

**UNIVERZITA KARLOVA**

Přírodovědecká fakulta



## **AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Meiotická inaktivace pohlavních chromozomů v průběhu  
myší spermatogeneze

Meiotic Sex Chromosome Inactivation in Mouse  
Spermatogenesis

**David Homolka**

Školitel: Ing. Petr Jansa, CSc

Praha 2012

## Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

**Předseda oborové rady:** Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc

**Školící pracoviště:** Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky  
Václavská 1083, 142 20, Praha 4-Krč

**Autor:** David Homolka

**Školitel:** Ing. Petr Jansa, CSc

Oponenti:

.....  
.....  
.....

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba se koná dne: ..... v ..... hod.

kde .....

.....

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

# Obsah

Obsah .....	3
Životopis .....	4
Seznam publikací.....	6
Úvod .....	7
Souhrn publikací.....	9
Chromozomální translokace brání meiotické inaktivaci X chromozomu .....	9
Genetické rozšíření asynapse autozomálního chromatinu podporuje dysregulaci transkripce a selhání meiozy .....	12
Rozdílná exprese nekódujících RNA a kontinuální evoluce X chromozomu v testikulárním transkriptomu dvou myších druhů .....	14
Závěr.....	16
Introduction .....	18
Summary of publications.....	20
Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation.....	20
Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure .....	23
Differential expression of non-coding RNAs and continuous evolution of the X chromosome in testicular transcriptome of two mouse species .....	25
Conclusion .....	27
Reference .....	29

# Životopis

Mgr. David Homolka (\* 1980, Praha, Česká republika)

## Vzdělání

od 2005 postgraduální doktorské studium biomedicíny, obor molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

2003-2005 bakalářské studium matematiky, Matematicko-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova v Praze - nedokončeno

1998-2004 magisterské studium biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, specializace: molekulární biologie

Diplomová práce: „Expresní analýza vybraných X – vázaných genů během myší spermatogeneze“

## Vědecká praxe

Od 2001 Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha

## Ocenění

2009 - Cena Akademie věd ČR za dosažené vynikající výsledky velkého vědeckého významu autorskému týmu Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., ve složení: prof. MUDr. Jiří Forejt DrSc., (vedoucí), Ing. Zdeněk Trachtulec, Dr., RNDr. Soňa Gregorová, Ing. Petr Jansa, CSc., Mgr. David Homolka, Mgr. Ondřej Mihola za vědecký výsledek: Soubor prací o funkční genetice a genomice myši domácí (*Mus musculus*) jako modelového savčího systému.

2008 - Cena ÚMG za nejlepší publikaci v roce 2007:

Homolka, D., Ivánek, R., Čapková, J., Jansa, P., Forejt, J.: „Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation“. *Genome Research* 2007; 17: 1431-1437.

2006 - Award for poster presentation at International Mammalian Genome Conference, Charleston, South Carolina, USA:

“D Homolka, P Jansa, R Ivánek, J Capková, J Forejt: Expression profiling of leptotene and pachytene spermatocytes in mice heterozygous for T(16;17)43H translocation.”

## **Příspěvky na konferencích**

**Homolka D**, Jansa P, Forejt J: Meiotic Consequences of Genetic Extension of Unsynapsed Autosomal Chromatin. Meiosis, EMBO Conference Series, Capaccio/Paestum, Italy (2011)

**Homolka D**, Ivanek R, Forejt J, Jansa P: Comparison of Testicular Transcriptome Between Two Mouse Species Shows Dysregulation of Protein-non-coding RNAs and Confirms Continuous Evolution of the X chromosome. 4th ESF Conference on Functional Genomics & Disease, Dresden, Germany (2010)

**Homolka D**, Jansa P, Ivanek R, Forejt J: Comparison of X-chromosome expression profiles in spermatogenic cells between mouse subspecies *musculus* and *domesticus*. XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany (2008)

**Homolka D**, Jansa P, Ivánek R, Čapková J, Forejt J: Aberrant synapsis of translocated autosomes interferes with meiotic X-chromosome inactivation. Chromatin Structure & Function Conference, Antigua (2007)

**Homolka D**, Jansa P, Ivánek R, Čapková J, Forejt J: Expression profiling of leptotene and pachytene spermatocytes in mice heterozygous for T(16;17)43H translocation. 20th International Mammalian Genome Conference, Charleston, South Carolina, USA (2006)

# Seznam publikací

Přijaté publikace, které jsou součástí předkládané dizertační práce:

**Homolka D**, Jansa P, Forejt J (2012) Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure. *Chromosoma* 121: 91-104. (IF 4.2)

**Homolka D**, Ivanek R, Forejt J, Jansa P (2011) Differential expression of non-coding RNAs and continuous evolution of the X chromosome in testicular transcriptome of two mouse species. *PLoS One* 6: e17198. (IF 4.4)

**Homolka D**, Ivanek R, Capkova J, Jansa P, Forejt J (2007) Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res* 17: 1431-1437. (IF 13.6)

# Úvod

Meiotická inaktivace pohlavních chromozomů (Meiotic sex chromosome inactivation - MSCI) je zásadní epigenetický proces, jehož prostřednictvím dochází v průběhu spermatogeneze k transkripčnímu umlčení X a Y chromozomu. Doprovází ho výrazná remodelace chromatinu, vedoucí k tvorbě tzv. pohlavního nebo-li XY tělíška, které je charakteristickým znakem pachytenních spermatocytů. Přestože MSCI je nezbytné pro samčí plodnost, jeho biologická role i molekulární podstata stále zůstává do značné míry nejasná. Nicméně, objevený vztah mezi chromozomální asynapsí a transkripčním umlčením poukazuje na úzký vztah MSCI a asynapse z velké části nehomologních pohlavních chromozomů, a na skutečnost, že MSCI je specifickým případem obecnějšího mechanismu nazývaného meiotické umlčení asynapsovaného chromatinu (meiotic silencing of unsynapsed chromatin - MSUC) [1-3].

