

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



DIZERTAČNÍ PRÁCE

Poziční klonování genu *Hst1* (*Hybrid sterility 1*)
a molekulární analýza jeho kandidatních genů

RNDr. Ondřej Mihola

Školitel: Ing. Zdeněk Trachtulec, PhD.
Ústav molekulární genetiky AVČR, v.v.i.

Praha 2008

Tato dizertační práce byla vypracována na Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v laboratoři vedené MUDr. Jiřím Forejtem DrSc., pod odborným dohledem ing. Zdeňka Trachtulce, kterým bych chtěl tímto poděkovat za trpělivý přístup a cenné rady a zkušenosti, které se mi snažili předat po celou dobu vypracovávání mé disertační práce.

Můj dík patří také všem spolupracovníkům z laboratoře, jmenovitě Soně, Martě, Vladaně, Petrovi D., Davidovi, Petrovi J, Petrovi F., Radce, Robertovi, Radkovi, Tanmoyovi, Tomášovi, Stoilovi, Ireně, Janě a Marušce nejen za jejich pomoc a přátelskou pracovní atmosféru v laboratoři, ale i nejeden relaxační zážitek po pracovní době.

Dále bych rád poděkoval svým věrným přátelům Medjákovi, Alešovi a Martinovi, bez kterých si oběd v „Ústavu“ snad ani nedovedu představit.

Poděkování také patří celé mé rodině za psychickou i materiální podporu po celou dobu mých postgraduálních studií.

“Pure species have of course their organs of reproduction in a perfect condition, yet when intercrossed they produce either few or no offspring. Hybrids, on the other hand, have their reproductive organs functionally impotent, as may be clearly seen in the state of the male element in both plants and animals”

*Charles Darwin: On the origin of species by means of natural selection.
John Murray, London, 1859*

Obsah

OBSAH	4
1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1. HYBRIDNÍ STERILITA	8
2.2. MYŠ DOMÁCÍ JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS PRO STUDIUM HYBRIDNÍ STERILITY	9
2.2.1. Původ myši domácí	9
2.2.2. Výhody užití myši domácí pro studium hybridní sterility	11
2.2.3. Původ laboratorních kmenů myší	12
2.2.4. Hybridní sterilita u myši domácí	13
2.3. GEN HYBRID STERILITY 1 (<i>HST1</i>)	15
2.3.1. Fenotyp hybridní sterility u hybridů <i>M. m. musculus</i> a <i>M. m. domesticus</i>	16
2.4. POZIČNÍ KLONOVÁNÍ GENŮ U MYŠI	16
2.4.1. Genetické mapování	17
2.4.1.1. Zpětné křížení (<i>Backcross</i>)	18
2.4.2. Fyzikální mapování	19
2.4.3. Mapování pomocí SNP haplotypů	20
2.4.3.1. Co jsou haplotypy a haplotypové bloky	20
2.4.3.2. Specifika myších haplotypů	21
2.4.3.3. Metody mapování pomocí haplotypů	23
2.4.4. Identifikace kandidátních genů	24
2.4.4.1. cDNA selekce	24
2.4.4.2. Genomové sekvenování a databáze <i>Expressed Sequence Tags</i> (dbEST)	25
2.4.4.3. Další metody pro identifikaci kandidátních genů	26
2.4.5. Identifikované kandidátní geny pro <i>Hst1</i>	27
2.4.5.1. Gen <i>Tbp</i>	27
2.4.5.2. Gen <i>Pdcd2</i>	27
2.4.5.3. Gen <i>Psemb1</i>	28

2.4.5.4. Gen <i>D17Ph4e</i> (<i>Pgcc1</i>)	29
2.4.5.5. Gen <i>Dll1</i>	30
2.4.5.6. Gen <i>Prdm9</i>	30
2.4.5.7. Pseudogeny v <i>Hst1</i> oblasti	30
2.4.6. Požadavky na <i>Hst1</i> kandidátní gen	32
2.5. USPOŘÁDÁNÍ GENŮ NA CHROMOZÓMECH U EUKARYOT	33
3. VÝSLEDKY	35
3.1. POZIČNÍ KLONOVÁNÍ GENU <i>HST1</i> (HYBRID STERILITY 1): JEMNÉ GENETICKÉ MAPOVÁNÍ A ZHODNOCENÍ KANDIDATURY VYBRANÝCH KANDIDÁTNÍCH GENŮ	35
3.2. SROVNÁVACÍ ANALÝZA <i>PDCD2-TBP-PSMB1</i> OBLASTI U OBRATLOVCŮ	37
3.3. KONZERVOVANÉ ALTERNATIVNÍ A ANTISENSE TRANSKRIPTY V <i>PDCD2</i> (PROGRAMMED CELL DEATH 2) LOKUSU	38
3.4. JEMNÁ HAPLOTYPOVÁ STRUKTURA OBLASTI NA 17. MYŠÍM CHROMOZÓMU.....	40
3.5. MYŠÍ <i>HST1</i> LOKUS KÓDUJE MEIOTICKÝ GEN PRO HISTON H3 METHYLTRANSFERÁZU.	41
4. DISKUZE.....	43
4.1. POZIČNÍ KLONOVÁNÍ GENU <i>HST1</i>	43
4.2. FUNKCE NOVĚ IDENTIFIKOVANÝCH TRANSKRIPTŮ V <i>HST1</i> LOKUSU A KONZERVACE SYNTENIE GENŮ <i>PDCD2</i> , <i>TBP</i> A <i>PSMB1</i> U OBRATLOVCŮ.....	48
4.3. VYUŽITÍ HAPLOTYPOVÉ ANALÝZY K MAPOVÁNÍ MYŠÍCH GENŮ	52
5. SEZNAM ZKRATEK	55
6. REFERENCE	56

1. Úvod

Hybridní sterilita je definována jako neplodnost postihující potomky dvou plně fertálních rodičovských forem. Je to jedna z prvních reprodukčních bariér, které se objevují mezi nově vznikajícími druhy a patří tedy k prvním krokům speciace. Speciace, neboli rozštěpení rodičovského druhu na několik druhů dceřinných, je klíčový evoluční proces, vedoucí k ohromné druhové diversitě na naší planetě. Přestože se speciací zabývají vědci již od dávnověku a zejména hybridní sterilita je posledních 70 let intenzivně zkoumána, není na molekulární úrovni objasněno mnoho případů jejího vzniku a mechanismu jejího působení. U savců nebyl doposud vyklonován jediný gen hybridní sterility (Forejt, 1985; Forejt, 1996). Poziční klonování genů¹ hybridní sterility komplikuje zejména fakt, že hybridní sterilita je na rozdíl od jiných znaků často způsobena větším počtem genů, mezi kterými existují velmi komplexní epistatické interakce (Orr and Irving, 2001; Sawamura et al., 2004), což má za následek, že se účinek genů hybridní sterility projeví pouze v určité specifické kombinaci genomů dvou druhů (Palopoli and Wu, 1994; Perez and Wu, 1995). Podle tzv. Haldaneova pravidla (Haldane, 1922) postihuje hybridní sterilita častěji heterogametické pohlaví, což je u savců pohlaví samčí. Fertální F₁ samice se tak mohou použít při studiu interakcí a účinků genů, které působí sterilitu hybridních samců. Z genomového hlediska rozlišujeme hybridní sterilitu chromozomální, která je způsobena velkými strukturními nehomologiemi mezi chromozomálními segmenty rodičů a genovou, která je způsobena interakcemi mezi specifickými geny (Forejt and Ivanyi, 1974). Hybridní sterilita mezi dvěma evolučně velmi blízkými myšimi poddruhy *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* je genová sterilita a projevuje se zastavením spermatogeneze ve stádiu primárních spermatocytů (Forejt and Ivanyi, 1974). Gen *Hybrid sterility 1 (Hst1)* je prvním a zároveň nejlépe charakterizovaným genem hybridní sterility u obratlovců. Genetická analýza odhalila, že *Hst1* je polymorfní mezi dvěma blízce příbuznými myšimi inbredními geny C57BL/6J (dále jen B6) a C3H/DiSnPh (dále jen C3H). Pokusy o vyklonování *Hst1* genu započaly v laboratoři Dr. Forejta před více než třiceti lety. Cílem této

¹ Poziční klonování- identifikace genů odpovědných za určitý fenotyp na základě jejich mapování v genomu

práce je popsat kroky, které vedly k identifikaci *Hst1* genu a objasnění molekulárních mechanismů tohoto druhu sterility. Vyklonování genu *Hst1* a poznání jeho produktu přispěje nejen k objasnění molekulární regulace spermatogenní diferenciace, ale může pomoci objasnit některé otázky týkající se problematiky mechanismu vzniku druhů.

