

**UNIVERZITA KARLOVA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Geny pro hybridní sterilitu myši: mapování epistatických interakcí**

**Bc. VÁCLAV JOHN**

**školitel: Prof. MUDr. Jiří Forejt, DrSc.**

**PRAHA 2010**



Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2008 - 2010 na Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v laboratoři Myší molekulární genetiky pod odborným dohledem prof. MUDr. Jiřího Forejta DrSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením svého školitele.

Chtěl bych tímto poděkovat v první řadě prof. Jiřímu Forejtovi za jeho velmi ochotnou pomoc při konzultaci této diplomové práce a především za možnost podílet se na zajímavém projektu. Dále bych rád poděkoval Soně Gregorové, Tanmoyi Bhattacharyyovi a Márii Džúr-Gajdošové za poskytnutí jejich vlastních, dosud nepublikovaných výsledků. Můj velký dík patří také Petrovi Šimečkovi, za jeho významnou pomoc při zpracování statistických analýz, bez které bych se neobešel. V neposlední řadě bych rád poděkoval všem ostatním, kteří mi radili a pomáhali při experimentální práci, zejména Janě Veselské, Zdeňkovi Trachtulcovi, Ireně Chvátalové a celému kolektivu laboratoře Myší molekulární genetiky.

## ABSTRACT

### MOUSE HYBRID STERILITY GENES: A MAPPING OF EPISTATIC INTERACTIONS

Hybrid sterility is an important postmeiotic reproductive isolation barrier. The phenotype of mouse hybrid sterility includes decreased testes weight and an absence of sperm. It occurs only in F1 males from PWD/Ph (PWD; *Mus musculus domesticus*) x C57BL/6J (B6, *M. m. musculus*) cross but not reciprocal B6 x PWD F1 males (FOREJT & IVÁNYI, 1974; FOREJT *et al.*, 1991). Nowadays we know that the phenotype of hybrid sterility is controlled by the PWD/B6 allelic combination on chromosome 17 at *Prdm9* locus is needed and by the PWD allele on chromosome X at *Hstx2* locus. This combination of two loci is necessary but not sufficient obtain full sterility (MIHOLA *et al.*, 2008; FOREJT, JIŘÍ, pers. comm.), so another genes must play role.

In this experimental work I prepared the F2 cross from B6 and PWD mouse strains and I genotyped the males of F2 crosses and I carried out the QTL analysis. Extended QTL analysis was carried out with all animals carrying *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> – *Hstx2*<sup>PWD</sup> allelic combination. The results showed unexpectedly low number of sterile males in F2 generation (1.90 %), and significant QTLs on chromosomes 17 (in *Prdm9* loci) and X (different from *Hstx2*) in sperm, no other significant peak on any chromosome was found. These results indicate a more complicated control of hybrid sterility, where probably more genes (therefore invisible in QTL analysis) play role. I also compared my results to the results from the backcross to the B6 strain (which was done in our lab in parallel). The difference between the two experiments could be explained by the absence of PWD/PWD allelic combination in the backcross, by some unspecified epigenetic interaction or by the different origin of Y chromosome.

**Keywords:** hybrid sterility, genotyping, QTL mapping, mouse laboratory strain C57BL/6J, mouse laboratory strain PWD/Ph.

**Klíčová slova:** hybridní sterilita, genotypizace, QTL mapování, myší laboratorní kmen C57BL/6J, myší laboratorní kmen PWD/Ph.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>10</b>
-2.1 TAXONOMIE A ROZŠÍŘENÍ RODU MUS	10
-2.2 MYŠÍ LABORATORNÍ KMENY	14
-2.3 KŘÍŽENÍ A HYBRIDNÍ STERILITA	16
-2.4 GENY HYBRIDNÍ STERILITY U MYŠI DOMÁCÍ	18
-2.4.1 CHROMOZOM 17: <i>Prdm9</i>	18
-2.4.2 CHROMOZOM X: <i>Hstx1</i> A <i>Hstx2</i>	20
<b>3. MATERIÁL A METODY</b>	<b>22</b>
-3.1 MATERIÁL	22
-3.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	22
-3.1.1.1 LABORATORNÍ KMEN C57BL/6J	22
-3.1.1.2 LABORATORNÍ KMEN PWD/PH	23
-3.1.2 CHEMIKÁLIE	24
-3.1.3 PŘÍSTROJE	25
-3.2 METODY	26
-3.2.1 ZÁKLADNÍ SCHEMA EXPERIMENTU	26
-3.2.2 PŘÍPRAVA F2 GENERACE KŘÍŽENÍM KMENŮ B6 A PWD	26
-3.2.3 MĚŘENÍ VYBRANÝCH FENOTYPOVÝCH ZNAKŮ	28
-3.2.4 IZOLACE CELKOVÉ DNA	28

-3.2.5	<u>GENOTYPIZACE ZVÍŘAT</u>	28
-3.2.6	<u>STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT</u>	31
<b>4.</b>	<b><u>VÝSLEDKY</u></b>	<b>32</b>
-4.1	<u>MĚŘENÍ VYBRANÝCH FENOTYPOVÝCH ZNAKŮ</u>	32
-4.2	<u>VÝSLEDKY GENOTYPIZACE VYBRANÝCH ZVÍŘAT</u>	40
-4.3	<u>QTL ANALÝZA</u>	40
-4.4	<u>SHRNUTÍ A DALŠÍ POSTUP</u>	50
-4.5	<u>QTL ANALÝZA ZVÍŘAT S <math>Prdm9^{PWD/B}</math> - <math>Hstx2^{PWD}</math> KOMBINACÍ</u>	
	<u>ALEL</u>	51
<b>5.</b>	<b><u>DISKUZE</u></b>	<b>53</b>
-5.1	<u>CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH ZVÍŘAT</u>	53
-5.2	<u>VÝSLEDKY QTL ANALÝZY</u>	56
-5.3	<u>VÝSLEDKY QTL ANALÝZY ZVÍŘAT S <math>Prdm9^{PWB/B6}</math> - <math>Hstx2^{PWB}</math></u>	
	<u>KOMBINACÍ ALEL</u>	59
<b>6.</b>	<b><u>ZÁVĚR</u></b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b><u>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</u></b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u></b>	<b>64</b>

# 1. ÚVOD

Cílem této diplomové práce je přispět novými poznatky k objasnění genetického základu hybridní sterility u myši domácí (*Mus musculus*). Hybridní sterilita je jev, kdy dva plně fertillní jedinci, pocházející od odlišných taxonů, mají sterillní potomky. Tento mechanismus působí jako postzygotická reprodukčně izolační bariéra mezi oběma taxony a uplatňuje se jako významný speciální mechanismus. Hybridní sterilita se řídí Haldaneovým pravidlem (HALDANE, 1922) a v F1 generaci postihuje především heterogametické pohlaví.

Hybridní sterilita je známa již relativně dlouho a byla pozorována u mnoha organismů, o jejím genetickém podkladě víme dosud relativně málo. Nejvíce poznatků bylo získáno studiem hybridů různých druhů octomilky (*Drosophila*) a nověji také genetickou analýzou hybridní sterility u myši domácí (*Mus musculus*). Prvním genem odpovědným za hybridní sterilitu, který byl nalezen, je *Odysseus* u octomilky (PEREZ *et al.*, 1993; PEREZ & WU, 1995). Prvním známým genem odpovědným za hybridní sterilitu u savců se stal gen *Prdm9* nalezený u myši domácí (MIHOLA *et al.*, 2009).

U myši domácí jsou hybridní sterilitou postiženi samci (u savců jsou samci heterogametickým pohlavím, s XY pohlavními chromozomy). Je známo, že při křížení samice kmene C57BL/6J (odvozen převážně od poddruhu *Mus musculus domesticus*, dále *M. m. domesticus*) a samce kmene PWD/Ph (odvozen od poddruhu *Mus musculus musculus*, dále *M. m. musculus*) jsou všichni samci v F1 generaci plně fertillní, zatímco při opačném křížení – samice kmene PWD/Ph (dále PWD) a samce kmene C57BL/6J (dále B6) jsou všichni samci v F1 generaci sterillní, nemají žádné spermie (GREGOROVÁ & FOREJT, 2000). Podmínkou hybridní sterility hybridů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* je heterozygotnost (*musculus/domesticus*) *Prdm9* genu (MIHOLA *et al.*, 2008) a PWD genotyp na chromozomu X, v oblasti zatím neidentifikovaného genu, prozatím označeného jako *Hstx2* lokus (BHATTACHARYYA, TANMOY, osobní sdělení). Současně ale tyto dva geny nejsou jediné, které se účastní vzniku hybridní sterility. (FOREJT, JIŘÍ, osobní sdělení).



Ve snaze identifikovat další oblasti, na kterých se nachází geny účastnící se na vzniku hybridní sterility u myši domácí, bylo navrženo připravit F2 generaci (interkros) křížením myších laboratorních kmenů B6 a PWD, z této generace jsem pak vybral samce, tyto samce genotypovat pomocí vhodně vybraných mikrosatelitových markerů a následně zpracovat výsledky pomocí QTL analýzy. Primárním cílem bylo zjistit, zda je F2 křížení vhodné pro analýzu hybridní sterility, zejména jak vysoký počet samců je v této generaci sterilní. Dalším cílem bylo pokusit se nalézt nové oblasti na myším genomu, které se podílí na vzniku hybridní sterility, a to pomocí QTL analýzy a eventuálně sestavením mapy epistatických interakcí mezi jednotlivými oblastmi genomu.

Paralelně s touto experimentální prací probíhal v laboratoři Myší molekulární genetiky prof. Forejta obdobný výzkum, který se lišil použitým křížením – jednalo se o zpětné křížení na C57BL/6J (B6) stranu s následnou QTL analýzou a sledováním epistatických interakcí obdobným způsobem. Smyslem bylo srovnat data z těchto dvou experimentů, zjistit jakým způsobem se liší, případně co mají společného, a z toho pak vyvodit společný závěr.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 TAXONOMIE A ROZŠÍŘENÍ RODU MUS

Myš domácí - *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) je druh doprovázející člověka po staletí a má prakticky kosmopolitní rozšíření. Názory na její taxonomii a obecně na taxonomii rodu *Mus* nejsou zcela jednotné a pohled na ně se měnil v průběhu času. V současné době ale převládá názor, podle kterého se druh *Mus musculus* člení do několika poddruhů (WILSON & REEDER, 2005):

- *Mus musculus musculus* (Linnaeus, 1758)
- *Mus musculus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943
- *Mus musculus bactrianus* Blyth, 1846
- *Mus musculus castaneus* Waterhouse, 1843

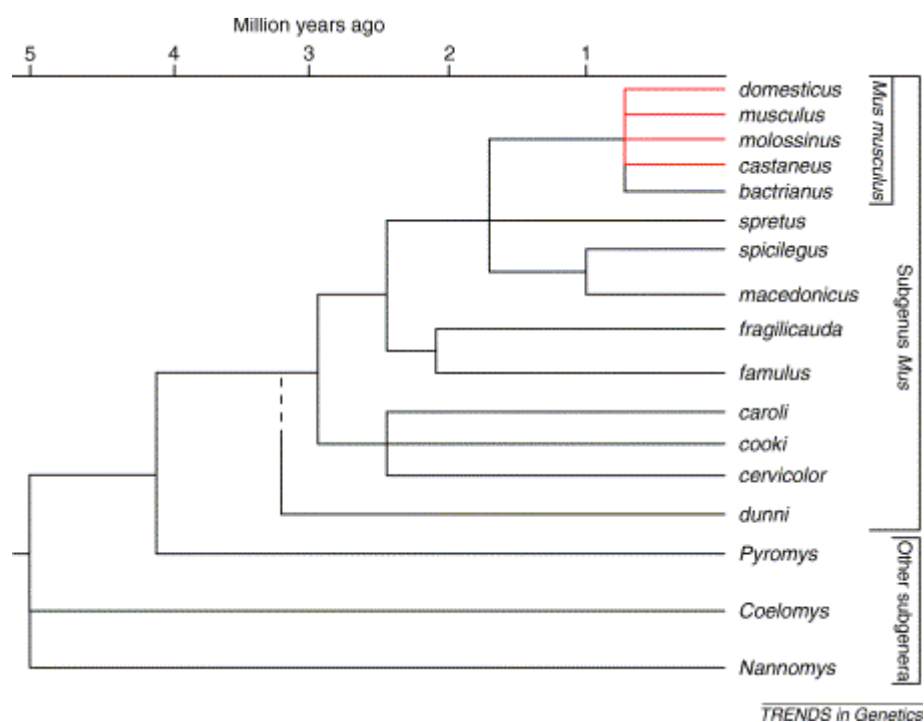
Nejistý je status taxonu *Mus musculus molossinus*, který většinou není uváděn jako poddruh, tento taxon se vyskytuje v Japonsku a vznikl hybridizací *M. m. castaneus* a *M. m. musculus* (YONEKAWA *et al.*, 1988)

Několik dalších blízkých příbuzných taxonů jsou řazeny jako samostatné druhy (WILSON & REEDER, 2005):

- |  |                |
|--|----------------|
| ▪ <i>Mus spretus</i> Lataste, 1883           | myš střeozemní |
| ▪ <i>Mus spicilegus</i> Petényi, 1882        | myš panonská   |
| ▪ <i>Mus macedonicus</i> Perov & Ruzič, 1983 | myš makedonská |

Počet druhů rodu *Mus* je podstatně větší, zde jsou vyjmenovány jen nejvýznamnější evropské druhy, kde je situace poměrně dobře prozkoumána. Morfologicky se tyto druhy liší minimálně, a tak byl dokonce v roce 2006 v Evropě popsán zcela nový druh myši objevený na Kypru – *Mus cypriacus* Cucchi *et al.*, 2006, vyskytující se na tomto ostrově sympatricky s myší domácí (BONHOMME *et al.*, 2004). Níže (Obr. 1) je znázorněn fylogenetický strom rodu *Mus*, z kterého lze vyčíst míru příbuznosti mezi jednotlivými taxony.

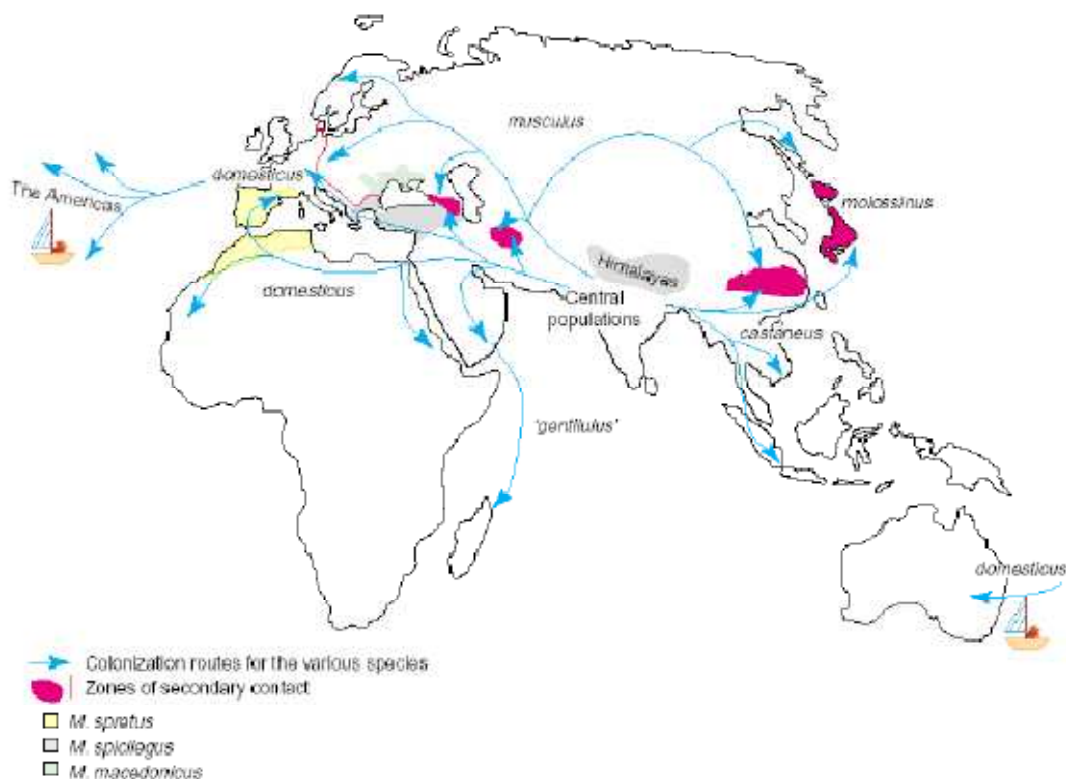
Obr. 1 – Fylogeneze rodu *Mus* (GUENET & BONHOMME, 2003)



Myš domácí (*Mus musculus*) a několik dalších příbuzných druhů se někdy označují jako „*Mus musculus* superspecies“. Termín superspecies se používá pro zahrnutí dvou a více blízce příbuzných druhů taxonů s parapatrickým typem rozšíření (parapatrické rozšíření je stav, kdy se blízce příbuzné druhy vyskytují společně jen na části areálu, jde např. o jejich styk na hybridní zóně).

Druh *Mus spretus* obývá nejzápadnější část evropského kontinentu (Francie a Pyrenejský poloostrov) a severní pobřeží Afriky. *Mus spicilegus* se vyskytuje ve východní Evropě (oblast Panonské nížiny) a druh *Mus macedonicus* na Balkáně a v Turecku. Myš domácí je rozšířena prakticky kosmopolitně – poddruh *Mus musculus castaneus* se vyskytuje v jihovýchodní a východní Asii, *M. m. musculus* obývá střední a východní Evropu a velkou část Asie a *M. m. domesticus* je rozšířený v jižní Asii, jižní a západní Evropě a kolonizoval i Afriku, Ameriku a Austrálii (GUENET & BONHOMME, 2003).

Obr. 2 – Schéma rozšíření a kolonizace poddruhů myši domácí a příbuzných druhů rodu *Mus* (GUENET & BONHOMME, 2003).



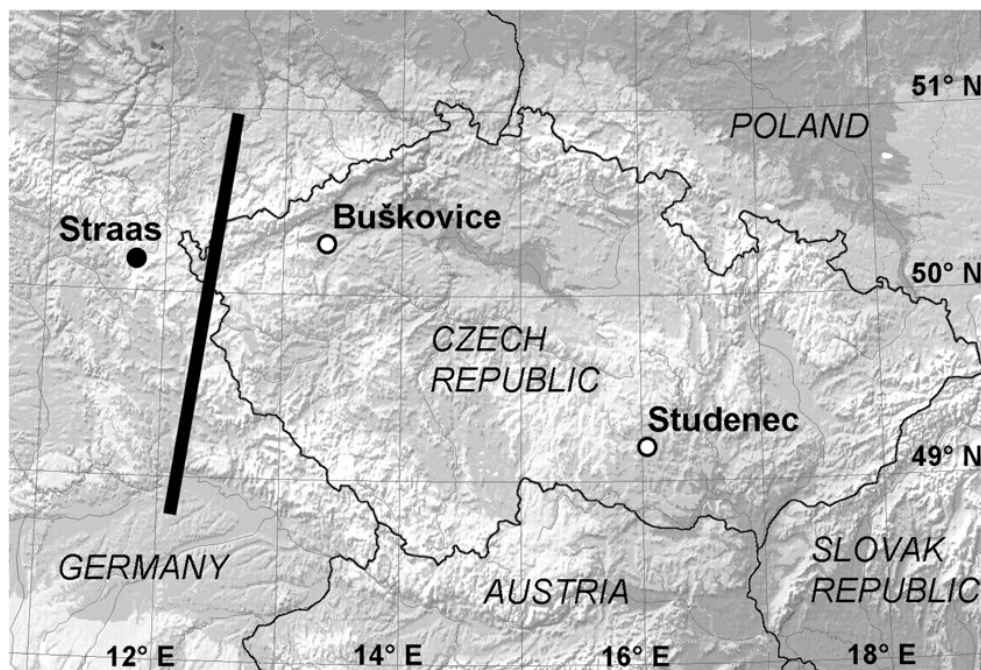
Poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se oddělily od společného předka zhruba před 350 000 až 1 000 000 let (SHE *et al.*, 1990; SILVER, 1995), jejich původ je v oblasti jižní Asie. Jak se tyto taxony šířily, vznikly na některých místech sekundární hybridní zóny, kde došlo k opětovnému styku dvou oddělených taxonů. V Evropě existuje hybridní zóna, která prochází většinou kontinentu, přičemž odděluje oba poddruhy – *M. m. domesticus* se vyskytuje na západě a jihu kontinentu (včetně Ašského výběžku v České republice), zatímco *M. m. musculus* obývá střední a východní Evropu, přičemž hybridní zóna (Obr. 3) probíhá Dánskem (Jutský poloostrov), přes střední Evropu, podél pobřeží Středozemního moře až k pobřeží Černého moře (BOURSOT *et al.*, 1993, MACHOLÁN *et al.*, 2003). Šířku hybridní zóny lze stanovit pomocí klinů, tzv. genetický klin (genoklin) je geografickým gradientem ve frekvenci zastoupení dvou alel (např. od východu na západ se bude zvětšovat frekvence alely A a současně klesat frekvence alely B). Šířka hybridní zóny nebude pro všechny geny stejná, například geny přispívající k reprodukční izolaci budou mít výraznější sklon klinu (a k introgresi bude

tedy docházet na menší vzdálenosti) než geny bez vlivu na reprodukční izolaci (HUNT & SELANDER, 1973; HARRISON, 1990). TEETER *et al.* (2008) zjistila pravděpodobnou asymetrickou introgresi v hybridní zóně, přičemž výsledky analýzy klinální variability ukázaly, že genový tok z *M. m. domesticus* do *M. m. musculus* je větší než tok opačný. Tato asymetrie je zřejmě způsobena i faktem, že samci poddruhu *M. m. domesticus* jsou agresivnější a dominují nad samci poddruhu *M. m. musculus* (THUESEN, 1977). MACHOLÁN *et al.* (2007) sledoval klinální variabilitu v hybridní zóně na 1800 vzorcích a zjistil průměrnou šířku klinů autozomálních lokusů 9,6 km a průměrnou šířku klinů na chromozom X vázaných lokusů 4,6 km.

