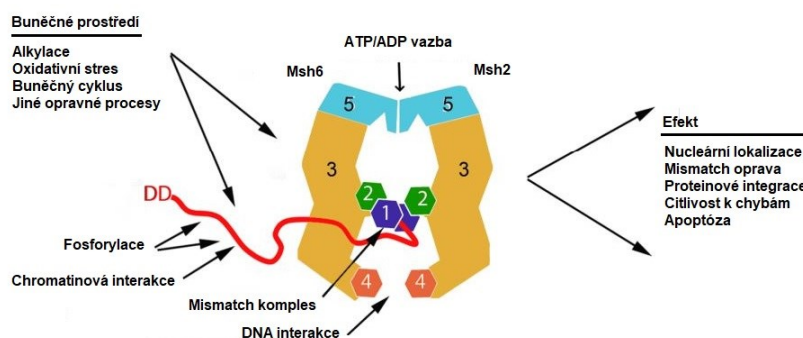
adeninu ani ekvivalentem sekvenčně specifické MutH endonukleázy. Eukaryotický MutS α je produktem dlouhého vývojového procesu způsobeného genovou duplikací a divergencí homodimerního MutS, jenž dal vzniknout dvou odlišným proteinům nezbytných pro iniciaci MMR, které bakteriální systém nepotřebuje. MSH2 a MSH6 sdílejí pět podobných domén s dostatečnými rozdíly, aby MSH6 mohl plnit odlišné funkce. MSH6 disponuje jedinečnou N- koncovou variabilní doménou, kterou postrádá MSH2. Lidský gen *MSH6* byl objeven v roce 1995 jako G/T mismatch vazebný protein (Constantin et al., 2005). Nedlouho poté byl objeven myši *Msh6* nacházející se na chromozomu 17 složený z 10 exonů s genomovou sekvencí o délce 16 kb produkující protein s molekulovou hmotností 160 kDa. V rámci 0,1 megabáze se ve stejném lokusu nachází druhý gen *Msh2* nezbytný pro stabilitu *Msh6*.



Obrázek 7. Schéma domén komplexu MutS α . Barevně jsou označeny jednotlivé domény lidských MSH2 a MSH6. N-koncová variabilní doména (červeně). Doména 1 se váže na místo mismatch (modře). Doména 2 (connector, zeleně) a doména 3 (lever, oranžově) jsou zodpovědné za stabilizaci komplexu. Doména 4 (clamp, červeně) dovoluje komplexi pohyb po DNA. Doména 4 (ATPase, světle modře) reaguje na ATP a mění konformaci proteinu do komplexu svorky (použito z Spies and Fishel, 2015).

Krystalografické studie dokazují, že všechny eukaryotické MutS α jsou si u různých druhů svou strukturou velmi podobné. Vysokou podobnost dokonce vykazují i s bakteriálním MutS, vyjma N-terminální oblasti MSH6. MSH2 a MSH6 proteiny jsou rozčleněny do pěti vysoce konzervovaných domén. Těchto pět domén je zodpovědných za finální strukturu komplexu připomínající svorku, kdy každá z domén představuje symetrický zrcadlový obraz každé protilehlé domény obou proteinů (viz obrázek 7) (Lamers et al., 2000). MutS α patří do skupiny ABC (z ang. ATP binding cassette) ATPáz regulující svou aktivitu v přítomnosti ATP. Po dimerizaci je komplex tvořený dvěma doménami ATPáz sloužící jako aktivní místa pro ATP. Za vazbu k DNA je zodpovědná svorková (ang. clamp) doména 4. Svorkové domény v dimeru vytvářejí smyčku (DNA helix) propojující pákové (ang. lever) domény. Msh6 N-terminální doména 1 se specificky váže na místa případného nesouladu (ang. mismatch) (Kaliyaperumal et al., 2011). Doména konektoru (ang. connector) je důležitá pro interakce

s proteinovým komplexem MutL α a domén zodpovědných za ATPázovou aktivitu. Na základě krystalografie, single-molekulární multiparametrové fluorescenční spektroskopie (z ang. single-molecule multiparameter fluorescence spectroscopy) a DNase footprintingových *in vitro* provedených studiích se ukazuje, že k navázání terminálního komplexu MutS α k místě nesouladu (ang. mismatch) je nutný heteroduplex DNA o minimální délce 60 párů bází. V případě přítomnosti komplexu MutL α v reakci až 143 párů bází, ačkoliv je vysoce pravděpodobné, že MutL α nikterak neinteraguje se samotnou strukturou DNA. Pro účinnou opravu nesouladu je potřebný molární poměr 4:1 (MutS α ku DNA). Některé studie uvádějí účinnost jednoho substrátu DNA a jedné molekuly MutS α (Edelbrock et al., 2013).



Obrázek 8. Schéma komplexu MutS α ve stavu posuvné svorky. Jednotlivé domény barevně i číselně odpovídají viz obrázek 7. Vlivem přítomné ATP dochází ke změně konformace proteinů Msh2 a Msh6 do podoby posuvné svorky. Systém se váže na DNA a vyhledává místa nesouladu. Pokud je DNA bez defektů, ATP je v doměně 5 spotřebováno na ADP a dochází k rozpadu struktury na jednotlivé proteiny (použito a upraveno z Spies and Fishel, 2015).

Během procesu rozpoznávání DNA defektů MutS prochází konformačními změnami, které jsou nezbytné pro správnou opravu. Tyto kroky vyžadují přítomnost ATP, jenž napomáhá dimerizaci ATPázových domén MSH2 a MSH6. V *in vitro* podmínkách dimery hydrolyzují ATP asymetricky, čímž je vytvořen ATPázový cyklus. Vazebná místa se liší vazebnou afinitou, kdy MSH2 má vyšší afinitu k ADP a MSH6 má vysokou afinitu k ATP ve stav nenavázaném k DNA pravděpodobně kvůli zvýšené dynamice MSH6 domény (Dufner et al., 2000). Jakmile je systémem nalezená neshoda, dochází k rychlé výměně ADP za ATP a hydrolýza ATP je potlačena. Pokud jsou obě vazebná místa obsazena ATP dojde v komplexu ke konformační změně připomínající tvar svorky (ang. clamp) (Antony et al., 2006). Ve stavu svorky je komplex schopen pohybovat se („klouzat“) po DNA, proto je tento stav znám pod názvem „posuvná svorka“ (z ang. sliding clamp). Pohyb svorky po DNA je možný právě díky konformační změně, kdy dimery jsou nakloněny proti sobě, kolem DNA vyváří volný kruh, kterým je DNA tlačena směrem dolů (Gorman et al., 2012). Pokud nedojde k nalezení nesouladu, ATP je

postupně uvolňováno, taktéž dochází k postupnému uvolňování struktury a svorka disociuje z vazby na DNA. Naopak pokud dojde k rozpoznání nesouladu, svorka zůstává připojena v tomto místě a interaguje s MuLS α a ostatními proteiny disponující endonukleázovou a exonukleázovou aktivitou nezbytnou pro opravu (Gueneau et al., 2013). Vazba komplexu MutS α na neshodný substrát reprezentovaný heteroduplexem DNA může být přerušena přebytkem ATP. U kvasinek je nutná vazba Msh6-ATP, aby došlo k vazbě Msh2-ATP opačně vazba Msh2-ATP není nutná pro vazbu Msh6-ATP. To naznačuje, že pro počáteční tvorbu komplexu je vyžadována alespoň vazba Msh6-ATP a možná Msh2-ATP (Monti et al., 2011). Přesný mechanismus vazby ATP a jeho hydrolýzy není znám, ale pravděpodobně je nezbytný pro provedení konformační změny formující svorku (Groothuizen a Sixma, 2016).

2.4.2 Role MutS α v meiotické rekombinaci

Pro správný průběh meiotické rekombinace je pro chromozomy podstatné najít svého homologního partnera. Je známo, že MMR komplexy jsou také aktivní v opravě nesprávného párování a defektního misalignmentu DNA vláken v průběhu meiotické rekombinace a zabraňují synapsi mezi neidentickými DNA sekvencemi (Jiricny, 2013). U kvasinek se podařilo prokázat, že pokud se v homologní sekvenci nachází jakýkoliv nesoulad, způsobený například záměnou jedné báze (SNP, single nucleotide polymorphism), jedno-nukleotidové delece či inzerce, může dojít k zastavení procesu rekombinace a tím i celé meiózy. Významnou úlohu při vzniku pohlavních haploidních buněk zastává zejména komplex MutS α tvořící dimer dvou proteinů MSH2-MSH6. Komplex MutS α je citlivý k těmto malým změnám v sekvenci DNA a jakkoliv není přesný mechanismus zamítnutí znám, předpokládá se, že funguje jako „strážce“ správného průběhu rekombinace před vznikem chiazmat. U některých kmenů bakterií a kvasinek mutace v *Msh2* zvyšuje množství rekombinace. Homologní rekombinace (HR) a mismatch oprava (MMR) jsou tedy spolu neoddělitelně svázány.

Procesy a funkce komplexu MutS α v meióze jsou nejlépe popsány na kvasinkovém modelu. Vysoce konzervativní charakter celého procesu nám dovoluje následující poznatky lze vztáhnout i na ostatní eukaryotické organismy. Významnou vlastností meiózy je rekombinace, která je iniciovaná vznikem programovaných a přísně regulovaných DSBs, jež jsou formovány v profázi I proteinem Spo11 (Bergerat et al., 1997; Murakami and Keeney, 2008; Sun et al., 1989). Meioticky specifická nukleáza Spo11 po vzniku DSBs zůstává kovalentně navázána na 5' konec každého vlákna. Od vláken DNA je pravděpodobně uvolněna během štěpení endonukleáz Mre11 nebo Sea2 následovanou exonukleázou Exo1. Exo1 svou aktivitou odštěpí

30-50 bp na na 5' konci vlákna čímž vznikne 3' převis (z ang. overhang) (Bergerat et al., 1997; Keeney and Kleckner, 1995; Zakharyevich et al., 2010). Proteiny Dmc1 a Rad51 patřící do rodiny RecA, se vážou na tento převis a katalyzují invazi vlákna do homologní dvouřetězcové DNA (dsDNA donorový templát), čímž dojde k formování D smyčky (z ang. D-loop). Zavedením druhého vlákna do templátové DNA je vytvořena struktura pojmenována podle svého objevitele jako Hollidayův spoj (z ang. Holliday junction, zkráceně HJ) (Allers and Lichten, 2001; McMahon et al., 2007). Komplex MutSα tvořený proteiny Msh2-Msh6 ve formě posuvné svorky skenuje DNA a hledá případné defekty. Pokud systém narazí na neopravnou část, zastaví celý proces rekombinace (Datta et al., 1996). V meióze se nejčastěji setkáváme s rekombinací homologní, některé DSBs však mohou být opravovány i za pomoci sesterské chromatidy. Nicméně převažuje homologní rekombinace, která vede buď k vzájemné výměně mezi chromozomovými rameny ohraničující DSBs (crossover zkráceně CO) nebo naopak k výměně dojít nemusí (non-crossover zkráceně NCO). Většina CO je formována přes dvojitý HJ meziprodukt, zatímco většina NCO je tvořena primárně na vzniklé HJ syntézou závislých na vláknech (z ang. Synthesis-dependent strand annealing, zkráceně SDSA) (Hunter, 2015). Laminární proteinová struktura synaptonemálního komplexu je zodpovědná za udržení homologních chromozomů v těsné blízkosti. Tyto události jsou zodpovědné za fyzické propojení mezi homology a jsou důležité pro tvorbu chiasmat, nezbytných pro napojení dělicího vřeténka zaručující správný průběh následné segregace homologních chromozomů v prvním meiotickém dělení. Absence těchto mechanismů vede k aneuploidii gamet, meiotické zástavě nebo k apoptóze buňky (Lam a Keeney, 2015).

Úlohou komplexu MutSα je najít chybu v sekvenci DNA v průběhu replikace, mitozy i meiózy. *In vitro* studie lidských HsMSH2-HsMH6 proteinů prokázaly schopnost v přítomnosti ATP změnit svou strukturu do podoby posuvné svorky. Po přidavku HsRPA nebo HsRAD51 rekombinázy odhalily překvapivou afinitu komplexu k meziproduktu DNA ve formě D smyčky, ve které se nacházela jakákoliv forma nesouladu párování. V kvasinkovém modelu se Msh2 a Msh6 váží na místo nesouladu párování v době, kdy se systém nachází v jednořetězcové formě. K procesu „zamítnutí“ (z ang. rejection) dochází pouze v přítomnosti helikázy Shs1. Podobně je tomu i v případě lidských helikáz, které interagují s komplexem MutSα. Posuvná svorka při pohybu po duplexní ssDNA může procházet strukturálními změnami v případě nalezení neshody, čímž znemožní navázání helikáz, které jsou zodpovědné za odvíjení DNA v D smyčce. D-smyčka pak pravděpodobně zůstává svázána a díky tomu je i znemožněna rekombinace (Honda et al., 2014; Spies and Fishel, 2015).

3 Cíle práce

Jakým způsobem ovlivní delece genu *Msh6* průběh samčí spermatogeneze

K tomuto účelu bude navrhnutá guide RNA pro CRISPR/cas9 pro přípravu delečních mutantů genu *Msh6*. Pro ověření nulového mutanta bude použito metod Sangerova sekvenování, genotypizace elektroforézou a Western blot. Následně u nich budou analyzovány parametry fertility, váha varlat a počet zralých spermií získaných z *epididymis*.

Jaký bude mít vliv vyřazení genu *Msh6* na počet crossoverů a dvouřetězcových zlomů v meióze u kmenů C57BL/6J a PWD/Ph

K tomuto účelu budou použiti případní deleční mutanti genu *Msh6*. U mutantů bude sledována profáze meiózy I za použití imunofluorescenčního značení meiotických proteinů. Důraz bude kladen na protein MLH1 specifický pro místa, kde dochází ke crossoverům a DMC1, který je specificky vázán v místě dvouřetězcových zlomů DNA před vznikem chiazmat.

Hlavním cílem celého projektu je vytvoření jednoduchých a dvojitých delečních mutantů genů *Msh2xMsh6* u kmenů C57BL/6J a PWD/Ph. U hybridních samců získaných z těchto mutantů existuje předpoklad obnovení jejich fertility, čímž by se podařilo překonat bariéru hybridní sterility a objasnit molekulární mechanismus poruchy párování meiotických chromozomů.

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Tabulka 1. Seznam používaných chemikálií.

Látka	Výrobce
2-merkapt ethanol	Sigma
Agaróza	Serva
Azidsodný	Sigma
Benzonáza	Sigma
Borát sodný	Serva
Ethanol	Merck
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma
Fenol	Serva
Glycin	Serva
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma
Chlorid sodný	Lachem
Chloroform	Lachem
Isopropanol	Merck
Kozí sérum(BSA)	EMD Millipore
Kyselina boritá	Lachema
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Serva
Kyselina chlorovodíková	Serva
Methanol	Serva
Mowiol (polyvinylalkohol)	Harco
Octan sodný	Sigma
Odtučněné mléko	SantaCruz
Orange G	Sigma
Orthovanadát sodný	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	ThermoFisher
Proteázové inhibitory	Roche
Sacharóza	Lachem
Tris (hydroxymetyl) aminometan (TRIS)	Serva
Tris (hydroxymetyl) aminometan (TRIS)	Serva
Triton X-100	Sigma
Trizol reagent (trireagens)	Sigma
Tween 20	Sigma
Xylen	Penta

4.1.1 Enzymy

Tabulka 2. Seznam použitých enzymů.

Látka	Výrobce
DNáza I	Roche
Proteináza K	Promega
Taq DNA polymeráza	ThermoFisher

4.1.2 PCR reagentie

Tabulka 2. Seznam použitých reagentů.

Reagentie	Výrobce
H ₂ O pro mol. biologii	Sigma
10xTaqBuffer bez KCL	ThermoFisher
dNTP 10mM	ThermoFisher
MgCl ₂ 25mM	ThermoFisher
Taq DNA polymeráza	ThermoFisher
Primery 100μM	Integrated DNA Technologies

4.1.3 Roztoky a pufrů

Tabulka 3. Seznam použitých roztoků a pufrů.

Látka	Množství
1% PFA-0,15% TX100-ph9	1ml
50mM NaBorát	900ml
32% PFA	34ml
10% triton X-100	15ml
Protein inib.	20ml
0,1 sacharóza	1ml
1M sacharózy	0,100
0,5xMAH-Binding pufr	50ml
1,5% BSA	0,75g
5% kozí serum	2,5g
0,05 Triton X-100	250 ul
10x Transfer pufr	4L
TRIS-base	121,1g
Glycin	576 g
ddH ₂ O	doplnit
1x Transfer pufr	1L
ddH ₂ O	700ml
10xTransfer pufr	100ml
Methanol	200ml
20xTBS 7,6 pH	4L
TRIS-base	193,6g
NaCl	640g
ddH ₂ O	doplnit
20xTBS-T	100ml
Tween 20	2ml
Stripping pufr	100ml
10% SDS	20ml
TRIS 0,5M 4pH	12,5
Merkaptoethanol	0,8ml
TBE pufr 7,6pH	1L

TRIS-base	108g
Kyselina boritá	55g
EDTA 0,5M	40ml
ddH ₂ O	doplnit
Orange-G pufr	50ml
Orange G	187mg
30% glycerol	40ml
ddH ₂ O	doplnit

4.1.4 Seznam komerčních kitů

Tabulka 4. Seznam použitých komerčních kitů

Kit	Firma
Puregene Core Kit	Qiagen
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
SuperSignal West Femto	ThermoFisher
WesternBright ECL	Advansta

4.1.5 Seznam primerů

Tabulka 5. Seznam použitých primerů pro genotypizaci

Název	Sekvence 5' k 3'	Délka [bp]	T _m [°C]
Msh6_F	TTGATGGCACCAGAGATTGA	691	60,2
Msh6_R	AGACTTGAGCTGCCACCACT	691	60,1
Msh6_R1	CTACACCCGGCAACATACCT	843	59,8
Msh6_F1	CTCATCCCTGGGGTACAAGA	843	59,9
Msh6_F3	GAAGAAGCACAGCCCAGTGT	178	60,4
Msh6_R3	CACTATCGCTGTCCCCAACT	178	60,1
Msh6_F4	GAAGAAGCACAGCCCAGTGT	483	60,4
Msh6_R4	TGGGGTTAAATTCAGGGTGA	483	60,1
Msh6_F5	GCAGGTGCATGAGGCTTATT	554	60,2
Msh6_R5	TGGGGTTAAATTCAGGGTGA	554	60,2
Msh2_F	AGAGGCGGTGAGGATAGTGA	421	59,8
Msh2_R	CCGCACGATACCTTCGTATT	421	60,0
Msh2_F1	AGAGGCGGTGAGGATAGTGA	607	59,8
Msh2_R1	CCTACAGCTAGCCACCAAGG	607	59,9

4.1.6 Seznam gRNA

Tabulka 6. Sekvence qRNA pro CRIPRS

Pozice v genomu	Cílová sekvence	gRNA sekvence
Msh6 exon 4	GCCGGCAAGTCAAGAAGCGA	GCCGGCAAGUCAAGAAGCGA
Msh6 exon 4	CTTTGGAGCGCCTTTGCCAA	CUUUGGAGCGCCUUUGCCAA
Msh2 exon 7	TAACCGGCTTGCCAAGAAAT	UAACCGGCUUGCCAAGAAAU
Msh2 exon 7	GAGACAAGCAGCGAATTTAC	GAGACAAGCAGCGAAUUUAC
Msh2 exon 7	AGACTGTTACCGACTGTATC	AGACUGUUACCGACUGUAUC

4.1.7 Primární protilátky

Tabulka 7. Seznam používaných primárních protilátek v imunofluorescenčním barvení.