2. Literární přehled

2.1. Hybridní sterilita

Hybridní sterilita byla pozorována již Aristotelem, a to jak u rostlin, tak u živočichů. Je to zvláštní forma neplodnosti, kde obě rodičovské formy jsou plně fertillní, ale produkují neplodné potomky. Je to jedna z prvních reprodukčních bariér, které se objevují mezi nově vznikajícími druhy. Platí pro ni jev známý jako Haldaneovo pravidlo, které říká, že je-li jedno pohlaví limitováno sterilitou nebo neživotaschopností u F_1 hybridů, je postiženo obvykle heterogametické² pohlaví (Haldane, 1922). Fertillní F_1 samice jsou používány při studiu interakcí a účinků genů, které působí sterilitu hybridních samců. Umožňují tak studium genetických základů reprodukčně izolačního mechanismu mezi dvěma příbuznými druhy (Coyne and Charlesworth, 1986). Z evolučního hlediska je zajímavé, že se sterilita samčích hybridů objevuje velmi rychle po oddělení dvou příbuzných druhů a neživotaschopnost hybridních samců je v této fázi evoluce poměrně vzácná (Perez et al., 1993).

Hybridní sterilita působí jako reprodukčně izolační mechanismus. Vytváří bariéru, která zabraňuje toku genetických informací z jednoho druhu do druhého, a tak uchovává celistvost genomů mezi příbuznými druhy. Přestože hybridní sterilita je fenomén tak dlouho známý a zejména posledních 70 let poměrně intenzivně zkoumaný, není u savců plně objasněn jediný mechanismus jejího působení (Forejt, 1985, 1996). Jediným doposud identifikovaným genem způsobujícím hybridní sterilitu je gen *Odysseus* (*Ods*) u drozofily (Perez and Wu, 1995; Perez et al., 1993). *Odysseus* je jeden z několika lokusů způsobujících sterilitu u hybridů mezi *Drosophila mauritiana* a *Drosophila simulans* (Coyne and Charlesworth, 1986). *Ods* byl pomocí pozičního klonování lokalizován do 8,4 kb dlouhé oblasti na chromozómu X, obsahující gen kódující homeoboxový transkripční faktor, který byl nazván *OdysseusH* (*OdsH*) (Perez et al., 1993; Ting et al., 1998). *OdsH* je

² Heterogametické pohlaví je to, které nese dva různé pohlavní chromozómy. U savců, některých plazů a obojživelníků, u většiny řádů hmyzu a u většiny dvoudomých rostlin je heterogametickým pohlavím samec s pohlavními chromozómy XY. Naproti tomu u ptáků, některých plazů a obojživelníků, u motýlů a některých dvoudomých rostlin je heterogametickým pohlavím samice nesoucí pohlavní chromozómy ZW.

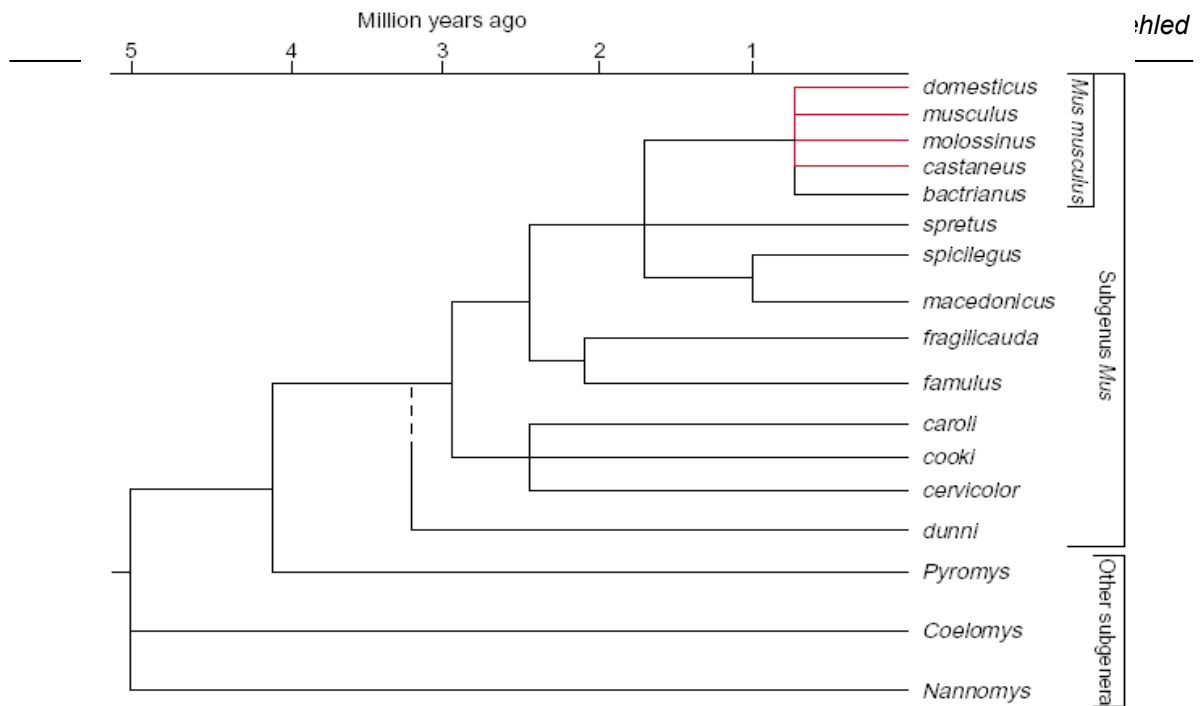
exprimovaný ve varlatech, jeho funkce je však neznámá. Vyřazení (tzv. *knock-out*) genu *OdsH* měl překvapivě nevýrazný fenotyp. Samci s nefunkčním *OdsH* byli plodní, pouze měli v mládí mírně snížený počet spermií (Sun et al., 2004).

Poziční klonování genů hybridní sterility komplikuje několik věcí. První zjevnou komplikací je samotná sterilita, která ztěžuje genetickou analýzu znaku založenou na křížení jedinců. Druhou, vážnější komplikací je skutečnost, že hybridní sterilita je na rozdíl od jiných znaků často podmíněna mnoha geny, mezi kterými existují velmi komplexní epistatické interakce (Orr and Irving, 2001; Sawamura et al., 2004). Překvapivě časté jsou především tzv. konspecifické interakce způsobující to, že se účinek genů hybridní inkompatibility projeví pouze tehdy, jsou-li přeneseny na genetické pozadí jiného druhu společně s dalšími geny pocházejícími ze stejného druhu (Palopoli and Wu, 1994; Perez and Wu, 1995).