Obr. 3 – Mapa hybridní zóny poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* v Evropě (MACHOLÁN *et al.*, 2008)



Obr. 4 – Znáznornění pozice hybridní zóny (pomocí černé linie) mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* na území České republiky (PIÁLEK *et al.*, 2008)

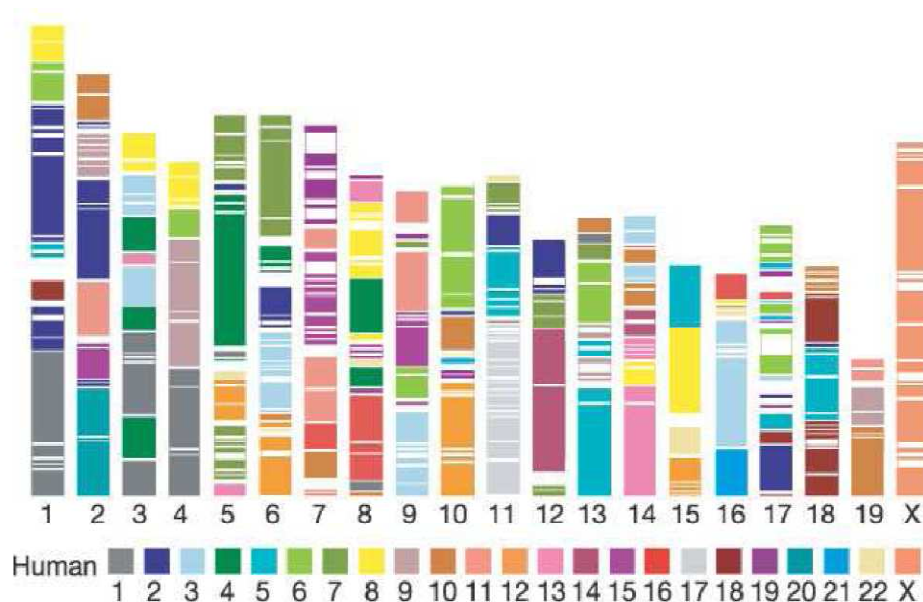


## 2.2 MYŠÍ LABORATORNÍ KMENY

Myš je ideálním savčím modelovým organismem pro genetická studia. Její relativně malá velikost, velký počet generací během roku a vysoký počet potomků v jednom vrhu tvoří ideální kombinaci pro umělý chov. V roce 2002 byla zveřejněna téměř kompletní („draft“) sekvence myšního genomu, přičemž sekvenovaným kmenem byl laboratorní kmen C57BL/6J (MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2002), díky které víme, že myší genom je velký asi 2,5 Gbp, což je o něco méně než u člověka (myš má v genomu také méně párů chromozomů – 20 párů oproti 23 párům chromozomů u člověka). Zhruba 99 % myších genů má svoji obdobu v lidském genomu (tzv. ortology), což umožňuje využít myš i jako modelový organismus pro studium lidských chorob (COPELAND *et al.*, 1993). V roce 1981 byly poprvé vypěstovány myší embryonální kmenové buňky, izolované za stádia blastocysty (EVANS & KAUFMAN, 1981). U myši jsou dále dostupné tzv. „knock-out“ technologie, pomocí kterých můžeme vyřadit z funkce libovolný gen, a to trvale („knock-out“) nebo jen dočasným způsobem v určité tkáni („conditional knock-out“). Toto vyřazení („knock-outování“) genu nám poskytne informaci o jeho funkci. Klasické laboratorní kmeny jako C57BL/6J jsou odvozeny

převážně od poddruhu *M. m. domesticus*, obsahují však i příměsi poddruhů *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* (WADE *et al.*, 2002). GREENE *et al.* (2000) dokonce zjistil v laboratorním kmeni C57BL/KsJ (odvozený převážně od poddruhu *M. m. domesticus*) sekvenci unikátní pro *Mus spretus*.

**Obr. 5 – Znázornění podobnosti myšího a lidského genomu: cytogenetické vyznačení homologních oblastí lidského genomu na 20 myších chromozomech (MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2002)**



Typů myších laboratorních kmenů je více (inbrední kmeny, konsomické kmeny, rekombinantně inbrední kmeny, kongenní kmeny aj.), níže jsou popsány jen ty, které se nějakým způsobem vztahují k této experimentální práci:

**Inbrední kmen** – jde o kmen, který je homozygotní ve všech lokusech na celém genomu, na rozdíl od kmene outbredního. Inbrední kmen získáme opakovaným mnohonásobným křížením typu bratr x sestra, kdy od F1 generace plynule roste homozygotita a klesá podíl lokusů s heterozygotní výbavou. Zhruba od dvacáté generace takto křížených jedinců se kmen považuje za inbrední. Inbrední kmen je velmi důležitý pro genetické analýzy, pro opakování a potvrzení řady pokusů je nutné vědět, zda se použítá zvířata liší ve svém genomu. Nicméně i zvířata pocházející ze stejného

inbredního kmene se mohou lišit, protože nelze eliminovat vznik spontánních mutací, z nichž některé se mohou zafixovat v různých chovech.

**Konsomický kmen (=chromozomálně substituční kmen)** – jde o kmen odvozený od dvou inbredních kmenů, kdy na genetické pozadí jednoho (recipientní kmen) je přenesen pár chromozomů pocházející z kmene druhého (dárcovský kmen), např. C57BL/J6-Chr17<sup>PWD</sup> znamená konsomický kmen, kdy na pozadí kmene C67BL/6J byl přenesen chromozom 17 z kmene PWD. Přípravu myších konsomických kmenů podrobně popisují GREGOROVÁ *et al.* (2008).

### 2.3 KŘÍŽENÍ A HYBRIDNÍ STERILITA

Pokud dojde v přírodním prostředí ke styku příbuzných, ale delší dobu vzájemně izolovaných populací (náležících původně ke stejnému taxonu), mohou se projevit díky nashromážděným a zafixovaným mutacím různé reprodukčně izolační mechanismy. Přítomnost nebo nepřítomnost těchto mechanismů určuje, jak se budou vzájemně jedinci obou populací chovat. Pokud je (například v důsledku relativně dlouhé vzájemné izolace) genetická odlišnost obou populací natolik velká, že úspěšné vzájemné křížení není možné, chovají se obě populace jako alopaticky vzniklé samostatné druhy. Jedná se o tzv. Mayrovu definici druhu (MAYR, 1942), která říká, že druh není pouze společenstvím morfologicky podobných jedinců, ale je tvořen těmi jedinci, kteří se mohou křížit mezi sebou navzájem. Tato definice druhu je nejpoužívanější a nejvýstižnější, i když z ní existuje řada výjimek.

Pokud ke křížení dochází, ale hybridy z těchto křížení mají sníženou fitness (ať už vitalitu nebo fertilitu), selekční tlak působí proti těmto hybridům a obě dílčí populace obvykle považujeme za odlišné poddruhy (s potenciálem pozdějšího rozštěpení na samostatné druhy). Pokud se nevytvoří dostatečná izolační bariéra, hybridy nejsou nijak postiženi, jedná se pak pouze o propojení dvou různých populací do populace jediné. Situace mnohdy není jednoznačná a stanovení, jestli jde už o druhy nebo ještě o poddruhy je často komplikované. Existují například tzv. „ring species“, což je fenomén, kdy se navzájem kříží sousední populace příbuzných druhů, ale okrajové populace jsou reprodukčně izolované (např. – IRWIN *et al.*, 2001). Pak nastane situace, kdy se např.



kříží druhy A a B, B a C, ale druhy A a C se nekříží. Z Mayrovy definice druhu existují i další výjimky.

Stav v F1 generaci vzniklé křížením dvou různých taxonů popisuje tzv. Dobzhanského-Mullerův model (DOBZHANSKY, 1937). Tento dnes široce akceptovaný model předpokládá nekompatibilitu mezi mutačně pozměněnými alelami genů, které se zafixovaly v obou populacích. Uvažujeme například situaci, kdy na jeden fenotypový znak (důležitý třeba pro přežití jedince) je třeba společného působení dvou genů s původními alelami A a B v populaci, kdy ještě nedošlo k oddělení. Při vzájemné izolaci na dvě dílčí subpopulace došlo vlivem mutací a genetického driftu v jedné populaci k fixaci „nové“ alely A\* a v druhé populaci k fixaci nové alely B\*. Kombinace A\*/B a A/B\* budou dávat obdobný výsledek jako kombinace původní, protože budou pod vlivem selekčního tlaku. Pokud ale dojde ke křížení obou taxonů a náhodnou segregací vznikne kombinace A\*/B\*, která nikdy nebyla pod vlivem selekce, může se tato kombinace ukázat neživotaschopnou nebo sterilní.

Reprodukčně izolační mechanismy se obecně dělí na prezygotické a postzygotické, v závislosti na tom, zda k nim dochází už před vznikem zygoty, nebo až po něm. Mezi prezygotické izolační mechanismy patří např. nekompatibilita vajíčka a spermie (a tím nemožnost oplodnění), posun doby výskytu během roku (typické u hmyzu – jedinci jedné populace se vyskytují během roku dříve než jedinci druhé populace, jejich výskyt se nepřekrývá, imaga se nemohou potkat, a tedy ani křížit), odlišnost feromonů (u hmyzu), hlasové projevy (typické u ptáků – odlišné hlasové vábení samců opět neumožní vzájemné křížení) aj. Mezi postzygotické izolační mechanismy patří neživotaschopnost zygoty a mortalita nebo sterilita hybridů F1 generace, případně mortalita nebo sterilita hybridů F2.

Hybridní sterilita se řídí tzv. Haldaneovým pravidlem (HALDANE, 1922), podle kterého více trpí hybridní sterilitou heterogametické pohlaví – tedy např. samci savců (XY pohlavní sada chromozom) nebo třeba samičky ptáků (ZW pohlavní sada chromozomů). Tzv. Mullerova teorie (MULLER, 1940) vysvětluje tento fenomén vznikem recesivních mutací vázaných na X chromozom, které mohou poškodit heterogametické pohlaví, ale nikoliv pohlaví homogametické, kde se recesivní mutace na chromozomu X nemůže projevit, vždy bude potlačena dominantní alelou na druhém chromozomu X.

## 2.4 GENY HYBRIDNÍ STERILITY U MYŠI DOMÁČÍ

Rozlišujeme hybridní sterilitu chromozomální, způsobenou strukturními nehomologiemi mezi homologními chromozomy rodičů a sterilitu genovou, která je způsobena interakcemi mezi odpovědnými geny (FOREJT & IVÁNYI, 1974).

### 2.4.1 CHROMOZOM 17: *Prdm9*

První nalezený gen odpovědný za hybridní sterilitu byl popsán u myši a označen jako *Hst1* (= název odvozen z anglického hybrid sterility 1) a namapován na chromozom 17 (FOREJT & IVÁNYI, 1974). Tento gen byl nalezen při křížení příbuzných myších poddruhů *M. m. musculus* a laboratorním inbredním kmenem B6 (převážně původem z *M. m. domesticus*), chromozomy sterilních samců z tohoto křížení byly sledovány cytogeneticky, nebyly nalezeny žádné strukturní nehomologie, z toho bylo usouzeno, že jde o čistě genový typ sterility. U genu *Hst1* byly definovány 2 alely, „sterilní“ - *Hst1<sup>s</sup>* a „fertilní“ - *Hst1<sup>f</sup>*. Zatímco většina klasických laboratorních myších kmenů odvozených od poddruhu *M. m. domesticus* má *Hst1<sup>s</sup>* alelu, u některých, například u kmene C3H/DiSnPh byla zjištěna alela *Hst1<sup>f</sup>* (FOREJT, 1996). Myši poddruhu *M. m. musculus* a od nich odvozené laboratorní kmeny, mají rovněž gen hybridní sterility, označený jako *Hst<sup>w</sup>*, který je polymorfní – byla zjištěna fertilní *Hst<sup>wf</sup>* alela a sterilní *Hst<sup>ws</sup>* alela. Lokus *Hst<sup>w</sup>* nemusí být nutně identický s lokusem *Hst1*, nicméně byl také mapován na 17. chromozom a to do stejné oblasti, kde se nachází *Hst1* (FOREJT, 1996). Sterilní fenotyp dostaneme, pokud křížíme laboratorní kmen nesoucí *Hst1<sup>s</sup>* alelu s kmeny odvozených *M. m. musculus*, získáme kombinaci *Hst<sup>ws</sup>/Hst1<sup>s</sup>*, všechny ostatní kombinace jsou plně fertilní (FOREJT, 1996; FOREJT & IVÁNYI, 1974).

Pomocí série genetických mapování a haplotypových analýz (FOREJT *et al.*, 1991; GREGOROVÁ *et al.*, 1996; TRACHTULEC *et al.*, 2005; 2008) byl gen *Hst1* lokalizován na 255 kb dlouhý úsek na chromozomu 17, kde se nacházelo celkem 6 kandidátních genů (*Dll1*, *Pgcc1*, *Psmbl*, *Tbp*, *Pdcd2* a *Prdm9*). Těchto 6 kandidátních genů bylo postupně testováno zkoumáním jejich schopnosti zvrátit fenotyp hybridní sterility jejich přenesením z kmene s fertilní alelou *Hst1<sup>f</sup>* (C3H) na kmen se sterilní alelou *Hst1<sup>s</sup>* (B6), za použití transgeneze pomocí 4 překrývajících se bakteriálních arteficiálních chromozomů (BAC), které byly transfekovány do embryonálních kmenových buněk jedinců F1 generace z křížení kmenů 129J a B6 (oba tyto kmeny jsou

převážně *M. m. domesticus* původu). Z výsledků křížení pomocí BAC transgenů vyplynulo zúžení oblasti kandidátního genu na úsek 15,9 kb obsahujících 5' konec genu *Prdm9* (MIHOLA *et al.*, 2009). Předchozí výsledky sekvenční analýzy genů *Dll1*, *Pgcl1*, *Psmbl1*, *Tbp* a *Pdcd2* navíc ukázaly, že tyto geny jsou nepravděpodobnými kandidáty na gen hybridní sterility (MIHOLA *et al.*, 2007; TRACHTULEC *et al.*, 2008). Pro naprosto jednoznačné vyloučení těchto genů byl klíčový BAC, označený jako BAC 21, který nedokázal zvrátit fenotyp hybridní sterility. Pro potvrzení tohoto objevu byly použity analýzy transgenní linie BAC 21, které vyloučily, že by došlo k umlčení genů obsažených v tomto BACu v jeho integračním místě (MIHOLA *et al.*, 2009). Byly tedy vyloučeny všechny geny, až na *Prdm9*, který se tak stal prvním známým genem, který způsobuje hybridní sterilitu u savců.

VYSKOČILOVÁ *et al.* (2009) pokusně křížila laboratorní kmen B10 (převážně původu *M. m. domesticus*) s dvěma nedávno ustanovenými laboratorními kmeny získanými z divokých myší poddruhu *M. m. musculus*, a to STUF a STUS (jejich přípravu popisuje PIÁLEK *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že při křížení samce kmene STUF (**Stu**denec **f**ertile) se samicí kmene B10 jsou F1 hybridi plně fertilní, zatímco při křížení kmene STUS (**Stu**denec **s**terile) jsou F1 hybridi bez výjimky sterilní. Bylo provedeno pokusné křížení samic (STUS x STUF) s C57BL/10 samci, přičemž část samců byla sterilní (snížený počet spermií a nízká váha testes). Následná QTL analýza, která potvrdila vliv proximální části chromozomu 17. To znamená, že polymorfismus na lokusu *Hst<sup>W</sup>* existuje i v divokých populacích, přičemž polymorfismus na lokusu *Hst1* a *Hst<sup>W</sup>* (tyto lokusy nemusí být nutně identické, viz výše) se vyvinul nezávisle na sobě (VYSKOČILOVÁ *et al.*, 2009).

*Prdm9* (označovaný také jako *Meisetz*) je gen exprimovaný v průběhu meiózy, který kóduje enzym histon-H3-lysin-4-trimethyltransferázu, jejíž funkcí je trimethylace histonu H3, který je dimethylovaný na lysinu 4 (HAYASHI *et al.*, 2005). Jedná se o epigenetickou modifikaci histonu H3, pomocí které gen *Prdm9* aktivuje jiné geny, potřebné k úspěšnému průběhu meiózy (HAYASHI & MATSUI, 2006). Vyřazení („knock-out“) tohoto genu způsobuje u myší zástavu spermatogeneze a oogeneze ve stádiu primárních spermatocytů, tj. ve svém důsledku azoospermii (HAYASHI *et al.*, 2005). PARVANOV *et al.* (2010) prokázal, že gen *Prdm9* je zároveň genem, který kontroluje aktivaci rekombinačních hotspotů u savců (rekombinační hotspot = oblast

genomu, s velmi častým výskytem rekombinací), k podobnému zjištění souběžně dospěli BAUDAT *et al.* (2010).

Gen *Prdm9* je jedním z myších genů, jejichž analoga můžeme nalézt i v lidském genomu. Také tento gen má pravděpodobně vliv na sterilitu – MIYAMOTO *et al.* (2008) zjistil, že u pacientů s azoospermií (absence spermatozoí ve spermatu) byly v genu *Prdm9* jednoduché nukleotidové substituce, označené jako SNP2 a SNP3, zastoupené signifikantně více než u zdravé kontrolní skupiny. Podobně IRIE *et al.* (2009) zjistil asociaci některých nesynonymních SNP mutací v genu *Prdm9* s lidskou azoospermií. Je překvapující, že v žádné z těchto studií nebyli sledováni příbuzní lidí postižených azoospermií, protože z těchto výzkumů by bylo možné vyvodit, zda jde o důsledek dědičné nebo *de novo* vzniklé mutace.

#### 2.4.2 CHROMOZOM X: *Hstx2* A *Hstx1*

Role chromozomu X ve fenoménu hybridní sterility logicky odpovídá jak Haldaneovu pravidlu, tak Mullerově teorii (viz Kapitola 2.3). Jestliže je hybridní sterilita u heterogametického pohlaví vysvětlena pomocí recesivních mutací na nepárovém pohlavním chromozomu, je logickým závěrem, že na chromozomu X by měl ležet gen (nebo více genů) odpovědných za hybridní sterilitu. GUENET *et al.* (1990) potvrdil tento předpoklad zpětným křížením ((B6 x *Mus spretus*) x B6), kdy se jeden z několika identifikovaných segregujících lokusů hybridní sterility nacházel právě na chromozomu X. K oddělení *Mus spretus* a *Mus musculus* došlo však už před třemi miliony let (SILVER, 1995), tedy podstatně dříve než k oddělení poddruhů *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*, proto nemohou být poznatky zjištěné křížením *Mus musculus* (B6 kmen) a *Mus spretus* automaticky přenositelné na fenotyp hybridní sterility získané křížením mezi laboratorními kmeny druhu *Mus musculus*.