Název protilátky	typ protilátky	sériové číslo	výrobce	ředění
myší α MLH1	monoklonální	ab14206	Abcam	1:30
králičí α SCP1	polyklonální	ab15087	Abcam	1:500
myší α SCP3	monoklonální	sc-74596	SantaCruz	1:100
králičí α HORMAD2	polyklonální	ab211	Attila Toth	1:700
králičí α H2AX	polyklonální	ab2893	Abcam	1:1000
lidská α CENtromera	autoimunitní sérum	inc-15-235	INC	1:200
králičí α Msh6	polyklonální	PA5-83010	ThermoFisher	1:250
myší α DMC1	monoklonální	ab11054	Abcam	1:200

4.1.8 Sekundární protilátky

Tabulka 8. Seznam použitých sekundárních protilátek.

Název protilátky	typ protilátky	sériové číslo	výrobce	ředění
anti-myší Alexa488	GaR kozí IgG	A-11005	ThermoFisher	1:500
anti-králičí Alexa568	GaR kozí IgG	A-11036	ThermoFisher	1:500
anti-lidská Alexa647	GaHu kotí IgG	A-21445	ThermoFisher	1:500

4.1.9 Biologický materiál

V pokusech byly použity laboratorní inbrední kmeny C57BL/6J jako zástupce podruhu *M.m.domesticus* pocházející z The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. PWD/Ph inbrední kmen zastupuje podruh *M.m. musculus* a byl připraven inbredizací z divokých myší odchycených v okolí Prahy.

4.2 Experimentální metodika

4.2.1 Design primerů pro genotypizaci a sekvenování

Pro design primerů byl použit volně dostupný webový program Primer3 verze 4.1.0. Ten volí vhodné primery na základě podobné teploty tání, zamezení tvorbě sekundárních produktů (primer dimer) a vlásenkových struktur. Jednotlivé délky výsledného produktu byly brány s ohledem na možnou přítomnost dlouhé delece. Sekvenční specifita byla ověřena pomocí In-silico PCR ve webovém genomovém prohlížeči UCSC. Koncentrace zásobních primerů byla nařaděna na 100 μ M.

4.2.2 Návrh guide RNA CRISPR/Cas9

Pro návrh guideRNA (zkráceně gRNA) CRISPR/Cas9 bylo využito volně dostupných webových utilit CHOPCHOPv2 a CCTop. Oba programy jsou postaveny na algoritmu dynamického programování, jehož výstupem jsou sekvence s nejvyšší pravděpodobnosti účinnosti střihu CRISPRu v hledaném místě a nejnižší mírou případných nechtěných střihů náhodně v genomu (angl. off-targets). Protospacer adjacent motif (PAM) sekvence bezprostředně zodpovědná za interakci s DNA byla zvolena běžně používaná 5'-NGG-3' pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*. Pro účinné vyřazení cíleného genu bylo v případě *Msh6* využito dvou rozdílných gRNA u *Msh2* celkem tří gRNA mířících do jednoho zvoleného exonu s dostatečným rozestupem střihu pro vytvoření delší delece. Tímto způsobem se výrazně zvyšuje pravděpodobnost zachování delece při opravě mechanismem nehomologní rekombinace (z ang. non-homologous end joining, zkráceně NHEJ). Delší delece je zároveň jednodušeji detekovatelná při následné genotypizaci. Syntéza gRNA byla provedena firmou Synthego společně s crRNA a tracrRNA. Design byl konzultován s Petrem Kašpárkem, který sídlí na oddělení transgenní jednotky a s návrhem má letité zkušenosti.

4.2.3 Vytvoření delečních mutantů

Čestně prohlašuji, že v době pokusů bylo se zvířaty zacházeno v souladu s § 15d odstavce 2 písmeno a) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Pro vytvoření delečního mutantu byla navázána spolupráce s transgenní jednotkou oddělení CPP. Během pokusů bylo využíváno systému CRISPR/Cas9 s aplikací metody elektroporace zygot a vejcovodu. U kmene C57BL/6 byly samice (8 – 10 týdnů) pomocí hormonů indukovány k super ovulaci, poté jsou samice připuštěny k samci (12 – 24 týdnů). Pro potvrzení páření se na druhý den zkontroluje přítomnost vaginální zátky. Samice s vaginální zátkou jsou uspány, za užití

disekčních nástrojů je otevřena peritoneální dutina, za účelem odebrání vejcovodů. Do zygot, získaných z vejcovodů, je prostřednictvím elektroporace vpraven Cas9 protein společně s guide RNA. Embrya jsou následně přenesena do pseudopregnantní náhradní samice (Wang et al., 2017). V případě kmene PWD/Ph mimo metody elektroporace zygot byla provedena elektroporace ovárií. Samice PWD/Ph (10-14 týdnů) jsou připuštěny k samci (12 – 24 týdnů). Po 1,5 dni od potvrzení pregnancy jsou samice uspány a chirurgicky odkryta ovária. Do vejcovodu je za pomoci elektroporace vnesen protein Cas9 dohromady s guideRNA. Tkáně jsou vráceny do původní pozice a samice je zašita. CRISPR/cas9 je po translaci importován do jádra, kde vytváří dvouřetězcové zlomy v místech navržené gRNA (Takahashi et al., 2015). Zlomy mohou být opravené homologní nebo nehomologní rekombinací. Výsledkem opravy může dojít buďto ke krátkým či dlouhým delecím nebo inzercím. Tímto způsobem je zaručen přenos mutace přímo do germinální linie. Získané myši prochází řadou genotypování a křížení za účelem získání homozygotní linie.

4.2.4 *Izolace celkové DNA NaOH metodou*

Pro PCR reakci a následnou genotypizaci provedenou na agarózovém gelu není potřeba čistá DNA. Materiál určený pro izolaci hrubého extraktu DNA sloužil malý kousek ocásku (cca 10mm), ten byl za použití pitevních nůžek rozstříhnut na dvě poloviny. Jedna z polovina byla zamrazena na -20 °C pro případnou izolaci čisté DNA. Druhá polovina ocásku byla vložena do mikrozkušavky s 600 µL 50 mM NaOH. Mikrozkušavka byla přenesena do pícky nastavené na 95 °C do rozpadu tkáně. Během procesu rozpadu byl roztok s ocáskem náhodně protřepáván. Rozpad tkáně je dokončen zhruba po 1,5 hodinách. Pro zchlazení roztoku byla mikrozkušavka přenesena na led. Po vychladnutí bylo pro úpravu pH použito 50 µL 1M TRIS-HCl pH 8. Pro sedimentaci zbylých částí (kosti, zbytky tkáně) byl vzorek stočen po dobu 6,5 minut v centrifuze nastavené na plný výkon. Izolovaná DNA byla skladována v lednici po dobu maximálně dvou týdnů. Do mastermixu bylo používáno 2 µL vzorku odebraného ze středu mikrozkušavky pro zamezení zanesení zbylých částí tkáni, jenž by výrazně snižovaly efektivitu PCR reakce.

4.2.5 *Izolace čisté DNA pomocí Puregene Core Kit A firmy Qiagen*

Izolace čisté DNA byla provedena výhradně u myši, které sloužili pro založení linie (z ang. founders). Jako materiál pro izolaci sloužil kousek ocásku, pokud u myši probíhala pitva, pak slezina. Čerstvý nebo zmražený ocásek (nebo slezina) byl rozstříhnut na délku 5 mm vložen do mikrozkušavky s 300 µL lyzačního pufru (Lysis Solution buffer). Pro rozpadnutí tkáně byla

do roztoku přidány 3 μL proteázy K, mikrozkušavka byla přenesena do pícky nastavené na 55 $^{\circ}\text{C}$ a za stálého otáčení inkubována přes noc. Po úplném rozpadu tkáně byl do vzorku přidán precipitační pufr (Precipitation Solution buffer) a důkladně zvortexován po dobu 20 sekund. Po vortexování byl vzorek stočen po dobu 3 minut při maximálním výkonu centrifugy. Ze vzorku byl pečlivě odpipetován supernatant (tak aby bylo zamezeno nasátí precipitujících proteinů). Supernatant byl přesunut do nové čisté mikrozkušavky s 300 μL isopropanolu, promíchání probíhalo jemným otáčením. Vzorek byl znovu centrifugován pro vytvoření pelety DNA, která se usadí na dně, supernatant byl odlit a vzorek byl obrácený ponechán na ubrousku z důvodu vysušení zbylého isopropanolu. Po vysušení byl do vzorku přidán 70% ethanol v množství 300 μL a pro pročištění DNA byla mikrozkušavka opět lehce obrácena. Následovala centrifugace po dobu 1 min pro usazení pelety. Obsah mikrozkušavky byl opatrně zbaven ethanolu a následně ponechán ve flow boxu k odpaření přebytečného ethanolu, který by mohl inhibovat PCR reakci. Pro rozpuštění pelety bylo do mikrozkušavky přidáno 100 μL molekulární čisté vody (molecular grade water). Vzorek byl vložen do lednice a na druhý den byla změřena koncentrace DNA. Pro PCR reakci byla DNA naředěna na koncentraci 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Uchovávaní bylo zajištěno v mrazáku při -20°C .

4.2.6 *Izolace PCR produktů pomocí MinElute Gel Extraction Kit firmy Qiagen*

Po PCR reakci byly vzorky rozděleny pomocí ELFO na 2 % agarosovém gelu. Extrakce produktů složila k Sangerovo sekvenování pro zjištění případné delecce. Pruhy DNA byly pod UV světlem opatrně vyříznuty z gelu (tak aby nedošlo k vyříznutí přebytečného množství gelu). Gel s pruhy obsahující PCR produkt byl vložen do mikrozkušavky a zvážen. Ideální váha výřezu se pohybuje kolem 100 mg. K vzorku bylo přidáno trojnásobné množství QC pufru, mikrozkušavka byla přesunuta na třepačku nastavenou na 50 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. Po 10 minutách došlo k úplnému rozpuštění gelu, následně byla zkontrolována barva mixu, které by měla být žlutá z důvodu optimálního pH. Za účelem precipitace DNA produktu byl do mixu přidán 100% isopropanol v poměru 1:1 k hmotnosti gelu. Vzorek byl přepipetován do izolační kolonky (MinElute column) umístěné v 2 ml mikrozkušavce. Pro usazení DNA na fritě kolonky byl vzorek centrifugován po dobu 1 minuty na maximální výkon. Přebytečný mix v mikrozkušavce byl vylit, pro úplné usazení DNA k fritě byl do kolonky opětovně napipetováno 500 μL QC pufru. Po odstranění QC pufru bylo do kolonky přidáno 750 μL PE pufru (s přidáním 100% ethanolu) a kolona byla ponechána stát po dobu 2 minut. Po uplynutí 2 minut byl vzorek znovu 2x stočen po dobu 1 minuty. Kolona byla přesunuta do 1,5 ml čisté

mikrozkumavky, pro eluci bylo využito 20 μL molekulární čisté vody (molecular degree water), tak aby celá fritka byla rovnoměrně vlhká. Vzorek byl naposledy stočen po dobu 1 minuty.

4.2.7 Genotypizace na agarózovém gelu

PCR mix byl rozpipetován v závislosti použitých primerů (viz tabulka 10 a 11) v reakce podle protokolu (viz tabulka 12 a 13). Jednotlivé koncentrace jsou uvedeny pro jednu reakci. Celkový objem reakce představoval 20 μL po přidání 2 μL nebo 1 μL DNA izolované NaOH metodou. U vzorků určených pro sekvenaci byla použita čistá DNA ve výchozí koncentraci 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Protokol PCR reakce se lišil v závislosti na použitých primerech. Primery Msh2+Msh6 FR, F1R1 sloužili pro detekci přítomné delece. Primery F3R3 až F6R6 byly navrženy za účelem potvrzení homozygotní delece obou alel. Reverse primer nasedal do místa delece, případný homozygot nedisponoval žádným bandem. Po PCR reakci byly jednotlivé vzorky s přidáním 3 μL Orange-G pufru napipetovány do jamek 2% agarózového gelu v 0,5x TBE. Do gelu pro zobrazení bandů bylo přidáno 0,1 μL na 1 ml ethidium bromidu. ELFO byla ponechána v chodu při 190V 85A dokud nedošlo k dostatečnému rozdělení bandů. V reakci byla přítomna pozitivní kontrola (wt/wt DNA, wt/- DNA, -/- DNA) a negativní kontrola obsahující vodu pro identifikaci možné cross-kontaminace. Bandy byly zobrazeny pod UV transiluminátorem a nafoceny. Pokud byly vzorky určeny k sekvenování, jednotlivé pruhy byly za použití skalpelu vyřezány a vloženy do mikrozkumavky pro následnou izolaci.

Tabulka 10. PCR mix pro různé primery

	1x	c
Primery Msh2+Msh6 RF, R1F1		
18 μl PCR MIX + 2 μl DNA		
2% agarose gel		
objem reakce 20 μl		
TK H ₂ O	13,75	
dNTP (10 mM)	0,40	0.2 mM
primers R+F (10 μM)	0,50	0.25 μM
10x Taq buffer KCl bez MgCl ₂	2,00	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,20	1.5 mM
Taq pol (comm) Thermo Scientific 500U	0,15	0,15 U
DNA	2,00	

Tabulka 11. PCR mix pro různé primery

Primery Msh6 F3R3 až F6R6
 19 μl PCR MIX + 1 μl DNA
 2% agarose gel

objem reakce 20 μ l	1x	c
TK H ₂ O	13,95	
dNTP (10 mM)	0,40	0.2 mM
primers R+F (10 μ M)	0,50	0.25 μ M
10x Taq buffer KCl bez MgCl ₂	2,00	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,00	2.5 mM
Taq pol (comm) Thermo Scientific 500U	0,15	0,15 U
DNA	1,00	

Tabulka 12. PCR protokol pro primery Msh2xMsh6 RF, R1F1

c. opakováno 32x		
cyklus	teplota	Čas
1.	95°C	5:00
2.c	95°C	0:30
3.c	60°C	0:30
4.c	72°C	1:00
5.	72°C	5:00
6.	8°C	∞

Tabulka 13. PCR protokol pro primery Msh6 F3R3 až F6R6

c. opakováno 34x		
cyklus	teplota	čas
1.	95°C	5:00
2.c	95°C	0:30
3.c	58°C	0:30
4.c	72°C	1:00
5.	72°C	5:00
6.	8°C	∞

4.2.8 Sangerovo sekvenování

Sekvenování složilo k identifikaci delece vyřazených sledovaných genů. DNA z myšního ocásku/sleziny byla izolována s použitím Puregene Core Kitu. Po izolaci byla změřena koncentrace vzorku a naředěná na 30ng/ μ L. Následně byla provedena PCR. Na 2% agarózovém gelu při 190V/80A byla provedena ELFO. Po rozdělení bandů bylo pod UV transiluminátorem vyříznuty jednotlivé bandy. Izolace z gelu byla provedena s použitím MinElute Gel Extraction Kitu. Následně byla změřena koncentrace izolátu. Poté byly vzorky rozpipetovány po 5 μ L do

stripů, do kterých bylo zvlášť přidán 5 μM forward a reverse primeru s konečnou koncentrací 25 pmol. Vzorky byly odeslány do servisního pracoviště SeQme. Po obdržení výsledků byly jednotlivé sekvence porovnávány s pozitivní kontrolou (myš divokého typu) a UCSC sekvencí odpovídající délce primerů. Vyhodnocení probíhalo za pomoci volně dostupného programu BioEdit a NCBI blastu.

4.2.9 Správa myší

Chov myší je zajištěn servisním pracovištěm České centrum pro fenogenomiku (CPP) Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Biocevu. Myši jsou chovány bariérově, aby bylo zamezeno vnesení možného patogenu. O myši je pečováno v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Pomocí programu PyRAT Animal Facility Software udělují požadavky (odběr tkáně, usmrcení, připuštění ke křížení, ukončení křížení atd) na personál zodpovědný za chov.

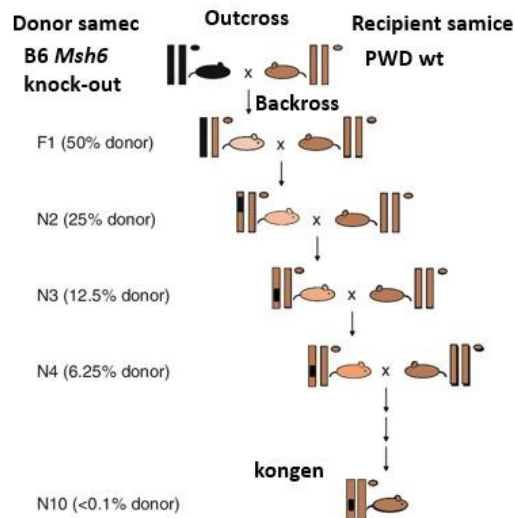
4.2.10 Průběh pitvy

Čestně prohlašuji, že v průběhů pokusů bylo se zvířaty zacházeno v souladu s § 15d odstavce 2 písmeno a) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Myš byla usmrcena dislokací krčních obratlů. Každá myš byla zvážena, váha byla zaznamenána do tabulky. Myši, byla pomocí nůžek otevřená břišní dutina, odebrány *testes*, které byly očištěny od zbývající tkáně a zváženy. Za účelem přípravy imunocytologického preparátu, byla jednomu z *testis* odstraněna tunika a přemístěna do mikrozskumavky s RPMI médiem. Pro přípravu histologických preparátů bylo použito druhé *testis*, které bylo ponecháno v nativní formě a vloženo do 4% para-formaldehydu pH7,3 v 1x PBS. Pro zjištění počtu zralých spermií byly odebrány *epididymis*, následně přesunuty do 1x PBS. Pro pitvu byly používány 9- 11 týdnů stará zvířata.