2.2. Myš domácí jako modelový organismus pro studium hybridní sterility

2.2.1. Původ myši domácí

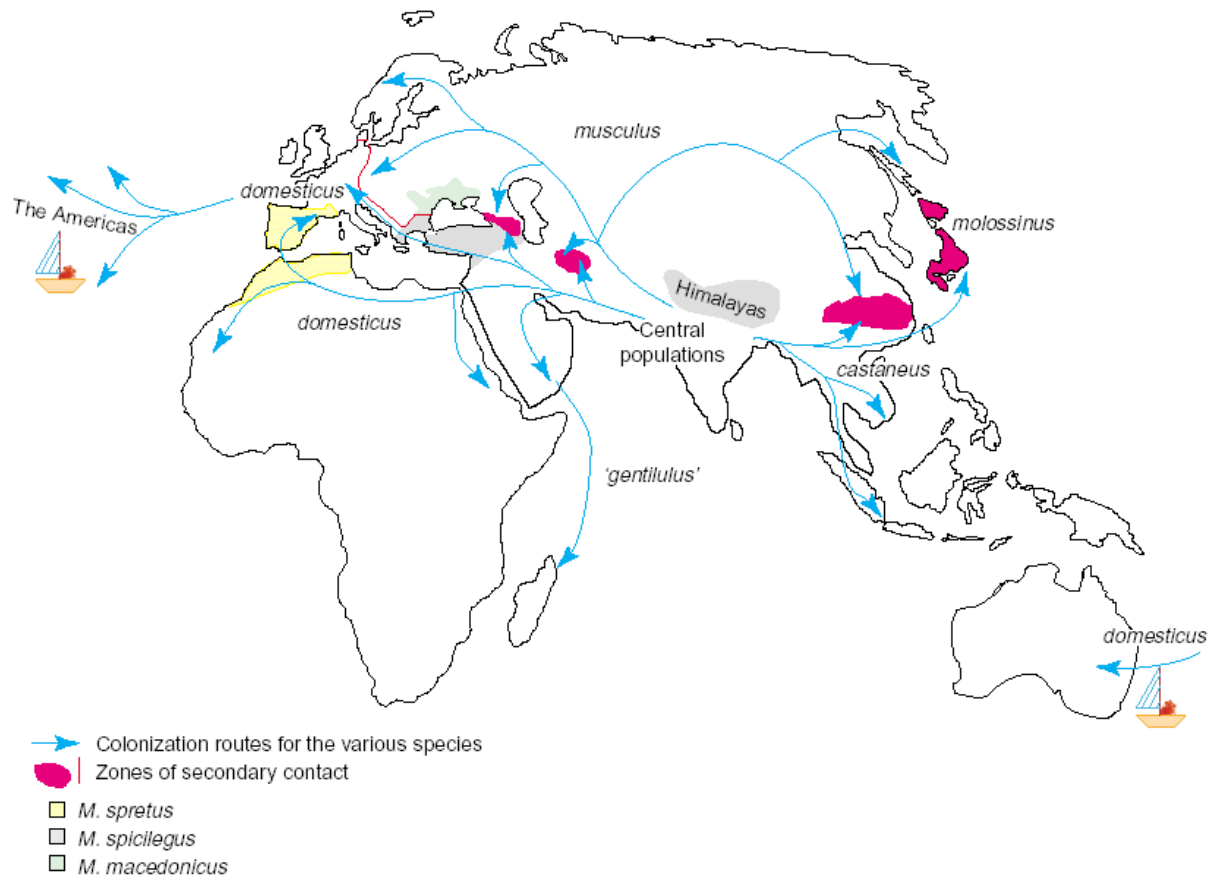
Většina studií zabývajících se genetickou podstatou hybridní sterility byla prováděná na drozofile. Nejvhodnějším savčím modelem je myš domácí. Výhodou je mimo jiné fakt, že myš domácí zahrnuje několik velmi mladých a ještě ne zcela reprodukčně izolovaných druhů (proto jsou často označovány jako poddruhy), které se oddělily asi před 350 000 až 1 milionem let (Boursot et al., 1996; Obr. 1) od společného předka, který žil pravděpodobně na severu indického subkontinentu. Po skončení poslední doby ledové asi před 10 000 lety, se zavedením zemědělství, došlo k jejich synantropizaci³ a následnému rozšíření (Boursot et al., 1993). *Mus musculus musculus* (dále jen *M. m. musculus*) osídlil téměř celou Asii a východní Evropu. *Mus musculus domesticus* (dále jen *M. m. domesticus*) se přes Blízký východ dostal do severní Afriky, jižní a západní Evropy a odtud později do Ameriky, jižní Afriky a Austrálie. *M. m. castaneus* pak osídlil jihovýchodní Asii a některé přilehlé ostrovy (Obr. 2). V místě sekundárního kontaktu se jednotlivé poddruhy mezi sebou do určité míry kříží a produkují životaschopné hybridní potomstvo. Dobře popsána je především hybridní zóna



Obr. 1. Fylogeneze myší rodu *Mus*. *M. m. bactrianus* je považován za potomky původní zakládající populace myši domácí. *M. m. domesticus*, *M. m. musculus*, *M. m. castaneus* a *M. m. molossinus* jsou označovány jako poddruhy, jelikož v přírodě dochází k jejich občasnému křížení, genetická izolace není ještě úplná; oddělily se zhruba před 1 milionem let. *M. spretus*, *M. spicilegus* či *M. macedonicus* již v přírodě přes sympatrické rozšíření s myšmi skupiny *M. musculus* nekříží, tedy jsou již samostatnými myšími druhy. Schéma fylogeneze bylo převzato z Trends in Genetics (Guenet and Bonhomme, 2003).

mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* v Evropě a hybridní zóna mezi *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* v Číně a Japonsku (Boursot et al., 1993; Bozikova et al., 2005; Macholan et al., 2007; Payseur et al., 2004; Raufaste et al., 2005). V Japonsku došlo k velmi výraznému prokřížení *M. m. musculus* a *M. m. castaneus*, čímž vznikla unikátní populace nazývaná *M. m. molossinus* (Yonekawa et al., 1988).

³ Synantropizace= přizpůsobení rostlin a živočichů životu v blízkosti člověka a jeho sídlišť.



Obr. 2. Geografické rozšíření poddruhů myši domácí – *M. m. domesticus*, *M. m. musculus*, *M. m. castaneus*, *M. m. molossinus* – a jejich nejbližších příbuzných – *M. spretus*, *M. spicilegus* a *M. macedonicus*. Převzato z Trends in Genetics (Guenet and Bonhomme, 2003).

2.2.2. Výhody užití myši domácí pro studium hybridní sterility

Myš domácí představuje velmi dobrý model pro studium genetických mechanismů hybridní sterility hned z několika důvodů.

- Jednotlivé poddruhy myši domácí jsou velmi mladé. Proces speciace u nich ještě nedoběhl do konce, což nám poskytuje jedinečnou možnost zkoumat samotné její příčiny. Při studiu vzdálenějších, reprodukčně úplně oddělených druhů, jako jsou mnohé druhy drozofil, je velmi těžké rozlišit, zda jsou pozorované genetické rozdíly mezi druhy samotnou příčinou speciace, nebo jen druhotným následkem druhové divergence.

- Od divokých jedinců myši domácí bylo odvozeno mnoho inbredních laboratorních kmenů myší, které mohou být využity pro genetické studie. Křížením mezi laboratorními kmeny myší, které pocházejí od různých poddruhů myši domácí, vznikají hybridní jedinci, kteří jsou plně životaschopní, avšak hybridní samci jsou často sterilní.
- Myši jsou v porovnání s většinou ostatních savců poměrně dobře chovatelné v laboratorních podmínkách; jsou malé, mají krátký generační čas a velký počet potomků ve vrhu (5-15).
- Díky tomu, že je laboratorní myš dlouho zavedeným a hodně využívaným modelovým organismem (nejužívanější model lidských dědičných chorob), máme k dispozici podrobnou genetickou mapu myšího genomu (Copeland et al., 1993; Dietrich et al., 1994) a téměř kompletní sekvenci (Consortium, 2002b). U myši jsou také zavedené metody značně usnadňující poziční klonování, jako je transgeneze nebo cílená manipulace genů homologní rekombinací v embryonálních kmenových buňkách.