Zásadní role MSCI vyplývá ze studia myších modelů, např. nesoucích X- autozomální translokace, kde abnormální synapse pohlavních chromozomů vede k poruše MSCI a sterilitě samců [4,5]. Specifická zástava ve spermatogenezi je překvapivě charakteristickým znakem nejen X- autozomálních translokací ale i řady autozomálních přestaveb, včetně translokací, inverzí či jiných strukturních mutací. Na základě častého těsného kontaktu strukturně změněných autozomů s pohlavním tělíškem byla vyslovena domněnka, že autozomální přestavby mohou ovlivňovat expresi pohlavních chromozomů a výsledné selhání MSCI pak může být obecným důvodem chromozomální sterility [6-8].

Tato práce se soustředí na studium myší autozomální translokace T(16;17)43H, která je příkladem autozomální přestavby vedoucí v heterozygotním stavu k samčí sterilitě. Naším cílem je charakterizovat zástavu spermatogeneze, která doprovází autozomální asynapsi, analyzovat změny v expresi, ke kterým dochází v postižené oblasti, a analyzovat vliv abnormálního uspořádání pohlavního tělíška na MSCI. Pomocí genetického rozšíření oblasti asynapse se také pokoušíme ukázat na přímou souvislost mezi rozsahem asynapse a mírou poruchy spermatogeneze.

Předpokládá se, že MSCI také hraje důležitou roli během evoluce, kdy doprovází diverzifikaci pohlavních chromozomů. Porucha MSCI zřejmě přispívá k hybridní sterilitě a tím k tvorbě reprodukční bariéry mezi nově oddělenými druhy [9,10]. Porovnáním rozsahu MSCI mezi dvěma myšimi druhy *Mus musculus* and *Mus spretus* se snažíme zjistit míru divergence MSCI a posoudit vztah MSCI k odlivu genů z chromozomu X.



# Souhrn publikací

Chromozomální translokace narušuje meiotickou inaktivaci X chromozomu

## **Cíle:**

Naším cílem bylo zjistit dopad reciproké autozomální přestavby na spermatogenezi a objasnit příčinu samčí sterility, kterou vyvolává. Zejména jsme usilovali o objasnění vlivu autozomální asynapse na genovou expresi a na průběh meiotické inaktivace pohlavních chromozomů.

## **Metody:**

T(16;17)43H (dále jen T43) chromozomální translokace je příkladem autozomální přestavby vedoucí k samčí sterilitě. C57BL/10-T43H/T43H kongenní kmen (B10-T43/T43) byl připraven opakovaným zpětným křížením T43 translokace na C57BL/10ScSnPh (B10) inbrední kmen a homozygotizován prostřednictvím fertálních B10-T43/B10-Rb7(16;17)Bnr dvojitě heterozygotních samců [11]. Křížení B10-T43/T43 samců s B10 samicemi vedlo k produkci sterilních B10-T43/+ samců nesoucích translokaci v heterozygotním stavu. Porovnání B10-T43/T43, B10-T43/+, and B10-+/+ samců nám umožnilo odlišit potenciální poziční efekt translokačního zlomu od vlivu asynapse na identickém genetickém pozadí. Průběh spermatogeneze byl analyzován pomocí histologických preparátů barvených modrým Massonovým trichromem a hematoxylinem/eosinem. Rozdíly v testikulární celularitě byly dále analyzovány na základě určení zastoupení jednotlivých spermatogenních populací pomocí barvení Hoechstem 33342 a následnou analýzou průtokovou cytometrií. Synapse translokačního kvadrivalentu a pohlavních chromozomů byla v jednotlivých spermatocytech charakterizována pomocí imunofluorescenční mikroskopie s protilátkami proti BRCA1 a  $\gamma$ H2AX, které značí asynapsované chromozomy. Chromozomy 17 a X byly vizualizovány v jádře pomocí DNA flourescenční in situ hybridizace (DNA-FISH) s myšími celochromozomálními próbami, která nám umožnila analyzovat kolokalizaci translokačního kvadrivalentu a pohlavních chromozomů. Ke zjištění vlivu autozomální asynapse na genovou expresi jsme provedli celogenomovou analýzu genové

exprese pomocí Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 čipů v izolovaných populacích pre-mid pachyténních spermatocytů, mid-late pachyténních spermatocytů a spermatid. Tyto populace byly izolovány pomocí barvení Hoechstem 33342 následovaným fluorescenčně aktivovaným buněčným sortováním [12]. Zjištěné rozdíly v expresi mezi populacemi fertálních a sterilních samců byly ověřeny pro vybrané geny pomocí kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR).