4.2.11 Zpětné křížení

Křížením samice kmene PWD/Ph (zkráceně PWD) se samcem kmene C57BL/6 (zkráceně B6) získáme sterilní hybridní samce, samice však zůstávají fertlní a umožňují zpětné křížení (backcross). Zpětné křížení bylo zahájeno outcrossem samce B6 s homozygotní delecí genu *Msh6* (dárce mutované alely B6.*Msh6*^{-/-}) se samicí PWD. Takto bylo získáno F1 (BC1) hybridní potomstvo. Heterozygotní samice nesoucí mutovanou alelu genu *Msh6* byla připuštěna s PWD samcem divokého typu, čímž bylo nastaveno zpětné křížení. U samic F2 generace bylo provedeno genotypování pro nalezení heterozygotní formy vyřazeného genu *Msh6*. Všechny

následující generace byly podrobené stejnému šetření. Postupným křížením je přenášena část genetického pozadí recipienta. V páté generaci zpětného křížení (N5) nesou potomci 96,9% genomu recipienta, pouze 3,1% dárce mutované alely a jsou považováni za částečně kongenní (ang. sub-congenic). Od desáté generace je již genom protomků tvořen více než 99,91% recipienta a jsou považováni za zcela kongenní. (viz obrázek 9).

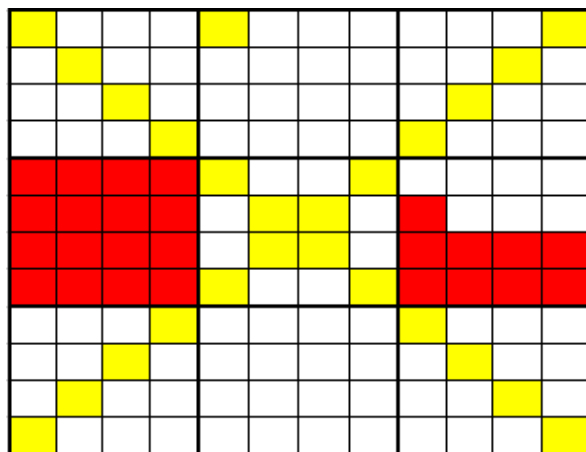


Obrázek 9. Schéma zpětného křížení. Homozygotní B6 samec s delecí genu *Msh6* slouží jako donor dané alely samice PWD je jejím recipientem. Postupným zpětným dochází k přenosu genetického pozadí dárce alely. Zlomový bod nastává ve čtvrté generaci, kdy již zůstává jen 6,25% genomu dárce a myš je považována za částečně kongenní. V desáté generaci je genom donora zúžen na oblast obklopující darovanou alelu a myš je považována za kongenní (použito a upraveno z (Jagodic a Stridh, 2016)).

4.2.12 Stanovení počtu spermií

Obě *epididymis* byly umístěny do mikrozkuřavky s 1ml 1x PSB. Pro narušení struktury a uvolnění spermií byl preparát důkladně rozstříhán a protřepán. Vzorek se nechal na ledu ustát po dobu 1 minuty, pro opadnutí horní tukové vrstvy. Ze středu byl odebrán alikvot sloužící k naředění suspenze se spermiemi. Ředění bylo odhadováno na základě váhy testes (váha testes pozitivně koreluje s množstvím zralých spermií), u zcela fertálních jedinců bylo používáno ředění v rozmezí 1:50 nebo 1:100. U jedinců s třetinovou váhou testes od fertálního jedince bylo ředění 1:20 nebo 1:30. Z naředěného vzorku bylo odebráno 10 μ L, nanášeno do Bürkerovy komůrky a přikryto krycím sklíčkem. Komůrka je rozdělena do celkem 144 čtverců (12x12) výšce 0,1 mm. Důvodem protřepání může dojít u spermií k oddělení hlavičky od ocásku, pokud byla taková spermie přítomna, započítala se pouze hlavička. Počítání čtverců probíhalo podle schématu (viz obrázek 10), kdy postupně byly spočítány spermie v diagonálech s přičtením jednoho náhodného čtverce (12+12+1). Dalších 25 čtverců bylo zvoleno ve středu komůrky. Takto bylo pokračováno i v druhé komůrce. Aby bylo zamezeno započítání jedné spermie

dvakrát, v malém čtverci byla započítána spermie zasahující do levé a spodní hrany. Spermie byla započítána, pokud do hrany zasahovala její hlavička. Výsledek byl zprůměrován, čímž celková koncentrace spermií v jednom ml byla vypočítána násobkem ředění, průměrného počtu spermií v 25 čtvercích a násobkem 10^4 (počet spermií v 1ml = ředění x průměr v 25 čtvercích X 10^4).



Obrázek 10. Schéma počítání spermií v Bürkerově komůrce.

4.2.13 Příprava imunocytologických preparátů

S materiálem se vždy pracuje na ledu. *Testes* byly zbaveny tuniky vloženy do zkumavky společně s 1 ml v lednici vychlazeného RPMI médiem a za účelem uvolnění spermií z tubulů byl vzorek v ruce důkladně protřepán po dobu 3 minut. Následně byl vzorek centrifugován 1 minutu při 2000 rpm. Poté bylo původní RPMI vyměněno za 1 ml čerstvého média. Pro důkladné rozrušení biologického materiálu bylo využito intenzivního stříhání pomocí pitevnických nůžek a pipetou nasáván obsah mikrozkušavky opakovaně dovnitř a ven. Pro odstranění shluků zbylé tkáně bylo použito 40 μ M síta, skrze nějž byl obsah přepipetován do nové mikrozkušavky. Ze vzorku byl odebrán alikvot o objemu 100 μ L, buněčná suspenze byla 3 minuty stočena při 1500 rpm. Po dokončení centrifugace byl odpipetován supernatant, kdy ve zkumavce se ponechalo zhruba 10 μ L. Ve zbytku média byla peleta re-suspendována přidáním 150 μ L 0,1 sacharózy obsahující proteázové inhibitory a EDTA. Jemné promíchání bylo provedeno obracením mixu v ruce. Buněčná suspenze byla ponechána na ledu po dobu 13 minut. Z důvodu hypotonického prostředí (0,1 sacharóza) v mixu dochází k lýze buněk. Tento krok je velice důležitý pro následné dobře oddělení chromozomů, stejně tak, aby nebyly příliš daleko od sebe. 13 minut je optimální doba, kterou není radno měnit. Na předem vychlazená podložní sklíčka bylo nakapáno 150 μ L 1% PFA s přidáním proteinových inhibitorů. Proteinové inhibitory jsou do roztoku vždy dodávány v době použití. Na podložní

skla byla nakapána buněčná suspenze z výšky 5-10 cm, aby došlo k dostatečnému oddělení buněk a narušení buněčné membrány. Sklíčka byla vložena do plastového boxu (krabička od špiček) s vodou, aby nedošlo k jejich vysušení a přesunuta do lednice, kde byla ponechána po dobu 3 hodin. Následně byla skla umytá lehkým proudem destilované vody a ponechána stát cca 15 minut pro jejich vysušení. Skla byla poté v kyvetě 2x promyta ve vychlazeném 1x PBS po dobu 10 minut. Pro blokaci bylo na jedno sklo nakapáno a rozprostřeno 70 μ L 0,5x MAH pufru. Skla byla vložena do krabičky, přikryta krycím sklíčkem a inkubována po dobu 4 hodin v lednici. Po čtyřech hodinách bylo krycí sklíčko šetrně odstraněno, tak aby nedošlo k narušení fixovaných buněk, následně bylo na každé sklo aplikována primární protilátka rozpuštěná v předem připraveném 0,5x MAH pufru. Inkubace opět probíhala v plastovém boxu v lednici v tomto případě přes noc. Na druhý den bylo odstraněno krycí sklíčko, skla byla promyta v 1x PBS celkově 3x po dobu 5 minut. Následně byla na skla aplikována sekundární protilátka rozpuštěná opět v 0,5x MAH pufru, přikryta krycím sklíčkem a ponechána v lednici po dobu 2-3 hodin. Pro zbaví se nespecificky vázané sekundární protilátky byla skla promyta v 1x PBS po dobu 5 minut následně opláchnuta lehkým proudem destilované vody. Skla byla nechána vyschnout po dobu více než 15 minut poté na každé ze skel byla aplikována jedna kapka fixačního média s DAPI (Vestashield mounting medium H1200 with DAPI), přikryta krycím sklíčkem a následně použita pro pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu značky Nikon.

4.2.14 Způsob odečítání imunofluorescenčních preparátů

Příprava imunofluorescenčních preparátů probíhala podle předchozí kapitoly. Pro každé ze skel bylo využito různých meiotických markerů za účelem sledování jednotlivých událostí v meiotické profázi I. Každé z jader bylo vybíráno a foceno náhodně pro zamezení zanesení stochastické chyby ve statistice. Vyhodnocení bylo prováděno vizuálně pomocí programu NIS-Elements (<https://www.nis-elements.cz/>). Všechny preparáty pocházely z myši 9-11 týdnů starých. Sledování bylo prováděno u kmene B6.Msh6^{-/-} s vyřazeným genem *Msh6* a kontrolou B6.

Pro identifikaci rekombinačních událostí byl využit marker MLH1 v kombinaci SCP1 a HumanCEN (viz tabulka 7). MLH1 se specificky váže do míst probíhajících crossoverů (zkráceně CO). SCP1 je jeden z proteinů centrálního elementu synaptonemálního komplexu. Ve fázi pachytene je již zcela formovaný a slouží k identifikaci chromozomových bivalentů. Pro

stanovení počtu MLH1 (CO) bylo použito minimálně 50 pachytenních jader pro každý vzorek zastupující jedince.

Pro vizualizaci DNA DSBs byly použity protilátky v kombinaci DMC1+SCP3+H1t (viz tabulka 7). DMC1 je přítomný v místech 3 jednovlaknových DNA úseků meziprojektu opravy dvouřetězcových zlomů (DBSs). SCP3 je součástí axiálního, později laterálního elementu synaptonemálního komplexu a je viditelný během všech fází profáze I. Strukturovaný jej můžeme vidět v zygotene a pachytene, kdy kopíruje homologně spárované chromozomy. Barvení protilátkou H1t histonu 1t sloužilo k přesnému rozlišení fáze středního pachytene, kdy všechny DBSs by měly být již zcela opraveny. Počty DBSs zobrazených jako DMC1 spoty byly stanoveny ve fázích leptotene, zygotene a pachytene. Zastoupení jader v jednotlivých fázích odpovídalo množství, jež se podařilo nálezt.

Vizualizace HORMAD2 byla použita v kombinaci s protilátkami HORMAD2+SCP3+HnCEN (viz tabulka 7). HORMAD2 protein je viditelný napříč všemi fázemi profáze I v místech, kde dochází k asynapsím chromozomů. Počet asynapsí byl zjišťován u nejméně 50 jader nacházejících se ve fázi pachytene.

Imunobarvení γ H2AX bylo použito společně s protilátkou SCP3 (viz tabulka 7). γ H2AX je fosforylovaná forma varianty (serine 139) histonu H2A – typický marker DSBs v meioze i mitotických buňkách. V meioze je zodpovědný za účinnou opravu dvouřetězcových zlomů (DSBs). Silně exprimován je zejména v pozdní fázi leptotene a během celé fáze zygotene, kde dochází právě k tvorbě DBSs. Ve fázi pachytene obklopuje nespárované pohlavní chromozomy XY.

4.2.15 Příprava histologických preparátů

Pro přípravu histologických preparátů bylo využito *testis* samců kmene C57BL/6J a samců stejného kmene s vyřazeným genem *Msh6*. Po pitvě, byly *testis* přesunuty do roztoku 4% p-formaldehydu v 1x PBS v pH 7,3. Fixace probíhala v lednici po dobu jednoho dne. Odvodňování tkáně bylo prováděno přes noc v servisní histologické laboratoři ÚMG podle protokolu (viz tabulka 14). Jednotlivá *testis* byla následně zalita parafínem do plastových bločků umístěných na chladicí desce s teplotou -16 °C. Po zaschnutí parafínu byl bloček vložen do mikrotomu. Přebytečný okolní parafín byl odřezán na velikost zapuštěné tkáně, následně bylo provedeno hrubé okrajování mikrotomem v režimu TRIM. Po naražení na tkáň byl mikrotom nastaven na režim SECT pro nakrájení tkáně na požadovanou tloušťku (standardně 2 μ m). Po nakrájení byly řezy přesunuty do vodní lázně s teplotou 38-39 °C, kde byly roztáhnuty a

naneseny na označená podložní sklíčka. Podložní skla s tkání byla přenesena na okraj vyhřáté vodní lázně. Barvení skel bylo prováděno pomocí automatu Leica TS5020 a Leica CV5030. Zhotovené preparáty na podložních sklíčkách byly vloženy do košíku označeným barevným čipem podle požadovaného typu barvení. Košík byl vložen do vstupního zásobního barvicího zařízení. Skla byla barvena hematoxylin-eosin a imunofluorescenčně protilátkami MSH6 a SCP3 (viz tabulka 7). Nanesení primárních a sekundárních protilátek probíhal stejně jako v případě přípravy imunofluorescenčních spredů (viz kapitola 4.2.13). Pro deparafinizace a rehydratace bylo použito pracovního postupu (viz tabulky 14, 15 a 16). Pro odkrytí antigenů byl prováděn na pozitivně nabitých sklech-superfrostoch. Jedna sada skel byla po deparafinizaci přenesena do nádoby obsahující citrátový pufru o pH6 a pH9 a následně byly přeneseny do přístroje pro revitalizaci antigenů při teplotě 95 °C. Druhá sada skel byla ponechána bez revitalizace. Po vychladnutí skel na pokojovou teploty byly skla vložena do 1x PBS. Imunofluorescenční barvení bylo provedeno z důvodu ověření knock outu genu *Msh6*.

Tabulka 14. Protokol procesu dehydratace tkáně.

Chemikálie	Čas
4% formaline ^{2,3} 15	min
70% Ethanol	1 h
100% Ethanol	1 h
100% Ethanol	1 h
100% Ethanol	1 h
50% Ethanol/50% Isopropanol	1 h
50% Ethanol/50% Isopropanol	1 h
xylene	1 h
xylene	1 h
xylene	1 h
parafín	1 h 30 min
parafín	2 h
parafín	2 h

Tabulka 15. Protokol pro barvení hematoxylin-eosin.

Chemikálie	Čas
zapékání	15 min
xylén	5 min
xylén	3 min
isopropanol	3 min
isopropanol/ethanol absolute (1:1)	3 min
ethanol absolute	3 min
ethanol 96%	3 min
ethanol 70%	3 min
voda	45 s

hematoxylin	1 min
voda	2 min
eosin	1 min
voda	1 s
ethanol 70%	1 min
ethanol 96%	2 min
ethanol absolute	2 min
isopropanol/ethanol absolute (1:1)	2 min
isopropanol	2 min
xylén	3 min
xylén	5 min
montovací médium Pertex	

Tabulka 16. Příprava skel pro odkrytí antigenu

Chemikálie	Čas
zapékání	15 min
xylén	5 min
xylén	3 min
isopropanol	3 min
isopropanol/ethanol absolute (1:1)	3 min
ethanol absolute	3 min
ethanol 96%	3 min
ethanol 70%	3 min
voda	45 s
1x PBS	

4.2.16 Western blot

Western blot byl prováděn pro ověření vyřazení genu *Msh6* na úrovni proteinu. Pokus byl prováděn u dvou myších linií kmene C57BL/6J s rozdílnou délkou delece v genu *Msh6* společně s kontrolou divokého typu. V prvním případě jako materiál sloužily tři tkáně – testes, ledviny a slezina. V druhém případě bylo použito testes a mozek. Podle expresní databáze MGI by mělo ve všech orgánech docházet k expresi proteinu MSH6. Po odebrání tkáně byly všechny orgány přendány do mikrozkušavky a vhozeny do tekutého dusíku pro zachování stability proteinu. Následně z tkání bylo odebráno množství odpovídající zhruba 5 mg, které bylo přeneseno do mikrocentrifugační zkušavky s kulatým dnem s 200 µL lyzačního pufru Qiagen P1 s přísávkem proteinových inhibitorů, Na₃VO₄ sloužící jako ATPázový inhibitor a benzonázou pro odstranění přítomných DNA a RNA s konečným ředěním 1:1000. Do každé zkušavky byla vhozena kovová kulička, následně byla přenesena do homogenizátoru TissueLyser II, pomocí jehož byla získána suspenze. Do zkušavky bylo přidáno 200 µL dodecylsírany sodného (SDS) poté byla suspenze vařena na 95 °C po dobu 10 minut. Po vaření byla provedena 5 minutová centrifugace na maximální výkon. Z mixu bylo odebráno 350 µL

proteinového extraktu, peleta byla uschována do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mrazáku pro případné další použití. Pro změření koncentrace proteinů bylo do stripů rozpipetováno $100\text{ }\mu\text{L}$ Pierce BCA Protein Assay kitu s přídavkem $2,5\text{ }\mu\text{L}$ extraktu, následně byly stripy přesunuty do inkubátoru s $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly ponechány na 30 minut. Měření bylo prováděno v triplicátech, výsledná koncentrace byla stanovena mediánem. Pro vytvoření standardní křivky byla použita ředící řada BSA. Pro nanesení vzorků na gel byl po naředění proteinů na koncentraci 20 ng a 40 ng přidán vzorkový pufr s 10 % merkaptoethanolem. Vzorky byly inkubovány po dobu 5ti minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rozdělení proteinu na gelu s running puffrem bylo provedeno při 85V po dobu 1,5 hodiny. Pro aktivaci membrány byl použit methanol následně byla omyta destilovanou vodou a vložena do 1x transferového pufru. Přenos na membránu probíhal při 24V 800mA po dobu 2 hodin. Následně byla membrána promyta destilovanou vodou 5 minut ponechá v Ponceau S červenou barvičkou, pro ověření úspěšného přenosu. Po vyfocení membrány byla barvička vymyta v 1x TBS pufru s přídavkem 0,1 % tween 20 (zkráceně TBS- T). Blokace membrány byla provedena v 5% odtučněného sušeného mléka po dobu 30min za stálého protřepávání. Následně byla membrána 2x promyta v 1x TBS-T po dobu 20 minut. Poté byla aplikována primární MSH6 protilátka uchovávaná v 1x TBS-T s 3% BSA a 0,01% azidem sodným v konečné koncentraci 1:5000. Membrána byla za stálého třepání inkubována společně s primární protilátkou přes noc v lednici. Na druhý den byla membrána 3x promyta v 1x TBS-T po dobu 10 minut. Poté byla aplikována sekundární protilátka (anti mouse horse radish peroxidase antibody) v konečné koncentraci 1:20 000 rozpuštěná v TBS-T s 5% mlékem. Následovalo opětovné promytí v 1x TBS-T a 1x PBS. Pro zobrazení proteinů v trans-iluminátoru bylo použito WesternBright ECL kitu od firmy advansta obsahující ECL buffer (luminol/enhancer solution) a stabilizační roztok pro peroxidázu, které byly smíchány v poměru 1:1. Pokud byl nedostatečný signál membrána byla znovu promyta v 1x TBS-T a následně bylo využito kitu West femto obsahující West femto pufr a peroxidázu, jenž byly opět smíchány v poměru 1:1. Po vyfocení byla membrána dále použita pro ověření správného naložování mixu s proteiny o dané koncentraci. Membrána byla v přítomnosti stripping pufru zbavena navázaných protilátek následně několikrát promyta a znovu blokována 5% mlékem. Následovala aplikace primárních protilátek SKP1 a beta aktinu s konečnou koncentrací 1:10 000 s inkubací probíhající přes noc. Poté byly aplikovány sekundární protilátky o koncentraci 1:7500. Postup zobrazení odpovídal předešlému postupu. Pro případné další použití byla membrána uchována v 1x PBS s 0,01% azidem.