2.2.3. Původ laboratorních kmenů myší

Většina běžně používaných laboratorních kmenů myší patří mezi klasické inbrední kmeny, které byly odvozené z poměrně malého počtu tzv. okrasných (*fancy*) myší chovaných v osmnáctém a devatenáctém století pro svůj neobvyklý vzhled v Japonsku, Číně a později v Evropě (Silver, 1995; Wade and Daly, 2005). Z tohoto důvodu nesou tyto inbrední kmeny jen omezené množství v přírodě existující variability. Jejich genom pochází převážně z poddruhu myši domácí *M. m. domesticus*, nicméně díky svým asijským kořenům nezanedbatelnou část tvoří i sekvence původem z jiných poddruhů myši domácí *M. m. musculus* a *M. m. castaneus* (Bonhomme et al., 1987; Wade and Daly, 2005; Wade et al., 2002). Podle nejnovějších studií založených na rozsáhlé analýze více než 8 milionů jednonukleotidových změn neboli SNPs⁴ mezi 15 laboratorními inbredními kmeny, je procentuální zastoupení jednotlivých poddruhů v klasických laboratorních kmenech asi 70-90% *M. m. domesticus*, 6% *M. m. musculus* a 3% *M. m. castaneus* (Frazer et al., 2007; Yang et al., 2007). Rozložení původu

⁴ SNPs- *Single Nucleotide Polymorphisms*

sekvence po chromozómech v běžných laboratorních kmenech je velmi nerovnoměrné, například nejčastěji používaný laboratorní kmen C57BL/6J (dále jen B6) nese celý chromozóm Y původem *M. m. musculus* (Bishop et al., 1985; Nagamine et al., 1992). Kromě klasických laboratorních kmenů se v poslední době začíná využívat i kmenů odvozených od divokých myší (*wild-derived strains*), které pochází výhradně z jednoho poddruhu myši domácí: *M. m. domesticus*, *M. m. musculus*, *M. m. castaneus* či *M. m. molossinus* nebo dalších druhů myší: *M. spretus*, *M. spicilegus* či *M. macedonicus* (Beck et al., 2000).

2.2.4. Hybridní sterilita u myši domácí

Hybridní sterilita u myši domácí byla poprvé popsána u kříženců mezi divokými myšmi *M. m. musculus* a laboratorním kmenem C57BL/10J (dále jen B10), který je odvozen převážně z poddruhu *M. m. domesticus* (Forejt, 1996; Forejt and Ivanyi, 1974). První lokus odpovědný za hybridní sterilitu samců (*M. m. musculus* x B10), nazvaný *Hybrid sterility 1 (Hst1)*, byl postupně zmapován do 350 kb dlouhého intervalu v proximální části chromozómu 17 (Forejt et al., 1991; Gregorova et al., 1996; Trachtulec and Forejt, 2001; Trachtulec et al., 1997a; Trachtulec et al., 1994). Populačně genetická studie ukázala, že hybridní sterilita v divoké populaci *M. m. musculus* segreguje nejen s genem *Hst1* a naznačila tak existenci dalších genů hybridní sterility, které jsou polymorfni v populaci divokých myší *M. m. musculus* (Vyskocilova et al., 2005). *Hstx1* je dalším popsaným genem způsobující hybridní sterilitu mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* (Storchova et al., 2004). Tento gen mapovaný do centrální části chromozómu X způsobuje spolu s dalšími nejméně dvěma lokusy na X chromozómu sterilitu samců konsomických myší B6-X^{PWD}Y^{B6}. Tento kmen nese X chromozóm z inbredního kmene PWD/Ph (dále jen PWD), který je čistě *M. m. musculus* původu, na genetickém pozadí klasického laboratorního kmene B6, který je převážně původu *M. m. domesticus* (Storchova et al., 2004). Podobný typ sterility jako u B6-X^{PWD}Y^{B6} myší, projevující se přítomností spermií s morfologicky poškozenými hlavičkami ve varlatech sterilních samců, byl zaznamenán i u konsomických myší nesoucích na B6 pozadí X chromozóm z kmene MSM, který je původem z myšího poddruhu *M. m. molossinus* (Oka et al., 2004). Stejně jako v případě B6-X^{PWD}Y^{B6} myší, sterilitu samců B6-X^{MSM}Y^{B6} způsobuje více lokusů na chromozómu X. Gen

Sha2 je lokalizovaný do podobné oblasti jako gen *Hstx1* a vzhledem k podobnému fenotypu sterilních samců je pravděpodobné, že *Hstx1* a *Sha2* představují tentýž gen.

Několik genů hybridní sterility bylo také popsáno u kříženců laboratorních myší kmene B6 s *M. spretus* nebo *M. macedonicus*. Celkem bylo popsáno šest lokusů odpovědných za hybridní sterilitu samců z křížení kongenních myší obsahujících část svého genomu původu *M. spretus* s myši kmene B6. Čtyři lokusy leží v proximální části chromozómu 17 – *Hst4* (Pilder et al., 1991), *Hst5*, *Hst6* (Pilder et al., 1993) a *Hst7* (Pilder, 1997). V poslední době se ukazuje, že sterilita způsobovaná *Hst6* lokusem je velice komplexní a účastní se jí nejméně tři geny v *Hst6* oblasti. Jako jeden ze slibných kandidátů na proximální *Hst6* gen označovaný také jako *Ccua* (*Curlicue a*) byl identifikován gen pro axonemální dynein⁵, *Dnahc8* (Fossella et al., 2000; Samant et al., 1999; Samant et al., 2002; Samant et al., 2005). Další dva lokusy hybridní sterility byly objeveny na chromozómu X - *Hst3* (Guenet et al., 1990) a *Ihtw1* (Elliott et al., 2001). Cytogenetické studie ukázaly, že hybridní sterilita samců (*M. spretus* x B6) souvisí s poruchou párování pohlavních chromozómů X a Y během meiózy. Sterilita samců koreluje s přítomností disociovaných X a Y v metafázi prvního meiotického dělení, která je způsobena heterozygotností v pseudoautosomální oblasti pohlavních chromozómů, jejímž prostřednictvím se X a Y párují (Hale et al., 1993; Matsuda et al., 1991; Matsuda et al., 1992). V případě hybridů (*M. macedonicus* x B6) byly nalezeny dva lokusy odpovědné za hybridní sterilitu samců. Jeden opět v proximální části chromozómu 17 a druhý na chromozómu X. *M. spretus* a *M. macedonicus* jsou od domácí myši *M. musculus* vzdálené více než 2-3 miliony let (Obr. 1) a vzájemně jsou úplně reprodukčně izolované. Ačkoli se jejich oblasti rozšíření překrývají, nedochází k mezidruhovému křížení. Je pravděpodobné, že geny způsobující sterilitu hybridů mezi těmito druhy myší nejsou samotnou příčinou speciace, nýbrž jen druhotným následkem druhové divergence.

⁵ Dyneiny= proteiny patřící mezi tzv. molekulární motory, molekuly schopné přeměňovat chemickou energii ve formě ATP (adenosin trifosfát) na mechanický pohyb; uplatňují se např. při buněčném transportu, pohybu bičků eukaryotického typu nebo také při rozchodu sesterských chromozómů v meióze.

2.3. Gen Hybrid sterility 1 (*Hst1*)

První a zároveň nejlépe charakterizovaný savčí gen pro hybridní sterilitu byl popsán u myši. Tento gen byl nazván *Hst1* a byl zmapován na 17. chromozóm (Forejt and Ivanyi, 1974; Forejt et al., 1991). Způsobuje hybridní sterilitu mezi evolučně velmi blízkými poddruhy *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*. Oba dva poddruhy se oddělily od svého předka asi před 1 miliónem let, což je v evoluci savců relativně krátká doba. Charakteristické pro oba poddruhy, které někteří klasifikují již jako druhy, je, že reprodukční izolace není kompletní. Hybridní samice jsou plodné a také ne všechna křížení mezi oběma druhy produkují sterilní samčí potomky. Ke zjištění typu hybridní sterility v případě *Hst1* lokusu byly cytogeneticky zkoumány mitotické a meiotické chromozómy sterilních samců. Nebyly na nich pozorovány žádné detekovatelné strukturní nehomologie. To znamená, že *Hst1* lokus je genový typ hybridní sterility (Forejt and Ivanyi, 1974).