STORCHOVÁ *et al.* (2004) prokázala, že přenesením chromozomu X z laboratorního kmene PWD na genetické pozadí kmene B6 (tj. vytvořením konsomického kmene B6-X<sup>PWD</sup>) lze získat sterilní samce. Tato sterilita byla asociována se sníženou váhou testes, morfologickými abnormalitami hlaviček spermií a sníženým počtem spermií – lišila se tedy od sterility F1 hybridů z křížení PWD x B6, kteří nemají žádné spermie (GREGOROVÁ & FOREJT, 2000). QTL analýza několika

fenotypových znaků asociovaných s hybridní sterilitou nasvědčuje pravděpodobnému oligogennímu charakteru této „X-vázané“ sterility. Lokus zodpovědný za samčí sterilitu (obsahující PWD alelu genu označeného jako *Hstx1* – z anglického hybrid sterility x) byl mapován do blízkosti DXMit119 markeru v centrální části X chromozomu, pro zajištění úplné sterility byla ale nutná podpora PWD alely na nejméně jednom dalším lokusu v proximální a (nebo) v distální části chromozomu X (STORCHOVÁ *et al.*, 2004). V této studii byla sterilita myší navíc testována pomocí 2-3 měsíce trvajících pokusného připuštění 2-6 týdnů starých samců se samicemi kmene BALB/C, což umožnilo jasnější určení sterilních a fertálních myší, než pouze sledování počtu spermií, kdy je v některých hraničních situacích obtížné stanovit, zda jde o sterilního nebo fertálního jedince.

BHATTACHARYYA *et al.* (osobní sdělení) za použití křížení samic kmene PWD a subkonsomických samců C57BL/6J-X<sup>PWD</sup>, C57BL/6J-Xp<sup>PWD</sup> (=proximální část chromozomu X je PWD původu), C57BL/6J-Xm<sup>PWD</sup> (=mediální část chromozomu X je PWD původu) a C57BL/6J-Xd<sup>PWD</sup> (=distální část chromozomu X je PWD původu) našel na chromozomu X lokus odpovědný za zástavu spermatogeneze v pachytenní fázi, přičemž tento lokus (4,5 Mbp), označený jako *Hstx2*, mapuje do stejného místa jako *Hstx1* (STORCHOVÁ, *et al.*, 2004), ale nemusí být nutně identický. *Hstx2* lokus je nezbytný pro fenotyp hybridní sterility u samců F1 generace z křížení PWD x B6, nicméně jen tento gen není dostačující.

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

##### 3.1.1.1 LABORATORNÍ KMEN C57BL/6J

Laboratorní kmen C57BL/6J patří mezi klasické kmeny laboratorních myší, u kterých je většina genomu původu *M. m. domesticus*, a protože v době, kdy byl tento kmen ustanoven, ještě nebyly známy informace o výskytu více myších poddruhů, obsahuje i příměsi dalších poddruhů – *M. m. musculus* a pravděpodobně i *M. m. castaneus* (WADE *et al.*, 2002). YANG *et al.* (2007) podrobnou genetickou analýzou pomocí SNP markerů zjistili, že zhruba 92% genomu tohoto kmene je tvořeno genomem *M. m. domesticus*, zbylých 8% tvoří příměsi.

Obr. 6 – Laboratorní kmen C57BL/6J (foto prof. Radislav Sedláček)



### 3.1.1.2 LABORATORNÍ KMEN PWD/PH

Laboratorní kmen PWD/Ph je vytvořen ze zvířat chycených v minulosti na území České republiky (Ph = Praha), a pocházejících z poddruhu *M. m. musculus*. Společně s příbuzným kmenem PWK/Ph se od klasických laboratorních kmenů původu *M. m. domesticus* (např. C57BL/6J) liší v řadě komplexních fenotypových znaků, jako je váha těla nebo chování (podrobně GREGOROVÁ & FOREJT, 2000). Oproti laboratornímu kmeni C57BL6/J jsou zvířata z tohoto kmene hnědě zbarvená, mají menší váhu těla, menší váhu testes i nižší počet spermií.

Obr. 7 – Laboratorní kmen PWD/Ph (foto prof. Jiří Forejt)



### 3.1.2 CHEMIKÁLIE

#### Chemikálie na PCR

- |   |           |
|---|-----------|
| ▪ 100mM dNTP  | Fermentas |
| ▪ 25 mM MgCl <sub>2</sub>                                 | Fermentas |
| ▪ 10x reakční pufr s obsahem Mg <sup>2+</sup>             | Fermentas |
| ▪ 10x reakční pufr s obsahem NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | Fermentas |
| ▪ Taq polymeráza  | *         |
| • mQ H <sub>2</sub> O                                     |           |

\*Klonovaná Taq polymeráza byla připravována z transformovaných bakterií *E. coli* v laboratoři Myši molekulární genetiky.

#### Chemikálie na elektroforézu

- |                          |       |
|--------------------------|-------|
| ▪ Agaróza                | SERVA |
| ▪ EtBr (ethidium bromid) | SIGMA |
| ▪ TBE pufr               | *     |
| ▪ Orange-G pufr          | *     |

\*Viz níže (Příprava pufrů)

#### Chemikálie na izolaci DNA

- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| ▪ NaOH (hydroxid sodný) | PENTA |
| ▪ TRIS base             | ROTH  |



### Příprava roztoků

<b>TBE (1 liter):</b>	TRIS	216 g	SERVA
	Kyselina boritá	130 g	
	0,5M EDTA	80 ml	
	H <sub>2</sub> O	doplnit do 1 litru	

<b>Orange-G pufr (50 ml):</b>	ORANGE G	187 mg	SIGMA
	30% glycerol	40 ml	PENTA
	mQ H <sub>2</sub> O	doplnit do 50 ml	

### 3.1.3 PŘÍSTROJE

- centrifuga **Mikro 22R** HETTICH
- elektrof. přístroj **Electrophoresis Power Supply EPS 601** BIOTECH
- mikrovlnná trouba CLATRONIC
- prohlížeč a analyzátor gelů **GeneGenius** SYNGENE
- světelný mikroskop **Eclipse E-200** NIKON
- termostat **Hybridiser HB-1D** TECHNO
- laboratorní váhy **AE 163** METTLER
- laboratorní váhy **EG600-2M** KERN
- termocyklér **DNA Engine Tetrad 2** BIOTECH

## **3.2 METODY**

### **3.2.1 ZÁKLADNÍ SCHEMA EXPERIMENTU**

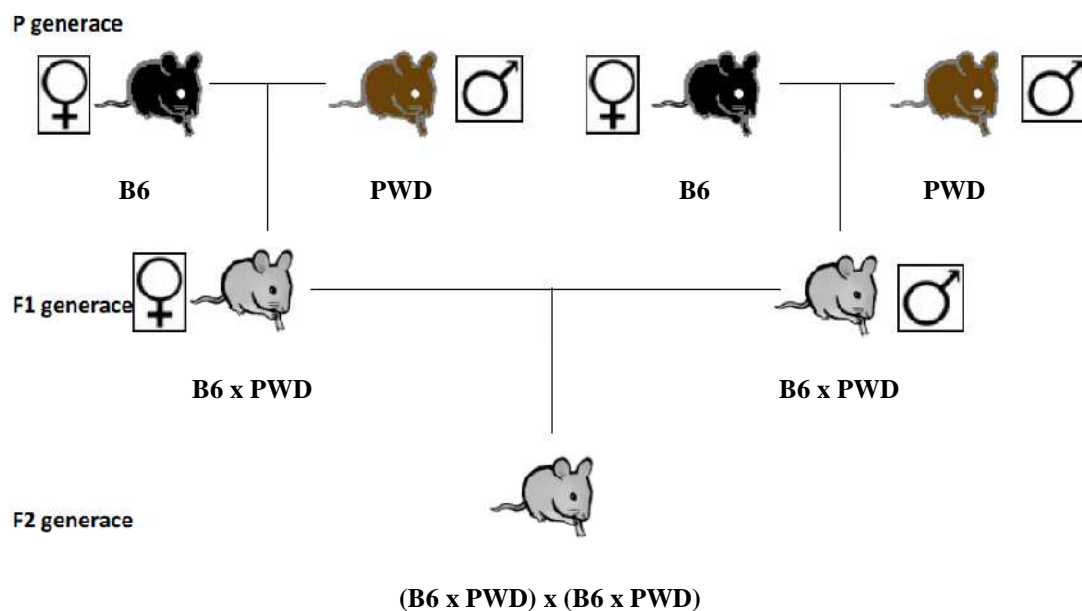
- Příprava F2 generace z křížení myších laboratorních kmenů C57/BL6J a PWD/Ph
- Výběr samců z této generace, jejich usmrcení, pitva a měření vybraných znaků (váha těla, váha testes, počet spermií)
- Izolace celkové DNA z usmrcených zvířat
- Genotypizace zvířat s použitím vhodně vybraných mikrosatelitových markerů
- QTL analýza zpracovaná v statistickém programu R
- Další postup v závislosti na získaných výsledcích

### **3.2.2 PŘÍPRAVA F2 GENERACE KŘÍŽENÍM KMENŮ B6 A PWD**

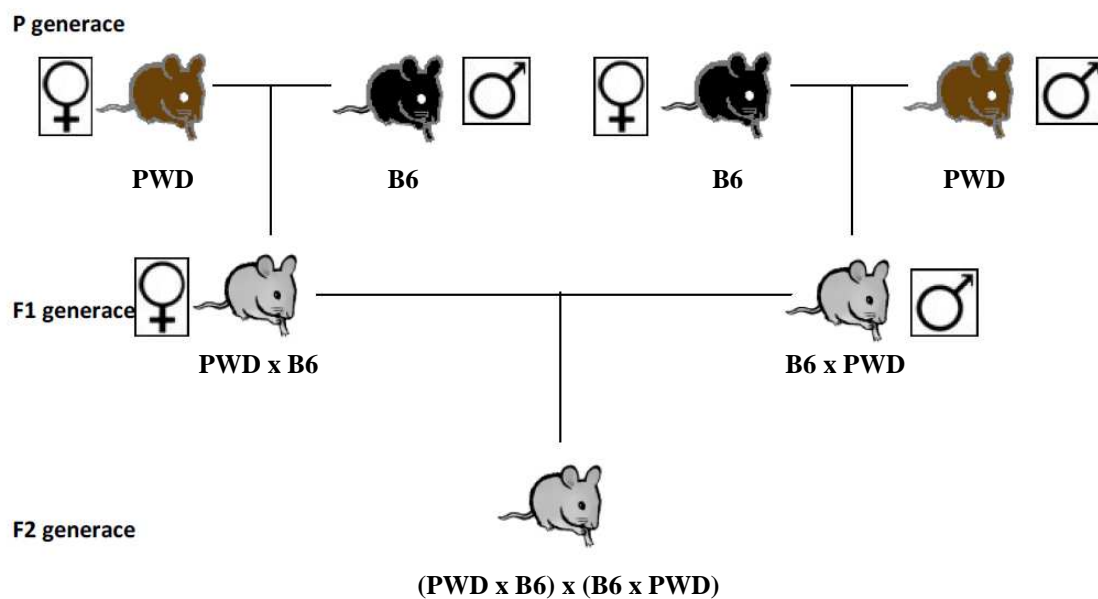
K získání F2 hybridů bylo použito křížení dvou laboratorních kmenů – B6 a PWD (podrobné informace o těchto kmenech viz kapitoly 3.1.1.1 a 3.1.1.2)

V parentální generaci jsou teoreticky možné dva typy křížení – buď křížení samice kmene PWD a samce kmene B6, nebo křížení samice kmene B6 a samce kmene PWD. Všichni samci z křížení samice kmene PWD a samce kmene B6 jsou sterilní, proto tato zvířata nelze použít a proto je třeba v křížení potomků z F1 generace použít jen samce vzniklé křížením samic kmene B6 a samců kmene PWD. Nicméně samice v F1 generaci jsou plodné v obou případech, ve svém křížení jsem použil oba typy samic.

Obr. 8 – Křížení zvířat s použitím (B6 x PWD) samic v F1 generaci



Obr. 9 – Křížení zvířat s použitím (PWD x B6) samic v F1 generaci



Příprava F2 generace je časově náročná – standardní doba délky březosti myši se pohybuje okolo 20 dní a myši lze připustit až ve věku kolem 1 měsíce. Jenom samotné získání F2 generace tak trvá od okamžiku připuštění jedinců v P generaci minimálně 70 dní, dalších 70 dní pak trvá než je možné se zvířaty manipulovat. Dílčím cílem bylo

získat minimálně 100 samců F2 generace (obecně pochopitelně platí čím více zvířat, tím statisticky průkaznější výsledky).

### **3.2.3 MĚŘENÍ VYBRANÝCH FENOTYPOVÝCH ZNAKŮ**

Hybridní sterilita velmi dobře koreluje s některými fenotypovými znaky (FOREJT & IVÁNYI, 1974; FOREJT *et al.*, 1991), proto byla u usmrcených zvířat měřena váha testes a počet spermií (= absolutní počet spermií v 1 ml roztoku PBS) pomocí počítání spermií v Bürkerově komůrce. Dalším znakem, který byl měřen, byla celková váha těla, ve snaze určit, jaký vliv má váha těla na váhu testes a pro stanovení tzv. relativní váhy testes (získáme ji, jestliže hodnotu váhy testes vydělíme váhou těla). Tyto kvantitativní znaky se samozřejmě mění s věkem, proto pro získání relevantních informací bylo třeba myši usmrtit a pitvat ve stejném věku, jako cílový věk bylo zvoleno 70 dní.

### **3.2.4 IZOLACE CELKOVÉ DNA**

DNA byla izolována z ocasu myší, podle standardizovaného protokolu byl na izolaci použit 2mm kus myšího ocasu (při větším množství je problém s balastními látkami, naopak při menším s nedostatečnou koncentrací DNA po izolaci). DNA byla izolována pomocí rozpouštění biologického materiálu v 50mM roztoku NaOH při teplotě 95 °C po dobu 90 minut, v laboratorní 96-jamkové destičce, na každou jamku bylo použito 600 µl NaOH. Poté byla provedena neutralizace pomocí 1M roztoku TRISu o pH = 8, přidáním 50 µl TRISu do každé jamky. Před vlastním použitím na PCR reakci byla získaná DNA ředěna 20x redestilovanou vodou (milliQ).

### **3.2.5 GENOTYPIZACE ZVÍŘAT**

Na určení genotypu použitých myší bylo vybráno 84 mikrosatelitových markerů (MIT markery), u kterých je známá odlišnost v délce fragmentu mezi oběma použitými laboratorními kmeny. Na každý chromozom bylo použito 3-5 markerů, s přihlédnutím k velikosti chromozomu, markery byly voleny tak, aby mezery mezi nimi ideálně

nebyly větší než 25 cM (podle MGI 2.96 rekombinační mapy, <http://www.informatics.jag.org>).

Obecně se MIT markery označují např. D17Mit19, kde D je zkratka z DNA (→ DNA marker), 17 je číslo myšího chromozomu, Mit je označení laboratoře (Massachusetts Institute of Technology) a 19 je vlastní číslo markeru, které je pro daný chromozom unikátní. Dále v textu jsou užity zkrácené symboly (např. D17-19) Sekvence použitých primerů ohraničujících markery – viz:

<https://mouse.mskcc.org/marker/MIT/query.php>

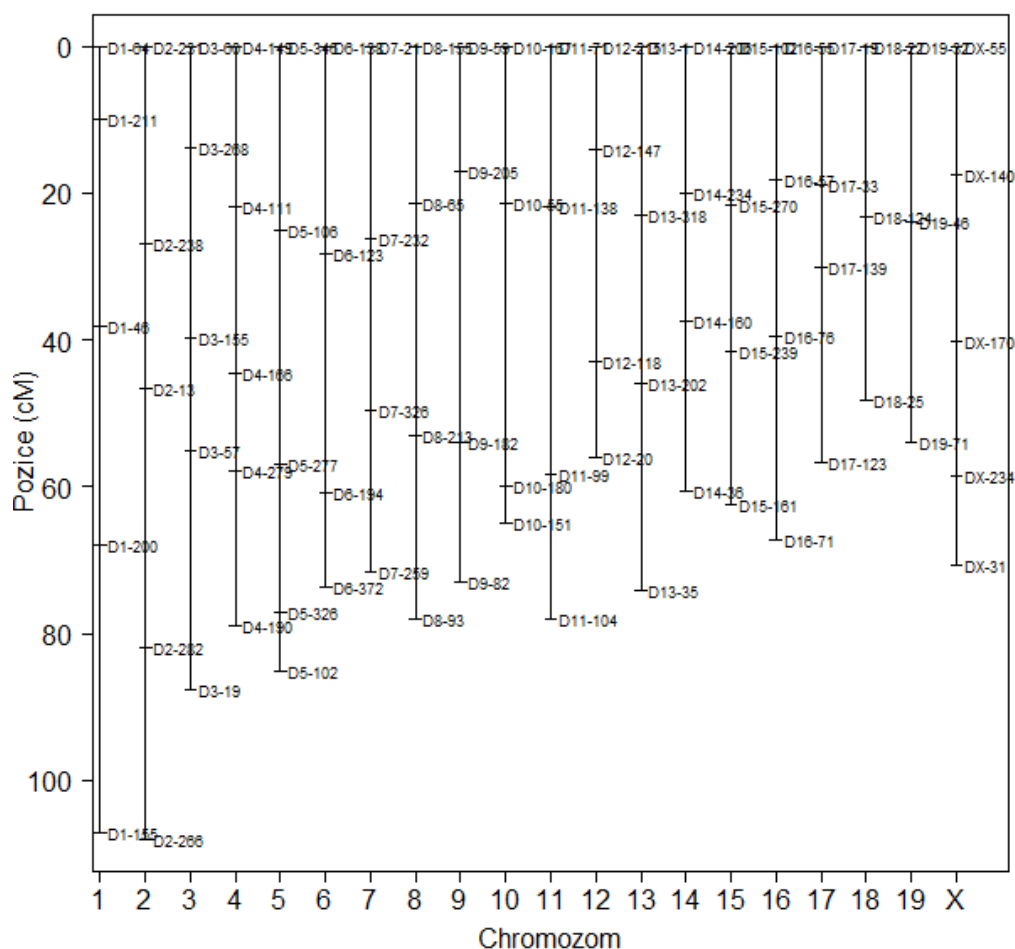
Standardními podmínkami, za kterých byly primery použity, se rozumí reakční směs bez amonných kationtů, teplota pro nasedání primerů (AT) 51 °C, 38 cyklů během PCR a použití 4% agarózového gelu při elektroforetickém dělení vzniklých fragmentů, odchylky od těchto podmínek jsou znázorněné v Tabulce 1 (viz níže). PCR reakce probíhala v cykléru za použití 7 µl roztoku DNA a 8 µl reakční směsi (složení reakční směsi viz Tabulka 2 a 3) na 1 jamku.

**Tabulka 1** – Přehled použitých markerů a odchylky od standardních podmínek (zkrácené názvy markerů)

Chromozom	Marker 1	Marker 2	Marker 3	Marker 4	Marker 5	Marker 6
1	D1-64	D1-211	D1-46	D1-200	D1-155 <b>5</b>	-
2	D2-231	D2-238	D2-13	D2-282	D2-266	-
3	D3-60	D3-268 <b>1</b>	D3-155	D3-57	D3-19 <b>1</b>	-
4	D4-149 <b>3,4,5</b>	D4-111	D4-166 <b>2,5</b>	D4-279	D4-190	-
5	D5-346	D5-106	D5-277	D5-326	D5-102	-
6	D6-138 <b>2,5</b>	D6-123	D6-194	D6-372	-	-
7	D7-21	D7-232	D7-326	D7-259	-	-
8	D8-155 <b>2,5</b>	D8-65	D8-213	D8-93	-	-
9	D9-59	D9-205	D9-182	D9-82	-	-
10	D10-167 <b>3,4,5</b>	D10-55	D10-180	D10-151 <b>2,5</b>	-	-
11	D11-71	D11-138	D11-99	D11-104	-	-
12	D12-215	D12-147	D12-118	D12-20	-	-
13	D13-1	D13-318	D13-202	D13-35	-	-
14	D14-206	D14-234	D14-160	D14-36	-	-
15	D15-102 <b>1</b>	D15-270	D15-239	D15-161	-	-
16	D16-55 <b>2,5</b>	D16-57 <b>2,5</b>	D16-76	D16-71	-	-
17	D17-19 <b>2,5</b>	D17-33	D17-139	D17-123	-	-
18	D18-22 <b>1</b>	D18-124	D18-25 <b>1</b>	-	-	-
19	D19-32	D19-46	D19-83 <b>2,5</b>	D19-71	-	-
X	DX-55	DX-81 <b>2,5</b>	DX-140	DX-170	DX-234	DX-31 <b>2,5</b>

**Legenda:** 1 = použití 4,5% agarózového gelu při elektroforéze, 2 = použita AT 51 °C, 3 = použita AT 53 °C, 4 = PCR zkrácena na 39 cyklů, 5 = použit reakční mix s amonnými ionty.