### **Výsledky:**

Autozomální translokace T43 mezi chromozomy 16 a 17 je příkladem chromozomální přestavby, jež v heterozygotním stavu vede k samčí sterilitě. K objasnění jejího vlivu na meiozu jsme porovnali průběh spermatogeneze mezi B10-T43/+, B10-T43/T43 a B10-+/+ samci. Jen B10-T43/+ samci, nesoucí T43 translokaci v heterozygotním stavu, byli sterilní. Jak B10-T43/T43 homozygoti, tak i B10 samci bez translokace byli fertální a sloužili jako kongenní kontroly. Histologická analýza objevila téměř naprostou absenci spermatozoí v semenných kanálcích B10-T43/+ samců a značnou redukci počtu spermatid. Analýza zastoupení populací pre-mid pachyténních spermatocytů (zahrnujících leptoténní, zygoténní a časná pachyténní stadia), mid-late pachyténních buněk (zahrnujících střední a pozdní pachyténní stadia) a spermatid pomocí průtokové cytometrie odhalila silný pokles již v zastoupení mid-late pachyténních spermatocytů. V heterozygotních B10-T43/+ samcích tedy dochází k progresivní zástavě spermatogeneze na úrovni pachytene první meiotické profáze. V pachytene je běžně dokončena synapse a meiotická rekombinace mezi homologními chromozomy. Abychom zjistili, zda dochází k ovlivnění synapse u B10-T43/+ samců, sledovali jsme v jednotlivých spermatocytech lokalizaci BRCA1 a  $\gamma$ H2AX, které značí asynapsovaný chromatin. Na základě silně asymetrického umístění translokačního zlomu jsme u B10-T43/+ samců předpokládali problémy s párováním translokačního kvadrivalentu. Předpokládanou asynapsi jsme našli u většiny spermatocytů, zároveň s častou asociací kvadrivalentu s pohlavním tělískem. To nás vedlo k formulaci hypotézy, že tato asociace může vést k interakcím mezi asynapsovanými autozomy a pohlavním tělískem, které jsou obdobou jevu popsaného jako „position effect variegation“ [13]. K posouzení vlivu na genovou expresi jsme provedli celogenomovou analýzu genové exprese v izolovaných populacích pre-mid

pachytenních spermatocytů, mid-late pachytenních spermatocytů a spermatid. U B10-T43/+ samců jsme pozorovali převahu downregulovaných genů (tzn. genů se sníženou expresí) na chromozomu 17, který je součástí translokačního kvadrivalentu a nejvíc náchylný k problémům se synapsí. Downregulované geny byly přednostně lokalizovány v okolí translokačního zlomu, mapovaného na ~30Mb pozici [14], který se nejčastěji nachází v asynapsi. Tento efekt byl nejvýraznější v populacích pre-mid pachytenních a mid-late pachytenních spermatocytů. Downregulace pěti vybraných genů z chromozomu 17 byla potvrzena pomocí qRT-PCR. Pokud je nám známo, pozorované snížení genové exprese v oblasti asynapse poskytuje první přímý důkaz, že meiotické umlčení asynapsovaného chromatinu (MSUC) ovlivňuje hladiny mRNA. V mid-late pachytenních spermatocytech fertálních samců dochází k heterochromatinizaci pohlavních chromozomů a jejich transkripčnímu umlčení prostřednictvím meiotické inaktivace pohlavních chromozomů (MSCI), která je nezbytná pro samčí fertilitu [5]. Profilování genové exprese ale ukázalo, že v mid-late pachytenních spermatocytech B10-T43/+ samců dochází k zvýšení exprese řady X-vázaných genů. Domníváme se, že pozorované selhání MSCI, které následuje po autozomálním MSUC, je pravděpodobnou příčinou zástavy spermatogeneze a možným vysvětlením specificky samčí sterility, jež je charakteristickým znakem řady autozomálních translokací.

## Genetické rozšíření asynapse autozomálního chromatinu podporuje dysregulaci transkripce a selhání meiozy

### Cíle:

Tato studie byla zaměřena na genetické rozšíření asynapse autozomálního chromatinu a na analýzu jeho vlivu na samčí meiozu. Vztah mezi asynapsí a genovou expresí byl sledován na úrovni jednotlivých buněk.

### Metody:

Genetického rozšíření oblasti asynapse bylo docíleno křížením B10-T43/T43 kongenního myšího kmene s  $T/t^{12}$  myšmi, nesoucími  $t^{12}$  haplotyp se čtyřmi inverzemi v proximální oblasti chromozomu 17 *trans* k *Brachyury* (*T*) mutaci, mapující také do oblasti *t*-komplexu. Získané potomstvo sestávalo z  $t^{12}+/+T43H$  a  $T+/+T43H$  myší. Test na fertilitu byl proveden připuštěním s dvouměsíčními C57BL/6J myšmi po dobu tří měsíců a spočítáním narozených potomků. Průběh spermatogeneze byl charakterizován pomocí testikulární histologie na sekcích zalitých do parafinu a barvených Schiffovým reagens. Imunocytochemie s protilátkami proti SYCP1, SYCP3, CEN, histonu H1t,  $\gamma$ H2AX a RAD51 sloužila k analýze chromozomální synapse, rozpoznání translokovaného kvadrivalentu, analýze progresu opravy dvojláknových zlomů a tvorby pohlavního tělíska. Transkripce vybraných genů v individuálních buňkách byla analyzována pomocí RNA-FISH na roztíraných spermatocytech. Populace pre-mid pachytenních spermatocytů byla izolována pomocí barvení Hoechstem 33342, následovaným fluorescenčně aktivovaným buněčným sortováním, a použita k celogenomové analýze genové exprese pomocí Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 čipů. Exprese vybraných genů byla ověřena pomocí qRT-PCR.