4.2.17 Statistické metody

Statistické šetření bylo prováděno u parametrů fertility samců (váha testes, počet zralých spermíí) a imunocytologických preparátů značených specifickým markerem (viz kapitola 4.2.13) z dat získaných dle (viz kapitola 4.2.14), se zaměřením na množství MLH1 a DMC1 spotů na jedno jádro, jako průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou. Pro analýzu bylo využito programu R ve verzi 4.0.3 se sadou základních balíčků v kombinaci s programem Prism Graphpad verze 8 pro vytvoření grafů.

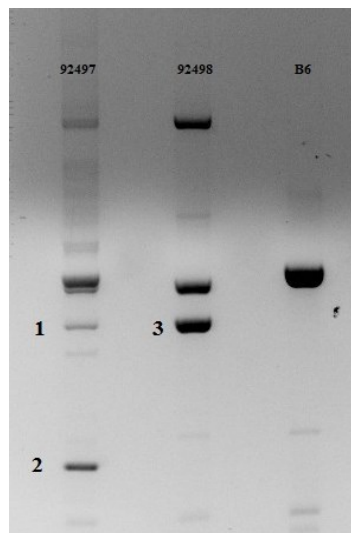
Na získaných datech byly nejprve provedeny testy normality v závislosti na velikosti nasbíraných dat (Shapirův-Wilkův, Andersonův-Darlingův, Kolmogorovův-Smirnovův). Statistická metoda byla provedena, pokud test normality prošel hodnotou $\alpha < 0,5$.

U porovnávání 2 skupin jednoho ze sledovaných znaků použit klasický nepárový t-test. K porovnávání více skupin pro jeden sledovaný znak byla provedena jednocestná ANOVA s Dunnettovým srovnávacím testem skupin vůči kontrole. Statistická významnost byla stanovena pokud hodnota $*P < 0,05$, $**P < 0,001$ a vysoce signifikantní $***P < 0,0001$, $****P < 0,00001$.

5 Výsledky

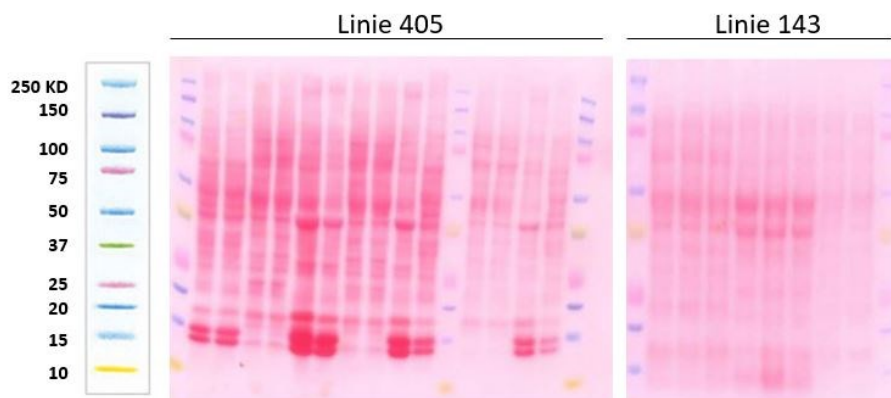
5.1 Vytvoření nulových mutantů genů *Msh2-Msh6*

Základním cílem projektu bylo získat nulové mutanty genů *Msh2* a *Msh6* u kmenů C57BL/6J (zkráceně B6) a PWD/Ph (zkráceně PWD). Po první provedené elektroporaci kmene B s příslušnými gRNA a CRIPS/cas9 protein se však rodila mrtvá mláďata. Domnívali jsme se, že příčinou může být krátká vzdálenost obou genů (chromozomy se nacházejí na stejném chromozomu 17 ve vzdálenosti menší než 0,1 mega báze), kdy v jednotlivých embryonálních buňkách pravděpodobně dochází k silným defektům, které procesem rekombinace nemohou nebo nemusí být opraveny správně. Z toho důvodu musel být změněn přístup. Proto bylo rozhodnuto vytvořit mutanta jednoho z genu, konkrétně *Msh6*, jehož mutace dosud nebyla publikována. Takový mutant by byl tedy „originální“ nejenom za účelem studia vlivu na správný průběh myši samčí spermatogeneze. Homozygotní myši s delecí v genu *Msh6* budou použity pro získání dvojného knock-outu *Msh6*, *Msh2*. Další problém nastal s kmenem PWD/Ph, který pocházel s divokých myši *M.m. musculus*. Tento kmen je svou biologickou podstatou jedinečný, metodika pro vytvoření knock-outovaných zvířat není doposud optimalizována. Vzhledem k opakovaným nezdarům připravit CRISPR/Cas9 knockout na PWD pozadí bylo započato zpětné křížení za účelem přenesení mutace genu *Msh6* z kmene C57BL/6J do genomu PWD/Ph (viz kapitola 4.2.9).

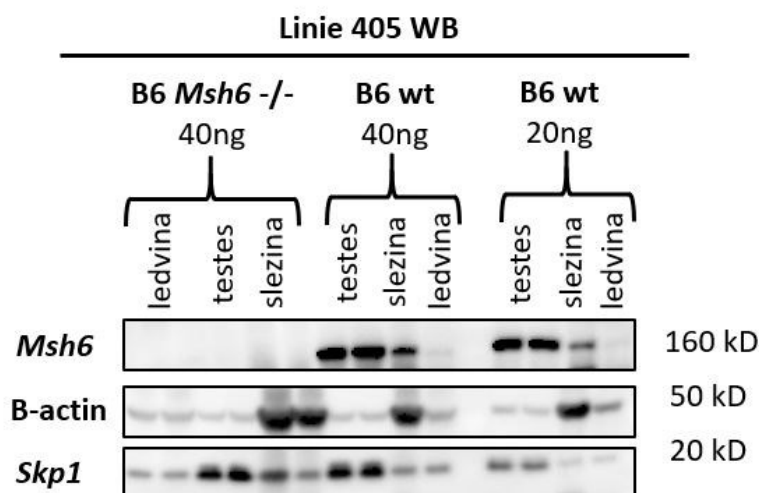


Obrázek 11. Elektroforéza na agarózovém gelu myši, pro založení homozygotní deleční linie. Pomocí elektroforézy se podařilo detekovat dlouhé delece u potomků získaných po elektroporaci CRISPR/Cas9. Bandy 1,2 3 byly vyříznuty a sekvenovány. (1) band s delecí délky 139 bp. (2) band s delecí 405 bp. (3) band s delecí 143 bp. Čísla označují ID myši.

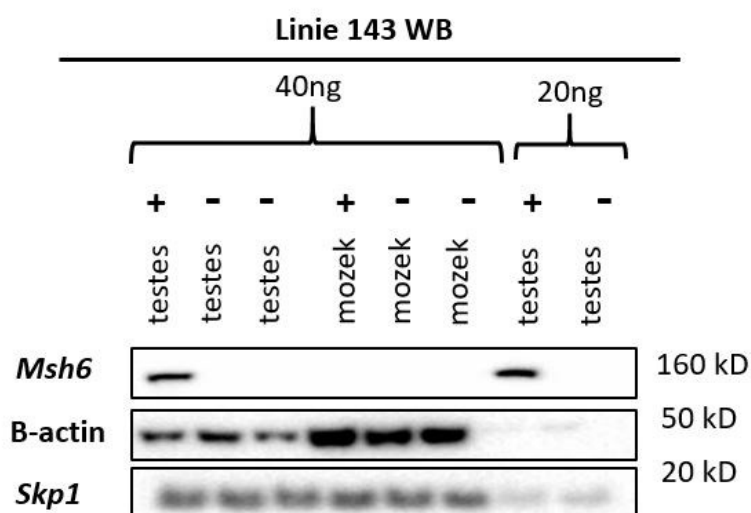
Po pokusech s CRISPR mířeným proti genu *Msh6* se podařilo získat deset B6. *Msh6*^{+/-} potomků. Dvě myši po genotypování na 2% agarózovém gelu vykazovaly přítomnost dlouhých delecí v heterozygotní formě (viz obrázek 11). Sangerovo sekvenování prokázalo přítomnost tří dlouhých delecí konkrétně 405 bp, 143 bp a 139 bp. Za pomoci volně dostupného webového programu ExPASy bylo zjištěno, že dvě kratší delece způsobují posun čtecího rámce, nejdelší delece pak nezpůsobuje delecí narušující čtecí rámec. Postupným křížením se podařilo oddělit všechny delece do tří samostatných linií, jež byly pojmenovány dle délky delece 405, 143 a 139. První homozygotní samec byl získán ve třetí generaci linie 405 (F3). Tento samec byl ihned připuštěn se samicí PWD/Ph pro zahájení zpětného křížení. V současné době se nacházíme v generaci N6, kdy je již mutace přenesena na pozadí s 98,4% PWD genomu. V desáté generaci mohou být zvířata brána za kongení (viz kapitola 4.2.9). Procentuální zastoupení genotypu vychází ze statistiky zpětného křížení, pro ověření proto bude v budoucnu použito metody GIGA-MUGA array, která na mikročipu obsahuje desetitisíce markerů pro určení pravého genotypu. Homozygotní linie se procesem křížení a řady genotypování podařilo nastolit v liniích s delecí 143 a 405 v páté generaci (F5). Linie 139 neprodukovala dostatečné množství potomku a ve čtvrté generaci (F4) byla ztracena. Pro ověření opravdového vyřazení genu *Msh6* a zamezení jeho translace do proteinu byl využit Western blot.



Obrázek 12. Barvení membrány pomocí Ponceau S. Ponceau S barvení slouží ke zviditelní proteinů na membráně po přenosu z gelu po elektroforéze. Přenos je považován za zdařilý z důvodu přítomnosti červených pruhů zastupujících jednotlivé proteiny obsažených v různých tkáních.



Obrázek 13. Výsledný western blot linie 405. Pro WB bylo využito několik kontrolních tkání u knock-outu myši genu *Msh6* nedocházelo k expresi daného proteinu v žádné tkáni. Actin a SKP1 sloužil jako kontrola správné koncentrace proteinu. Z výsledků je patrné, že v jednotlivých tkáních dochází k rozdílné expresi kontrolních proteinů.



Obrázek 14. Výsledný western blot linie 143. (+) znázorňuje wild type kontrolu (-) znázorňuje knock-out genu *Msh6*. Z výsledné membrány je patrné, že nedocházelo k expresi proteinu v testes u myši s vyřazeným genem. V mozku, který měl sloužit jako kontrolní orgán nebyl protein detekován v obou případech. Actin s Sp1 sloužící jako kontrola nanesení správné koncentrace proteinů prokázala v případě SKP1 rovnoměrnou expresi v obou tkáních.

S využitím MGI myší databáze byly vybrány tkáně, v nichž dochází k expresi proteinu MSH6, sloužící jako kontrola vůči studované tkáni (*testes*). Výsledný western blotu potvrdil, že u dvou linií 143 a 405 nedocházelo k expresi proteinu MSH6 ve sledovaných tkáních (viz obrázky 13 a 14). U linie 143, kde jako kontrolní orgán sloužil mozek, nebyl protein detekován ani v případě kontrolního samce. Důvodem může být stáří myši (10 týdnů). MSH6 protein je exprimován zejména u mláďat s doposud ne zcela vyvinutou centrální nervovou soustavou. Ponceau S barvení potvrdilo úspěšný přenos proteinů na membránu (viz obrázek 12).

Pro ověření nanesení správného množství proteinu na gel, byly vybrány kontrolní proteiny SKP1 a β -actin, u kterých by mělo docházet ke stejné expresi ve všech tkání. Podařilo se prokázat, že SKP1 kináza je v jednotlivých orgánech exprimována konzervativněji, než v případě β -actinu.

V současně době se intenzivně pracuje na přípravě *Msh2xMsh6* dvojného nulového mutantu v kmeni C57BL/6J. Homozygotní samci z linie 405 B6.*Mshh6*^{-/-} byly zkříženi se samicemi B6 divokého typu, a zygoty byly elektroporovány CRISPR/Cas9 společně s gRNA pro vyřazení genu *Msh2*. Existuje předpoklad, že tento způsob by měl zabránit opětovnému rození mrtvých mláďat jako tomu bylo v případě pokusů vytvořit dvojného mutantu přímo v první generaci. Zároveň je tímto způsobem možné získat případné vyřazené alely odděleně, což by dovoľovalo sledovat efekt jednotlivých alel zvlášť.

5.2 Fenotyp základních parametrů fertility delečních linií genu *Msh6* a kontrol

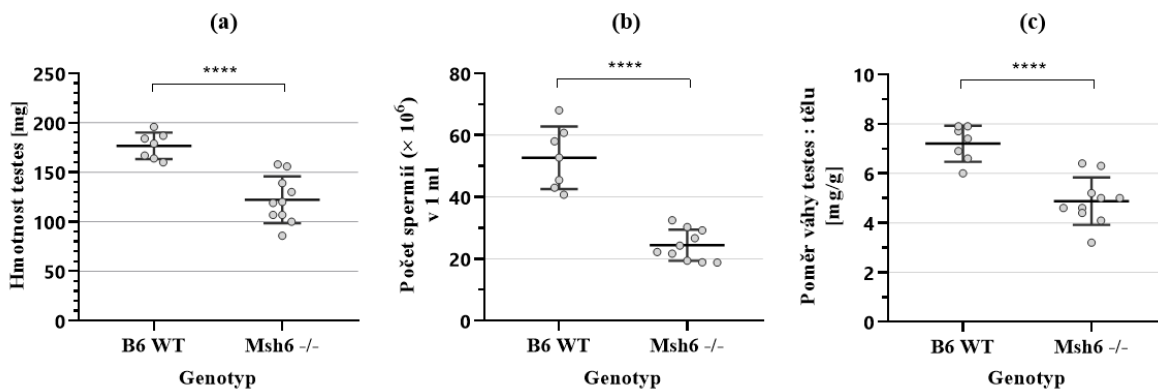
Pro hodnocení parametrů fertility byla sledována váha obou *testes*, relativní váha *testes* (poměr hmotnosti *testes* k k tělu) a počet zralých spermií získaných z *epididymis*. Taktéž bylo vyhodnoceno, zdali dochází ke korelaci váhy *testes* a počtu spermií. Spermie byly počítané s použitím Bürkerovy komůrky. Pokusy byly prováděny u samců kmene B6. Celkem bylo použito patnáct myší, 10 B6.*Mshh6*^{-/-} nesoucí knock-out pro gen *Msh6* linie 405 a šest myší s divokým genotypem sloužící jako kontrola. Všechny použité myši byly ve stáří 9-11 týdnů (viz příloha, tabulka 16).

Získaná data byla prověřena Kolmogorov–Smirnov testem, ten potvrdil normální Gaussovo rozdělení. Díky zjištění normálního rozdělení byl použit pro všechny kategorie stanovené fertility klasický t-test. Pro zjištění korelace váhy *testes* k počtu spermií byl použit Pearsonův korelační test. Z důvodu nízkého zastoupení dat, pro interpretaci korelace bude použito R^2 , které udává, do jaké míry spolu jednotlivé znaky souvisejí. Pro zamezení případného vlivu fitness myši na sledované znaky (obecně větší samec může disponovat vyšší váhou *testes* a tím i vyšším množstvím spermií) byla stanovena relativní váha *testes* poměrem váhy *testes* k váze těla.