Gen *Hst1* byl definován u *M. m. domesticus* jako gen dvou alelických forem, které jsou odpovědné za rozdíly mezi dvěma typy hybridů. U myšího kmene B10 byla popsána alela *Hst1^s*, zajišťující sterilitu. U myšího kmene C3H byla zjištěna alela zajišťující fertilitu *Hst1^f* (Forejt and Ivanyi, 1974). Myši obou těchto laboratorních inbredních kmenů jsou původu *M. m. domesticus*. Divoké myši a od nich odvozené inbrední kmeny původu *M. m. musculus* mají také gen hybridní sterility, označený *Hst^w*, který nemusí být identický s *Hst1* lokusem *M. m. domesticus* (Forejt, 1996), nicméně také mapuje na 17. chromozóm do stejné oblasti jako *Hst1*. Ukázalo se, že *Hst^w* je polymorfní u divokých *M. m. musculus* myší (Forejt and Ivanyi, 1974; Pialek et al., 2008; Vyskocilova et al., 2005). Kromě myší s alelou označovanou jako *Hst^{ws}* dávající sterilní samčí potomky v kombinaci s *Hst1^s* byly nalezeny myši nesoucí *Hst^{wf}*, jejichž potomci z křížení s jedinci s alelou *Hst1^s* jsou fertilní. Tři popsané inbrední kmeny *M. m. musculus* (PWD, PWB a PWK) mají po křížení s B10 inbredním kmenem sterilní samčí potomky (Forejt, 1981). Sterilní fenotyp tedy dostáváme pouze při kombinaci alel *Hst^{ws}/Hst1^s*, všechny ostatní ať už heterozygotní (*Hst1^s/Hst1^f*, *Hst^{ws}/Hst1^f*) nebo homozygotní alelické kombinace jsou plně fertilní (Forejt, 1996; Forejt and Ivanyi, 1974; Forejt et al., 1991). Předpokládá se, že v přírodě gen *Hst1* přispívá k reprodukční izolaci mezi *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* (Forejt and Ivanyi, 1974).

2.3.1. Fenotyp hybridní sterility u hybridů *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*

Interakce sterilních alel *Hst^{ws}* a *Hst1^s* působí u hybridních samců zástavu meiotického dělení primárních spermatocytů (Forejt, 1981). K zástavě spermatogeneze dochází hlavně v průběhu pachytene, ojediněle přežívají spermatocyty v diakinesi a metafázi prvního meiotického dělení vykazují poruchy v párování homologních chromozómů a častou disociaci X a Y chromozómu. Sterilní hybridi nemají žádné spermie v seminiferních tubulech (Forejt and Ivanyi, 1974). Sterilita se morfologicky projeví také snížením hmotnosti varlat (Forejt et al., 1991). Závislost mezi hmotností varlat a sterilitou myších samců byla zjištěna porovnáním počtu potomků zplozených samci za měsíc a hmotností varlat jednotlivých samců. Hybridní samci, kteří mají varlata lehčí než 75 mg nemají spermie v nadvarletech a neplodí potomky. U zcela fertálních samců přesahuje hmotnost varlat 120 mg. Samci, kteří měli varlata v rozmezí 75 - 120 mg, vykazovali plynulý přechod fenotypu od úplné sterility až po normální fertilitu (Forejt and Ivanyi, 1974). Varlata byla vážena u samců starých 60 ± 3 dnů (Forejt et al., 1991). Statisticky významné rozdíly ve hmotnosti varlat hybridních samců mohou být poprvé pozorovány 20. den postnatálního vývoje, i když redukce varlat zřejmě začíná již 13. den postnatálního vývoje, kdy byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtu pachytenních spermatocytů ve varlatech sterilních a fertálních hybridů (Forejt, 1981).

2.4. Poziční klonování genů u myši

Poziční klonování je definováno jako klonování genů pro fenotypové znaky na základě jejich mapování v genomu. Mutantní fenotyp je postupně geneticky a fyzikálně mapován, čímž se postupně zpřesňuje lokalizace genu zodpovědného za tento fenotyp na chromozómu. Výsledkem fyzikálního mapování je ohraničení genomové sekvence, ve které se nachází gen nebo geny zodpovědné za pozičně klonovaný fenotyp. Další fází pozičního klonování je hledání kandidátních genů v takto ohraničené sekvenci a ověřování jejich fenotypu.

Poziční klonování myších genů se stává s nástupem moderních metod snadnější záležitostí, než tomu bylo v minulosti. Předně máme k dispozici jak kompletní sekvenci myšního genomu, tak jeho podrobnou genetickou mapu (Copeland et al., 1993; Dietrich et al., 1994). V databázi *Mouse Genome Informatics* (MGI) je možné nalézt veškeré informace o všech asi 25 000 identifikovaných myších genech kódujících protein, včetně expresních dat a informací o orthologních genech u člověka nebo šimpanze. Vzhledem k tomu, že 99% myších genů má lidského orthologa, myš slouží i jako výtečný modelový organismus pro studium lidských genetických chorob (Copeland et al., 1993). U myši lze využít mnoho unikátních postupů, které nelze aplikovat u člověka a které se uplatňují jen omezeně u jiných savčích modelových organismů. Patří sem krátký generační čas myši a velký počet potomků ve vrhu, dostupnost geneticky definovaných inbredních kmenů myši nebo rozsáhlý panel mutací. Navíc je u myši k dispozici řada metod takzvané reverzní genetiky, která reprezentuje postup genetické analýzy vedoucí obráceným směrem než „klasická genetik“, tedy od modifikace DNA sekvence k fenotypu. Klasickými metodami reverzní genetiky jsou transgeneze, cílená manipulace genů homologní rekombinací v embryonálních kmenových buňkách nebo v poslední době velice používaná tzv. „gene knockdown“ metoda, umožňující přechodné umlčení požadovaných genů pomocí RNA interference (RNAi). Všechny výše zmíněné metody jsou vysoce účinným nástrojem k ověřování fenotypu kandidátních genů.

Laboratorní myš je nejčastěji používaný savčí modelový organismus při molekulárně genetických pokusech a slouží jako důležitý model pro studium lidských genetických chorob (Copeland et al., 1993; Peters et al., 2007).

2.4.1. Genetické mapování

Genetické mapování je založeno na stanovení frekvence rekombinace mezi dvěma lokusy. Podstatou rekombinace je meiotický crossing-over, probíhající mezi homologními oblastmi chromozómů v profázi prvního meiotického dělení. Obecně platí, že pravděpodobnost rekombinace mezi dvěma lokusy je mírou vzdálenosti mezi lokusy na chromozómech. Vzdálenosti mezi lokusy jsou na genetické mapě vyjadřovány v centimorganech (cM), přičemž 1 cM odpovídá jednomu procentu rekombinace. Vzdálenost mezi lokusy stanovená na základě frekvence

rekombinace je vzdálenost relativní, jelikož opravdová fyzikální vzdálenost může být zkreslena nerovnoměrností rekombinace podél chromozómu. Například existence oblastí chromozómů, ve kterých detekujeme výrazně více crossing-overů než v oblastech jiných (tzv. *hot spots*), mapovou vzdálenost mezi geny oproti reálné vzdálenosti zvětšují. Naopak v případě, že jsou geny od sebe dostatečně vzdálené, může mezi nimi dojít ke dvěma crossing-overům, což se na výsledné genetické mapě projeví zmenšením vzdálenosti mezi geny oproti vzdálenosti reálné. U myši 1 cM v průměru odpovídá asi dvěma milionům párů bází (2 Mb).