**Obr. 10 – Schéma rozložení použitých markerů na chromozomech**



**Tabulka 2 – Složení reakční směsi při standardní PCR**

Složka	Objem na 1 reakci
Taq polymeráza	0.11 $\mu$ l*
pufř s obsahem $MgCl_2$	2.03 $\mu$ l
mq $H_2O$	1.41 $\mu$ l*
dNTP	3.25 $\mu$ l

**Tabulka 3 – Složení reakční směsi při PCR za použití amonných iontů**

Složka	Objem na 1 reakci
Taq polymeráza	0.11 $\mu$ l*
pufř s obsahem $NH_4^+$	2.03 $\mu$ l
$MgCl_2$	1.22 $\mu$ l
mq $H_2O$	0.23 $\mu$ l*
dNTP	3.25 $\mu$ l

**\*Poznámka** – podle použité frakce Taq polymerázy bylo přidáváno mírně odlišné množství enzymu, podle toho se analogicky snižovalo nebo zvyšovalo množství mq H<sub>2</sub>O, aby celkový objem zůstal stejný.

PCR produkt byl následně elektroforeticky rozdělen v 4% (4,5%) agarózovém gelu, obarven pomocí ethidium bromidu (EtBr) a fotografován v UV transluminátoru. Pro odečtení vzorků byly použity pozitivní kontroly – PWD homozygot, B6 homozygot a B6/PWD heterozygot.

### **3.2.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT**

Na statistické zpracování dat, mj. QTL analýzu a analýzu mapy genových interakcí byl použit statistický program R, konkrétně jeho uživatelská verze 2.10.0, dostupná zdarma na stránkách výrobce programu:

<http://www.r-project.org/>

Na vlastní QTL analýzu byl použit uživatelský balíček „qtl“. Přesný postup a použité funkce při analýze a dalších výpočtech je popsán v kapitole Výsledky.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 MĚŘENÍ VYBRANÝCH FENOTYPOVÝCH ZNAKŮ

Hodnoty tělesných znaků (stav v okamžiku pitvy) byly sestaveny do tabulky, do tabulky byl zahrnut i věk zvířat. Datum pitvy bylo vybráno tak, aby se věk jednotlivých zvířat vzájemně lišil jen minimálně (70 dní +/- 5 dní).

Tabulka 4 – Přehled zvolených měřených znaků

N	Věk (dny)	Váha těla (g)	Testes (mg)	Počet spermií v 1 ml (v mil)	Genotyp matky
3576	70	20,46	160	22,68	B6 x PWD
3577	70	24,06	126	25,38	B6 x PWD
3578	70	22,89	117	8,37	B6 x PWD
3579	70	20,67	145	19,98	B6 x PWD
3638	68	20,12	132	29,16	B6 x PWD
3639	68	21,32	121	26,46	B6 x PWD
3640	68	24,85	97	15,66	B6 x PWD
3641	68	27,73	191	9,72	B6 x PWD
3642	68	21,1	109	19,17	B6 x PWD
3643	68	20,61	161	39,96	B6 x PWD
3644	68	25,15	165	38,34	B6 x PWD
3645	68	22,99	184	23,22	B6 x PWD
3646	68	23,23	171	33,48	B6 x PWD
3740	71	16,02	163	18,9	B6 x PWD
3741	71	21,3	130	22,68	B6 x PWD
3742	71	19,36	138	11,88	B6 x PWD
3743	71	17,75	132	12,96	B6 x PWD
3744	75	21,96	130	37,26	PWD x B6
3745	75	25,24	127	16,74	PWD x B6
3746	75	22,5	138	30,78	PWD x B6
3749	75	16,61	47	2,673	PWD x B6
3750	71	22,59	132	31,32	PWD x B6
3751	71	20,29	134	20,52	PWD x B6
3752	71	22,1	191	15,12	PWD x B6
3753	71	22,7	160	28,08	PWD x B6
3754	75	18,74	96	19,44	B6 x PWD
<b>3755</b>	<b>75</b>	<b>20,86</b>	<b>61</b>	<b>0,027</b>	<b>B6 x PWD</b>
3756	75	18,52	134	8,64	B6 x PWD
3757	75	16,67	132	28,62	B6 x PWD



3882	72	17,63	150	34,02	B6 x PWD
3883	72	21,88	174	55,62	B6 x PWD
3884	72	22,24	250	24,84	B6 x PWD
3885	72	19,35	145	17,28	B6 x PWD
3886	72	18,37	136	18,9	B6 x PWD
3887	72	15,9	72	5,049	B6 x PWD
3888	72	19,54	194	23,22	B6 x PWD
3889	70	21,51	162	22,14	B6 x PWD
3890	70	18,65	156	30,24	B6 x PWD
<b>3891</b>	<b>70</b>	<b>18,15</b>	<b>68</b>	<b>0,135</b>	<b>B6 x PWD</b>
3892	70	24,1	151	5,94	PWD x B6
3893	70	20,64	140	19,98	PWD x B6
3894	70	20,5	201	34,02	PWD x B6
3895	70	21,77	136	18,9	PWD x B6
3896	70	19,61	178	32,94	PWD x B6
3897	70	19,76	90	8,64	PWD x B6
3898	70	20,4	173	14,04	PWD x B6
3899	70	25,04	145	11,88	PWD x B6
3900	70	23,4	182	24,3	PWD x B6
3913	72	21,41	127	7,56	B6 x PWD
3914	72	20,96	156	26,46	B6 x PWD
3915	72	15,27	102	12,96	B6 x PWD
3916	72	17,6	90	8,1	B6 x PWD
3917	72	19,46	142	21,06	B6 x PWD
3918	72	18,78	212	24,84	B6 x PWD
3905	72	21,14	209	26,46	B6 x PWD
3906	72	19,36	130	11,88	B6 x PWD
3907	72	18,87	185	53,46	B6 x PWD
3908	72	21,56	192	83,7	B6 x PWD
3909	70	19,08	152	30,78	PWD x B6
3910	70	23,06	121	17,01	PWD x B6
3911	70	20,42	163	15,12	PWD x B6
3912	70	18,35	134	18,36	PWD x B6
3919	70	19,45	107	11,07	PWD x B6
3920	70	18,14	110	16,2	PWD x B6
3921	70	16,61	145	9,18	PWD x B6
3922	70	19,61	145	28,08	PWD x B6
3923	70	21,78	165	23,22	PWD x B6
4010	70	17,92	128	29,16	PWD x B6
4002	70	19,74	128	21,6	B6 x PWD
4003	70	18,5	131	10,26	B6 x PWD
4004	70	21,38	204	14,58	B6 x PWD
4005	70	25,36	212	36,72	B6 x PWD
4006	70	23,86	147	18,9	B6 x PWD
4007	70	18,63	168	8,64	B6 x PWD

4008	70	22,44	183	12,42	B6 x PWD
4009	70	26,41	201	53,46	B6 x PWD
4011	70	22,06	164	22,68	B6 x PWD
4012	70	21,32	160	37,8	B6 x PWD
4171	71	18,79	181	29,16	B6 x PWD
4172	71	17,85	132	20,52	B6 x PWD
4173	71	21,67	156	50,76	B6 x PWD
4174	71	23,94	150	35,64	B6 x PWD
4180	71	25,11	147	49,68	PWD x B6
4181	71	19,46	194	43,74	PWD x B6
4182	71	31,33	178	38,88	PWD x B6
4183	71	29,35	172	8,64	PWD x B6
<b>4184</b>	<b>71</b>	<b>19,56</b>	<b>75</b>	<b>0,378</b>	<b>PWD x B6</b>
4185	71	26,62	184	28,62	PWD x B6
4161	71	20,19	181	29,7	B6 x PWD
4163	71	21,27	135	19,44	PWD x B6
4164	71	18,36	85	15,66	PWD x B6
4175	71	18,81	139	30,78	PWD x B6
4176	71	16,19	126	26,46	PWD x B6
4177	71	17,99	102	21,33	PWD x B6
4178	71	19,95	95	14,04	PWD x B6
4179	71	19,47	176	22,68	PWD x B6
4186	71	23,46	146	43,2	PWD x B6
4187	71	21,17	161	18,9	PWD x B6
4188	71	19,76	197	50,22	PWD x B6
4189	71	21,84	143	19,44	PWD x B6
4190	71	23,92	174	24,84	PWD x B6
4191	71	18,53	190	45,36	PWD x B6
4192	72	16,06	76	17,55	PWD x B6
4193	72	18,71	124	18,63	PWD x B6
4162	72	25,00	194	44,28	PWD x B6
4165	72	20,26	162	42,12	PWD x B6
4166	72	19,65	157	25,92	PWD x B6
4167	72	19,64	175	23,22	PWD x B6
4168	72	19,72	166	22,68	PWD x B6
<b>4169</b>	<b>72</b>	<b>23,23</b>	<b>70</b>	<b>0,216</b>	<b>PWD x B6</b>
4170	72	24,95	126	3,78	PWD x B6
4200	71	26,78	130	3,24	B6 x PWD
4201	71	21,75	156	10,26	B6 x PWD
4202	71	17,3	122	41,58	B6 x PWD
4203	71	25,39	149	13,5	B6 x PWD
4204	71	20,61	201	9,72	B6 x PWD
4205	70	21,23	166	8,64	B6 x PWD
4206	70	26,99	187	43,74	B6 x PWD
4207	71	19,56	181	21,6	PWD x B6

4208	71	22,83	231	30,78	PWD x B6
4209	71	20,61	123	19,98	PWD x B6
4216	71	21,34	138	29,16	PWD x B6
4217	71	21,08	168	21,6	PWD x B6
4218	71	17,75	84	13,23	PWD x B6
4300	71	22,79	152	12,42	B6 x PWD
4301	71	23,17	205	24,84	B6 x PWD
4305	71	19,54	146	21,06	B6 x PWD
4306	71	20,07	156	10,8	B6 x PWD
4307	71	23,22	132	1,08	B6 x PWD
4328	69	16,77	119	11,34	PWD x B6
4330	69	20,59	164	18,36	B6 x PWD
4331	69	20,18	152	16,74	B6 x PWD
4332	69	18,28	130	12,42	B6 x PWD
4333	69	18,7	129	7,56	PWD x B6
4303	69	20,34	85	21,33	PWD x B6
4304	69	21,95	138	10,26	PWD x B6
4308	69	26,42	122	5,94	PWD x B6
4309	69	22,4	177	9,18	PWD x B6
4310	69	21,41	153	29,7	PWD x B6
4311	69	19,91	164	32,94	PWD x B6
4312	69	22,32	143	38,34	PWD x B6
4313	69	24,26	130	28,62	PWD x B6
4314	69	21,4	169	16,2	PWD x B6
4315	69	31,11	135	47,52	PWD x B6
4316	69	29,35	208	35,1	PWD x B6
4317	69	22,45	137	36,18	PWD x B6
4318	69	22,62	133	32,4	PWD x B6
4319	69	21,32	130	22,68	PWD x B6
4320	69	22,55	198	46,44	PWD x B6
4321	69	23,01	133	15,12	PWD x B6
4322	69	20,78	171	28,08	PWD x B6
4323	69	25,18	187	29,16	PWD x B6
4324	69	20,32	208	35,1	PWD x B6
4325	69	20,2	142	21,06	PWD x B6
4326	72	22,38	178	30,4	PWD x B6
4327	72	19,12	173	16,2	PWD x B6
4329	72	23,1	100	1,3	PWD x B6
4352	69	28,94	140	14,6	B6 x PWD
4353	69	22,76	138	23,2	B6 x PWD
4354	69	18,32	106	5,6	B6 x PWD
4355	69	26,37	219	27,6	B6 x PWD
4356	69	22,81	200	27,8	B6 x PWD
4369	69	16,15	126	5,5	PWD x B6
4370	69	22,9	235	28,8	PWD x B6

4349	71	21,27	129	17,6	B6 x PWD
4350	71	20,04	165	43,8	B6 x PWD
4351	71	22,34	130	30,2	B6 x PWD
4357	72	25,01	201	40,6	B6 x PWD
4358	72	24,54	113	7,4	B6 x PWD
4359	72	22,47	116	14,1	B6 x PWD
4360	71	25,1	189	33,2	B6 x PWD
4361	71	22,37	130	13,8	B6 x PWD
4362	71	20,4	110	2,1	B6 x PWD
4363	71	25,09	180	26	B6 x PWD
4364	71	21,96	90	5,7	B6 x PWD
4365	71	26,76	215	26,6	B6 x PWD
4366	71	24,39	111	6,4	B6 x PWD
4367	71	22,3	163	34,2	B6 x PWD
4368	71	24,4	194	36,6	B6 x PWD
4447	71	19,38	192	32,8	B6 x PWD
4448	71	20,6	116	7,3	B6 x PWD
4449	71	20,61	148	17	B6 x PWD
4450	71	17,96	126	6,9	B6 x PWD
4451	71	24,09	166	26	B6 x PWD
4452	71	19,92	172	32	PWD x B6
4453	71	20,73	160	31,8	PWD x B6
4454	71	22,56	199	31,4	PWD x B6
4455	71	19,98	154	33,6	PWD x B6
4456	71	21,34	121	11,2	PWD x B6
4461	71	21,34	100	5,4	B6 x PWD
4462	71	26,97	108	9,3	B6 x PWD
4463	71	22,76	174	20,2	B6 x PWD
4457	71	21,17	96	18,9	PWD x B6
4458	71	22,98	180	24,6	PWD x B6
4459	71	20,57	156	25	PWD x B6
4460	71	29,94	238	45,2	PWD x B6
4464	71	24,32	180	19,2	PWD x B6
4465	71	22,44	177	23,4	PWD x B6
4466	71	23,2	131	27,6	PWD x B6
4467	71	24,94	207	30,4	PWD x B6
4468	71	20,81	171	15,4	PWD x B6
4469	71	24,18	175	18,8	PWD x B6
4470	71	23,01	160	32,2	PWD x B6
4471	71	21,74	210	38,8	PWD x B6
4472	71	24,51	166	43,2	PWD x B6
4473	71	23,57	155	30,6	PWD x B6
4474	71	23,53	207	36,2	PWD x B6
4475	71	21,21	170	29,4	PWD x B6
4476	71	28,69	156	25,8	PWD x B6

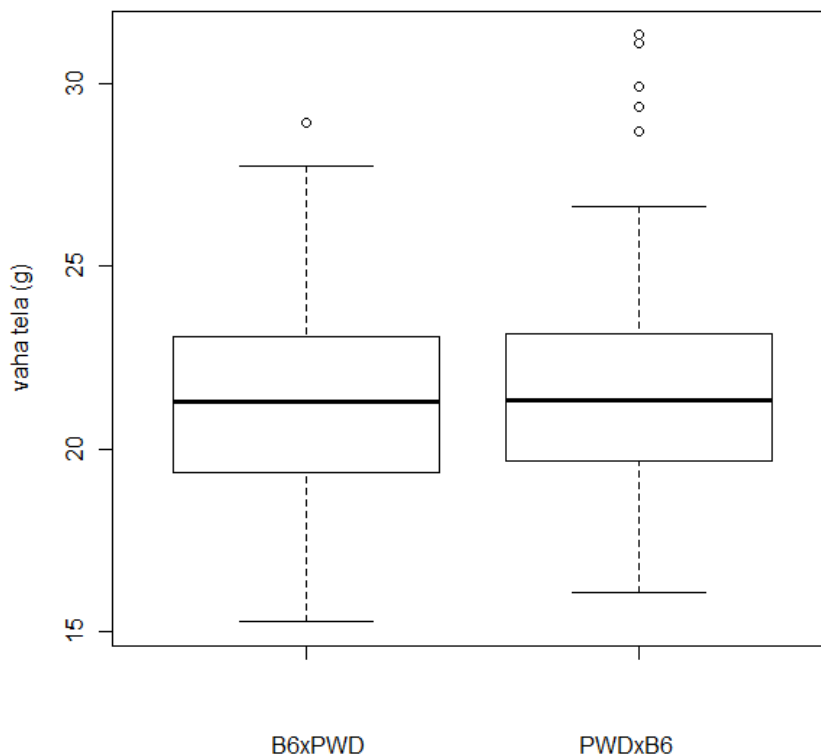
4477	71	25,12	119	20,3	PWD x B6
4478	71	19,15	174	33,4	PWD x B6

V křížení je jako první vždy uváděna samice, B6 x PWD tedy znamená křížení B6 samice a PWD samce a opačně. Zvířata definovaná jako sterilní jsou v tabulce červeně vyznačena.

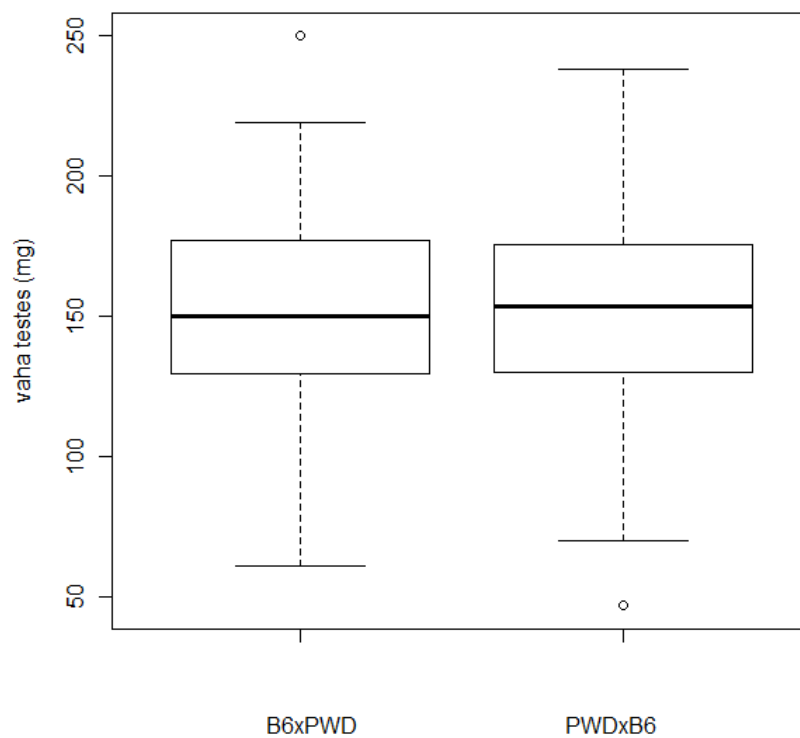
Ve vzorku 211 zvířat nebyl překvapivě nalezen ani jeden samec, který by neměl žádné spermie. V případě 4 jedinců byl ale počet spermií výrazně snížen, pod 500 tisíc spermií / 1 ml, tyto zvířata jsou s největší pravděpodobností sterilní. **Frekvence sterilních zvířat v F2 generaci** byla tedy 4 sterilní zvířata z 211 celkem, tj. **1,90 %**.

V F2 generaci existovaly dvě skupiny samců - genotyp jejich matek v F1 generaci byl buď B6 x PWD nebo PWD x B6. Z celkem 211 zvířat byl u 112 z nich genotyp matky PWD x B6 a u 99 z nich B6 x PWD. Tyto dvě skupiny zvířat (v následujících grafech označovány jako B6 x PWD nebo PWD x B6) byly statisticky srovnávány, ve snaze zjistit, zda má rozdílný genotyp matky vliv na počet spermií, váhu testes a váhu těla.