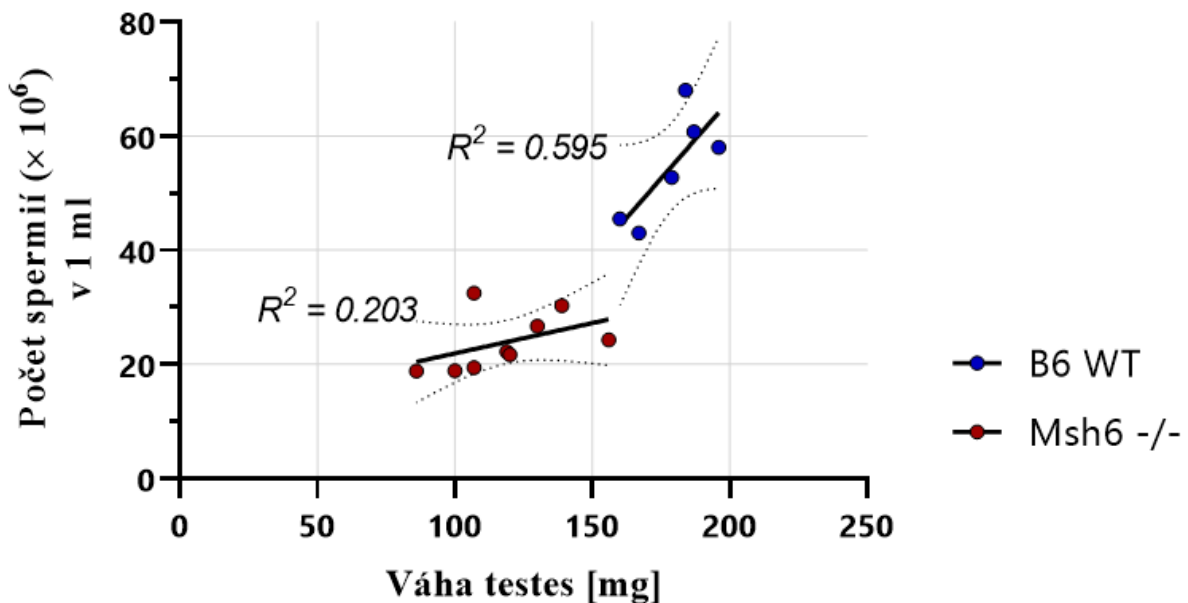
Porovnání základních parametrů fertility skupin samců B6.*Mshh6*^{-/-} z linie 405 a kontrolní skupiny B6 s použitím klasického nepárového t-testu, odhalilo vysoce signifikantně nižší váhu *testes* a počet zralých spermií u samců 405 B6.*Mshh6*^{-/-} (**** p < 0,00001 (t-test)). Poměr váhy *testes* a těla vykazoval taktéž vysokou míru statistické významnosti (****

$p < 0,00001$ (t-test)), vliv fitness sledovaných skupin samců na ostatní znaky můžeme (do jisté míry) považovat za bezvýznamný (viz graf 1).

Zajímavé bylo sledovat korelaci mezi váhou testes a počtem spermií. V případě kontrol B6 docházelo dle očekávání k pozitivní korelaci ($R^2=0,595$), tedy větší váha testes vede k vyššímu množství spermií. U myši s vyřazeným genem *Msh6* byla míra variability daleko nižší ($R^2=0,203$), což nasvědčuje, že ani výrazně větší váha testes nedokáže zabezpečit značně vyšší počet zralých spermií a indikuje postmeiotický efekt *Msh6* mutace na tento fenotyp (viz graf 2).



Graf 1. Statistické vyhodnocení mezi skupinou samců s delecí genu *Msh6* a kontrolních myši divokého typu kmenu C57BL/6J. (a) váha testes sledovaných skupin B6 wt (průměr 176,7, SD 13,16), Msh6 -/- (průměr 122,2, SD 13,36). (b) počet zralých spermií v milionech v 1ml skupin B6 wt (průměr 52,68, SD 10,13), Msh6 -/- (průměr 24,41, SD 5,03). (c) poměr váhy testes:tělo u skupin B6 wt (průměr 7,20, SD 0,72), Msh6 -/- (průměr 4,88, SD 0,98). (** $p < 0,00001$ (t-test)).**



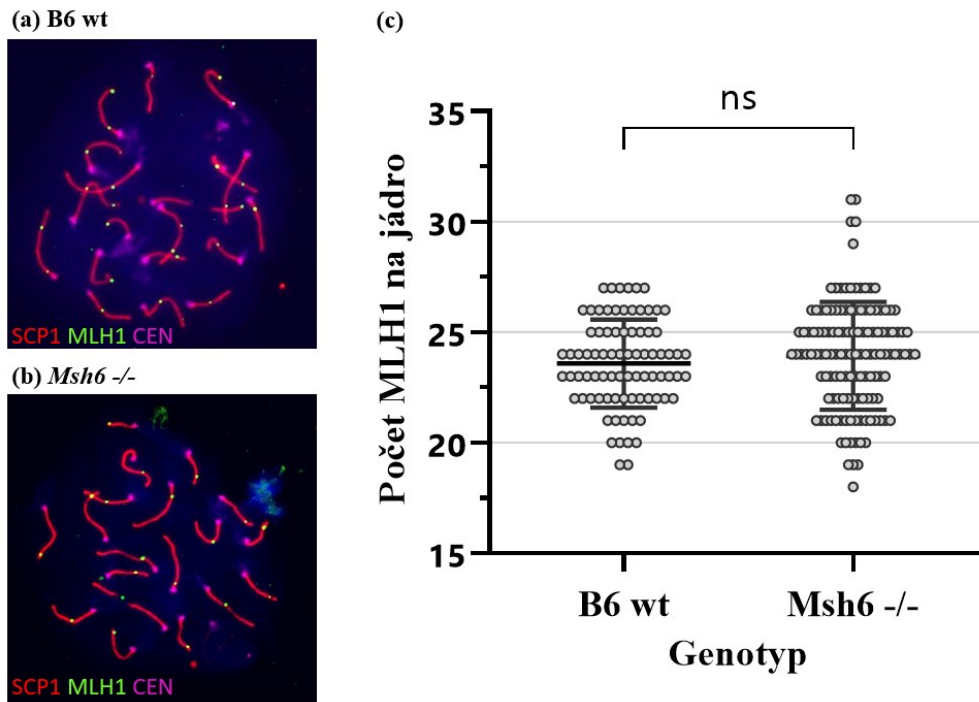
Graf 2. Míra variability mezi hmotnostmi testes a počtem spermií u deleční linie a kontroly divokého typu. Červeně jsou značeni deleční mutanti genu *Msh6*. Modře kontrolní samci. Pomocí Pearsonova testu byla stanovena míra variability. Mutanti vykazovali hodnotu $R^2=0,203$ dokazující nízkou závislost

váhy testes na celkový počet spermií. V případě kontrol hodnota činila $R^2=0,595$ což dokazuje výraznou spojitost obou znaků.

5.2.1 Studie fenotypu meiotické profáze I pomocí imunofluorescenční značení

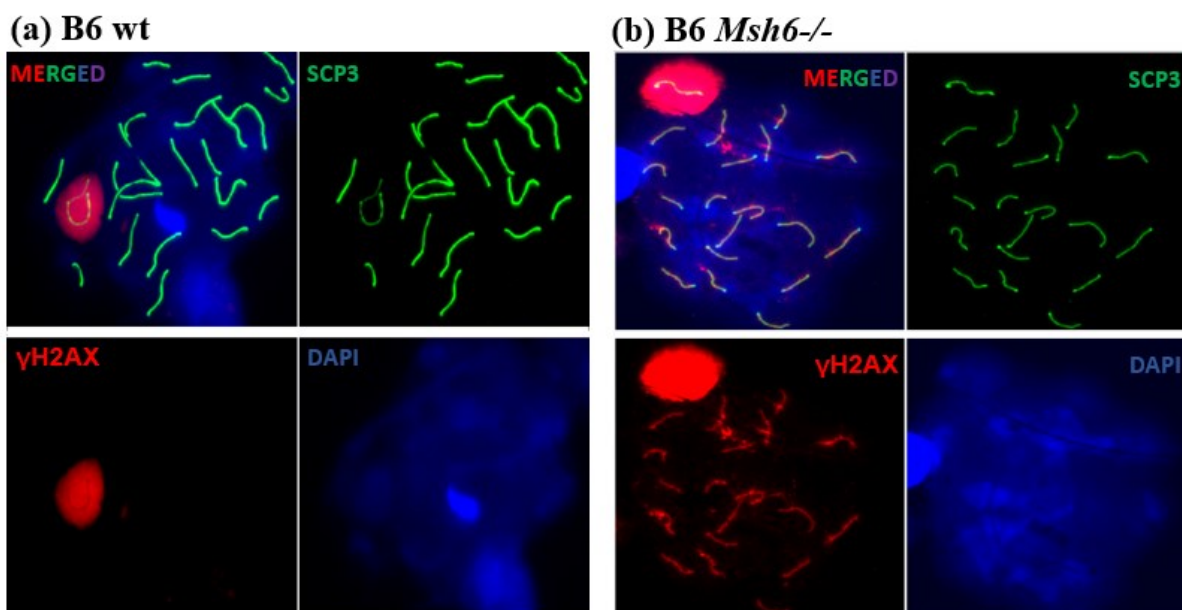
Připravené meiotické preparáty (viz kapitola 4.2.13) sloužily pro studium jednotlivých fází profáze I. Každé se skel bylo inkubované se sadou různě kombinovaných protilátek. V pokusech bylo využito celkem třech samců pro každou kombinaci použitých protilátek. Dva samci zastupovali delečního mutanta genu *Msh6* linie 405 B6.*Mshh6*^{-/-} a jeden samec B6 sloužil jako kontrola s normální alelou *Msh6*. Myši v době pokusů byly ve věku 11 týdnů. V případě barvení DMC1 byl použit jeden kontrolní samec B6 a po jednom samci s delecí genu *Msh6* *-/-* s linie 405 a 143. Samec linie 143 v době pokusu dosahoval věku 14 týdnů, z toho důvodu jsou data interpretována zvlášť, ačkoliv se jedná o nositele nulové alely jako v případě samce linie 405.

Kombinace protilátek MLH1+SCP1+HumanCEN sloužila k identifikaci probíhajících crossoverů. Do těchto míst se specificky váže protein MLH1. SCP1 je jeden z proteinů synaptonemálního komplexu viditelný ve fázi pachytene. Protilátka získaná z autoimunitního lidského séra je vázaná do místa centromer. MLH1 je fluorescenčním značením přítomný ve formě tečky (spotu) v místech probíhající rekombinace chromozomů. Označení centromer je důležité pro ověření správného počtu spárovaných homologních chromozomů v buňce a tím zamezení chyby při vyhodnocování počtu jednotlivých spotů. Data byla šetřena Kolmogorov–Smirnov testem pro ověření jejich normálního rozdělení. Pro zjištění míry signifikance byl použit klasický t-testu. V mezidruhových hybridech kvasinek proteiny Msh6 společně s Msh2 omezují rekombinace (CO) v případě neshody v obou řetězcích. V tomto pokusu bylo cílem ověřit, zdali vyřazení genu *Msh6* ovlivní frekvenci CO i myši s identickým genetickým pozadí kmenu B6. Pomocí klasického t-testu se podařilo zjistit mírný nárůst CO v případě myši B6.*Mshh6*^{-/-}, rozdíl však není signifikantní (viz obrázek 15).



Obrázek 15. Průměrný počet crossoverů na jádro buňky v období pachytene. (a) preparát s imunofluorescenčním značením linie B6.*Msh6*^{nu1}. (b) preparát s imunofluorescenčním značením kontroly B6 WT. SPC1 (červené čáry), MLH1 (zelené tečky), CENtromera (fialové tečky na konci chromozomu), DAPI (modré jádro). Každé tečka zastupuje ohnisko místa probíhajícího crossoverů (c) graf průměrného počtu crossoverů na jádro buňky u dvou sledovaných skupin. U samců myši B6 *Msh6*^{-/-} dochází k většímu počtu rekombinačních událostí (průměr 23,93, SD 2,44) než v případě B6 wt (průměr 23,59, SD 1,99), rozdíl však není signifikantní ($p = 0,2799$).

Dalším sledovaným znakem byla prezenze neopravených dvouřetězcových zlomů (DBSs). Tvorba DBSs v chromatinu iniciuje fosforylaci histonového proteinu H2AX na γ H2AX. Oblasti chromatinu, u kterých dochází ke tvorbě zlomů, nebo kde nedošlo k jejich opravě, mohou být fluorescenčně značeny protilátkou anti- γ H2AX v kombinaci se SCP3. Pozorování bylo především zaměřeno na pachytenní buňky, jež prošly procesem oprav, a proto by zde neměl existovat žádný γ H2AX signál, až na pohlavní chromozomy XY. Takto tomu bylo v případě B6 kontrol. Daleko zajímavějšího zjištění bylo docíleno sledováním delečních mutantů *Msh6*, u kterých byl zaznamenán signál γ H2AX i u sady autozomů. Signál, vystupující kolem spárovaných autozomálních chromozomů připomínající krátké štětinky, jsme pracovně nazvali „chlupaté chromozomy“ (ang. hairy chromosomes). Chlupaté chromozomy byly detekovány v některých buňkách obou B6.*Msh6*^{-/-} samců (viz obrázek 16). Pokus sloužil jako pilotní experiment, jenž naznačil možnost existence neopravených DBSs zlomů v době pachytene, pro následné ověření a možnosti interpretace byla používána jiná sada meiotických markerů.

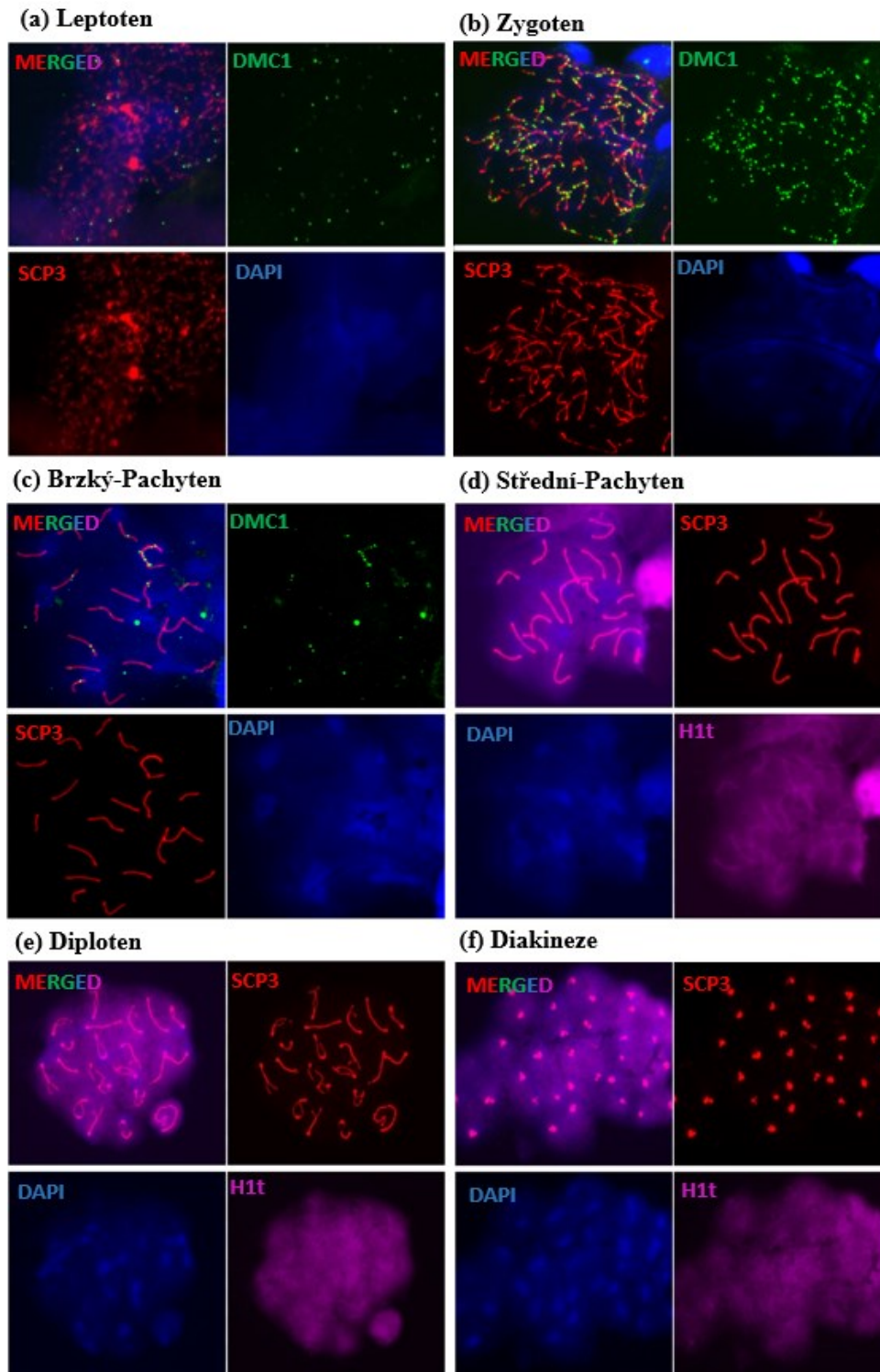


Obrázek 16. *Imunofluorescenční barvení samčí myši meiózy, reprezentované fázi pachytene. SCP3 (zeleně), yH2AX (červeně), DAPI (modře). (a) kontrolní samec B6 divokého typu vykazuje signál yH2AX pouze kolem spárovaných pohlavních chromozomů XY, kde nedochází k opravě dvouřetězcových zlomů. (b) linie B6.Msh6^{mut}, signál yH2AX je detekovatelný kolem pohlavních chromozomů XY, včetně všech autozomálních chromozomů.*