2.4.1.1. Zpětné křížení (*Backcross*)

Nejčastější metodou genetického mapování u laboratorních myši je zpětné křížení. Tímto typem křížení, kdy je F1 hybrid zpětně křížen na jednoho z rodičovských kmenů, jsou vygenerovány stovky, až tisíce jedinců, kteří jsou jednak fenotypizováni a jednak genotypizováni, většinou pomocí tzv. mikrosatelitových markerů (SSLP⁶) nebo jednonukleotidových polymorfismů SNPs. Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice (např. (CA)_n) vyskytující se v průměru každých asi 30 kb v genomu a vysoce polymorfní mezi myšimi druhy (80% mezi *M. m. domesticus* x *M. m. musculus*). Asociací fenotypu a genotypu je možné získat lokalizaci genu zodpovědného za mutantní fenotyp na chromozómu s přesností až na desetiny cM. Výsledkem genetického mapování je tedy interval na chromozómu, ve kterém se vyskytuje gen zodpovědný za zkoumaný fenotyp.

V případě pozičního klonování *Hst1* genu byly zpětně kříženy myši laboratorních inbredních kmenů C3H a B10, tedy myši kmeny, které se po křížení na PWD liší právě *Hst1* fenotypem. Zpětným křížením (B10-*T* x C3H) x B10 bylo získáno přes 2500 jedinců, z čehož bylo 183 jedinců rekombinantních mezi *T* a *H2* lokusem, které jsou od sebe vzdáleny 13,07 cM a mezi kterými se nachází *Hst1* lokus (Gregorova et al., 1996). *T* (*Brachyury*) mutace způsobuje dominantní krátkoocasý fenotyp, *H2* je lokus pro hlavní histokompatibilní komplex a jeho fenotyp je možno zjistit pomocí specifických monoklonálních protilátek nebo

⁶ SSLP- *Simple Sequence Length Polymorphism*

polymorfizmu v délce restrikčních fragmentů RFLP⁷ (Forejt et al., 1991). Každý rekombinantní jedinec v *T-H2* intervalu byl testován na *Hst1* fenotyp určením fertility jeho potomků vzniklých z křížení s myším kmenem PWD, který je *M. m. musculus* původu. Dále byli rekombinanti typizováni na DNA lokusy definované pomocí RFLP nebo mikrosatelitů. Touto analýzou byla získána podrobná mapa se submilimorganovým rozlišením *T-H2* regionu myšího chromozómu 17. Tato *T - H2* mapa s rozlišením 0,071 cM obsahovala tři fenotypové lokusy *H2*, *T* a *Hst1*, 12 RFLP markerů a 22 mikrosatelitových lokusů, které mapují do 14 geneticky definovaných lokusů (Gregorova et al., 1996).

2.4.2. Fyzikální mapování

Fyzikálním mapováním rozumíme pokrytí zkoumané oblasti překrývajícími se genomickými DNA klony, tzv. kontigy. Genomová DNA je nesena ve vektorech schopných nést velké úseky genomické DNA (desítky až stovky kb). Takovými vektory jsou P1, YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) nebo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*). P1 je vektor odvozen od temperovaného fága P1, využívající jeho schopnosti infikovat bakterii *Escherichia coli* (dále jen *E. coli*) a dosahovat tak extrémně vysoké účinnosti transformace, nevýhodou je menší kapacita vektoru 70-95 kb. YAC jsou vektory schopné replikace jak v bakteriích tak v kvasinkách, mají velkou kapacitu až přes 1000 kb, ale díky své značné nestabilitě způsobenou velkou účinností homologní rekombinace v kvasinkách, se od jejich používání zvolna upouští. Jejich místo ve většině případů zaujímají BAC, které mohou nést sice menší, 100- 300 kb dlouhé DNA úseky, ale zato jsou mnohem stabilnější. Organismus sloužící k replikaci naklonované DNA je bakterie *E. coli*.

S pomocí genetické mapy byla vytvořena fyzikální mapa oblasti s *Hst1* genem. Z myší YAC knihovny byly na základě přítomnosti stejných markerů, které byly mapovány do oblasti obsahující *Hst1*, izolovány jednotlivé YACové klony. Šestnáct takto získaných překrývajících se YACových klonů bylo poté podle překryvů uspořádáno do souboru (kontigu) pokrývajících oblast asi 2000 kb. K odhadu vzdáleností jednotlivých markerů a míry překryvů jednotlivých

⁷ RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*)- polymorfismus délky restrikčních fragmentů je klasická metoda zjišťování genetického profilu, která je založena na štěpení DNA restrikčními endonukleázami (RE). Pokud sekvenční diference vytváří nebo ruší specifické místo pro RE, vznikají po restrikci DNA fragmenty odlišných velikostí a dají se oddělit elektroforézou.

YACových klonů byla zkonstruována restriční mapa YACových klonů. Při vytváření fyzikální mapy bylo charakterizováno pět nových lokusů a byla upřesněna fyzikální poloha 12 již známých lokusů (Trachtulec et al., 1994).

Pomocí kombinace genetického a fyzikálního mapování byl poté nalezen YACový klon (FFE11) velký 580 kb, ve kterém se nachází *Hst1* gen. Genetické mapování izolovaného konce tohoto YACového klonu (marker *D17Ph1*) 0,14 cM distálně od genu *Hst1* totiž odpovídá asi 300 kb na myší DNA, což je méně než velikost klonu 580 kb. Dalším potvrzením přítomnosti *Hst1* lokusu v FFE11 klonu bylo mapování dvou SSLP markerů nově izolovaných z YACu FFE11. Tyto dva lokusy *D17Mia6* a *D17Mia7* byly geneticky mapovány 0,28 cM proximálně od *Hst1*. YAC klon FFE11 nese vedle *Hst1* genu pět polymorfních DNA markerů a rekombinační zlomy šesti zvířat zpětného křížení (Gregorova et al., 1996). Locus *Hst1* tak byl na myší genomové DNA ohraničen genetickými markery *D17Mia7* z proximální a *D17Ph1* z distální strany. Tyto polymorfní lokusy jsou od sebe vzdáleny asi 0,4 cM, což odpovídá zhruba 500 kb na fyzikální mapě (Gregorova et al., 1996; Trachtulec et al., 1994). Gen *Hst1* byl první gen hybridní sterility takto lokalizovaný v genomovém DNA klonu (Gregorova et al., 1996). Celá *Hst1* oblast byla dále izolována a mapována v BAC klonech, které byly použity k dalšímu zúžení *Hst1* oblasti pomocí transgeneze (Mihola et al., 2008; Trachtulec et al., 2005, viz výsledky).

2.4.3. Mapování pomocí SNP haplotypů

2.4.3.1. Co jsou haplotypy a haplotypové bloky

Sekvence myšího genomu publikovaná v roce 2002 je sekvencí klasického laboratorního kmenu C57BL/6J (Consortium, 2002b). Od té doby je k dispozici velké množství sekvenčních dat i z jiných myších kmenů. Značné množství SNPs se například získalo v roce 2005 veřejným zpřístupněním dat společnosti *Celera Genomics*, která osekvenovala myší genom už v roce 2001, a svoji sekvenci založila na myších kmenech 129X1/SvJ, 129S1/SvIm, A/J a DBA/2J. Dalším přelomovým rokem byl rok 2007, kdy v projektu organizovaným společností

NIEHS⁸ a firmou *Perlegen Sciences* bylo identifikováno přes 8 miliónů SNPs v 15 vybraných myších kmenech (Frazer et al., 2007). Takové obrovské množství SNP dat bylo možné získat díky aplikaci nových technologií založených na hybridizaci značených prób na oligonukleotidové DNA čipy (tzv. *DNA microarrays*), jejichž jednou z největších výhod je možnost automatizace a vysoká efektivita (tzv. *high-throughput*). Ve veřejně přístupné databázi dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html) je v současnosti (*build* 128 ze 23.10.2007) již přes 18 milionů identifikovaných SNPs u myši a jejich počet stále stoupá. S množstvím dostupných dat a metod na jejich analýzu se SNPs začalo používat jako vhodných markerů pro celogenomové mapování myších genů. Kromě využití SNPs jako klasických genetických markerů se SNPs začalo využívat na mapování pomocí tzv. haplotypů, neboli sdružených bloků SNPs. Haplotypem tedy rozumíme kombinaci určitých alel dvou nebo více lokusů na jednom chromozómu. Myší chromozómy jsou složeny ze segmentů (haplotypových bloků), úseků genetické informace, které v rámci evoluční historie myšího kmene prodělaly minimální počet rekombinačních změn, a které je možné u většiny laboratorních kmenů myší charakterizovat jen několika haplotypy. Pro takové oblasti s vysokou vazebnou nerovnováhou⁹ a nízkou diverzitou haplotypů pak stačí identifikovat jen několik polymorfizmů (např. právě SNPs), které zastupují daný haplotyp. Haplotypový blok můžeme tedy jednoduše definovat jako oblast s vysokou vazebnou nerovnováhou ohraničenou místy časté rekombinace.