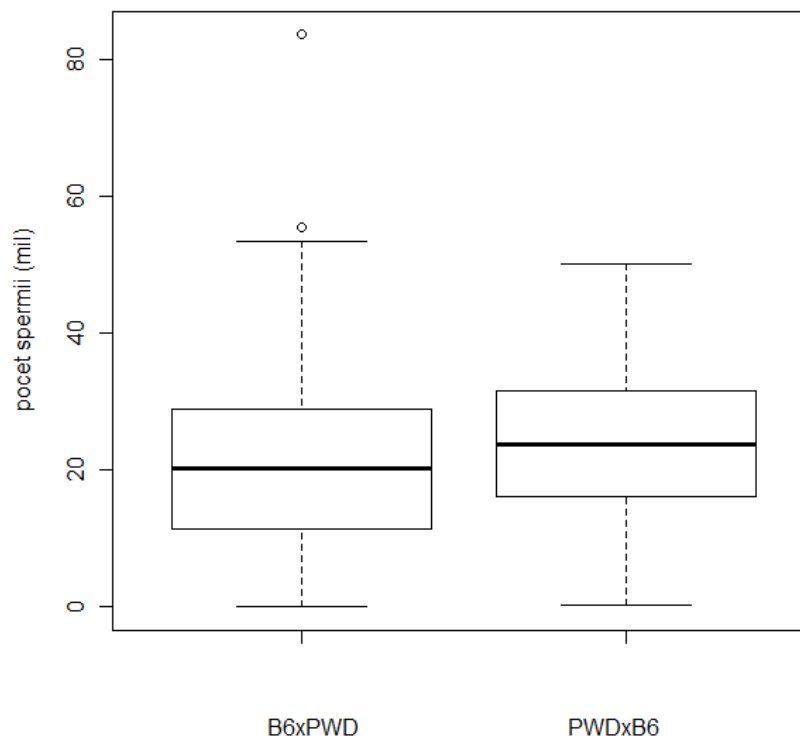
Obr. 11 – Grafické znázornění vlivu genotypu matky na váhu těla



Obr. 12 – Grafické znázornění vlivu genotypu matky na váhu testes



Obr. 13 – Grafické znázornění vlivu genotypu matky na počet spermií



**Výsledky t-testu srovnání dvou různých skupin samců (podle genotypu matky) pro váhu těla**

t-hodnota	-0,7052
df	208,236
p-hodnota	0,4815

**Výsledky t-testu srovnání dvou různých skupin samců (podle genotypu matky) pro váhu testes**

t-hodnota	-0,1481
df	205,61
p-hodnota	0,8824

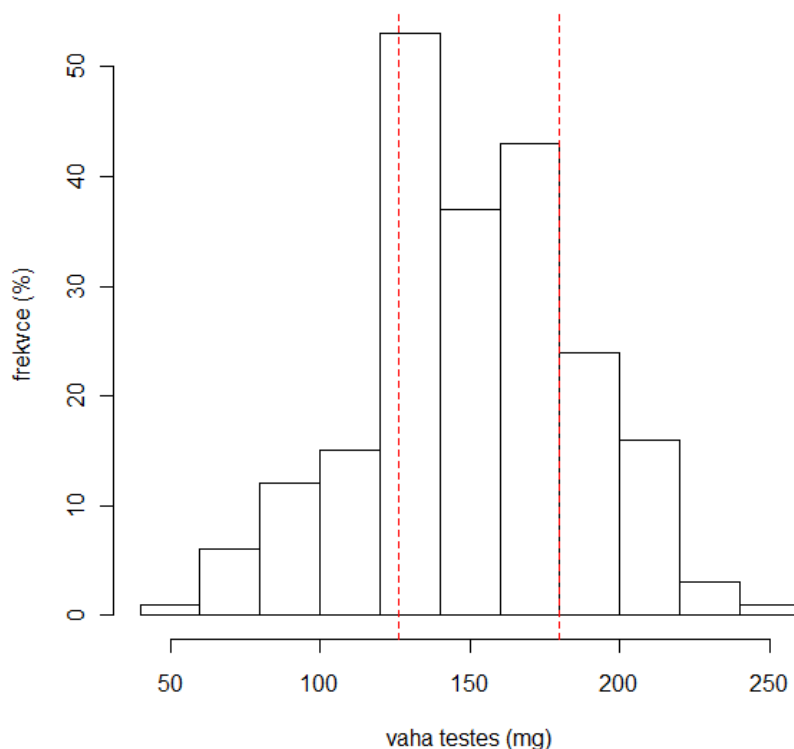
**Výsledky t-testu srovnání dvou různých skupin samců (podle genotypu matky) pro počet spermií**

t-hodnota	-1,4513
df	189,967
p-hodnota	0,1484

Ve všech případech je p-hodnota větší než 0,5; na 5% hladině významnosti nelze zamítnout nulovou hypotézu, že se tyto skupiny neliší. Nebylo tedy potvrzeno, že by genotyp matky (B6 x PWD nebo PWD x B6) měl vliv na fenotyp samců v F2 generaci.

Vzhledem k velkému počtu zvířat ( $N = 211$ ) byli v QTL analýze použiti jen jedinci s nejvyšší a nejnižší hodnotou znaku, tento postup se v podobných případech považuje za přípustný, (viz např. SILVER, 1995). Jako klíčový znak pro výběr těchto zvířat byla použita váha testes (měření váhy testes je přesnější a odchylka menší, než počítání spermií v Bürkerově komůrce). Do QTL analýzy bylo vybráno 46 zvířat s nejnižší váhou testes a 46 zvířat s nejvyšší váhou testes. V histogramu je pomocí červených linií znázorněno, která zvířata byla použita – všechna zvířata, jejichž váha testes leží nalevo od první červené linie a ta, jejichž váha testes leží napravo od druhé červené linie.

Obr. 14 – Histogram se zvýrazněním zvířat použitých na QTL analýzu



## 4.2 VÝSLEDKY GENOTYPIZACE VYBRANÝCH ZVÍŘAT

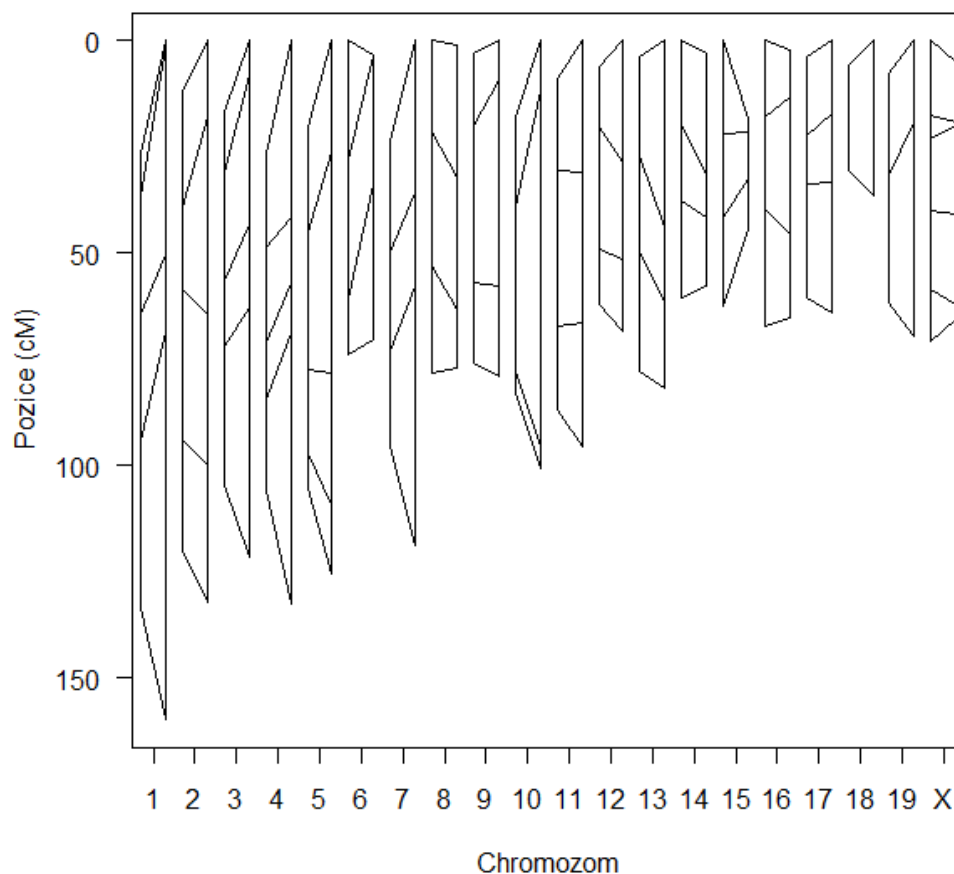
Celkem 96 vybraných zvířat bylo genotypizováno za použití 84 MIT markerů uvedených v Tabulce 1. Souhrnné výsledky genotypování zpracované v tabulce jsou uvedeny v Příloze k této práci na CD nosiči (B = B6 alela, P = PWD alela, H = heterozygotní PWD/B6 kombinace alel).

## 4.3 QTL ANALÝZA

Ze zadaných výsledků byla sestavena rekombinační mapa, při výpočtu ve statistickém programu R je v grafu srovnána zadaná rekombinační mapa (zadané pozice markerů v cM) s rekombinační mapou, kterou program vypočítává ze zadaných výsledků genotypování. V grafu jsou pak spojnicí propojeny obě hodnoty – očekávaná pozice (napravo) a vypočítaná pozice (nalevo), přičemž obě pozice by se neměly významně lišit (vlivem náhody se ale samozřejmě mírně lišit mohou).



Obr. 15 – Rekombinační mapa myšního genomu na základě genotypizace 96 F2 samců



Data získaná z genotypování vybraných zvířat byla převedena do elektronické podoby (ve formátu .csv) a zpracována QTL analýzou ve statistickém programu R. Na vlastní QTL analýzu byla použita funkce „scanone“ a na analýzu epistatických interakcí funkce „scantwo“. Pro zjištění nejbližšího markeru k signifikantnímu vrcholu byla použita funkce „lodint“.

Při QTL analýze program hledá nenáhodné vlivy na hodnotu fenotypového znaku (např. signifikantně vyšší zastoupení zvířat s jedním konkrétním genotypem u jedinců s vysokou váhou znaku), místa na genomu s vysokou pravděpodobností nenáhodného vlivu se pak objeví v grafu jako vrcholy nad hranicí signifikance. Hranice signifikance, zobrazená ve výsledném grafu jako červená linie, je programem vypočítána (nikoliv zvolena předem).

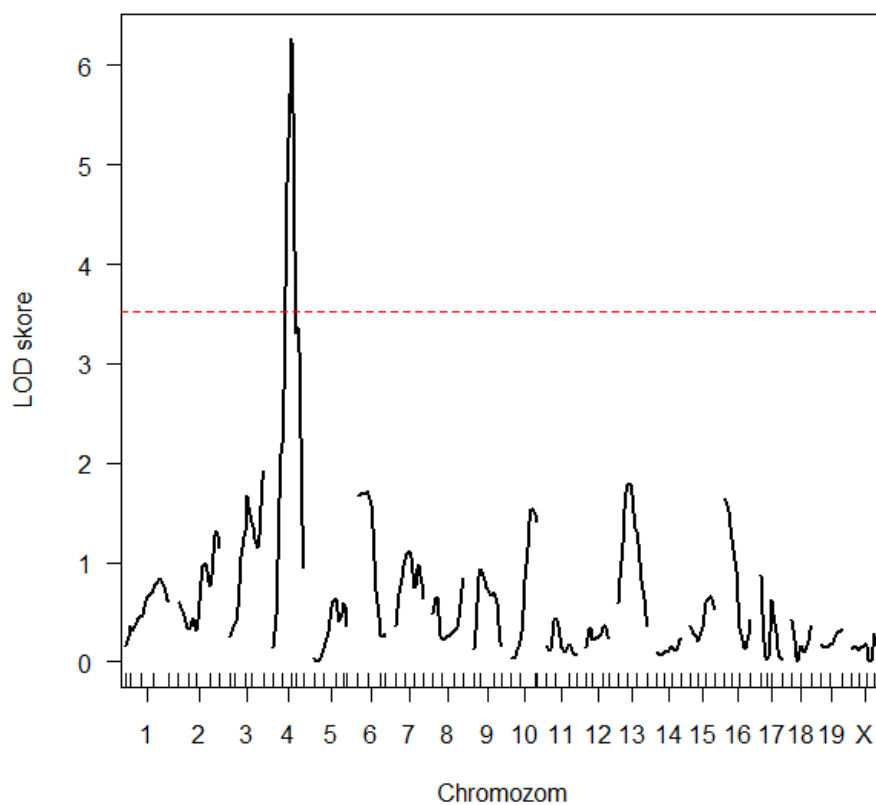
Při vlastní analýze je třeba zadat nejen data z genotypování (tj. typ konkrétní alely na konkrétním markeru u daného zvířete), ale i vzdálenost tohoto markeru (v cM) od začátku chromozomu, na kterém marker leží. Program totiž pro optimální funkci

potřebuje vypočítat vzdálenost rekombinace (v případě, že mezi dvěma konkrétními markery k ní došlo); pravděpodobnost rekombinace roste s rostoucí vzdáleností obou markerů (udávané v rekombinační mapě v cM). Pokud tento krok neprovedeme, je riziko, že se nezobrazí všechny geny, protože některé budou ležet relativně daleko od vybraných markerů a v QTL analýze „nebudou vidět“.

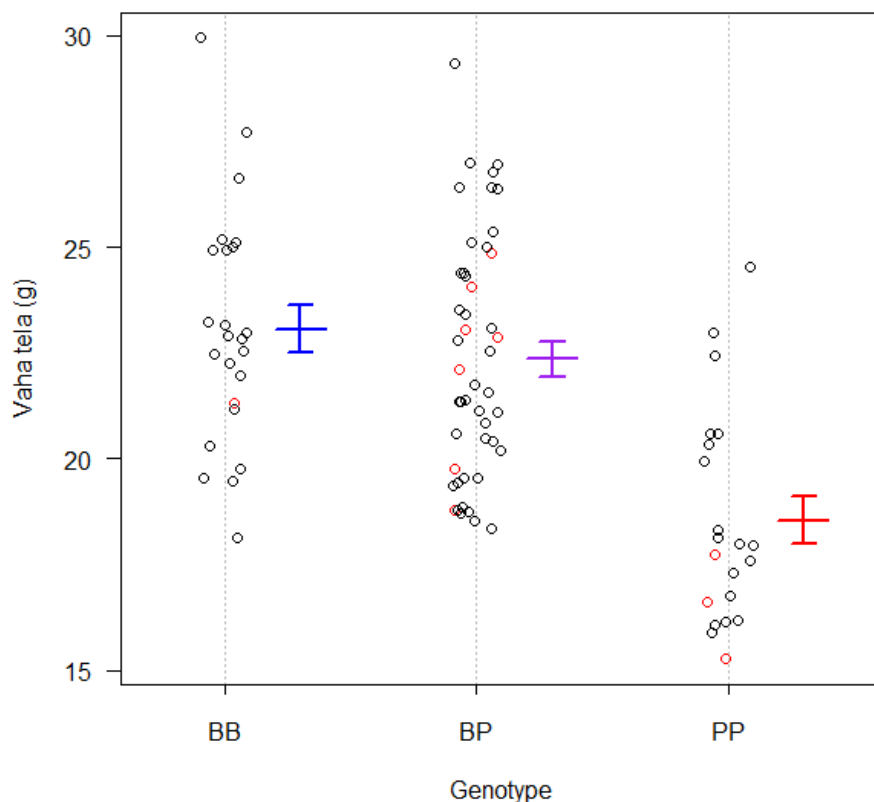
### **Mapování QTL lokusů pro váhu těla**

Z QTL analýzy je vidět signifikantní vrchol na chromozomu 4. Pomocí funkce „lodint“ bylo zjištěno, že nejbližším markerem k tomuto vrcholu je marker D4-166.

**Obr. 16 – Výsledky QTL analýzy pro váhu těla vybraných zvířat**



Obr. 17 – Schéma rozložení genotypů na markeru D4-166



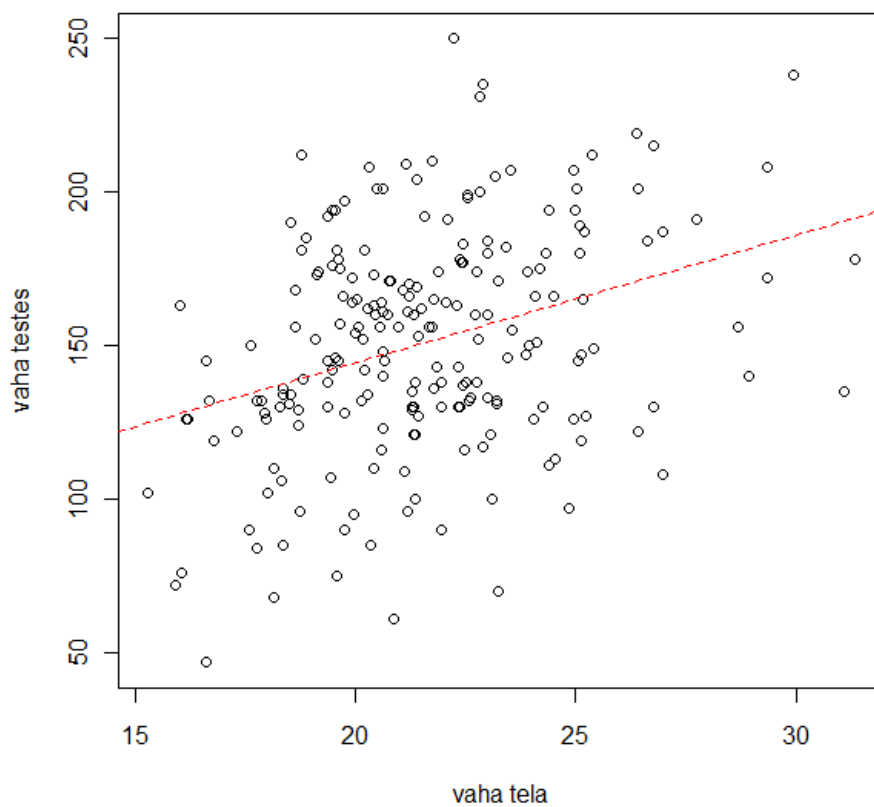
### Mapování QTL lokusů pro váhu testes

Protože existoval předpoklad, že váha těla může korelovat s váhou testes, což by mohlo zkreslovat výsledky QTL analýzy, bylo prvním cílem zjistit vztah váhy těla a váhy testes v programu R za použití funkce „cor.test“ (Pearsonův korelační test). Výsledek testu ukazuje na velmi vysokou korelaci mezi váhou těla a váhou testes, z grafu vidíme, že tato korelace má sice množství výjimek (hodnoty jsou hodně rozptýlené kolem korelační přímky), ale vliv váhy těla na váhu testes je jednoznačný (obr. 11). Tento výsledek ukazuje na oprávněnost použití relativní váhy testes, ve snaze odfiltrovat část vlivu váhy těla na váhu testes, který může zkreslovat výsledky. Z výsledků QTL analýzy jsou patrné dva signifikantní vrcholy – na chromozomu 17 a na chromozomu 4.