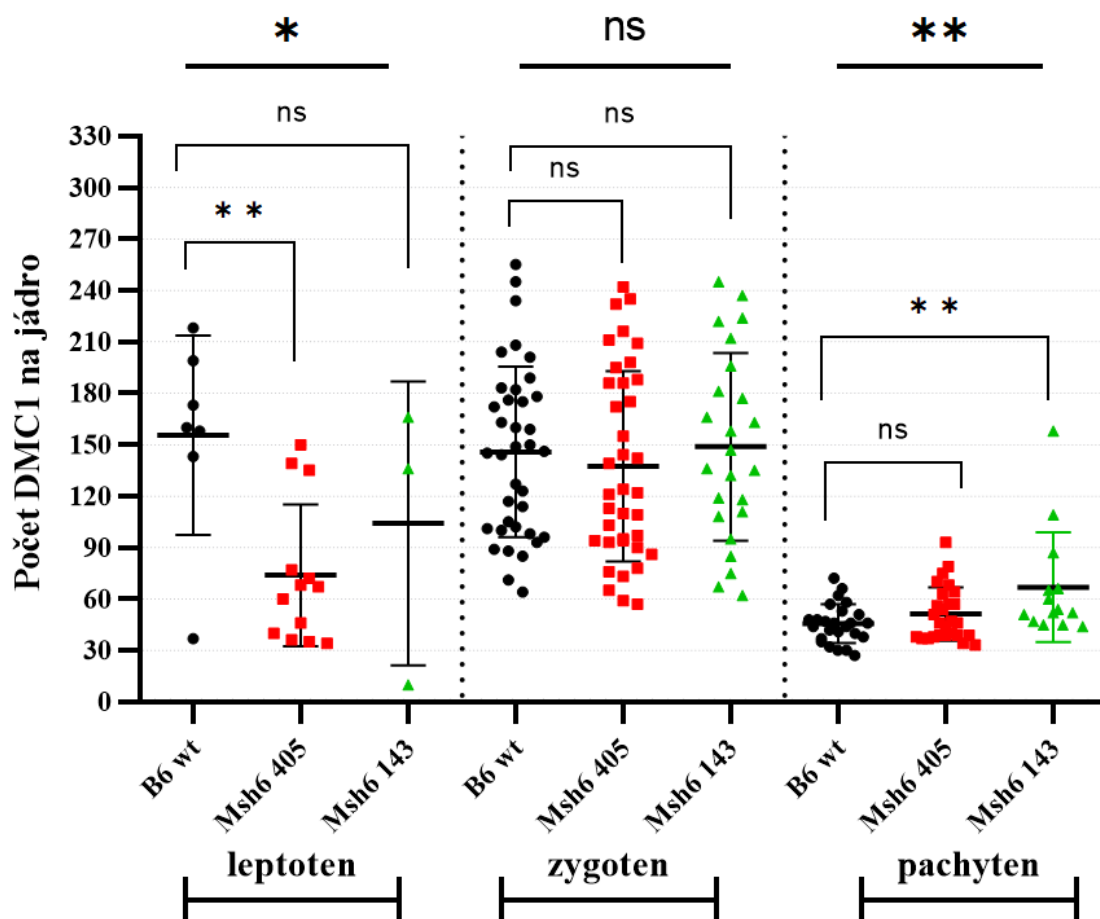
Kombinace protilátek DMC1+SCP3+H1t byla použita za účelem detekce počtu dvouřetězcových zlomů během profáze I. DMC1 se váže na 3' jednovláknovou DNA v místech procesovaných DBSs. Zde zůstává až do doby, než dojde k jejich úplnému opravení. K úplné synapsy chromozomů dochází v brzkém pachytenu, proces opravy je ukončen v období středního pachytenu. SCP3 je jeden ze zástupců synaptonemálních proteinů. Strukturovaný začíná být od zygotenu, největší intenzity nabývá v pachytenu, kde tvoří spolu s koheziny laterální elementy formovaného synaptonemálního komplexu. Počítány byly DMC1 spoty, tedy místa, kde dochází k vyšší koncentraci proteinu v místech indukovaných DBSs přes fáze leptoten, zygoten, brzký a střední pachytenu. Zvlášť byly počítány spoty na pohlavních chromozomech XY v brzkém pachytenu, do statistiky byly započítány společně se spoty nacházejících se na autozomech. Histonový protein H1t je specificky exprimován ve středním a pozdním pachytenu a podílí se na restrukturalizaci relaxovaného chromatinu, čímž chromozomům napomáhá regulovat proces homologní rekombinace. V době středního pachytenu jsou již chromozomy zcela spárované, DBSs jsou již opraveny, signál DMC1 mizí stejně tak jako v následujících fázích diplotene a diakinezi již není viditelný. DMC1 signál ve formě spotů je možné poprvé zaznamenat ve fázi pozdního leptotene, kde dochází k iniciaci tvorby DBSs iniciovaných topoizomerázou SPO11. Nejvyšší množství DMC1 spotů je viditelné ve fázi zygotene, nejméně v brzkého pachytenu. H1t imunofluorescenčního značení

umožňuje rozlišit fáze brzkého a středního pachytenu (viz obrázek 17). Protein MSH6 je v meiotické rekombinaci zapojený do procesu oprav DBSs, kde vyhledává případné neshody v sekvenci homologních chromozomů. Jeho vyřazení by mohlo narušit průběh opravy DBSs a tím i jejich četnost ve sledovaných fázích.

Ze sledovaných skupin B6 wt, *Msh6*^{-/-} linie 405 a 143 byl zaznamenáván počet DMC1 spotů na jádro buňky ve fázích leptoten, zygotene a brzký pachyten. Statistické šetření odhalilo signifikantně nižší počet DMC1 spotů u samců *Msh6*^{-/-} ve fázi leptotene ($p=0,0120$, jednosměrná ANOVA). Vyšší míra signifikance vůči kontrolnímu samci B6 wt byla zachycena v případě linie B6.*Msh6*^{-/-} linie 405 ($p=0,0063$, Dunnettův test). Zygotene nebyl zaznamenán významný rozdíl ($p=0,6762$, jednosměrná ANOVA). Naopak signifikantně vyšší množství spotů, než u kontroly bylo napočítáno v brzkém pachytenu u B6.*Msh6*^{null} linie 143 ($p=0,0028$, Dunnettův test). Výsledné hodnoty statistických testů jsou uvedeny v popisu (viz graf 3), průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou (viz příloha tabulka 19).



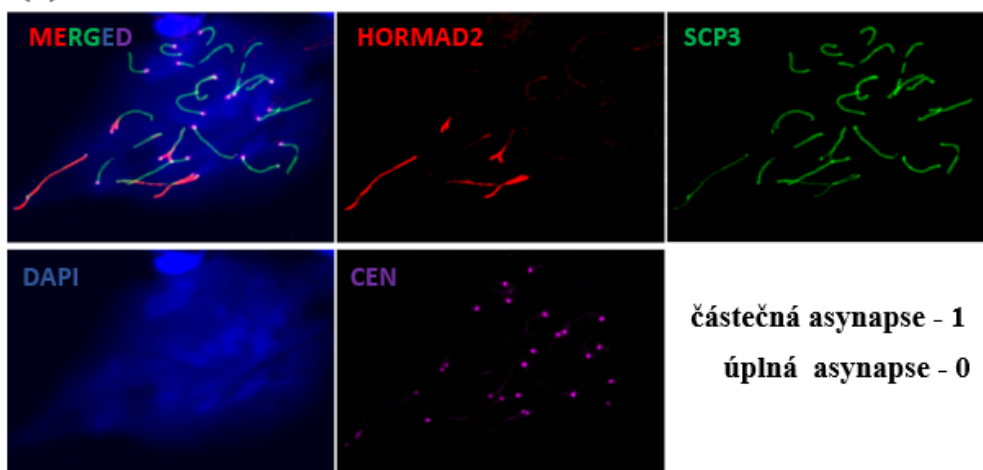
Obrázek 17. Imunofluorescenční barvení pro odhadnutí průměrného počtu dvouřetězcových zlomů na jádro buňky napříč meiotickými fázemi. DMC1 (zelené tečky), SPC3 (červené čáry), DAPI (modře). **(a)** spermatocyt ve fázi pozdního leptotene, kde dochází ke vzniku indukovaných DBSs detekovatelných pomocí DMC1 proteinu podílející se na jejich opravě **(b)** spermatocyt ve fázi zygotene disponující nejvyšším množstvím DBSs zlomů detekovaných DMC1. **(c)** v brzkém pachytene jsou již chromozomy zcela spárovány, některé DBSs zůstávají stále neopraveny, zejména pak na pohlavních chromozomech XY. K expresi histonového proteinu H1t stále nedochází. **(d)** v průběhu středního pachytenu jsou opraveny všechny DBSs, signál DMC1 není viditelný naopak dochází k iniciaci exprese H1t. **(e)+(f)** pozdní fáze profáze I diplotene a diakineze. Dochází k rozestupu bivaletních chromozomů, signál H1t je nejsilnější.



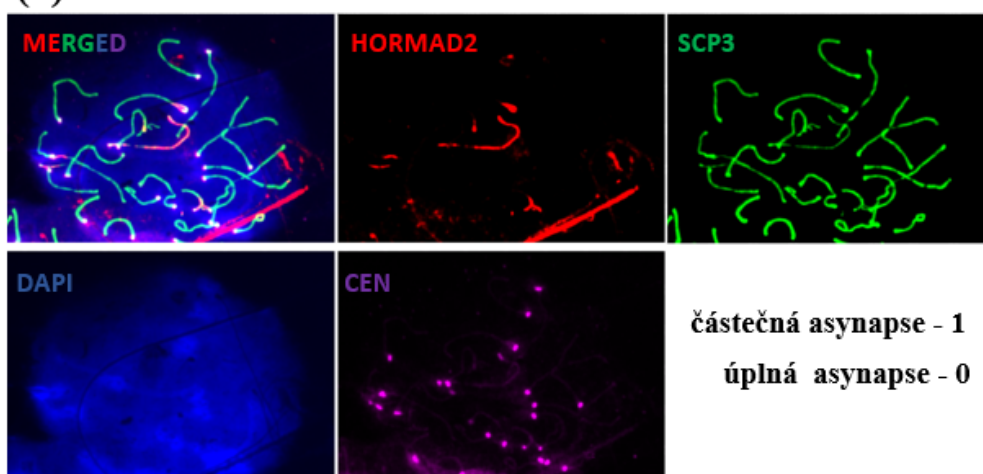
Graf 3. Porovnání počtů DMC1 spotů mezi skupinou samců kmenu B6 s vyraženým genem Msh6 a kontroly divokého typu. Leptoten – porovnání všech skupin ($p=0,0120$, jednosměrná ANOVA), B6 wt x Msh6 405 ($p=0,0063$, Dunnettův test), B6 wt x Msh6 143 ($p=0,2880$, Dunnettův test). **Zygotene** – porovnání všech skupin ($p=0,6762$, jednosměrná ANOVA), B6 wt x Msh6 405 ($p=0,7329$, Dunnettův test), B6 wt x Msh6 143 ($p=0,9658$, Dunnettův test). **Pachyten** – porovnání všech skupin ($p=0,0054$, jednosměrná ANOVA), B6 wt x Msh6 405 ($p=0,4717$, Dunnettův test), B6 wt x Msh6 143 ($p=0,0028$, Dunnettův test).

HORMAD2 hraje klíčovou roli v kontrole asynapsovaných chromozomů v období pachyteny. Viditelný je v pozdním zygotene, taktéž může být spatřen ve fázi pachyteny na nespárovaných univalentech, zejména u hybridních samců PWDxB6. HORMAD2 byl použit v kombinaci s protilátkami SCP3 a HumanCEN. U B6.Msh6^{-/-} byla pozorována pouze jedna buňka z 96 s částečně asynapsovanými chromozomy v období pozdního zygotene. Během pachyteny nebyla nalezena žádná. Stejně tomu bylo i v případě kontroly, kde byla pozorována pouze jedna částečně asynapsovaná buňka v době pozdního zygotene, v pachyteny pak žádná. Ve kmeni B6 mohou být obecně shledány +/- 3% asynapsovaných buněk. Absence většího množství vzorků zatím nedovoluje vyvodit jasný závěr.

(a) B6 wt



(b) B6 *Msh6*^{-/-}



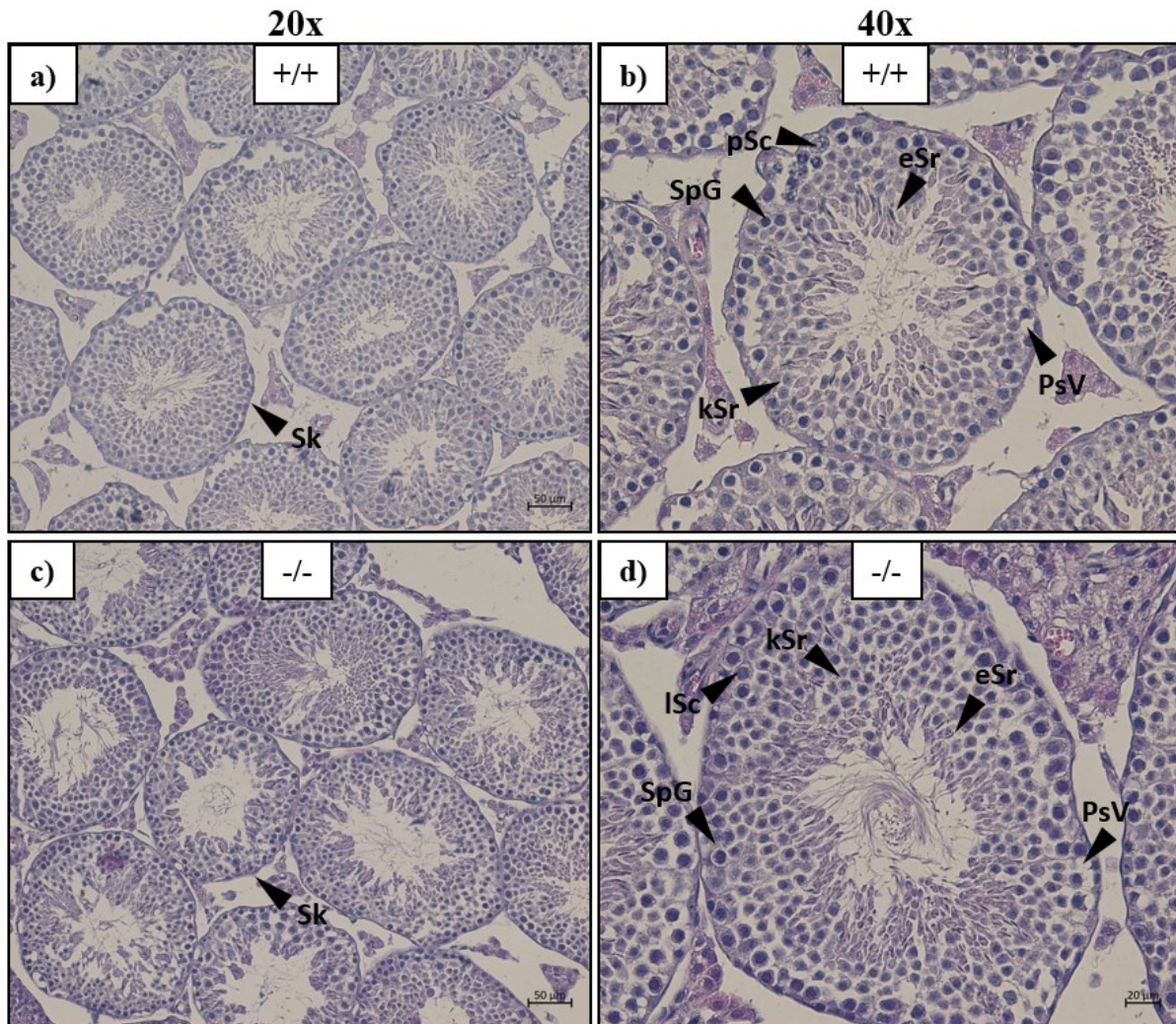
Obrázek 18. Částečně asynapsované chromozomy ve fázi pozdního zygotene u dvou sledovaných skupin. HORMAD2 (červeně), SCP3 (zeleně), HumanCEN (fialově), DAPI (modře). **(a)** fáze pozdního zygotene s částečně asynapsovanými chromozomy u linie B6.*Msh6*^{mut}. **(b)** částečně asynapsovaná buňka v B6 divokého typu ve fázi pozdního zygotene. Ve fázi pozdního zygotene chromozomy nejsou ještě zcela spárované.

5.3 Histologické preparáty testis delečních linií B6.*Msh6*^{mut} a kontrol

Hned po odebrání bylo *testis* přes noc fixováno pro následnou přípravu histologických preparátů. V pokusu byl použit jeden samec zastupující B6.*Msh6*^{-/-} linie 405 a jeden kontrolní samec B6. Oba samci měli v průběhu experimentu 11 týdnů. Po deparafinaci bylo *testis* nařezáno a přeneseno na podložní sklíčko. První sada skel byla barvena hematoxylin-eosinem, druhá sada imunofluorescenčním značením s využitím protilátek MSH6 a SPC3 (viz kapitola 4.2.15).

Barvení hematoxylinem sloužilo k detekci možné patologie semenotvorných kanálků a okolních tkání, včetně jednotlivých buněk během procesu spermatogeneze. Z důvodu nízkého počtu spermií a váhy *testes* u knock-out myši, existuje předpoklad vyššího zastoupení

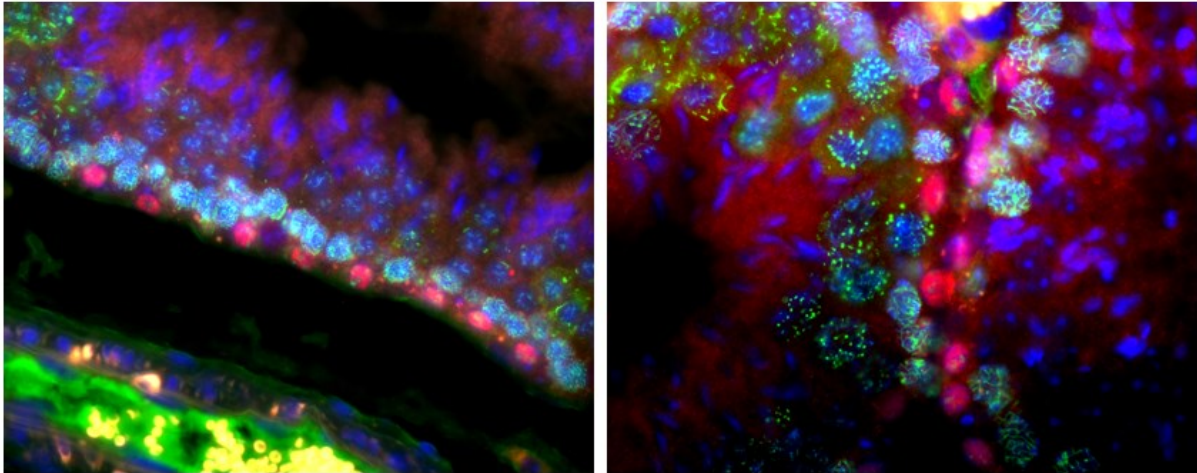
defektních kanálků a apoptovaných buněk. Na základě vizuálního vyhodnocení nebyla u preparátu obou skupin nalezena žádná známka nasvědčující rozdílné míry patologických jevů (viz obrázek 19). Pro kvantitativní vyjádření množství sledovaných apoptických buněk s možností statistického vyhodnocení bude v budoucnu využito metody TUNEL assay.



