

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