### Výsledky:

Abychom zjistili, zda vliv T43 autozomální translokace na samčí fertilitu závisí na rozsahu asynapse, rozšířili jsme oblast asynapse vnesením  $t^{12}$  haplotypu *trans* k translokačnímu zlomu.  $t^{12}$  haplotyp obsahuje čtyři nepřekrývající se inverze, které pokrývají přes 25 Mb proximální části chromozomu 17 [15,16]. Samci heterozygotní pro translokaci obsahující  $t^{12}$  haplotyp ( $t^{12}+/+T43H$ ) i bez  $t^{12}$  haplotypu ( $T+/+T43H$ ) byli sterilní při křížení na

C57BL/6J (B6), zatímco samice o stejném genotypu byly fertlní. Histologie nicméně potvrdila, že přítomnost  $t^{12}$  haplotypu značně zvýšila závažnost poruchy spermatogeneze, charakterizované úplnou ztrátou postmeiotických buněk, menším průměrem testikulárních kanálků a zástavou spermatogeneze v epitheliálním stadiu IV. Porovnání zastoupení jednotlivých populací primárních spermatocytů pomocí imunofluorescenční mikroskopie pak potvrdilo zástavu spermatogeneze na úrovni pachytenních spermatocytů jak u  $t^{12}/+T43H$  tak u v  $T+/+T43H$  samců, nicméně úplný pachyténní blok byl pozorován jen u samců  $t^{12}/+T43H$ . Charakterizace chromozomální synapse pomocí imunofluorescenční analýzy s protilátkami proti SYCP1, SYCP3 a  $\gamma$ H2AX odhalila výrazně vyšší frekvenci obtíží s párováním translokačního kvadrivalentu u  $t^{12}/+T43H$  spermatocytů, navíc často doprovázené asociací asynapsovaného kvadrivalentu s pohlavním tělískem. Autozomální asynapse byla také doprovázena opožděnou opravou dvouvláknových zlomů, vyplývající z přetrvávajícího RAD51 signálu. Expresní analýza pak potvrdila transkripční umlčení genů v asynapsované oblasti chromatinu, které bylo umocněno přítomností  $t^{12}$  haplotypu. K umlčení překvapivě došlo již v pre-mid pachyténním stadiu, kde asynapsovaný X chromozom je stále aktivní. RNA-FISH proti vybraným genům z chromozomu 17 pak potvrdila, že u  $t^{12}/+T43H$  samců je větší počet buněk předmětem MSUC. Expresní analýza X vázaného genu *Scml2* a Cot1 barvení, detekující nascentní transkripty, naznačili, že autozomální MSUC je následováno poruchou inaktivace pohlavních chromozomů v mid-late pachytenních spermatocytech. Závěrem můžeme shrnout, že rozšíření autozomální asynapse vede k výraznějšímu MSUC, které předchází a interferuje s transkripčním umlčením pohlavních chromozomů a zvyšuje závažnost poruchy spermatogeneze.

## Rozdílná exprese nekódujících RNA a kontinuální evoluce X chromozomu v testikulárním transkriptomu dvou myších druhů

### **Cíle:**

Porovnání testikulární exprese mezi myšími druhy *Mus musculus* a *Mus spretus* mělo za cíl nalézt rozdílně regulované transkripty pocházející z X chromozomu a prozkoumat vztah mezi evolucí MSCI a retropozicí z X chromozomu.

### **Metody:**

Testikulární exprese byla analyzována pomocí oligonukleotidových „tiling“ čipů, rovnoměrně pokrývajících chromozomy 2, X, Y a mitochondriální genom, ve dvou myších druzích: v *Mus spretus* inbredizovaným z divokých myší odchycených ve Francii a v *Mus musculus* reprezentovaným laboratorním kmenem C57BL/6J (B6). Exprese vybraných transkriptů byla analyzována i u C3H/HeJ podkmenu (C3H), který reprezentuje další kmen odvozený od *Mus musculus*. Kandidátní oblasti z *Mus spretus* byly sekvenovány, abychom zjistili podstatu pozorované rozdílné intenzity prób. Rozdíly v intenzitě, reprezentující změny v expresi, byly pro vybrané transkripty dále ověřeny pomocí qRT-PCR jak v celých varlatech tak v izolovaných populacích pre-mid pachytenních spermatocytů, mid-late pachytenních spermatocytů a spermatid. Populace byly izolovány na základě barvení Hoechstem 33342 následovaným fluorescenčně aktivovaným buněčným sortováním.

### **Výsledky:**

Užití oligonukleotidových „tiling“ čipů nám umožnilo nalézt rozdíly v testikulárním transkriptomu dvou myších druhů bez ohledu na předchozí anotaci funkčních genů. Oligonukleotidové próby se signifikantně odlišnou intenzitou byly sloučeny do rozdílně regulovaných oblastí, tzv. klastrů. Díky navržení prób na základě druhu *Mus musculus*, mohla snížená intenzita (downregulace) u *Mus spretus* odpovídat buď sekvenčním rozdílům nebo rozdílům v množství transkriptu. Sekvenční rozdíly byly identifikovány jako hlavní zdroj pozorované downregulace u mitochondriálního genomu a zčásti i chromozomu Y. Dva downregulované klastry z chromozomu 2 byly podrobeny detailní analýze, neboť obsahují PIWI-interagující RNA (piRNA) – malé RNA

s důležitou rolí ve spermatogenezi. Pro obě oblasti jsme potvrdili snížené množství přepisovaných piRNA prekurzorů. Pokles byl nejvýraznější v populaci pachytenních spermatocytů. Mezi upregulovanými klastry (tzn. oblastmi se zvýšenou expresí) na chromozomu 2 byla značná převaha transkriptů z neanotovaných oblastí, pravděpodobně nemajících protein-kódující potenciál. Na chromozomu X jsme našli pouze jeden upregulovaný klaster odpovídající transkriptu *G6pdx*, který kóduje glukózo-6-fosfát dehydrogenázu a je v *Mus musculus* jak meioticky tak postmeioticky transkripčně umlčen. Postmeiotickou funkci *G6pdx* nahrazuje jeho funkční autozomální retrogen *G6pd2* [17]. Zároveň s ověřením zvýšené exprese *G6pdx* v *Mus spretus* jsme zjistili, že k nejvýraznějšímu zvýšení exprese dochází v populaci spermatid. Na druhou stranu, exprese autozomálního *G6pd2* byla nezměněna. Abychom zjistili evolučně původní expresi *G6pdx*, porovnali jsme expresi krysího ortologního *G6pd* genu, který v průběhu evoluce nevyprodukoval žádný autozomální retrogen, a potvrdili jeho nejvyšší expresi ve spermatidách. Věříme, že rozdílná regulace exprese *G6pdx* mezi *Mus spretus* a *Mus musculus* dokumentuje proces úniku X-vázaných genů důležitých pro spermatogenezi na autozomy, jež umožňuje následnou inaktivaci těchto X-vázaných genů.