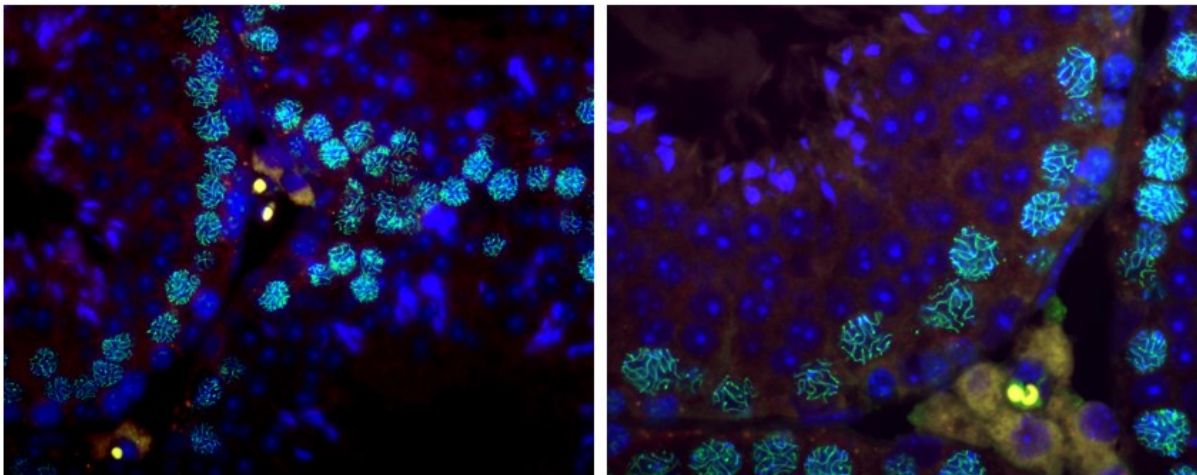
Obrázek 19. Histologické preparáty testis barveny hematoxylinem eosinem. (a) + (b) řezy testis kontrolních skupin samců B6 wt. (c) + (d) řezy testis samců linie B6.Msh6^{mut}. Sk – semenotvorný kanálek, SpG – spermatogonium pSc – pachytenní spermatocyt, lSc –leptotenní spermatocyt, kSr – krukový spermatid, eSr – elongovaný spermatid, PsV – pseudo-vakuola, SpC – spermatocyt, SpG – spermatogonium.

Imunofluorescenční barvení řezů společně s protilátkami proti MSH6 a DAPI bylo použito z důvodů detekce proteinu MSH6 v jádrech buněk a úplnému potvrzení nepřítomnosti proteinu v případě B6.Msh6^{-/-} linií. Ze sledovaných preparátů je dobře patrné, že u kontrolního samce B6 wt byl signál MSH6 detekován, patrně v jádrech spermatogoniálních buněk. Naopak v případě nulového mutantu genu *Msh6* tento signál nebyl registrován.

(a) B6 wt



(b) B6 Msh6^{-/-}



Obrázek . Řezy testis s imunofluorescenčním značím dvou skupin myši. Msh6 (červená), SCP3 (zelená), DAPI (modrá). **(a)** detail kanálku kontrolní myši B6 se signálem Msh6 detekovatelný v jádrech buňky spermatogonia **(b)** detail kanálku knock-out myši Msh6 bez přítomnosti červeného signálu.

6 Diskuze

V této diplomové práci jsem se podílel na vytvoření delečních mutantů genů *Msh2* a *Msh6* u dvou laboratorních inbreních kmenů C57BL/6J, PWD/Ph a jeho ustálení do homozygotní linie. Dále jsem se podílel na procesu zpětného křížení k získání kongenního kmene PWD nesoucí delecí genu *Msh6*. Taktéž se mi podařilo definovat fenotypové znaky samců myši linie B6.*Mshh6*^{-/-}.

Protein MSH6, společně s celou řadou dalších proteinů patří do velké rodiny MMR proteinů zodpovědných za opravu DNA. Do centra zájmů vědců se MMR skupina dostala na přelomu 20. a 21. století, kdy se podařilo definovat primární funkce základních procesů buňky, zejména při replikaci v prokaryotické *E.coli*. Dodnes byla a stále je publikována celá řada článků odkazující na vysokou konzervovanost procesů i u eukaryotických organismů, a to ne jenom v době replikace, ale také v procesu dělení buněk mitózou a vzniku pohlavních buněk procházejících meiózou. Důležitým poznatkem na poli studia meiotické sterility se stal článek vydaný v roce 1996, kdy gen *Msh2*, tvořící společně s genem *Msh6* komplex MutS, u dvou mezidruhů kvasinek *S. Cerevisiae* a *S. Paradoxus*, do značné míry ovlivňuje frekvenci meiotické rekombinace (Chambers et al., 1996). Diploidní hybridní buňka vzešlá konjugací těchto dvou mezidruhů disponuje nízkou hladinou životaschopnosti a není schopná dalšího dělení. Vyřazením genu *Msh2* u obou rodičovských kvasinek, jejíž následnou konjugací se podařilo získat vitální hybridní buňky způsobilé se dále dělit, byla prolomena bariéra hybridní sterility (Hunter et al., 1996). Pokud je proces dostatečně konzervovaný, podobného nebo dokonce stejného efektu by bylo možno docílit i na myším modelu používaným v naší laboratoři.

Na počátku bylo úmyslem vyřadit oba geny *Msh2* a *Msh6* současně, s cílem úplného vyřazení komplexu MutS α . Protein MSH2 má také schopnost dimerizovat s proteinem MSH3, kdy společně tvoří komplex MutS β , ten je na rozdíl MutS α komplexu zodpovědný za opravu poškození delších úseků v sekvenci DNA, než jsou defekty délky jednoho páru báze. Vyřazením genu *Msh2* by s vysokou pravděpodobností znemožnilo vznik komplexu MutS β , který by v procesu oprav mohl přebrat roli komplexu MutS α . V průběhu získání knock-outovaných (KO) myši čekala celá řada nástrah v podobě rození mrtvých mláďat kmene B6 s použitím sady gRNA CRISPR/Cas9 mířících proti obou genům. Potenciální příčinou tohoto jevu může být pozice genů, jenž jsou oba lokalizované na stejném chromozomu 17 ve velice krátké vzdálenosti 32,2 kb, kdy během embryonálního vývoje mohlo dojít vlivem opakovaného

štěpení sady CRISPRů k celé řadě poškození DNA, jež nemusela být procesem rekombinace náležitě opravena. Přenesením možné mutace do diferencovaných buněk a jejich následné dělení mohlo vést k úmrtí jedince. Nelze ale ani vyloučit negenetickou příčinu rození mrtvých mláďat. Pro snížení pravděpodobnosti opětovného rození mrtvých potomků jsme rozhodli ve druhé fázi pokusů vyřadit pouze jeden z genů (konkrétně *Msh6*), po získání homozygotní linie s KO genem pokus opakovat v zygotách získaných křížením s linií divokého typu (B6 wt) nesoucí nemutovanou alelu v přítomnosti gRNA s cílem vyřadit aspoň jednu z alel genu *Msh2*. Vliv mutace genu *Msh6* na meiotickou rekombinaci dosud nebyl popsán.

Po sérii neúspěšných pokusů s cílem vyřadit gen *Msh6*, se nakonec podařilo získat dva potomky vykazující tři dlouhé delece. Díky systematickému křížení došlo k jejich oddělení do tří samostatných linií pojmenovaných podle délky delece 143, 139 a 405. Homozygotní linie 143 a 405 byla ustanovena v F5 generaci, linie 139 neprodukovala dostatečné množství potomků a byla ztracena. Druhá generace homozygotů (celkově F7 od zakladatele linie) produkovala nižší množství potomků, taktéž docházelo k výraznému navýšení náhlým předčasných úmrtím zvířat. Za fenoménem předčasných úmrtí u myši *Msh6* ^{-/-} je podle článku (Roa et al., 2010) zodpovědná vysoká míra akumulace mutací v genomu vedoucí k tvorbě maligních nádorů B-lymfomu. U nulového mutantu *Msh2* ^{-/-} a *Msh2xMsh6* ^{-/-} převažovala forma T-lymfomu. Z toho důvodu jsou linie po dvou homozygotních generacích kříženy opětovně s B6 wt a následně drženy v heterozygotní formě. Western blot potvrdil vyřazení proteinů MSH6 ve sledovaných tkáních, zároveň se podařilo zjistit, že u 11 týdenních samců B6 divokého typu, nedochází k jeho expresi v mozku. Taktéž histologické preparáty připraveny z *testes* wt a KO samců potvrdili expresi proteinu pouze u B6 wt samců s nejvyšší koncentrací v buňkách ve stádiu spermatogonia. V současné době probíhají pokusy pro vytvoření dvojitého delečního nulového mutantu *Msh2/Msh6* s využitím homozygotní linie 405 *Msh6* ^{-/-}.

Bohužel se doposud nepodařilo získat delečního mutantu ani jednoho z genů v případě kmene PWD. Kmen PWD pocházející z divokých myši se svou biologickou podstatou výrazně liší od běžně používaného laboratorního kmenu B6. Servisní pracoviště CCP stále pracuje na optimalizaci a validaci metody. Jako náhradní řešení jsme díky existenci homozygotního B6.*Msh6*^{-/-} zahájili zpětné křížení za účelem přenosu mutace na genetické pozadí PWD pro získání kongenní myši PWD nesoucí deletovanou alelu. V budoucnu bude nutné zjistit zastoupení obou genomů v kongenních myších pomocí metody GIGA-MUGA.

První sada experimentů byla zaměřena na sledování základních parametrů fertility. Nízké vrhy mláďat nasvědčovaly, že u samců B6.*Msh6*^{-/-} je pravděpodobně narušen správný

průběh zrání spermií, mající vliv na celkový počet zralých spermií a váhu *testes*, která v případě divokých B6 vysoce koreluje s počtem spermií. Výsledky testů fertility desíti samců linie B6.*Msh6*^{-/-} a sedmi kontrol B6 wt ve stáří 9-11 týdnu odhalily signifikantně nižší průměrnou váhu *testes* a počet spermií B6.*Msh6*^{-/-} (viz příloha tabulka 18) než B6 wt (t-test: p-hodnota < 0.0001). Na základě vizuálního pozorování spermií a připravených histologických preparátů *testes*, samci B6.*Msh6*^{-/-} nevykazovali výrazné známky patologie vůči provedeným kontrolám. Příčina nízké váhy *testes* a počtu spermií zatím nebyla zjištěna.

Pro sledování průběhu meiózy při spermatogenezy byla využívána celá řada specifických markerů. Imunofluorescenční barvení γH2AX+SCP3 poukazovalo na možnost přítomnosti neopravených dvouřezcových zlomů (DBSs) ve fázi pachytene B6.*Msh6*^{-/-}. Kvantitativní vyhodnocení množství DBSs pozorovaných pomocí DMC1 spotů delečních mutantů linie *Msh6*^{-/-} 405,143 a B6 wt prokázal z pohledu delečních mutantů, mírný pokles průměrného množství DBSs a to ve fázi leptotene, v zygotenu nebyl zaznamenán žádný rozdíl a v brzkém pachytenu se podařilo ověřit statisticky významný mírný nárůst vůči kontrole (viz obrázek graf 3). Zde je nutno poznamenat, že meióza je dynamický proces, kde každá fáze probíhá s rozdílnou délkou, tomu taktéž odpovídá poměr zastoupených buněk v dané fázi a případné množství DMC1 spotů.

Velká očekávání byla kladena na pokusy pro ověření množství crossoverů (CO) během období pachytene. Z článku publikovaném roku 1996 se u dvou kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces paradoxus* podařilo prokázat, že vyřazením genu *Msh2* se řádově zvýšil počet rekombinačních událostí (Chambers et al., 1996). S využitím imunofluorescenční mikroskopie v kombinaci s protilátkou mířící proti proteinu MLH1, který je specifický pro místa rekombinace se u samců B6.*Msh6*^{-/-} podařilo zaznamenat mírný nárůst průměrného množství probíhajících crossoverů na jádro buňky než v případě B6 kontrol, rozdíl však nebyl statisticky významný (viz obrázek 15). Množství rekombinačních událostí v procesu spermatogeneze u samců myši (C57BL/6) nesoucí stejné genetické pozadí vyřazením genu *Msh6* tedy není ovlivněno. Výsledek je srovnatelný s prací (Peterson et al., 2020), kde stejného závěru bylo dosaženo u samců zastupující stejný kmen, ovšem s knock-out genem *Msh2*, patřící do stejné rodiny proteinů MMR jako *Msh6*. Autoři svou pozornost věnují dvěma definovaným polymorfním hotspotům konsomických kmenů A/J a DBA/2J s cílem zachytit frekvenci proběhlých crossoverů (CO) a non-crossoverů (NCO). Počet rekombinací v těchto místech se mezi kontrolami divokého typu a knock-out samci genu *Msh2* výrazně nelišil, rozdílná však byla úroveň zastoupení CO a NCO ve prospěch NCO v oblasti více polymorfního hotspotu

u samců *Msh2* $-/-$. K podobným závěrům dochází i celogenomové studie v rostlinném modelu *Arabidopsis*. Hybridní F1 generace *Msh2* $-/-$, vzešlá z dvou genomicky rozdílných populací rostlin, taktéž nedisponovala celkově vyšším množstvím rekombinačních událostí, avšak rekombinace byla upřednostňována do míst polymorfních hotspotů (Blackwell et al., 2020). Tento poznatek může být do jisté míry vztažen k myšimu modelu C57BL/6 a PWD/Ph využívaném v naší laboratoři. Tvorba asymetrických DBSs, způsobená diferenciací homologních hotspotů PRDM9 histonovou metyl transferázou, má za následek meiotickou zástavu hybridních samců. V případě chybějícího komplexu MutS α by byla odstraněna jeho očekávaná antirekombinační funkce a rekombinace by byla úspěšně dokončena. Samozřejmě je předběžně velice těžké odhadovat vliv genu *Prdm9*, ten může být u myši v epistatickém postavení vůči genům *Msh2xMsh6* a u kvasinek a rostlin jeho ortholog zcela chybí.

Výsledky všech provedených experimentů slouží jako pilotní projekt vlivu delece genu *Msh6* na parametry fertility u samců kmene C57BL/6. V budoucnu bude studium zaměřeno především na vliv delece obou genů *Msh2* a *Msh6* u kmenů C57BL/6 a PWD/Ph. Pracovní hypotéza založena na kvasinkovém modelu nám poskytuje předpoklad získání fertálních hybridních samců získaných z křížení PWDxB6 a tím překonání bariéry hybridní sterility. Takováto informace by se stala přelomovou v oblasti studia hybridní sterility, s teoretickým přesahem do rozdílných skupin eukaryotických organismů.

7 Závěr

Na základě analyzovaných dat lze konstatovat, že se podařilo ustavit dvě myší linie B6.*Msh6*^{-/-}. U mutaních samců docházelo k výraznému snížení váhy *testes* a průměrnému počtu spermií ve srovnání s B6 kontrolními samci. Výsledky vykazovaly silnou míru signifikance. Taktéž bylo prokázáno, že ani s navyšující se váhou *testes* u samců postrádající gen *Msh6*^{-/-} nedochází k tvorbě vyššího počtu zralých spermií. Analýza histologických preparátů připravených z *testes* těchto samců neprokázala známky patologie.

Data získaná imunofluorescenční mikroskopií prokázala mírné navýšení množství crossoverů v období pachytene u linie B6.*Msh6*^{-/-}, výsledný rozdíl však není statisticky významný. Množství indukovaných dvouřetězcových (DBSs) zlomů napříč fázemi profáze I (DBSs) u skupin samců B6 postrádající gen *Msh6*^{-/-} a kontrol poukázal na drobné statistické rozdíly.

8 Přílohy

Tabulka 17. Seznam testovaných myší s naměřenými

Id myši	genotyp	věk [týdny]	váha těla [g]	váha testes[mg]	spermií [mil/ml]	testes/tělo
A5486	B6 wt	9	23.3	184	68.0	7.9
A5487	B6 wt	9	25.6	196	58.0	7.7
A5488	B6 wt	9	23.8	187	60.8	7.9
A0329	B6 wt	10	27.1	179	52.8	6.6
A0495	B6 wt	11	21.8	160	45.5	7.4
I2085	B6 wt	10	24.0	167	43.0	6.9
I2086	B6 wt	11	27.3	164	40.8	6.0
G8620	B6.Msh6 [405]	11	24.5	100	18.9	4.1
G8621	B6.Msh6 [405]	11	23.4	107	32.5	4.6
G8622	B6.Msh6 [405]	11	23.3	107	19.4	4.6
A0264	B6.Msh6 [405]	11	27.3	119	22.2	4.4
A0265	B6.Msh6 [405]	11	26.7	86	18.8	3.2
A0652	B6.Msh6 [405]	10	24.4	156	24.3	6.4
A0653	B6.Msh6 [405]	10	27.0	139	30.3	5.2
A0808	B6.Msh6 [405]	10	23.8	120	21.7	5.0
A3211	B6.Msh6 [405]	11	26.2	130	26.7	5.0
A8478	B6.Msh6 [405]	10	25.1	158	29.5	6.0
A8701	B6.Msh6 [143]	14	24.7	164	35.7	6.6

Tabulka 18. Výsledné hodnoty parametrů fertility testovaných myší.

Marker	Jednotka	Genotyp			
		B6 wt		Msh6 405	
		Průměr	SD	Průměr	SD
Váha testes	[mg]	176,70	13,36	122,20	13,36
Počet spermií	mil/ml	52,68	10,13	24,41	5,03
Testes/tělo	poměr	7,20	0,72	4,88	0,96

Tabulka 19. Výsledné hodnoty parametrů meiotických markerů testovaných myší.

Marker	Stádium	Genotyp					
		B6 wt		Msh6 405		Msh6 143	
		Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD
DMC1	Leptoten	155,4	58,21	73,77	41,35	104,0	82,78
	Zygoten	145,7	49,75	137,4	55,47	148,8	54,73
	Pachyten	45,60	11,36	51,22	15,62	66,79	31,95
MLH1	Pachyten	23,59	1,98	23,93	2,44	NA	NA
HORMAD2	Pacyhten	0	0	0	0	NA	NA

9 Přehled literatury

- Acharya, S., Foster, P.L., Brooks, P., and Fishel, R. (2003). The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Mol. Cell* 12, 233–246.
- Alani, E. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5604–5615.
- Alibert, P., Fel-Clair, F., Manolakou, K., Britton-Davidian, J., and Auffray, J.-C. (1997). Developmental Stability, Fitness, and Trait Size in Laboratory Hybrids Between European Subspecies of the House Mouse. *Evolution (N. Y.)* 51, 1284.
- Allers, T., and Lichten, M. (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106, 47–57.
- Anderson, E., and Hubricht, L. (1938). Hybridization in *Tradescantia*. III. The Evidence for Introgressive Hybridization. *Am. J. Bot.* 25, 396.
- Antony, E., Khubchandani, S., Chen, S., and Hingorani, M.M. (2006). Contribution of Msh2 and Msh6 subunits to the asymmetric ATPase and DNA mismatch binding activities of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2-Msh6 mismatch repair protein. *DNA Repair (Amst.)* 5, 153–162.
- Auffray, J., Marshall, J.T., Thaler, L., and Bonhomme, F. (1990). Focus on the nomenclature of European species of *Mus*. *Mouse Genome* 88, 7–8.
- Baird, S.J.E., and Macholán, M. (2012). What can the *mus musculus musculus* M. M. *Domesticus* hybrid zone tell us about speciation. In *Evolution of the House Mouse*, (Cambridge University Press), pp. 334–372.
- Baker, Z., Schumer, M., Haba, Y., Bashkirova, L., Holland, C., Rosenthal, G.G., and Przeworski, M. (2017). Repeated losses of PRDM9-directed recombination despite the conservation of PRDM9 across vertebrates. *Elife* 6.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and De Massy, B. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science (80-.)* 327, 836–840.
- Bergerat, A., De Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414–417.
- Berry, R.J., and Bronson, F.H. (1992). Life history and bioeconomy of the house mouse. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 67, 519–550.
- Blackwell, A.R., Dluzewska, J., Szymanska-Lejman, M., Desjardins, S., Tock, A.J., Kbir, N., Lambing, C., Lawrence, E.J., Bieluszewski, T., Rowan, B., et al. (2020). MSH2 shapes the meiotic crossover landscape in relation to interhomolog polymorphism in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 39.