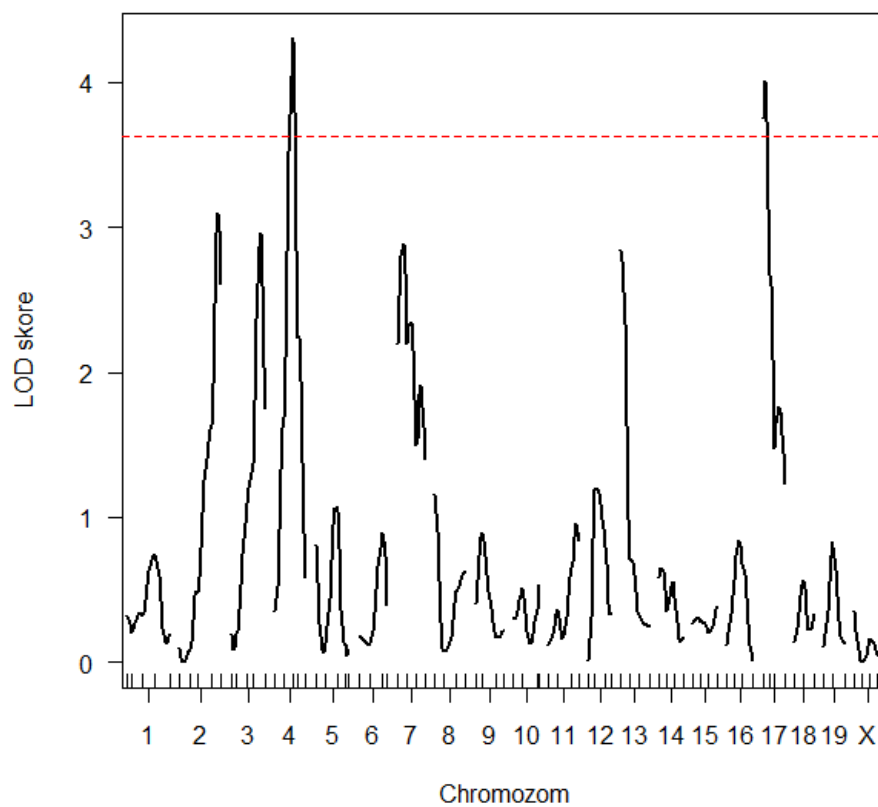
#### **Výsledky korelačního testu (závislost váhy testes na váze těla)**

t-hodnota	5.1576
p-hodnota	< 0,001
df	209

Obr. 18 – Graf korelace váhy těla a váhy testes



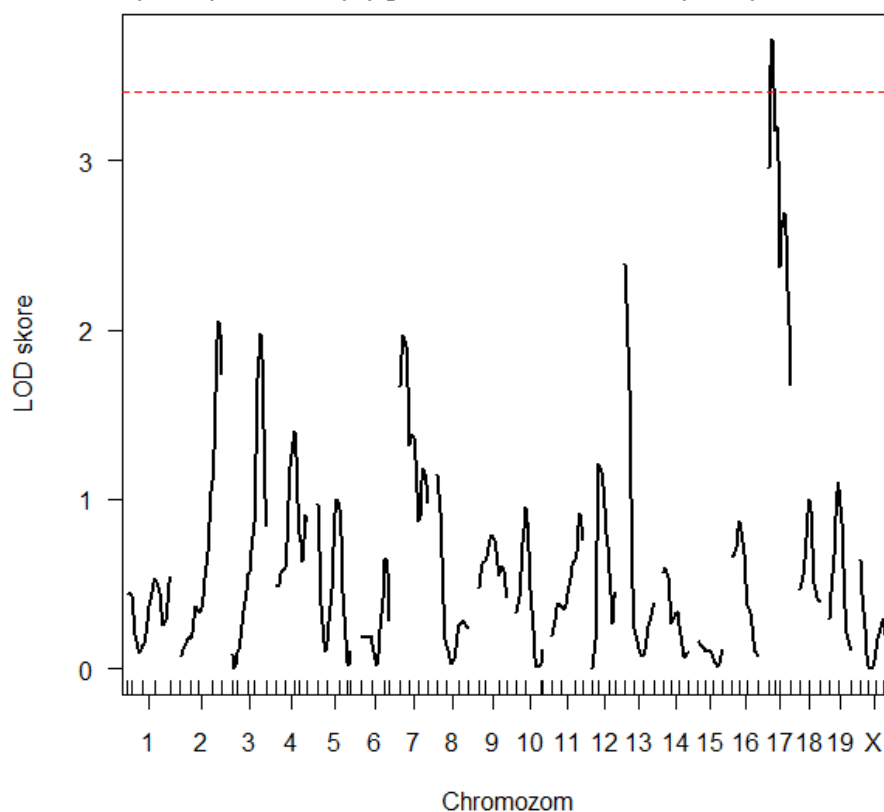
Obr. 19 – Výsledky QTL analýzy pro váhu testes vybraných zvířat



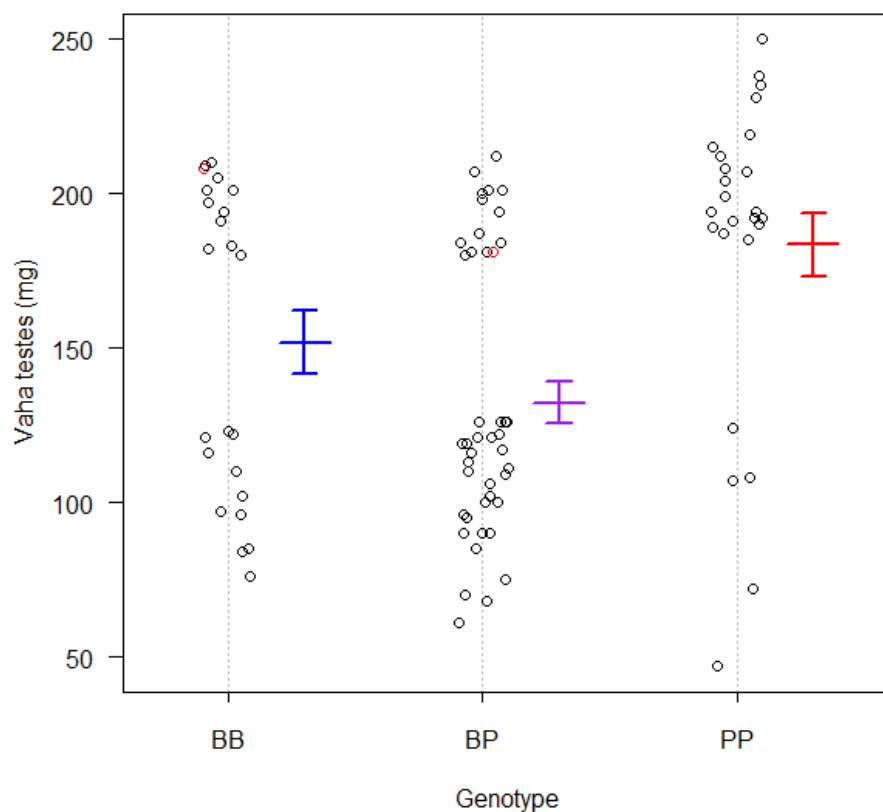
### Mapování QTL lokusů pro relativní váhu testes

Z výsledků QTL analýzy je vidět signifikantní vrchol na chromozomu 17, zatímco signifikantní vrchol na chromozomu 4, pozorovaný při analýze absolutní váhy testes (Obr. 14) nebyl pozorován. Pomocí funkce „lodint“ bylo zjištěno, že nejbližším markerem k tomuto vrcholu je D17-19.

Obr. 20 – Výsledky QTL analýzy pro relativní váhu testes vybraných zvířat



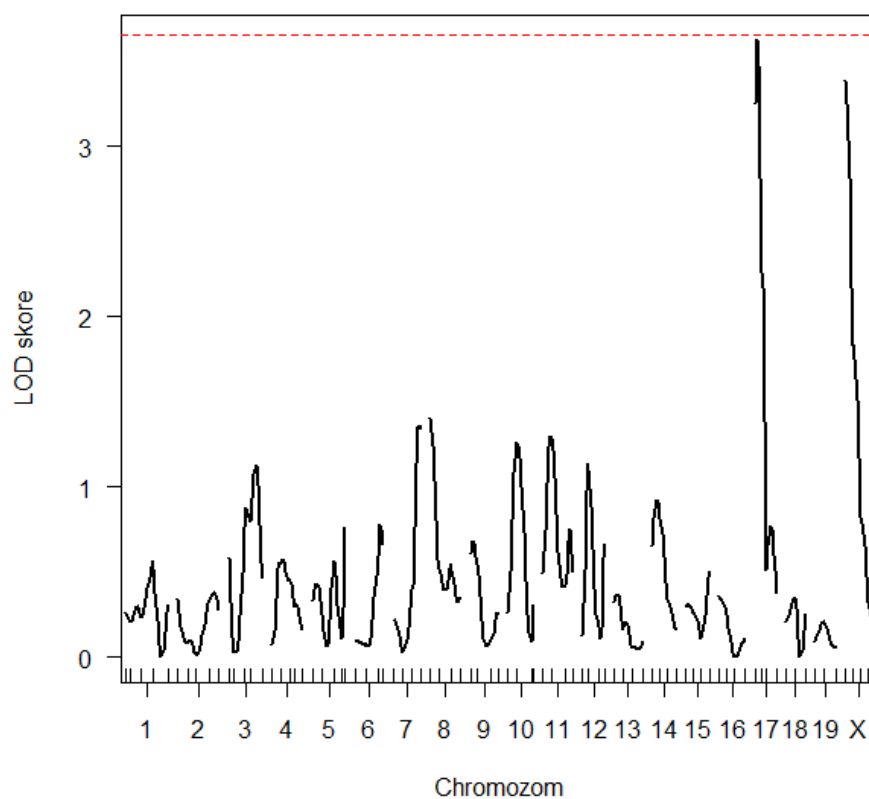
Obr. 21 - Schéma rozložení genotypů na markeru D17-19



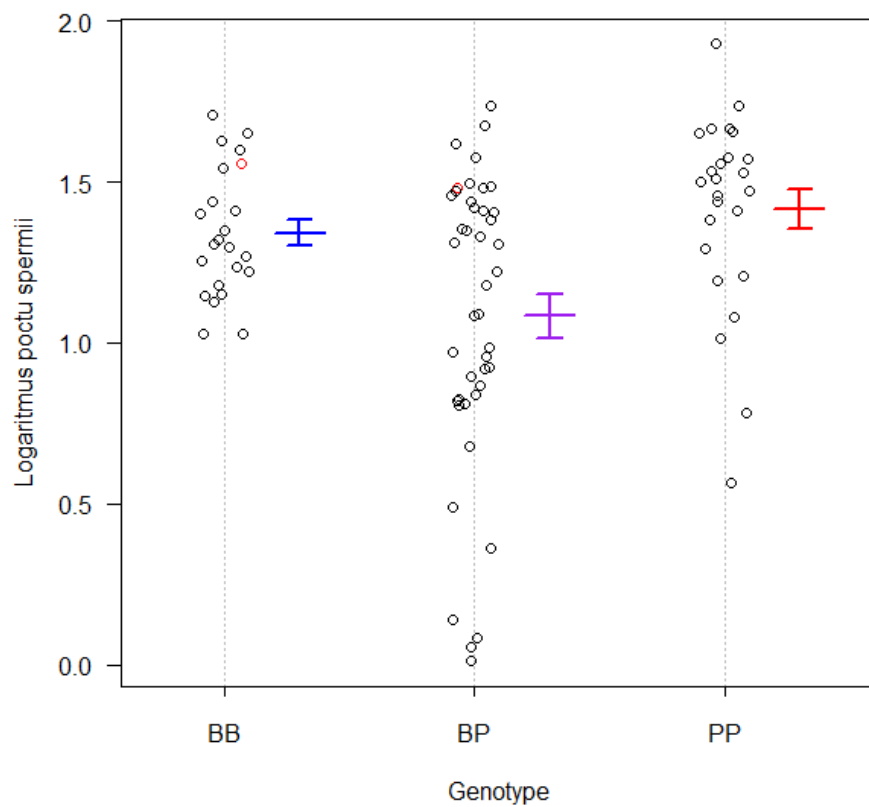
### **Mapování QTL lokusů pro počet spermií**

Z výsledků QTL analýzy je patrný signifikantní vrchol na chromozomu 17 a marginálně signifikantní vrchol na chromozomu X. Pomocí funkce „lodint“ bylo zjištěno, že na chromozomu 17 je vrcholu nejbližší marker D17-19 a na chromozomu X marker DX-55.

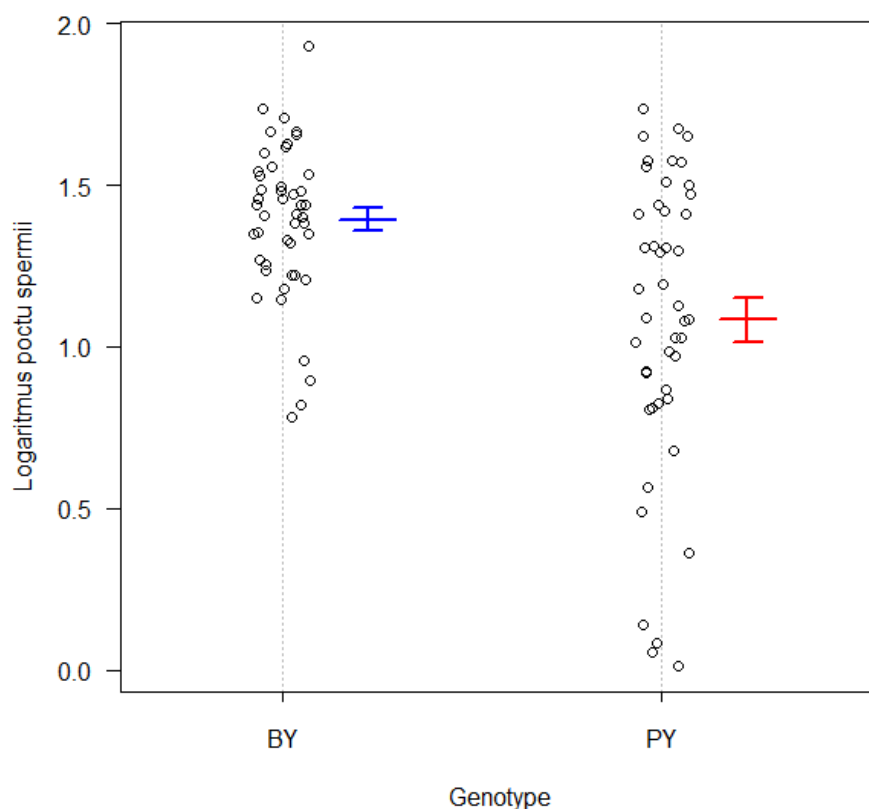
Obr. 22 – Výsledky QTL analýzy pro počet spermií vybraných zvířat



Obr. 23 - Schéma rozložení genotypů na markeru D17-19



Obr. 24 - Schéma rozložení genotypů na markeru DX-55

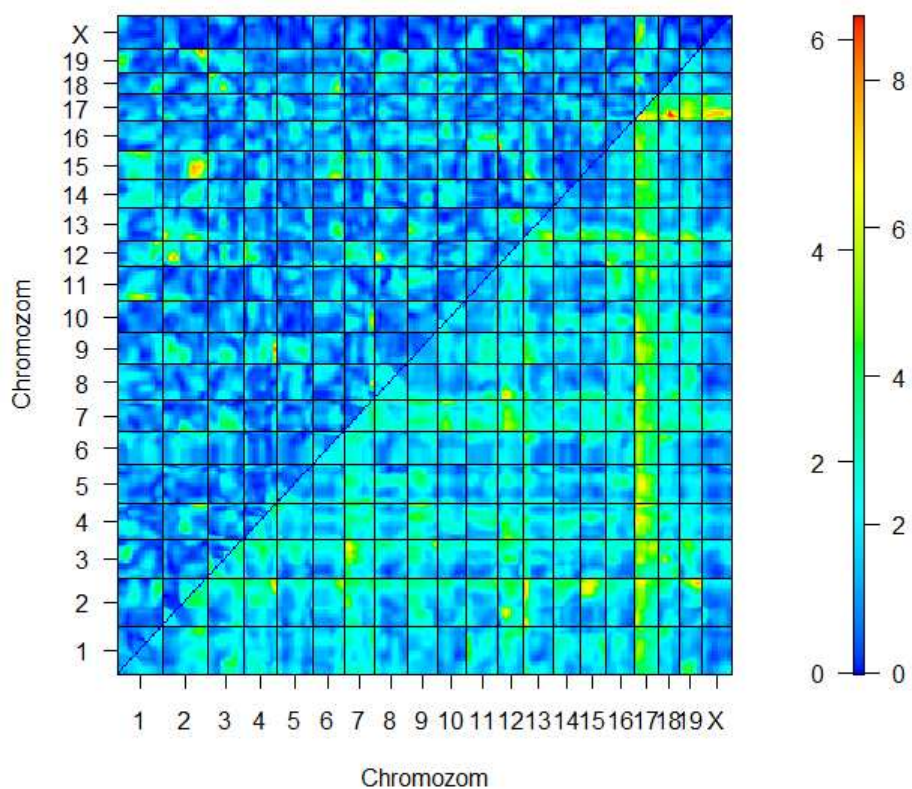


### **Sledování epistatických interakcí**

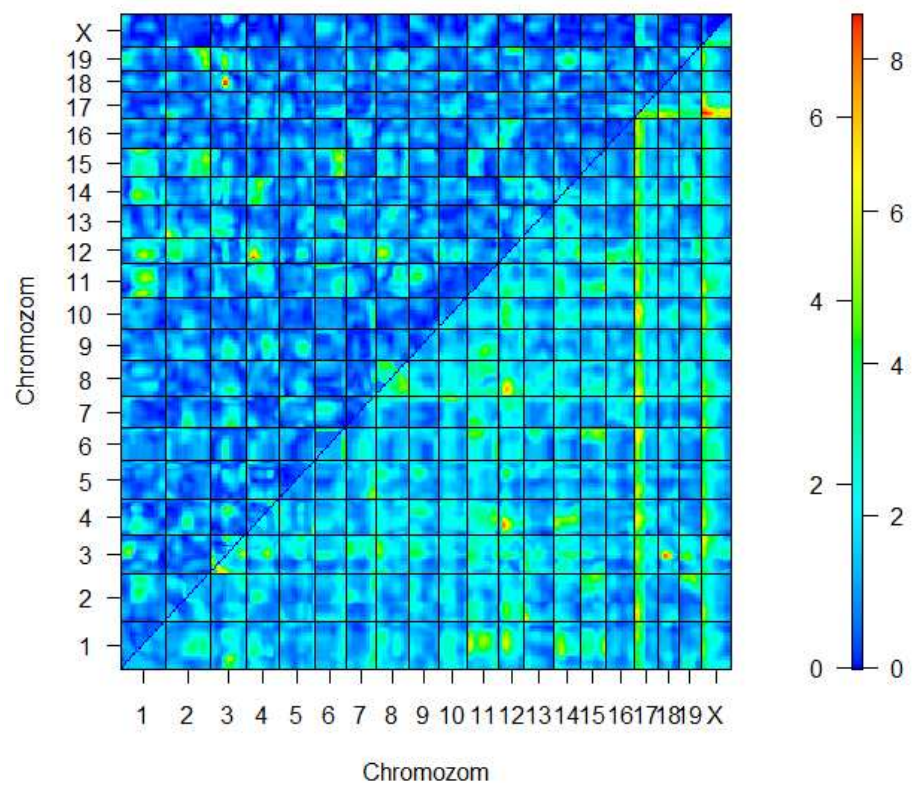
Pomocí programu funkce „scantwo“ byla sestavena mapa epistatických interakcí pro sledování případných genových interakcí u relativní váhy testes a u počtu spermií. Graf má dvě části zjednodušeně řečeno v pravém dolním rohu je zobrazena jakákoliv interakce (efekt jednoho genu, efekt druhého genu nebo jejich vzájemná interakce), zatímco v levém horním rohu je zobrazena vzájemná interakce lokusů – tj. zda je vzájemný účinek vyšší než aditivní, přičemž platí, že čím víc se barva interakce blíží k červené, tím vyšší je pravděpodobnost interakce (podrobný popis viz BROMAN & SEN, 2009).



Obr. 25 – Výsledky sledování epistatických interakcí u relativní váhy testes



Obr. 26 – Výsledky sledování epistatických interakcí u počtu spermií



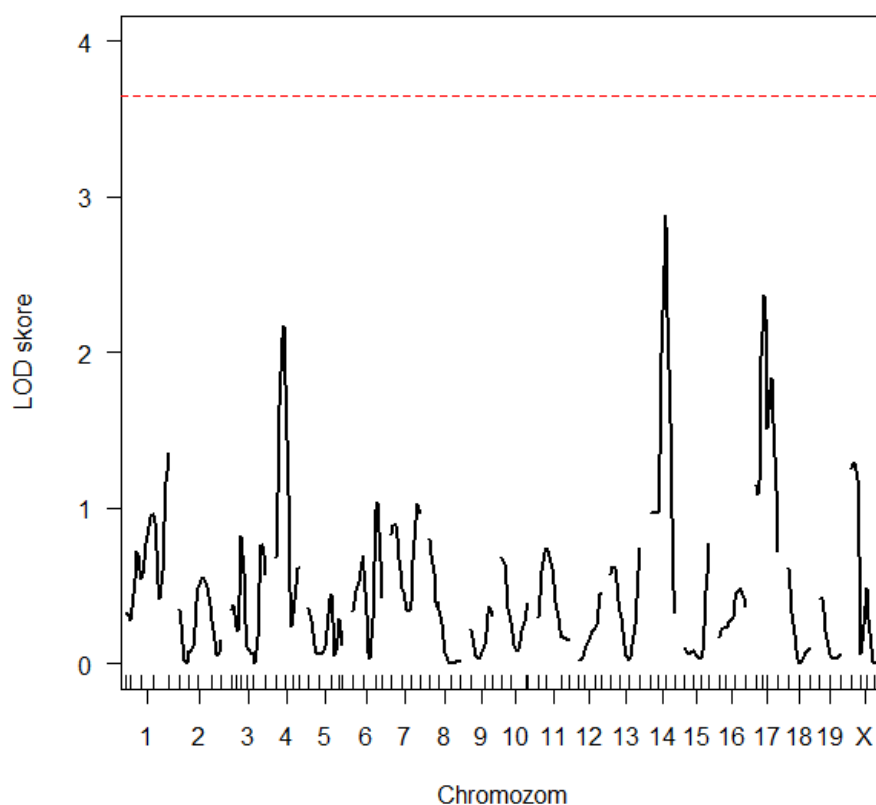


#### 4.5 QTL ANALÝZA ZVÍŘAT S *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> - *Hstx2*<sup>PWD</sup> KOMBINACÍ ALEL

##### Mapování QTL lokusů pro relativní váhu testes

Z výsledků QTL analýzy není patrný žádný signifikantní vrchol.