## Závěr

Meiotická inaktivace pohlavních chromozomů (meiotic sex chromosome inactivation - MSCI) je epigenetický proces nezbytný pro spermatogenezi, jehož porucha je spojena s pachytenní zástavou a sterilitou samců [5]. Předpokládá se, že MSCI je specifickým případem obecnějšího mechanismu, nazvaného meiotické umlčení asynapsovaného chromatinu (meiotic silencing of unsynapsed chromatin - MSUC), který umlčuje veškerý chromatin v asynapsi [1-3]. V této práci jsme analyzovali meiotické důsledky autozomální asynapse, zejména pak vliv na autozomální MSUC, MSCI a jejich vztah k zástavě spermatogeneze. Na myších samcích heterozygotních pro T(16;17)43H translokaci jsme ukázali, že translokační kvadrivalent často zůstává v asynapsi a asociuje s pohlavním tělískem. Asynapsi doprovázelo transkripční umlčení příslušných genů. Pokud je nám známo, jedná se o první potvrzení vlivu MSUC na hladiny mRNA jednotlivých genů. MSUC translokovaného autozomu bylo následováno zvýšenou expresí X-vázaných genů naznačující selhání MSCI. Předpokládáme, že prostřednictvím úzkého kontaktu asynapsovaných autozomů s pohlavními chromozomy dochází k interferenci autozomálního MSUC a MSCI, která následně vede k apoptóze, zástavě spermatogeneze a specificky samčí sterilitě. Na základě podobných meiotických fenotypů řady nezávislých autozomálních přestaveb a potvrzené roli selhání MSCI u X-autozomálních translokací [4], navrhuje poruchu MSCI jako obecný důvod chromozomální sterility, jež postihuje výlučně samce.

Genetickým rozšířením oblasti asynapse pomocí  $t^{12}$  haplotypu jsme pak ukázali, že porucha spermatogeneze i MSCI je úměrná rozsahu asynapse a síle autozomálního MSUC. Překvapivě, transkripční umlčení asynapsované autozomální oblasti předchází poruše inaktivace X chromozomu, což naznačuje rozdíl v buněčné odpovědi na asynapsi autozomálního a gonozomálního chromatinu. Nicméně způsob, jakým autozomální asynapse vede k poruše MSCI, zůstává nejasný. Lákavými vysvětleními mohou být: vyvážení inaktivující mašínérie autozomálními oblastmi, která pak nedostačuje pro MSCI nebo inaktivace autozomálních genů, jež jsou pro MSCI nezbytné.

MSCI hraje pravděpodobně také důležitou roli v utváření genového složení X chromozomu v průběhu evoluce, kdy působí jako hnací síla pro odliv genů



důležitých ve spermatogenezi z X chromozomu na autozomy [18]. Porovnáním testikulární exprese mezi myšimi druhy *Mus spretus* a *Mus musculus* jsme odhalili rozdílnou expresi X vázaného genu *G6pdx*, která poukazuje na kontinuální evoluci regulace exprese X chromozomu a osvětluje změny v genové expresi, ke kterým dochází v souvislosti s genovou retropozicí z X chromozomu.

# Introduction

Meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) is an essential epigenetic process, which transcriptionally silences X and Y chromosomes during spermatogenesis. It is accompanied by substantial chromatin remodeling resulting in a formation of so called sex or XY body, which is a characteristic of male pachytene spermatocytes. In spite of MSCI indispensability for male fertility, its biological role and molecular nature still remain rather unclear. However, the described link between chromosomal asynapsis and transcriptional silencing demonstrated that MSCI is tightly associated with the asynapsis of largely non-homologous sex chromosomes and is a specific form of more general mechanism called meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC) [1-3].

The essential role of MSCI was demonstrated using mouse models, such as carriers of X-autosome translocations, where anomalous synapsis of sex chromosomes leads to impairment of MSCI and male sterility [4,5]. Intriguingly, the exclusive spermatogenic arrest is a hallmark of not only X-autosome translocations but even various autosomal rearrangements, including autosomal translocations, inversions, or other structural mutations. Because the rearranged autosomes often intimately associate with the sex body, it was suggested that such autosomal rearrangements might influence sex chromosome expression and that MSCI failure is therefore a common reason for chromosomal sterility [6-8].

In this work, we study a mouse autosomal translocation T(16;17)43H as an example of autosomal rearrangement, which in heterozygous state induces male sterility. We aim to characterize the spermatogenic arrest, which accompanies the autosomal asynapsis, to analyze the expression changes in the affected region and to analyze the impact of aberrant sex body formation on MSCI. By genetic enlargement of the region of asynapsis, we also strive to show a causative relationship between the extent of asynapsis and degree of spermatogenic failure.

MSCI is also believed to play an important role during evolution, where it accompanies the diversification of sex chromosomes. Impairment of MSCI was suggested to participate in hybrid sterility and therefore to contribute to

reproductive barrier between newly formed species [9,10]. To obtain an insight on MSCI divergence we compare its extent in two close mouse species *Mus musculus* and *Mus spretus* and evaluate its relationship to gene flow out of the X chromosome.