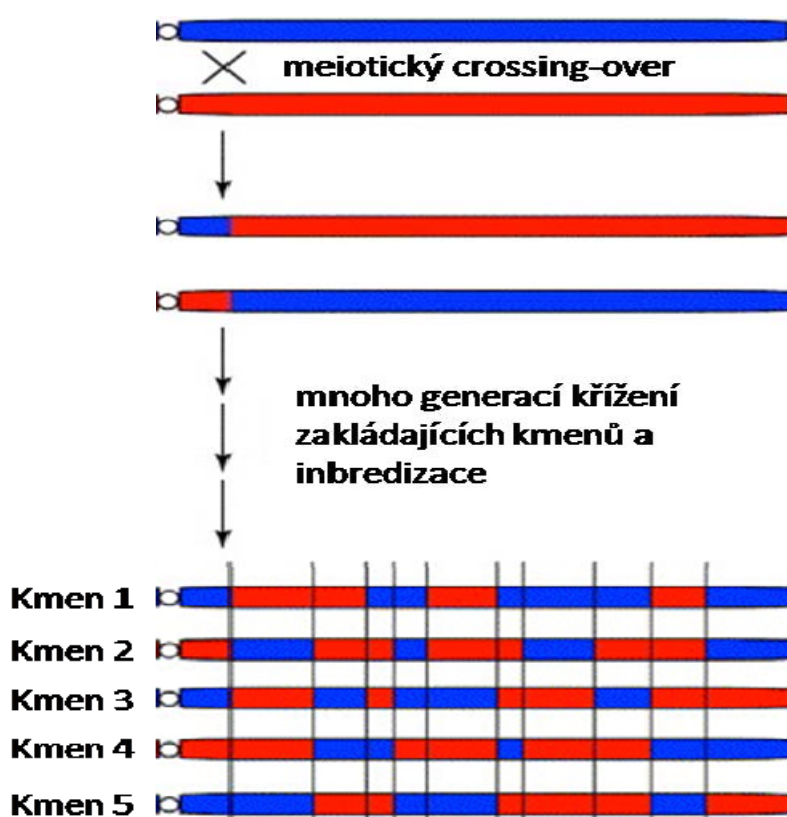
2.4.3.2. Specifika myších haplotypů

Při porovnání sekvence dvou libovolných klasických laboratorních kmenů pozorujeme střídající se, v průměru 1,2 Mb dlouhé úseky s nízkou (~0,5 SNPs na 10 kb) a vysokou (~40 SNPs na 10 kb) koncentrací SNPs (Wade et al., 2002). Málo polymorfní úseky zabírající asi dvě třetiny genomu jsou interpretovány jako

⁸ NIEHS (*The National Institute of Environmental Health Sciences*)- je jedním z ústavů NIH (*The National Institutes of Health*), který je součástí ministerstva zdravotnictví Spojených států Amerických. Byl založen za účelem podpory vzdělávání a vědy, včetně základního a klinického výzkumu v oblastech spojených se zdravím člověka.

⁹ Vazebná nerovnováha (*Linkage Disequilibrium*, LD) je nenáhodná asociace alel dvou nebo více lokusů; má za následek, že se některé kombinace alel nebo genetických markerů vyskytují častěji nebo méně často než jak by se očekávalo z jejich frekvencí v populaci

úseky se stejným (pod)druhovým původem, naopak polymorfní bloky, pokrývající asi jednu třetinu genomu, mají zřejmě odlišný (pod)druhový původ (Frazer et al., 2007; Wade and Daly, 2005; Wade et al., 2002; Yang et al., 2007). Pokud porovnáme více laboratorních myších kmenů, haplotypové bloky jsou oblasti mezi každým přechodem mezi vysoce a málo polymorfními úseky. Čím více myších kmenů použijeme, tím se délka haplotypových bloků snižuje (Obr.3). Nicméně i při použití většího počtu klasických laboratorních myších kmenů se délka haplotypových bloků pohybuje minimálně od stovek kb až po několik Mb (Wade et al., 2002). Tyto úseky mohou obsahovat desítky genů, a tak nemůžeme tímto způsobem dosáhnout dostatečně jemného mapování. V poslední době byla



Obr. 3. Původ haplotypových bloků. Díky meiotickému *crossing-overu* dochází v tomto hypotetickém příkladě k segmentaci dvou zakládajících haplotypů (znázorněny červenou a modrou barvou). V pěti hypotetických inbredních kmenech, které vznikají po mnoha generacích křížení původních dvou kmenů a inbredizaci, se střídají genomické úseky pocházející z jednoho nebo druhého původního haplotypu. Při porovnání libovolných dvou kmenů se střídají úseky pocházející ze stejného původního kmene, vyznačující se nízkou koncentrací SNPs a odlišného původního kmene naopak s vysokým počtem SNPs. Při porovnání více kmenů jsou haplotypové bloky oblasti mezi každým přechodem mezi vysoce a málo polymorfními úseky. Hranice haplotypových bloků jsou znázorněny svislými čarami. Upraveno z Trends in Genetics (Cuppen, 2005).

snaha tento problém řešit použitím myších kmenů odvozených od divokých myší, s předpokládanou nižší délkou haplotypových bloků (Ideraabdullah et al., 2004; Laurie et al., 2007; Trachtulec et al., 2008, viz výsledky).

2.4.3.3. Metody mapování pomocí haplotypů

Existují dvě základní metody mapování pomocí haplotypů. První z nich je haplotypová analýza pomocí které zužujeme již definovanou kandidátní oblast pozičně klonovaného genu (tzv. *interval-specific haplotype analysis*) (Dipetrillo et al., 2005). Tato metoda je založená na faktu, že asi 97% genetické variability mezi inbredními myšími kmeny odráží variabilitu původních zakladatelů inbredního kmene a nikoli mutace vzniklé po inbredizaci jednotlivých kmenů. Při porovnání dvou inbredních kmenů s rozdílným fenotypem tedy můžeme vyloučit ty genomové úseky, které jsou stejného ancestrálního původu. Při použití více inbredních kmenů se známým fenotypem tak můžeme identifikovat haplotyp sdílený všemi kmeny se společným fenotypem a lišící se ve všech kmenech s fenotypem opačným. Tímto způsobem je někdy možné dosáhnout značného zúžení kandidátní oblasti (Moritani et al., 2006; Park et al., 2003; Sheehan et al., 2007).

Druhým typem haplotypové analýzy je celogenomové mapování, tzv. klonování *in silico*. Tato metoda spočívá v asociaci určitých haplotypů v genomu se zkoumaným fenotypem pomocí speciálního počítačového algoritmu (Grupe et al., 2001; Pletcher et al., 2004). Pro obě metody platí, že čím k haplotypové analýze použijeme více myších kmenů se známým fenotypem a SNP haplotypy, tím je mapování přesnější. Stále více se však ukazuje, že díky vlastnostem genomů klasických inbredních laboratorních myších kmenů nepomůže ani větší množství dat zúžit kandidátní oblast natolik, aby obsahovala pouze několik kandidátních genů. Omezená diverzita myší použitých na přípravu těchto laboratorních kmenů má totiž za následek příliš dlouhé haplotypové bloky.