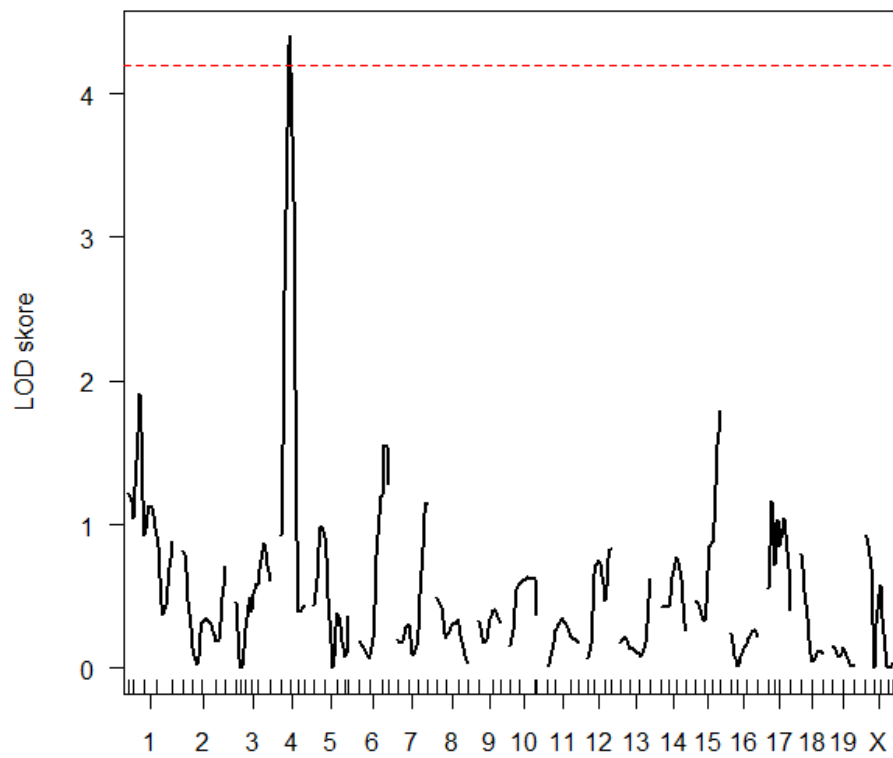
Obr. 27 – Výsledky QTL analýzy pro relativní váhu testes za použití zvířat se „sterilní“ kombinací alel genů *Prdm9* a *HstX2*



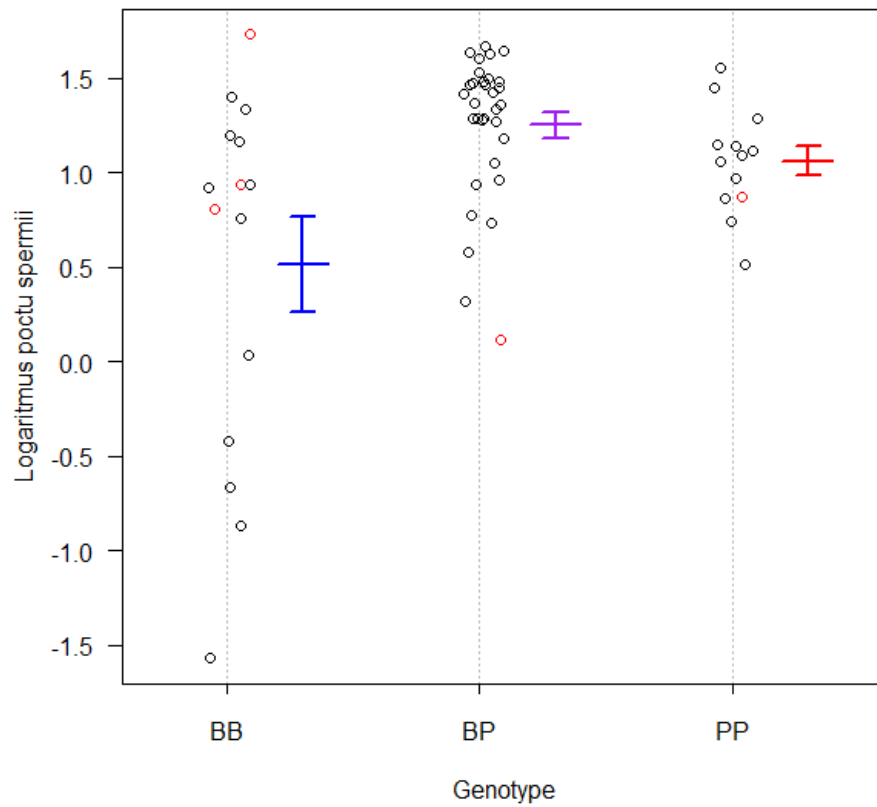
##### Mapování QTL lokusů pro počet spermií

Z výsledků QTL analýzy je patrný signifikantní vrchol na chromozomu 4. Pomocí funkce „lodint“ bylo zjištěno, že nejbližším markerem k tomuto vrcholu je D4-111.

Obr. 28 – Výsledky QTL analýzy pro počet spermií za použití zvířat se „sterilní“ kombinací alel genů *Prdm9* a *HstX2*



Obr. 29 - Schéma rozložení genotypů na markeru D4-111



## 5. DISKUZE

### 5.1 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH ZVÍŘAT

Z 211 zvířat F2 generace získaných křížením laboratorních kmenů PWD a B6 byla pouze 4 zvířata hodnocena jako sterilní, a to díky výrazně sníženému počtu spermií, pod 500 000 / 1 ml. Je samozřejmě obtížné dokázat, že tato zvířata jsou skutečně sterilní, pokud nebyl proveden např. experiment s pokusným připuštěním těchto zvířat (viz STORCHOVÁ *et al.*, 2004), nicméně zjištěný počet sterilních zvířat (1,90 %) je neočekávaně nízký. Při zachování stejných kritérií pro hodnocení sterility, bylo nalezena v back-crossu (zpětném křížení) na B6 stranu ((PWD x B6) x B6), prováděném souběžně s tímto experimentem, z celkového počtu 259 zvířat 4 zvířata s nulovým počtem spermií (tj. 1,54 %) a celkem 20 sterilních zvířat s počtem spermií pod 500 000 (tj. 7,72 %; DZÚR-GAJDOŠOVÁ, MÁRIA, osobní sdělení). V obou případech byl populační vzorek dostatečně velký na to, aby mohly pozorované rozdíly být pouze vlivem náhody. V F2 generaci získané z křížení B6 x PWD je tedy výrazně nižší počet sterilních zvířat, než při zpětném křížení na B6 stranu.

Dalším rozdílem byla skutečnost, že zatímco u zpětného křížení měla všechna sterilní zvířata s nejnižším počtem spermií současně i nejnižší váhu testes (DZÚR-GAJDOŠOVÁ, MÁRIA osobní sdělení), v tomto experimentálním křížení měla sice všechna sterilní zvířata výrazně sníženou váhu testes, nicméně několik fertálních zvířat mělo velmi výrazně sníženou váhu testes, ale současně normální počet spermií. Pokud bychom tedy sledovali rozdělení sterilních a fertálních zvířat podle váhy testes, pak ve zpětném křížení na B6 stranu budou tvořit dvě oddělené skupiny, zatímco při interkrosu se obě skupiny promíchají. Vysvětlením může být částečná rekonstrukce rodičovského PWD genotypu, který zajišťuje nižší váhu testes u plodných PWD samců, nicméně ani toto vysvětlení není plně postačující, protože váha testes některých plodných F2 hybridů byla výrazně nižší než váha testes jedinců kmene PWD. Jedná se tedy o nepříliš častý efekt, kdy křížením dvou různých taxonů lišících se ve fenotypovém znaku dostaneme v F1 nebo F2 generaci ještě extrémnější hodnotu fenotypového znaku, než je maximální (nebo minimální) hodnota u taxonů rodičovských, např. VRANA *et al.* (2000) popisuje

tuto situaci při křížení dvou druhů severoamerických křečků rodu *Peromyscus*, kdy mají potomci z jednoho křížení nižší váhu těla než oba rodičovské druhy.

Protože při křížení byly použity pro přípravu F1 hybridů dva typy samic (samice vzniklé křížením B6 x PWD a samice vzniklé křížením PWD x B6), sledoval jsem, jestli se v F2 generaci vzájemně liší samci, kteří jsou potomky těchto dvou typů samic. Pomocí variačního testu nebyl zjištěn vliv genotypu matky na fenotyp samců v F2 generaci u váhy testes, váhy těla ani u počtu spermií (Obr. 11, 12 a 13).

Možné interpretace rozdílu mezi (B6 x PWD) interkrosem a zpětným křížením na B6 stranu:

a) vliv mitochondriálního genomu – vliv mitochondriálních genů nebo jaderných genů mitochondriálního původu na hybridní sterilitu byl potvrzen u rostlin (např. YAMAGATA *et al.*, 2010), nicméně mitochondriální genom živočichů se od rostlinného zásadně liší - je menší a obsahuje mnohem méně kódujících genů. Mitochondrie se dědí po mateřské linii, tzn. samice vzniklé křížením B6 x PWD budou mít mitochondriální genom B6 původu, zatímco samice vzniklé křížením PWD x B6 budou mít mitochondriální genom původu PWD. Protože jsem ve svém křížení použil v F1 generaci oba tyto typy samic, a v žádném fenotypovém znaku se jejich samčí potomci nelišili, lze vliv mitochondriálního genomu jako možné vysvětlení rozdílu v počtu sterilních zvířat mezi oběma kříženími vyloučit.

b) chromozom X – situace na chromozomu X je v obou případech stejná (na každém lokusu je 50% šance výskytu PWD alely a 50% šance výskytu B6 alely). Podstatný vliv chromozomu X na hybridní sterilitu je sice zřejmý (OKA *et al.*, 2007; STORCHOVÁ *et al.*, 2004; BHATTACHARYYA, TANMOY, osobní sdělení), nicméně situace na X chromozomu nevysvětluje rozdíly mezi F2 generací a zpětným křížením na B6 stranu.

c) chromozom Y – Y chromozom je nepárový, dědí se po otcovské linii, nicméně obsahuje nevelkou pseudoautozomální oblast, kde může docházet k rekombinaci s X chromozomem, u myši je tato oblast asi 700 kb dlouhá (PERRY *et al.*, 2001). Pseudoautozomální lokus je sice relativně malý, ale např. MATSUDA *et al.* (1991) lokalizuje lokus skrývající gen pro hybridní sterilitu mezi kmenem B6 a druhem *Mus spretus* právě do pseudoautozomální oblasti chromozomu X.

Obě křížení se liší původem chromozomu Y – při zpětném křížení na B6 stranu ((PWD x B6) x B6) budou mít v F2 generaci všichni samci Y chromozom původu B6, zatímco při interkrosu (Obr. 8 a 9) budou mít všichni samci Y chromozom PWD původu. Lze uvažovat model, kdy by na Y chromozomu ležel gen důležitý pro získání fenotypu hybridní sterility – podmínkou by byla B6 alela tohoto genu (sterilní F1 hybridy z křížení PWD x B6 mají Y chromozom B6 původu). Tento model by mohl vysvětlit rozdíl mezi oběma kříženími, nicméně křížením konsomických samců B6-Y<sup>PWD</sup> s PWD samicemi bylo zjištěno, že vytvořením zvířete s heterozygotní kombinací alel na autozomech a s X a Y chromozomy PWD původu nedojde ke zvrácení fenotypu hybridní sterility (GREGOROVÁ, SOŇA, osobní sdělení), nicméně vliv chromozomu Y nelze zcela vyloučit, protože pseudoautozomální oblast při přípravě těchto zvířat bude díky křížení s PWD samicemi PWD původu.

d) absence PWD/PWD homozygotní kombinace na autozomálních lokusech při zpětném křížení – ačkoliv situace na chromozomu X je v obou případech stejná, situace na autozomech je odlišná, při zpětném křížení na B6 stranu bude chybět PWD/PWD genotyp autozomálních lokusů. Možným vysvětlením rozdílu v obou kříženích by mohl být fakt, že PWD/PWD kombinace na některých místech genomu mohou zvrátit fenotyp hybridní sterility (zatím potvrzeno u chromozomů 17 a 19, GREGOROVÁ SOŇA, osobní sdělení) a absence těchto kombinací ve zpětném křížení na B6 stranu by znamenala vyšší počet sterilních zvířat v tomto křížení. Protože k dosažení fenotypu hybridní sterility je nutný *Hstx2* lokus na chromozomu X PWD původu, bylo by logické předpokládat, že gen na tomto lokusu bude lépe komunikovat s geny také PWD původu na autozomálních lokusech, což by mohlo zvrátit fenotyp hybridní sterility. Pokud by byl tento předpoklad správný, pak při pokusném křížení na PWD stranu by měl počet sterilních zvířat být ještě nižší, než v F2 generaci.

e) epigenetický efekt – lze uvažovat například vliv imprintingu a jeho eventuálních poruch při ustavování a mazání imprintových značek na jeden nebo více genů odpovědných za fenotyp hybridní sterility. To by v praxi znamenalo rozlišovat nejen B6 nebo PWD původ lokusu, ale i to, jestli byl lokus zděděn od otce nebo od matky. Vliv imprintingu na hybridní sterilitu prokázal VRANA *et al.* (2000), kdy analýzou zpětných křížení dvou různých druhů křečků (*Peromyscus polionotus* a *Peromyscus maniculatus*) odhalil vliv maternálně exprimovaného lokusu na X chromozomu

původem z druhu *P. polionotus* a současně paternálně exprimovaného autozomálního lokusu původem z druhu *P. maniculatus*.

## 5.2 VÝSLEDKY QTL ANALÝZY

Mapování QTL lokusů pro váhu těla ukázalo neočekávaně jediný signifikantní vrchol ležící na chromozomu 4, a to v centrální části, nedaleko MIT markeru D4-166. Jedná se o zajímavé zjištění, protože váha těla je obvykle klasickým kvantitativním znakem podmíněným velkým počtem genů. Například SHAO *et al.* (2007) zjistil větší množství lokusů odpovědných za váhu těla při křížení laboratorních kmenů C57BL/6J a PWK/PhJ. V tomto případě je z výsledku analýzy patrný jediný signifikantní lokus, což naznačuje, že rozdíl ve váze těla mezi kmeny PWD a B6 může buď kontrolovat jen jediný gen, lokalizovaný na chromozomu 4, nebo že tento gen sice nemusí být jediným, ale má na váhu těla největší vliv.

Analýza korelace váhy těla a váhy testes potvrdila předpoklad vzájemného vztahu a signifikantně významného vlivu váhy těla na váhu testes (Obr. 18). Protože tento vztah zkresluje výsledek QTL analýzy váhy testes (dále absolutní váha testes), byla stanovena relativní váha testes definovaná jako podíl absolutní váhy testes a váhy těla. Srovnáním výsledků QTL analýzy absolutní a relativní váhy testes vidíme, že zatímco QTL se ukázal při absolutní, ale ne relativní váze testes, QTL chromozomu 17 byl signifikantní v obou případech (Obr. 16, 19 a 20). To znamená, že QTL na chromozomu 4 se objevil pouze díky vlivu váhy těla na váhu testes a nemá s hybridní sterilitou nic společného. QTL na chromozomu 17 byl mapován podle očekávání nedaleko markeru D17-19, který je nejbližší k místu, kde leží gen *Prdm9*. Ve shodě s dosud nepublikovanými výsledky (GREGOROVÁ, SOŇA *et al.*, osobní sdělení) je i fakt, že nejnižší váhu testes měla zvířata, která byla na tomto lokusu heterozygotní PWD/B6 (Obr. 21) a že tudíž ani jedna z homozygotních kombinací (B6/B6, PWD/PWD) genu *Prdm9* není slučitelná s hybridní sterilitou.

Při QTL analýze relativní váhy testes však nebyl nalezen žádný signifikantní QTL na chromozomu X (Obr. 20). Očekával jsem, že bude viditelný signifikantní QTL, který by odpovídal pozici *Hstx2* genu (BHATTACHARYYA, TANMOY, osobní sdělení), vrchol v této oblasti byl nalezen v souběžném experimentu zpětného křížení (DZÚR-



GAJDOŠOVÁ, MÁRIA, osobní sdělení). Tento fenomén může být ve vztahu k extrémně nízkému počtu sterilních zvířat v F2 generaci. Není vyloučen ani epigenetický efekt v F2 generaci.

Při QTL analýze počtu spermií byl podobně jako v případě relativní váhy testes opět nalezen signifikantní QTL na chromozomu 17 (Obr. 22), v oblasti, ve které se nachází gen *Prdm9*, přičemž nejnižší váhu testes měli jedinci s heterozygotním genotypem (Obr. 23). Na chromozomu X byl nalezen vrchol ležící těsně pod hranicí signifikance, který ale neodpovídal známé pozici genu *Hstx2*, tento vrchol byl nejbližší markeru DX-55, který je lokalizován v proximální části chromozomu X, přičemž *Hstx2* byl mapován do centrální části X chromozomu (očekávan byl vrchol zhruba v pozici markeru DX-140). Opakovanou kontrolou bylo ověřeno, že se nejedná o chybu v genotypování (například záměnou pořadí markerů), pokusným vyřazením tohoto markeru (tj. DX-55) z QTL analýzy se vrchol na chromozomu X snížil zhruba na polovinu (oblast sousedního markeru DX-140), dále byly provedeny při QTL analýze některé kontroly např. kontrola záměny pořadí markerů a pravděpodobnosti rekombinace (podle BROMAN & SEN, 2009). Mohlo by se teoreticky jednat o jeden z lokusů, které popisuje STORCHOVÁ *et al.* (2004) jako nezbytné pro podporu lokusu *Hstx2* k získání fenotypu sterility vázané na chromozom X, což podporuje i skutečnost, že v tomto lokusu měly nižší počet spermií myši s PWD alelou (Obr. 24). Nicméně tento vrchol je těsně pod hranicí signifikance a nelze tak zcela vyloučit vliv náhody.

Ačkoliv nebyl vrchol v oblasti genu *Hstx2* pozorován, všechna zvířata označená jako sterilní (s počtem spermií pod 0,5 mil) nesla v oblasti *Hstx2* PWD alelu, což odpovídá předpokladům. Nízký počet těchto zvířat (1,90 %) mohl způsobit zkreslení výsledků a ve svém důsledku „neviditelnost“ genu *Hstx2* při genetickém mapování. To by naznačovalo odlišný projev genů *Prdm9* a *Hstx2* v F2 generaci interkrosu, kdy i přes celkově extrémně nízký počet sterilních zvířat byl vliv genu *Prdm9* prokázán, zatímco vliv genu *Hstx2* prokázán nebyl.

Kromě nalezení signifikantního QTL na chromozomu 17 a v případě počtu spermií i naznačeného QTL na chromozomu X nebyl nalezen žádný další signifikantní QTL vrchol. Možným vysvětlením je opět nízký počet sterilních zvířat v F2 generaci, nicméně ani při analýze zpětného křížení na B6 stranu nebyl nalezen žádný další vrchol. Pravděpodobným vysvětlením je skutečnost, že QTL mapování je ideální hlavně pro

znaky podmíněné několika málo geny, ale pokud existuje vliv většího počtu genů, pak mnoho z nich nemusí být v QTL analýze vidět (BROMAN & SEN, 2009).