# Summary of publications

Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation

## **Aims:**

Our aim was to investigate the effect of reciprocal autosomal rearrangement on spermatogenesis and elucidate the cause of its male-limited sterility. Specifically, we strived to evaluate how the autosomal asynapsis influences the gene expression and whether it antagonizes meiotic sex chromosome inactivation.

## **Methods:**

We studied T(16;17)43H (hereafter T43) chromosomal translocation as an example of male-sterile autosomal rearrangement. The C57BL/10-T43H/T43H congenic strain (B10-T43/T43) was prepared by repeated backcrossing the T43 translocation to the C57BL/10ScSnPh (B10) inbred strain and made homozygous through a fertile intermediate, a B10-T43/B10-Rb7(16;17)Bnr double heterozygous male [11]. Comparing B10-T43/T43, B10-T43/+, and B10-+/+ males, we could distinguish a possible position effect of the translocation break from the effect of asynapsis on the identical genetic background. The course of the spermatogenesis was analyzed using mounted histological sections stained by Mason's blue trichrome and hematoxylin/eosin. Differences in testicular cellularity were also assessed comparing the proportions of individual spermatogenic populations using Hoechst 33342 staining followed by flow cytometry analysis. Synapsis of translocated quadrivalent and sex chromosomes was characterized in individual spermatocytes by immunofluorescence microscopy using antibodies against BRCA1 and  $\gamma$ H2AX, which are markers of asynapsed chromosomes. Chromosomes 17 and X were visualized in the nucleus using DNA fluorescence in situ hybridization (DNA-FISH) with mouse whole-chromosome paint probes, which allowed us to analyze the co-localization of the translocated quadrivalent with the sex body. To assess how the autosomal asynapsis influences the gene expression, the whole genome gene expression analysis was performed using Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 arrays in isolated populations of pre-mid

pachytene, mid-late pachytene spermatocytes and spermatids. These populations were isolated using Hoechst 33342 staining followed by fluorescence activated cell sorting of individual populations of spermatogenic cells [12]. Obtained expression differences between the populations of sterile and fertile males were verified for a subset of genes using quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR).

## **Results:**

Autosomal translocation T43 between chromosome 16 and 17 was studied as an example of chromosomal rearrangement, which in heterozygous state leads to male-limited sterility. To assess its meiotic effects we compared the course of spermatogenesis between B10-T43/+, B10-T43/T43 and B10-+/+ males. Only B10-T43/+ males, carrying T43 translocation in a heterozygous state, were sterile. The B10-T43/T43 translocation homozygotes and B10 males without translocation were fertile and served as isogenic controls. Histological examination revealed virtual absence of spermatozoa in seminiferous tubules of B10-T43/+ males and severe reduction of spermatids. The proportions of populations of pre-mid-pachytene spermatocytes (comprising leptotene, zygotene, and early pachytene stages), the mid-late pachytene cells, and spermatids were further analysed by flow cytometry, which revealed strong decrease even in the population of mid-late pachytene spermatocytes. It implies a progressive spermatogenic breakdown in heterozygous B10-T43/+ males at the pachytene stage of the first meiotic prophase. In pachytene the synapsis and meiotic recombination between the homologous chromosomes is completed. To find out whether the synapsis of individual chromosomes is affected in B10-T43/+ males, we inspected the localization of BRCA1 and  $\gamma$ H2AX, which mark the asynapsed chromatin, in individual pachytene spermatocytes. Based on the extremely asymmetrical positions of the translocation breaks we expected pairing difficulties of rearranged autosomes of sterile B10-T43/+ males. We confirmed the asynapsis of translocated quadrivalent in majority of spermatocytes together with its frequent association with asynapsed sex chromosomes and we suggested that this intimate contact might result in position-effect-variegation-like interactions between the unsynapsed autosomes and XY body. To check the impact on gene expression we performed whole genome gene expression profiling in isolated

populations of pre-mid pachytene spermatocytes, mid-late pachytene spermatocytes and spermatids. We observed prevalence of genes, which were downregulated in sterile B10-T43/+ males, on chromosome 17, which is part of translocated quadrivalent and most prone to pairing difficulties. Intriguingly, the downregulated genes clustered around the translocation break, previously mapped to ~30 Mb position [14], which is a most frequent region of asynapsis. This effect was most apparent in the population of pre-mid pachytene spermatocytes and mid-late pachytene spermatocytes. The down-regulation of five selected genes of chromosome 17 was confirmed by qRT-PCR. To our knowledge the observed gene down-regulation in the area of asynapsis provides the first direct evidence that meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC) operates at mRNA level. In mid-late pachytene spermatocytes of fertile males the sex chromosomes become heterochromatic and are transcriptionally silenced by a process called meiotic sex chromosome inactivation (MSCI), which is indispensable for male fertility [5]. Strikingly, the gene expression profiling revealed upregulation of plenty of X chromosomal genes in mid-late pachytene spermatocytes of B10-T43/+ males. We conclude that the observed impairment of MSCI, which follows the autosomal MSUC, is likely the cause of the spermatogenic arrest and might explain the male-limited character of the sterility, which is the hallmark of various autosomal translocations.

## Genetically enhanced asynapsis of autosomal chromatin promotes transcriptional dysregulation and meiotic failure

### Aims:

The study was aimed at genetic enlargement of partial autosomal asynapsis and analysis of its impact on male meiosis. Single-cell analysis was performed to correlate the asynapsis of particular cells with gene expression.