- Boulton, A., Myers, R.S., and Redfield, R.J. (1997). The hotspot conversion paradox and the evolution of meiotic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 8058–8063.
- Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J., and Bonhomme, F. (1993). The Evolution of House Mice. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* *24*, 119–152.
- Britton-Davidian, J., Fel-Clair, F., Lopez, J., Alibert, P., and Boursot, P. (2005). Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse: Estimates from fertility patterns in wild and laboratory-bred hybrids. In *Biological Journal of the Linnean Society*, pp. 379–393.
- Buffon, C.D. (1797). *Buffon's Natural History, Containing a Theory of the Earth, a General History of Man, of the Brute Creation, and of Vegetables, Minerals. Etc. From French 10.*
- Cabot, E.L., Davis, A.W., Johnson, N.A., and Wu, C.-I. (1994). Genetics of Reproductive Isolation in the *Drosophila simulans* Clade: Complex Epistasis Underlying Hybrid Male Sterility.
- Chambers, S.R., Hunter, N., Louis, E.J., and Borts, R.H. (1996). The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6110–6120.
- Charlesworth, B., Coyne, J.A., and Barton, N.H. (1987). The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Am. Nat.* *130*, 113–146.
- Chevret, P., Veyrunes, F., and Britton-Davidian, J. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Mus* (Rodentia: Murinae) based on mitochondrial and nuclear data. In *Biological Journal of the Linnean Society*, pp. 417–427.
- Constantin, N., Dzantiev, L., Kadyrov, F.A., and Modrich, P. (2005). Human mismatch repair: Reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *J. Biol. Chem.* *280*, 39752–39761.
- Coop, G., and Przeworski, M. (2007). An evolutionary view of human recombination. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 23–34.
- Coutton, C., Abada, F., Karaouzene, T., Sanlaville, D., Satre, V., Lunardi, J., Jouk, P.-S., Arnoult, C., Thierry-Mieg, N., and Ray, P.F. (2013). Fine Characterisation of a Recombination Hotspot at the DPY19L2 Locus and Resolution of the Paradoxical Excess of Duplications over Deletions in the General Population. *PLoS Genet.* *9*, e1003363.
- Coyne, J.A., and Allen Orr, H. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *353*, 287–305.
- Coyne, J.A., and Charlesworth, B. (1986). Location of an X-linked factor causing sterility in male hybrids of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*.
- Coyne, J.A., and Orr, H.A. (2004). Speciation genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *14*, 675–679.
- Darwin, C. (1859). *The Origin of Species by Means of Natural Selection.*
- Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G.F., and Jinks Robertson, S. (1996). Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1085–1093.

- Davis, A.W., and Wu, C.-I. (1996). The Broom of the Sorcerer's Apprentice: The Fine Structure of a Chromosomal Region Causing Reproductive Isolation Between Two Sibling Species of *Drosophila*.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: Protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.* 6.
- Dobzhansky, T. (1936). Studies on Hybrid Sterility. II. Localization of Sterility Factors in *Drosophila Pseudoobscura* Hybrids. *Genetics* 21, 113–135.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the origin of species* Columbia Univ. Press. New York.
- Drotschmann, K., Aronshtam, A., Fritz, H.J., and Marinus, M.G. (1998). The *Escherichia coli* MutL protein stimulates binding of Vsr and MutS to heteroduplex DNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 948–953.
- Dufner, P., Marra, G., Raschle, M., and Jiricny, J. (2000). Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutS α is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. *J. Biol. Chem.* 275, 36550–36555.
- Duvaux, L., Belkhir, K., Boulesteix, M., and Boursot, P. (2011). Isolation and gene flow: Inferring the speciation history of European house mice. *Mol. Ecol.* 20, 5248–5264.
- Dzur-Gejdosova, M., Simecek, P., Gregorova, S., Bhattacharyya, T., and Forejt, J. (2012). Dissecting The Genetic Architecture Of F1 Hybrid Sterility In House Mice. *Evolution (N. Y.)* 66, 3321–3335.
- Edelbrock, M.A., Kaliyaperumal, S., and Williams, K.J. (2013). Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 743–744, 53–66.
- Fishel, R., and Wilson, T. (1997). MutS homologs in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 105–113.
- Forejt, J. (1996). Hybrid sterility in the mouse. *Trends Genet.* 12, 412–417.
- Forejt, J., and Iványi, P. (1974). Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genet. Res.* 24, 189–206.
- Forejt, J., Vincek, V., Klein, J., Lehrach, H., and Loudová-Micková, M. (1991). Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mamm. Genome* 1, 84–91.
- Frisman, L. V., Korobitsina, K. V., Yakimenko, L. V., Bokstein, F.M., and Muntyanu, A.I. (1990). Genetic differentiation of U.S.S.R. house mice: electrophoretic study of proteins. *Biol. J. Linn. Soc.* 41, 65–72.
- Geraldes, A., Basset, P., Smith, K.L., and 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.
- Gorman, J., Wang, F., Redding, S., Plys, A.J., Fazio, T., Wind, S., Alani, E.E., and Greene, E.C. (2012). Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.

- Gregorová, S., Mňuková-Fajdelová, M., Trachtulec, Z., Čapková, J., Loudová, M., Hoglund, M., Hamvas, R., Lehrach, H., Vincek, V., Klein, J., et al. (1996). Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse Chromosome 17 including the hybrid sterility 1 gene. *Mamm. Genome* 7, 107–113.
- Grey, C., Baudat, F., and de Massy, B. (2018). PRDM9, a driver of the genetic map. *PLoS Genet.* 14, e1007479.
- Grilley, M., Welsh, K.M., Su, S.S., and Modrich, P. (1989). Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product. *J. Biol. Chem.* 264, 1000–1004.
- Groothuizen, F.S., and Sixma, T.K. (2016). The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. *DNA Repair (Amst).* 38, 14–23.
- Gueneau, E., Dherin, C., Legrand, P., Tellier-Lebegue, C., Gilquin, B., Bonnesoeur, P., Londino, F., Quemener, C., Le Du, M.H., Márquez, J.A., et al. (2013). Structure of the MutL α C-terminal domain reveals how Mlh1 contributes to Pms1 endonuclease site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 461–468.
- Guénet, J.L., and Bonhomme, F. (2003). Wild mice: An ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet.* 19, 24–31.
- Haldane, J.B.S. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12, 101–109.
- Hayashi, K., Yoshida, K., and Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438, 374–378.
- Hohenauer, T., and Moore, A.W. (2012). The Prdm family: Expanding roles in stem cells and development. *Dev.* 139, 2267–2282.
- Honda, M., Okuno, Y., Hengel, S.R., Martín-López, J. V., Cook, C.P., Amunugama, R., Soukup, R.J., Subramanyam, S., Fishel, R., and Spies, M. (2014). Mismatch repair protein hMSH2-hMSH6 recognizes mismatches and forms sliding clamps within a D-loop recombination intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111.
- Horiuchi, Y., Agulnik, A., Figueroa, F., Tichy, H., and Klein, J. (1992). Polymorphisms distinguishing different mouse species and t haplotypes. *Genet. Res.* 60, 43–52.
- Horton, I.H. (1939). A Comparison of the Salivary Gland Chromosomes of *Drosophila Melanogaster* and *D. Simulans*. *Genetics* 24, 234–243.
- Hunter, N. (2015). Meiotic recombination: The essence of heredity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016618.
- Hunter, N., Chambers, S.R., Louis, E.J., and Borts, R.H. (1996). The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO J.* 15, 1726–1733.
- Jacobs, L.L., and Downs, W.R. (1994). The evolution of murine rodents in Asia. In *Rodent and Lagomorph Families of Asian Origins and Diversification*, pp. 149–156.
- Jacobs, L.L., and Pilbeam, D. (1980). Of mice and men: Fossil-based divergence dates and molecular “clocks.” *J. Hum. Evol.* 9, 551–555.

- Jagodich, M., and Stridh, P. (2016). Positional Gene Cloning in Experimental Populations. *Methods Mol. Biol.* 1304, 3–24.
- Kaliyaperumal, S., Patrick, S.M., and Williams, K.J. (2011). Phosphorylated hMSH6: DNA mismatch versus DNA damage recognition. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 706, 36–45.
- Keeney, S., and Kleckner, N. (1995). Covalent protein-DNA complexes at the 5' strand termini of meiosis-specific double-strand breaks in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11274–11278.
- Kimura, Y., Hawkins, M.T.R., McDonough, M.M., Jacobs, L.L., and Flynn, L.J. (2015). Corrected placement of *Mus-Rattus* fossil calibration forces precision in the molecular tree of rodents. *Sci. Rep.* 5, 1–9.
- Klaus Pxtau, V., and Einleitung, B.-D.I. (1935). Chromosomenmorphologie bei *Drosophila melanogaster* und *Drosophila simulans* und ihre genetische Bedeutung.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA MISMATCH REPAIR. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 681–710.
- Lachaise, D., Cariou, M.-L., David, J.R., Lemeunier, F., Tsacas, L., and Ashburner, M. (1988). Historical Biogeography of the *Drosophila melanogaster* Species Subgroup. In *Evolutionary Biology*, (Springer US), pp. 159–225.
- Lam, I., and Keeney, S. (2015). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Lamers, M.H., Perrakis, A., Enzlin, J.H., Winterwerp, H.H.K., De Wind, N., and Sixma, T.K. (2000). The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G·T mismatch. *Nature* 407, 711–717.
- Larson, E.L., Vanderpool, D., Sarver, B.A.J., Callahan, C., Keeble, S., Provencio, L.L., Kessler, M.D., Stewart, V., Nordquist, E., Dean, M.D., et al. (2018). The evolution of polymorphic hybrid incompatibilities in house mice. *Genetics* 209, 845–859.
- Lecompte, E., Aplin, K., Denys, C., Catzeflis, F., Chades, M., and Chevret, P. (2008). Phylogeny and biogeography of African Murinae based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with a new tribal classification of the subfamily. *BMC Evol. Biol.* 8.
- Lesecque, Y., Glémin, S., Lartillot, N., Mouchiroud, D., and Duret, L. (2014). The Red Queen Model of Recombination Hotspots Evolution in the Light of Archaic and Modern Human Genomes. *PLoS Genet.* 10, e1004790.
- Li, G.M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85–98.
- Lustyk, D., Kinský, S., Ullrich, K.K., Yancoskie, M., Kašíková, L., Gergelits, V., Sedlacek, R., Chan, Y.F., Odenthal-Hesse, L., Forejt, J., et al. (2019). Genomic structure of *hstx2* modifier of *Prdm9*-dependent hybrid male sterility in mice. *Genetics* 213, 1047–1063.
- Malone, J.H., and Michalak, P. (2008). Physiological sex predicts hybrid sterility regardless of genotype. *Science* (80-.). 319, 59–59.
- Marshall, J.T. (1981). Taxonomy of the house mouse. *Symp. Zool. Soc. London* 47, 15–25.

- Masly, J.P., and Presgraves, D.C. (2007). High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5, 1890–1898.
- Masly, J.P., Jones, C.D., Noor, M.A.F., Locke, J., and Orr, H.A. (2006). Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science* (80-.). 313, 1448–1450.
- De Massy, B. (2013). Initiation of meiotic recombination: How and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 47, 563–599.
- McMahill, M.S., Sham, C.W., and Bishop, D.K. (2007). Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis. *PLoS Biol.* 5, e299.
- Mendel, G. (1866). *Verh Naturforsch Vereines Abhandlungen Brünn* (Springer International Publishing).
- Michaux, J., Reyes, A., and Catzeflis, F. (2001). Evolutionary history of the most speciose mammals: Molecular phylogeny of muroid rodents. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2017–2031.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J.C., and Forejt, J. (2009). A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* (80-.). 323, 373–375.
- Monti, M.C., Cohen, S.X., Fish, A., Winterwerp, H.H.K., Barendregt, A., Friedhoff, P., Perrakis, A., Heck, A.J.R., Sixma, T.K., Van Den Heuvel, R.H.H., et al. (2011). Native mass spectrometry provides direct evidence for DNA mismatch-induced regulation of asymmetric nucleotide binding in mismatch repair protein MutS. *Nucleic Acids Res.* 39, 8052–8064.
- Moriwaki, K., Miyashita, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., and Yonekawa, H. (1986). Genetic features of major geographical isolates of *Mus musculus*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 127, 55–61.
- Muller, H. (1942). Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biol. Symp* 71–125.
- Murakami, H., and Keeney, S. (2008). Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes Dev.* 22, 286–292.
- Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R.E., Freeman, C., MacFie, T.S., McVean, G., and Donnelly, P. (2010). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* (80-.). 327, 876–879.
- Orr, H.A., and Betancourt, A.J. (2001). Haldane’s Sieve and Adaptation From the Standing Genetic Variation.
- Paigen, K. (2003). One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. I. The classical period (1902-1980). *Genetics* 1–7.
- Paigen, K., and Petkov, P.M. (2018). PRDM9 and Its Role in Genetic Recombination. *Trends Genet.* 34, 291–300.
- Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T., and Jiricny, J. (1996). hMutS β , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr. Biol.* 6, 1181–1184.
- Parvanov, E.D., Petkov, P.M., and Paigen, K. (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* (80-.). 327, 835.

- Perez, D.E., U, C.-I.W., Johnson, N.A., and Wu, M.-L. (1993). Genetics of Reproductive Isolation in the *Drosophila simulans* Clade: DNA Marker-Assisted Mapping and Characterization of a Hybrid-Male Sterility Gene, *Odysseus* (*Ods*).
- Peterson, S.E., Keeney, S., and Jasin, M. (2020). Mechanistic Insight into Crossing over during Mouse Meiosis. *Mol. Cell* 78, 1252-1263.e3.
- Phadnis, N. (2011). Genetic architecture of male sterility and segregation distortion in *Drosophila pseudoobscura bogota*-USA hybrids. *Genetics* 189, 1001–1009.
- Pluciennik, A., Burdett, V., Lukianova, O., O'Donnell, M., and Modrich, P. (2009). Involvement of the β clamp in methyl-directed mismatch repair in vitro. *J. Biol. Chem.* 284, 32782–32791.
- Quackenbush, L.S. (1910). Unisexual broods of *Drosophila*. *Science* (80-.). 32, 183–185.
- Roa, S., Li, Z., Peled, J.U., Zhao, C., Edelmann, W., and Scharff, M.D. (2010). MSH2/MSH6 Complex Promotes Error-Free Repair of AID-Induced dU:G Mispairs as well as Error-Prone Hypermutation of A:T Sites. *PLoS One* 5, e11182.
- Rockman, M. V., and Kruglyak, L. (2009). Recombinational landscape and population genomics of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5.
- Sandor, C., Li, W., Coppeters, W., Druet, T., Charlier, C., and Georges, M. (2012). Genetic variants in REC8, RNF212, and PRDM9 influence male recombination in cattle. *PLoS Genet.* 8.
- Sawamura, K. (2000). Genetics of hybrid inviability and sterility in *Drosophila*: The *Drosophila melanogaster* – *Drosophila simulans* case. *Plant Species Biol.* 15, 237–247.
- Schwahn, D.J., Wang, R.J., White, M.A., and Payseur, B.A. (2018). Genetic dissection of hybrid male sterility across stages of spermatogenesis. *Genetics* 210, 1453–1465.
- Seiffert, E.R. (2006). Interpreting the Past: Essays on Human, Primate, and Mammal Evolution in Honor of David Pilbeam. *J. Hum. Evol.* 51, 327–328.
- Silver, L. (1996). Mouse genetics: concepts and applications. *Genet. Researc* 68.2, 183.
- Spies, M., and Fishel, R. (2015). Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Sturtevant, A.H. (1920). Genetic Studies on *DROSOPHILA SIMULANS*. I. Introduction. Hybrids with *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 5, 488–500.
- Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., and Szostak, J.W. (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* 338, 87–90.
- Sun, S., Ting, C.T., and Wu, C.I. (2004). The normal function of a speciation gene, *Odysseus*, and its hybrid sterility effect. *Science* (80-.). 305, 81–83.
- Takahashi, G., Gurusurthy, C.B., Wada, K., Miura, H., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2015). GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: A novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci. Rep.* 5.

- Trachtulec, Z., Mihola, O., Vlček, Č., Himmelbauer, H., Pačes, V., and Forejt, J. (2005). Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biol. J. Linn. Soc.* *84*, 637–641.
- Turner, L.M., Schwahn, D.J., and Harr, B. (2012). Reduced male fertility is common but highly variable in form and severity in a natural house mouse hybrid zone. *Evolution (N. Y.)*. *66*, 443–458.
- Úbeda, F., and Wilkins, J.F. (2011). The Red Queen theory of recombination hotspots. *J. Evol. Biol.* *24*, 541–553.
- Wang, W., Zhang, Y., and Wang, H. (2017). Generating mouse models using zygote electroporation of nucleases (ZEN) technology with high efficiency and throughput. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 219–230.
- Wu, C.-I., and Hollocher, H. (1998). Subtle is nature. *Endless Forms Species Speciat.* 339–351.
- Wu, C.I., and 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.
- Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P.Y.H., Boiteux, S., and Hunter, N. (2010). Temporally and Biochemically Distinct Activities of Exo1 during Meiosis: Double-Strand Break Resection and Resolution of Double Holliday Junctions. *Mol. Cell* *40*, 1001–1015.