### Srovnání s jinými QTL mapováními myší hybridní sterility

ELLIOTT *et al.* (2004) sledovala pomocí QTL mapování rozdíly mezi laboratorním kmenem C57BL/6J a druhem *Mus macedonicus*, přičemž F1 hybridy z tohoto křížení mají také výrazně sníženou váhu testes (~ 60 mg) a jsou sterilní. QTL analýza zvířat z tohoto křížení ukázala signifikantní QTL vrcholy pro váhu testes na chromozomech X a 17 a signifikantní QTL vrchol pro váhu těla na chromozomu X, morfologická analýza sterilních a fertálních zvířat z křížení ((B6 x *Mus macedonicus*) x C57BL/10J) ukázala na zástavu v meióze I. *Mus macedonicus* a *Mus musculus* jsou samozřejmě evolučně vzdálenější (viz Obr. 1) než poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, poznatky z křížení *Mus macedonicus* x B6 (odvozený z *M. m. domesticus*) tak samozřejmě nelze automaticky aplikovat na situaci mezi oběma poddruhy. Je současně velmi pravděpodobné, že genetická podstata hybridní sterility mezi *Mus macedonicus* a B6 (tj. *Mus musculus*) bude složitější, než hybridní sterilita mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* poddruhy, protože během podstatně delší izolace mohly v obou odštěpených liniích diverzifikovat další důležité geny.

GOOD *et al.* (2008) přispěl k objasnění role chromozomu X pomocí reciproké studie introgrese chromozomu X mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Oproti jiným studiím použil laboratorní kmen LEWES/EiJ, který je odvozený čistě z myší poddruhu *M. m. domesticus*, a neobsahuje tak příměsi jiných poddruhů; tato zvířata jsou původem ze Severní Ameriky. Jako zástupce poddruhu *M. m. musculus* byl použit kmen PWK/PhJ (čistě původu *musculus*, viz GREGOROVÁ & FOREJT, 2000). X chromozom byl rozdělen na proximální, mediální a distální část, přičemž ve dvou paralelně prováděných zpětných kříženích byly tyto části přeneseny na pozadí druhého kmene. Výsledky QTL analýzy potvrdily, že fertilita samců je poškozena při introgresi chromozomu X *musculus* původu (zde PWK/PhJ) na genetické pozadí *domesticus* původu (zde LEWES/EiJ), ukázaly navíc několik signifikantních QTL, z nichž nejvyšší bylo lokalizováno v proximální oblasti chromozomu X.

### 5.3 VÝSLEDKY QTL ANALÝZY PODSOUBORU ZVÍŘAT S *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> - *Hstx2*<sup>PWD</sup> KOMBINACÍ ALEL

Dalším cílem bylo sestavit podsoubor obsahující jen taková zvířata, která nesou genotyp nezbytný, ne však postačující pro hybridní sterilitu. Tito jedinci mají PWD alelu na *Hstx2* lokusu na chromozomu X a heterozygotní kombinaci alel PWD/B6 na *Hst1* lokusu obsahujícím gen *Prdm9*. Pokud by roli při hybridní sterilitě hrály jen tyto dva geny, měla by všechna tato zvířata být sterilní. Alelické složení těchto lokusů bylo zjištěno pomocí mikrosatelitových markerů. Pravděpodobnost heterozygotní kombinace na chromozomu 17 v oblasti *Prdm9* je 50 % (PWD/PWD : B6/PWD : B6/B6 je v poměru 1:2:1) a pravděpodobnost výskytu alely PWD v oblasti *Hstx2* je také 50% (PWD : B6 je v poměru 1:1), tj. celková šance tohoto genotypu je 25 % z celkového počtu zvířat. Bylo nalezeno celkem 60 těchto zvířat, přičemž 4 z nich byly sterilní (zhruba 7 %). Pokud předpokládáme pouze vliv *Hstx2* a *Prdm9* genů, pak by sterilní musela být všechna tato zvířata, ale nejsou, což je dalším důkazem, že roli v hybridní sterilitě mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* hrají další, dosud nenalezené geny.

60 zvířat s heterozygotní kombinací v oblasti *Prdm9* genu a PWD alelou v oblasti *Hstx2* genu bylo genotypováno v celém genomu pomocí stejných mikrosatelitových markerů jako 96 vybraných zvířat v první QTL analýze. QTL analýza mapující lokusy pro váhu testes neukázala žádný signifikantní vrchol (Obr. 27), zatímco QTL analýza mapující lokusy pro počet spermií ukázala signifikantní vrchol na chromozomu 4 (Obr. 28). Nicméně nejnižší počet spermií vykazovala zvířata, která měla v tomto lokusu alelu B6 původu (logický by byl nejnižší počet spermií u heterozygotní kombinace alel B6/PWD, protože kompletně sterilní F1 hybridní mají všechny autozomální geny v heterozygotní kombinaci). To znamená, že případný gen nacházející se v této oblasti nemůže být klíčový pro vznik hybridní sterility, jde pravděpodobně o efekt, který vidíme „navíc“ v F2 generaci.

Pokud předpokládáme jednoduchý model, kdy je pro získání fenotypu hybridní sterility potřebná heterozygotní kombinace několika genů a současně PWD alela na chromozomu X, pak by musel být počet těchto genů minimálně 7-8, aby bylo pravděpodobné, že v F2 generaci bude nalezeno jen 1,90 % sterilních zvířat. Vzhledem k tomu, že při zpětném křížení byl nalezený počet sterilních zvířat větší, přestože je

zastoupení heterozygotní kombinace na autozomech stejné (50 %) a stejné je i zastoupení PWD alel na X chromozomu (50 %), lze tento jednoduchý model vyvrátit.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že hybridní sterilita mezi poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* je podmíněna větším počtem genů, přičemž genetické interakce mezi těmito geny mohou být složitější. Lze uvažovat například model, kdy *Hstx2* a *Prdm9* jsou hlavními geny nezbytnými pro získání fenotypu hybridní sterility, přičemž existuje například 6 dalších genů, z nichž je nutné, aby alespoň 3 byly v heterozygotní kombinaci (tato čísla jsou zvolena náhodně, lze samozřejmě vytvořit mnoho obdobných modelů s jinými čísly). Takováto situace by byla pomocí QTL mapování těžko zjištělná. Stejně tak lze uvažovat, že vliv homozygotních kombinací (PWD/PWD a B6/B6) na některých místech genomu může zvrátit fenotyp hybridní sterility, tato situace byla dokonce už dokonce potvrzena (GREGOROVÁ SOŇA, osobní sdělení).

Je pravděpodobné, že některé z těchto dalších, dosud neidentifikovaných genů vidíme v mapě epistatických interakcí (Obr. 25 a 26), nicméně pouze dvourozměrný model (sledování vzájemného ovlivnění dvou různých lokusů) neumožňuje odhalit všechny možné kombinace, přičemž by zřejmě nestačil ani třírozměrný model.

## 6. ZÁVĚR

V F2 generaci bylo zjištěno pouze 1,90 % sterilních zvířat (4 z 211), přičemž i tato sterilní zvířata měla spermie, byť jejich počet byl velmi nízký, jinými slovy nebylo nalezeno ani jedno zvíře, které by vykazovalo stejný fenotyp jako plně sterilní samci F1 generace křížení PWD x B6.

Při QTL analýze byl podle očekávání potvrzen vliv lokusu obsahujícího gen *Prdm9* na chromozomu 17, nicméně vliv chromozomu X byl potvrzen pouze u počtu spermií a navíc v jiné oblasti, než ve které leží *Hstx2* lokus. Při analýze zpětného křížení na B6 stranu (prováděno paralelně v laboratoři Myši molekulární genetiky), se ukázalo významně vyšší zastoupení sterilních zvířat a na chromozomu X byly signifikantní QTL v oblasti *Hstx2* lokusu zjištěny pro počet spermií i váhu testes. Pouze na základě získaných výsledků nelze tento rozdíl jednoznačně vysvětlit, lze pouze uvažovat několik hypotéz, jako je odlišný původ chromozomu Y, možnost epigenetického efektu v F2 generaci a zejména absence PWD/PWD alelické kombinace u zpětného křížení na B6 stranu. Tato situace vyžaduje další výzkum, vhodná by byla srovnávací analýza zpětného křížení na PWD stranu.

Při QTL analýze zvířat s *Prdm9*<sup>PWD/B6</sup> - *Hstx2*<sup>PWD</sup> alelickou kombinací byl při sledování počtu spermií nalezen signifikantní QTL na chromozomu 4, nedaleko markeru D4-111. Nalezení tohoto QTL naznačuje, že na chromozomu 4 v této oblasti by mohl ležet další gen, který hraje roli při fenotypu hybridní sterility. Nicméně rozložení zvířat podle jejich genotypů na tomto markeru ukazuje, že nejnižší počet spermií mají zvířata s B6/B6 genotypem. Aby byl tento gen jedním z genů nutných pro fenotyp hybridní sterility, musel by mít heterozygotní genotyp PWD/B6.

Zjištěné výsledky, a to jak srovnání s křížením na B6 stranu, tak obě QTL analýzy, ukazují na vliv většího množství genů a zřejmě přítomnost složitějších epistatických interakcí.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>AT</b>	teplota, při které dochází k nasedání primerů (annealing temperature)
<b>B6</b>	laboratorní kmen C57BL/6J
<b>BAC</b>	bakteriální uměle vytvořený chromozom (bacterial artificial chromosome)
<b>bp</b>	páry bazí (base pairs), analogicky kbp, Mbp, Gbp)
<b>C3H</b>	laboratorní kmen C3H/DiSnPh
<b>cM</b>	centimorgan
<b>df</b>	stupně volnosti (degrees of freedom)
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleotid trifosát (deoxyribonucleotide triphosphate)
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>EtBr</b>	ethidium bromid
<b>F1 generace</b>	první filiální generace
<b>F2 generace</b>	druhá filiální generace
<b>LOD</b>	dekadický logaritmus poměru dvou modelů: modelu s vazbou a modelu s nezávislou segregací (logarithm of odds ratio)
<b>MGI</b>	Mouse Genome Informatics
<b>MIT</b>	Massachusetts Institute of Technology
<b>mQ voda</b>	milli Q voda (voda opakovaně destilovaná, zbavená iontů)
<b>P generace</b>	parentální (rodičovská) generace

<b>PBS</b>	fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
<b>PWD</b>	laboratorní kmen PWD/Ph
<b>QTL</b>	quantitative trait loci
<b>SNP</b>	jednoduchý bodový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
<b>TBE</b>	tris-borátový-EDTA pufr (Tris/Borate/EDTA)
<b>T<sub>m</sub></b>	teplota, při které je disociována polovina dvoušrobovicové DNA (melting temperature)
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., de Massy, B. (2010): PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* **327**: 836-840.
- Broman, K. V., Sen, Ś. (2009): A Guide to QTL Mapping with R/qtl. *Springer Science + Business Media*, London, New York, 396 pp.
- Bonhomme, F., Orth, A., Cucchi, T., Hadjisterkotis, E., Vigne, J. D., Auffray, J. C. (2004): A new species of the wild mice on the Island of Cyprus. *C R Biol* **327**: 501-507.
- Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J., Bonhomme, F. (1993): The evolution of house mice. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **24**: 119-152.
- Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Eppig, J. T., Maltais, L. J., Miller, J. C., Dietrich, W. F., Weaver, A., Lincoln, S. E., Steen, R. G. *et al.* (1993): A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science* **262**: 57-66.
- Dobzhansky, T. (1937): Genetics and the Origin of Species. *Columbia University Press*, New York, 364 pp.
- Elliott, R. W., Poslinski, D., Tabaczynski, D., Hohman, C., Pazik, J. (2004): Loci affecting male fertility in hybrids between *Mus macedonicus* and C57BL/6J. *Mammalian Genome* **15**: 704-710.
- Forejt, J. (1996): Hybrid sterility in the mouse. *Trends in Genetics* **12**: 412-417.
- Forejt, J., Iványi, P. (1974): Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genetical Research* **24**: 189-206
- Forejt, J., Vincek, V., Klein, J., Lehrach, H., Loudová-Micková, M. (1991): Genetic mapping of the T-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mammalian Genome* **1**: 84-91.
- Good, J. M., Dean, M. D., Nachman, M. W. (2008): A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mouse. *Genetics* **179**: 2213-2228.



- Greene, T. R., Zhao, Y, Hardies, S. C. (2000): Gene flow of unique sequences between *Mus musculus domesticus* and *Mus spretus*. *Mammalian Genome* **11**: 225-230.
- Gregorová, S., Divina, P., Storchová, R., Trachtulec, Z., Fotopulosová, V., Svenson, K. L., Donahue, L. R., Paigen, B., Forejt, J. (2008): Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Research* **18**: 509-515.
- Gregorová, S., Forejt, J. (2000): PWD/Ph and PWK/Ph inbred strain of *M. m. musculus* subspecies – a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphism. *Folia Biologica* **46**: 31-41.
- Gregorová, S., Mnuková-Fajdelová, M., Trachtulec, Z., Capková, J., Loudová, M., Houglound, M., Hamvas, R., Lehrach, H., Vincek, V., Klein, J., Forejt, J. (1996): Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse Chromosome 17 including the hybrid sterility 1 gene. *Mammalian Genome* **7**: 107-113.
- Guénet, J. L., Bonhomme, F. (2003): Wild Mice: An Ever-Increasing Contribution to a Popular Mammalian Model. *Trends in Genetics* **19**: 24-31.
- Guénet, J. L., Nagamine, C., Simon-Chazottes, D., Montagutelli, X., Bonhomme, F. (1990): Hst-3: an X-linked sterility hybrid sterility gene. *Genetical Research* **56**: 163-165.
- Haldane, J. B. S. (1922): Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *Journal of Genetics* **12**: 101-109.
- Harrison, R. G. (1990): Hybrid zones: Windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* **7**: 69-128.
- Hayashi, K., Matsui, Y. (2006): Meisetz, a novel histone-3-methyltransferase, regulates meiosis-specific epigenesis. *Cell Cycle* **5**: 615-620.
- Hayashi, K., Yoshida, K., Matsui, Y. (2005): A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**: 374-378.
- Hunt, W. G., Selander, R. K. (1973): Biochemical genetics of hybridisation in European mice. *Heredity* **31**: 11-33.
- Irie, S., Tsujimura, A., Miyagawa, Y., Ueda, T., Matsuoka, Y., Matsui, Y., Okuyama, A., Nishimune, Y., Tanaka, H. (2009): Single-nucleotide polymorphism of the PRDM9 (MEISETZ) gene in patients with nonobstructive azoospermia. *Journal of Andrology* **4**: 426-431.

- Irwin, D. E., Irwin, J. H., Price, T. D. (2001): Ring species as a bridges between microevolution and speciation. *Genetica* **112-113**: 223-243.
- Macholán, M., Kryštufek, B., Vohralík, V. (2003): The location of the *Mus musculus*/*M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: clues from morphology. *Acta Theriologica* **48**: 177-188.
- Macholán, M., Baird, S. J. E., Munclinger, P., Dufková, P., Bímová, B., Piálek, J. (2008): Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? *BMC Evolutionary Biology* **8**: 271.
- Macholán, M., Munclinger, P., Sugerková, M., Dufková, P., Bímová, B., Božíková, E., Zima, J., Piálek, J. (2007): Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* **61**: 746-771.
- Matsuda, Y., Hirobe, T., Chapman, V. M. (1991): Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **88**: 4850-4854.
- Mayr, E. (1942): Systematics and the origin of species. *Columbia University. Press*, New York,
- Mihola, O., Forejt, J., Trachtulec, Z. (2007): Conserved alternative and antisense transcripts at the programmed cell death 2 locus. *BMC Genomics* **8**: 20.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlček, Č., Schimenti, J. C., Forejt, J. (2009): A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* **323**: 373-375.
- Miyamoto, T., Koh, E., Sakugawa, N., Sato, H., Hayashi, H., Namiki, M., Sengoku, K. (2008): Two single nucleotide polymorphism in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **11-12**: 553-557.
- Mouse Genome Sequencing Consortium: Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J. *et al.* (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-562.
- Muller, H. J. (1940): Bearing of the *Drosophila* work on systematics. In: *The New Systematics*, Huxley, J. S. *Oxford, Canderon*, 185-268.
- Oka, A., Aoto, T., Totsuka, Y., Takahashi, R., Ueda, M., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Kuriki, S., Takagi, N., Moriwaki, K., Shiroishi, T. (2007): Disruption of genetic interaction between two autosomal regions and the X

chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies. *Genetics* **175**: 185-197.

- Parvanov, E. D., Petkov, P. M., Paigen, K. (2010): Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* **327**: 835.
- Perry, J., Palmer, S., Gabriel, A., Ashworth, A. (2001): A short pseudoautosomal region in laboratory mice. *Genome Research* **11**: 1826-1832.
- Piálek, J., Vyskočilová, M., Bímová, B., Havelková, D., Piálková, J., Dufková, P., Bencová, V., Dureje, L., Albrecht, T., Hauffe, H. C., Macholán, M., Munclinger, P., Storchová, R., Zajícová, A., Holán, V., Gregorová, S., Forejt, J. (2008): Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *Journal of Heredity* **99**: 34-44.
- Perez, D. E., Wu, C. I., Johnson, N. A., 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). *Genetics* **134**: 261-275.
- Perez, D. E., Wu, C. I. (1995): Further characterization of the Odysseus locus of hybrid sterility in Drosophila: one gene is not enough. *Genetics* **140**: 201-206.
- Shao, H., Reed, D. R., Tordoff, M. G. (2007): Genetic loci affecting body weight and fatness in a C57BL/6J x PWK/PhJ mouse intercross. *Mammalian Genome* **18**: 839-851.
- She, J., Bonhomme, F., Boursot, P., Thaler, L., Catzeflis, F. (1990): Molecular phylogenesis in the genus Mus: Comparative analysis of electrophoretic, scnDNA hybridization, and mtDNA RFLP data. *Biological Journal of the Linnean Society of London* **41**: 83-103.
- Silver, L. M. (1995): Mouse Genetics. Concepts and Applications. *Oxford, New York: Oxford University Press*, 384 pp.
- Storchová, R., Gregorová, S., Buckiová, D., Kyselová, V., Divina, P., Forejt, J. (2004): Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mammalian Genome* **15**: 215/224.
- Teeter, K. C., Payseur, B. A., Warris, L. H., Bakewell, M. A., Thibodeau, L. M., O'Brien, J. E., Krenz, J. G., Sans-Fuentes, M. A., Nachman, M. W., Tucker, K. T. (2008): Genome-wide patterns of gene flow across a house mouse hybrid zone. *Genome Research* **18**: 67-76.

- Thuesen, P. (1977): A comparison of the agonistic behavior of *Mus musculus musculus* L. and *Mus musculus domesticus* Ruddy (Mammalia, Rodentia). *Videnskabelige Meddelelser Dansk Naturhistorisk Forening* **140**: 117-128.
- Trachtulec, Z., Mihola, O., Vlček, Č., Himmelbauer, H., Pačes, V. (2005): Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biological Journal of the Linnean Society of London* **84**: 637-641.
- Trachtulec, Z., Vlček, C., Mihola, O., Gregorová, S., Fotopulosová, V., Forejt, J. (2008): Fine haplotype structure of a chromosome 17 region in the laboratory and wild mouse. *Genetics* **178**: 1777-1784.
- Vrana, P. B., Fosella, J. A., Matteson, P., del Rio, T., O' Neill, M. J., Tilghman, S. M. (2000): Genetic and epigenetic incompatibilities underlies hybrid dysgenesis in *Peromyscus*. *Nature Genetics* **25**: 120-124.
- Vyskočilová, M., Pražanová, G., Piálek, J. (2009): Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus musculus* strains on proximal chromosome 17. *Mammalian Genome* **20**: 83-91.
- Wade, C., M., Kulbokas, E. J., Kirby, A. W., Zody, M. C., Mullikin, J. C., Lander, E. S., Lindblad-Toh, K., Daly, M. J. (2002): The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* **420**: 574-578.
- Wilson, D. E., Reeder, D. A. (2005): Mammal species of the world. A Taxonomic and geographic reference (3 rd ed). *Johns Hopkins University Press*, 142 pp.
- Yamagata, Y., Yamamoto, E., Aya, K., Win, K. T., Doi, K., Sobrizal, I. T., Kanamori, H., Wu, J., Matsumoto, T., Matsuoka, M., Ashikari, M., Yoshimura, A. (2010): Mitochondrial gene in the nuclear genome induces reproductive barrier in rice. *Proceedings of the National Academy of Science* **107**: 1494-1499.
- Yang, H., Bell, T. A., Churchill, G. A., Pardo-Manuel de Villena, F. (2007): On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nature Genetics* **39**: 1100-1107.
- Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Miyashita, N., Matshushima Y., Shi, L. M., Cho, W., S., Zhen, X., L., Tagashira, Y. (1988): Hybrid origin of Japanese mice "Mus musculus molossinus": evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 63-78.