### Methods:

To genetically enlarge the region of asynapsis, the mice of B10-T43/T43 congenic strain were crossed with  $T/t^{12}$  mice, carrying  $t^{12}$  haplotype with four inversions in the proximal part of chromosome 17 *in trans* to *Brachyury* ( $T$ ) mutation also mapping within the  $t$ -complex region. The obtained progeny consisted of  $t^{12} +/+T43H$  and  $T+/+T43H$  mice. Fertility test was performed based on mating with 2 months old C57BL/6J mice for three months and on calculation of produced offspring. Testicular histology using paraffin embedded sections stained by periodic acid Schiff was employed to analyze the course of spermatogenesis. Immunocytochemistry with antibodies against SYCP1, SYCP3, CEN, histone H1t,  $\gamma$ H2AX and RAD51 was used to assess the chromosomal synapsis, recognition of translocated quadrivalent, progression of DSB repair and sex body formation. RNA-FISH on spread meiocytes was performed to analyze the transcription of selected genes in individual cells. Population of pre-mid pachytene spermatocytes was isolated using Hoechst 33342 staining followed by fluorescence activated cell sorting [12] and subjected to whole-genome gene expression profiling using Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrays. Expression of selected genes was validated by qRT-PCR.

### Results:

To see whether the sterilizing effect of T43 autosomal translocation depends on the extent of autosomal asynapsis, we decided to enlarge the region of asynapsis by introducing the  $t^{12}$  haplotype *in trans* to the translocated break. The  $t^{12}$  haplotype harbors four adjacent non-overlapping inversions that encompass over 25 Mb of proximal part of chromosome 17 [15,16]. The male translocation heterozygotes with ( $t^{12} +/+T43H$ ) or without the  $t^{12}$  haplotype ( $T+/+T43H$ ) were completely sterile when outcrossed to C57BL/6J (B6),

however their female siblings of the same genotype were fertile. Presence of  $t^{12}$  haplotype significantly deteriorated the course of spermatogenesis as demonstrated by histology showing complete loss of postmeiotic cells, smaller testicular tubule diameter and no progression beyond epithelial stage IV. Immunofluorescence microscopy comparison of proportions of individual primary spermatocytes confirmed spermatogenic arrest at mid-late pachynema in both  $t^{12}/+T43H$  and  $T+/+T43H$  males, however complete pachytene block was observed only in  $t^{12}/+T43H$  males. Characterization of chromosomal synapsis using immunofluorescence analysis with antibodies against SYCP1, SYCP3 and  $\gamma$ H2AX revealed much greater frequency of pairing difficulties of translocated quadrivalent in  $t^{12}/+T43H$  spermatocytes, which was accompanied by common association of asynapsed quadrivalent with sex body. Autosomal asynapsis was accompanied by delayed DSB repair as demonstrated by pachytene persistence of RAD51 foci. Expression analysis then confirmed transcriptional silencing of the genes in unsynapsed portion of chromatin, which was much more apparent in the presence of  $t^{12}$  haplotype. Intriguingly, the silencing started already in pre-mid pachytene stage, where the asynapsed X chromosome is still active. RNA-FISH against specific genes from chromosome 17 then confirmed that higher proportion of cells underwent MSUC in  $t^{12}/+T43H$  males. Expression analysis of X chromosomal *Scml2* gene and Cot1 staining of nascent transcripts indicated that autosomal MSUC is followed by failure of proper sex chromosome inactivation in mid-late pachytene spermatocytes. Altogether, we showed that the enlargement of autosomal asynapsis leads to more pronounced MSUC response, which precedes and antagonizes transcriptional silencing of sex chromosomes, and increases severity of spermatogenic failure.



## Differential expression of non-coding RNAs and continuous evolution of the X chromosome in testicular transcriptome of two mouse species

### **Aims:**

Comparison of testicular expression between mouse species *Mus musculus* and *Mus spretus* aimed at discovery of differentially regulated X chromosomal transcripts and investigation of the relationship between MSCI evolution and retroposition out of the X chromosome.

### **Methods:**

Testicular expression was analyzed using tiling arrays overlapping Chromosomes 2, X, Y and mitochondrial genome in two mouse species: *Mus spretus* inbred from wild caught animals in France and *Mus musculus* represented by laboratory C57BL/6J strain (B6). C3H/HeJ substrain (C3H) was used as another *Mus musculus* derived strain in analysis of individual transcript expression. Candidate regions of *Mus spretus* were sequenced to elucidate the nature of obtained differential probe intensities. Differences in probe intensities, which might have been attributed to expression variation, were validated for several transcripts using qRT-PCR both in whole testes and isolated populations of pre-mid pachytene spermatocytes, mid-late pachytene spermatocytes and spermatids. The populations were isolated using Hoechst 33342 staining followed by FACS [12].

### **Results:**

Usage of tiling arrays enabled us to search for differences in testicular transcriptome of two mouse species, which was not limited to previously annotated functional genes. Array probes with significantly different intensities between samples were merged to identify differentially regulated clusters. Due to the probe design based on *Mus musculus* species, downregulation in *Mus spretus* might have referred to either sequence divergence or difference in transcript abundance. Sequence divergence was identified to be the predominant cause of observed downregulation of mitochondrial genome and presumably much of Y chromosome. Two downregulated clusters of chromosome 2 were inspected in detail, as they contain clusters of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) – small RNAs having essential role in

spermatogenesis. Decrease in abundance of piRNA precursors transcribed from both clusters was confirmed in *Mus spretus*, which was most apparent in pachytene spermatocytes. Among upregulated clusters on chromosome 2 there was a significant overrepresentation of transcripts originating in unannotated regions and presumably without a protein-coding potential. On the X chromosome only single upregulated cluster was found referring to *G6pdx* transcript, which encodes glucose-6-phosphate dehydrogenase and exhibits both meiotic and postmeiotic transcriptional silencing in *Mus musculus*. *G6pdx* function in these cells is substituted by its functional autosomal retrogene *G6pd2* [17]. We verified the upregulation of *G6pdx* in *Mus spretus* and found out that it is strongly upregulated mainly in spermatids. On the other hand expression of autosomal *G6pd2* was unchanged. To elucidate the evolutionary original expression pattern of *G6pdx* we compared the expression of rat orthologous *G6pd* gene, which did not produce any autosomal copy during evolution and confirmed its high expression in spermatids. We believe that the observed different expression pattern of *G6pdx* between *Mus spretus* and *Mus musculus* documents the process of escaping of X-linked genes important for spermatogenesis to autosomes, which finally enables the inactivation of X-linked genes.

# Conclusion

Meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) is an essential epigenetic event during spermatogenesis, whose impairment is associated with pachytene arrest and male sterility. It is believed to be a specific case of more general process called meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC), which silences all asynapsed chromatin. Here, we analyzed the meiotic consequences of autosomal asynapsis, focusing on autosomal MSUC, MSCI and their relationship to spermatogenic breakdown. Using mouse males heterozygous for T(16;17)43H translocation, we have shown that the translocation quadrivalent often remains asynapsed and co-localizes with the sex body. The asynapsis was accompanied by transcriptional silencing of affected genes, which is to our knowledge the first confirmation of MSUC affecting mRNA levels of individual genes. Strikingly, MSUC of the translocated autosome was followed by aberrant expression of X-linked genes indicating MSCI impairment. We argued that the interference of autosomal silencing, perhaps *via* the intimate contact between the asynapsed autosomes and the sex chromosomes, with MSCI functions as a trigger of apoptosis and results in spermatogenic arrest and male-limited sterility. Based on similar meiotic phenotypes of various independent autosomal rearrangements and confirmed role of MSCI failure in X-autosomal translocations, we suggest that the MSCI impairment is a common reason for male-limited chromosomal sterility.

By genetic enlargement of the region of asynapsis using the  $t^{12}$  haplotype we then showed that the spermatogenic and MSCI impairment is proportional to the extent of asynapsis and to the strength of MSUC response. Interestingly, the transcriptional silencing of the asynapsed autosomal region preceded impairment of X chromosome inactivation, indicating different cellular response to the asynapsed autosomal and sex chromatin. However, the exact way of how autosomal silencing interferes with MSCI is still unclear, with several tempting explanations: asynapsed autosomal parts might sequester the silencing machinery, which is then insufficient for proper MSCI, or MSCI might be impaired due to the inactivation of autosomal genes indispensable for its function.

MSCI is also supposed to play an important role in shaping the gene content of X chromosome during evolution as a driving force leading to the escape of genes important in spermatogenesis from X chromosome to autosomes [18]. Comparing testicular expression between *Mus spretus* and *Mus musculus*, we have discovered differential expression of X-linked *G6pdx* gene, which demonstrates the continuous evolution of X-chromosome regulation and sheds a light on the changes in gene expression which accompanies the out-of-the X-chromosomal retroposition [19].

# Reference

1. Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, et al. (2005) Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol* 25: 1041-1053.
2. Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, et al. (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37: 41-47.
3. Schimenti J (2005) Synapsis or silence. *Nat Genet* 37: 11-13.
4. Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ, Mitchell MJ, Burgoyne PS (2006) Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell* 10: 521-529.
5. Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, et al. (2010) Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* 20: 2117-2123.
6. Forejt J (1982) X-Y involvement in male sterility caused by autosome translocations - a hypothesis; Crosignani P, Fraccaro M, Rubin B, editors. New York: Academic Press. 135-152 p.
7. Forejt J (1984) X-inactivation and its role in male sterility; Gropp A, Bennett M, Wolf U, editors. Hemel Hempstead George Allen and Unwin. 117-127 p.
8. Forejt J (1985) Chromosomal and genic sterility of hybrid type in mice and men. *Exp Clin Immunogenet* 2: 106-119.
9. Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, Forejt J (2009) A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* 323: 373-375.
10. Good JM, Giger T, Dean MD, Nachman MW (2010) Widespread over-expression of the X chromosome in sterile Fhybrid mice. *PLoS Genet* 6.
11. Forejt J, Gregorova S, Landikova M, Capkova J, Silver L (1995) Genetic variations in parental imprinting on mouse chromosome 17. In: Ohlsson R, editor. *Genomic imprinting: causes and consequences*: Cambridge University Press. pp. 29-46.
12. Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, et al. (2005) Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A* 65: 40-49.
13. Hendrich BD, Willard HF (1995) Epigenetic regulation of gene expression: the effect of altered chromatin structure from yeast to mammals. *Hum Mol Genet* 4 Spec No: 1765-1777.

14. Vacik T, Ort M, Gregorova S, Strnad P, Blatny R, et al. (2005) Segmental trisomy of chromosome 17: a mouse model of human aneuploidy syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4500-4505.
15. Lyon MF (2005) Elucidating mouse transmission ratio distortion. *Nat Genet* 37: 924-925.
16. Bauer H, Veron N, Willert J, Herrmann BG (2007) The t-complex-encoded guanine nucleotide exchange factor Fgd2 reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse. *Genes Dev* 21: 143-147.
17. Hendriksen PJ, Hoogerbrugge JW, Baarends WM, de Boer P, Vreeburg JT, et al. (1997) Testis-specific expression of a functional retroposon encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase in the mouse. *Genomics* 41: 350-359.
18. Emerson JJ, Kaessmann H, Betran E, Long M (2004) Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. *Science* 303: 537-540.
19. Homolka D, Ivanek R, Forejt J, Jansa P (2011) Differential expression of non-coding RNAs and continuous evolution of the X chromosome in testicular transcriptome of two mouse species. *PLoS One* 6: e17198.