2.4.4. Identifikace kandidátních genů

Další fází pozičního klonování je hledání kandidátních genů ve vyklonované oblasti a jejich ověřování. V současné době, kdy je k dispozici důkladná mapa a téměř kompletní sekvence myšního genomu (Consortium, 2002b) a také množství expresních informací jako například databáze kompletních cDNA (Carninci et al., 2005; Consortium, 2002a) nebo databáze transkripčních počátků CAGE¹⁰ (Carninci et al., 2005; Kawaji et al., 2006; Shiraki et al., 2003), se hledání kandidátních genů ve vybrané oblasti stalo snadnější záležitostí. Na identifikaci kandidátních genů pro *Hst1* však bylo třeba použít zejména následující dvě metody.

2.4.4.1. cDNA selekce

Jednou z dříve velmi používaných metod pro identifikaci genů exprimovaných v daném genomovém regionu je cDNA selekce (Lovett, 1994). Tato metoda je založená na izolaci cDNA z vybrané cDNA knihovny pomocí YACových nebo jiných klonů, které obsahují danou oblast genomu. Výhodou této metody v rámci pozičního klonování je to, že jsou identifikovány geny, které mapují do určitého místa v genomu a zároveň jsou exprimovány v určité tkáni; geny izolované cDNA selekcí tak splňují hned dva požadavky na kandidátní gen.

V projektu pozičního klonování genu *Hst1* byly na cDNA selekci použity YACové klony obsahující *Hst1* region a pokrývající celkem více než jednu megabázi genomové sekvence. Aby se zvýšila pravděpodobnost izolace všech ve varlatech exprimovaných genů, byly postupně použity celkem tři cDNA knihovny; jedna byla konstruována z mRNA vyizolovaných z varlat dospělých BALB/c myší, jedna z mRNA varlat nedospělých myší (12-13 dní starých) a jedna z mRNA spermatocytů. YACové klony byly naamplifikovány pomocí PCR s biotinylovanými primery. Pomocí PCR s primery ohraničujícími klonovací místa byly amplifikovány i cDNA knihovny. Namnožené a denaturované YACové a cDNA klony byly smíchány a hybridizovány. Po inkubaci se přes biotin vychytaly YACy s případně navázanými cDNA klony na streptavidinem pokryté paramagnetické

¹⁰ CAGE- *Cap-analysis gene expression*- vysoce účinná metoda umožňující přesnou analýzu transkripčních počátků. Je založená na preparaci a sekvenaci konkatemerů 20 nt dlouhých DNA oligomerů, tzv. tagů odvozených z 5' konce úplných mRNA.

kuličky. Po několikanásobném odmytí nespecificky navázaných cDNA byly specificky navázané cDNA klony vyloučovány denurací, naamplifikovány pomocí PCR, osekvenovány a mapovány na YAC klonech (Trachtulec et al., 1997a).

Pomocí cDNA selekce bylo získáno celkem deset genů mapujících do blízkosti *Hst1* regionu a exprimovaných ve varlatech. Byly rozděleny do dvou skupin. Geny z první skupiny mohly být vyloučeny z kandidatury na *Hst1*, protože leží proximálně od *D17Mia7* a nemapují do identifikovaného YAC klonu FFEH11, obsahujícího *Hst1* gen. Druhá skupina mapuje do FFEH11 klonu a má čtyři lokusy, které jsou kandidátními geny pro *Hst1* gen. Jsou to: *Psmb1* (*Proteasome subunit, beta type 1*), *D17Ph4e*, *Zfp91-rs1* a *Odc-rs15* (Trachtulec et al., 1997a). Dříve mapovaný *Hst1* kandidát, gen *Tbp*, byl použit jako pozitivní kontrola.

Pomocí cDNA selekce se těžko odhalují geny, které obsahují repetitivní elementy, jež maskují jejich přítomnost nebo geny, které jsou GC-bohaté, a tudíž špatně amplifikovatelné pomocí běžného PCR. Další případ, ve kterém je použití této metody neúčinné, je situace, kdy se transkript hledaného genu vyskytuje ve sledované tkáni pouze ve velmi malém množství. Příkladem genů, které pomocí cDNA selekce v projektu pozičního klonování genu *Hst1* nebyly detekovány, přestože byly později mapovány do *Hst1* oblasti a jsou exprimovány ve varlatech, jsou geny *Pdcd2*, *Prdm9* a *Dll1*. Geny *Pdcd2* a *Prdm9* mají repetice na 3' konci a GC-bohaté úseky na 5' konci, gen *Dll1* má takéž GC-bohatý 5' konec a navíc je ve varlatech exprimován na relativně nízké úrovni (Trachtulec et al., nepublikovaná data).

2.4.4.2. Genomové sekvenování a databáze *Expressed Sequence Tags* (dbEST)

Jinou metodou pro izolaci kandidátních genů je náhodné sekvenování klonované genomové DNA s následnou identifikací exprimovaných sekvencí porovnáním s počítačovou databází *Expressed Sequence Tags* (EST), což je databáze náhodně sekvenovaných úseků cDNA, tedy exprimovaných oblastí genomu. Genomová DNA nemusí být sekvenována zcela náhodně. Některé DNA sekvence totiž naznačují přítomnost kódující sekvence, jako např. CpG ostrovy, charakteristické pro promotorové sekvence řady (asi 65%) myších genů (Bird,

1986). CpG ostrovy se dají detekovat pomocí některých vzácně štěpících restričních enzymů jako třeba *NotI*, *BssHII* nebo *MluI*, které ve svých rozpoznávacích místech obsahují CG bohaté sekvence. Důvodem toho, že se CpG dinukleotidy vyskytují u savců 5x méně než by se statisticky očekávalo, je skutečnost, že tyto dinukleotidy jsou cílem specifické DNA methyltransferázy a methylovaný cytosin m^5C může snadno mutovat na thymin. Pokud tedy jeden nebo více ze vzácně štěpících restričních enzymů štěpí savčí genomovou DNA v jednom místě, pravděpodobně se tam nachází promotor genu. Je možno také využít skutečnosti, že naprostá většina kódujících, či jinak důležitých sekvencí je konzervovaná mezi myší a člověkem. Náhodným sekvenováním byl do *Hst1* oblasti zmapován kandidátní gen *Prdm9*.

2.4.4.3. Další metody pro identifikaci kandidátních genů

Pro identifikaci transkribovaných genů ve vymezené genomické oblasti je užitečné prohledávání dostupných databází s expresními daty. Kromě výše zmíněných- databáze kompletních cDNA (Carninci et al., 2005; Consortium, 2002a) a databáze transkripčních počátků CAGE (Carninci et al., 2005; Kawaji et al., 2006; Shiraki et al., 2003), jsou to dále databáze SAGE¹¹ (Divina and Forejt, 2004; Velculescu et al., 1995) nebo databáze s daty z expresních DNA chipů jako je SymAtlas nebo GEO (*Gene Expression Omnibus*)

Metoda *Exon trapping* je další možností jak izolovat kódující sekvence z úseku savčí genomické DNA. Je založena na identifikaci RNA sekvencí, které jsou ohraničeny funkčními 5' a 3' sestřihovými místy, tedy exonů. Studovaná genomická DNA je vložena do intronu genu, který je součástí speciálně upraveného vektoru. Tímto konstruktem jsou transfekovány buněčné linie, kde dochází *in vivo* k transkripci konstruktů a následnému sestřihu. Pokud vložená genomová sekvence obsahuje funkční exon, je zainkorporován do vzniklé mRNA a může být dále amplifikován pomocí PCR a sekvenován (Buckler et al., 1991).

¹¹ SAGE- *Serial Analysis of gene expression*- je technika umožňující globální analýzu genové exprese. Každý transkript je identifikován pomocí krátkého (10 bp) oligonukleotidu, zvaného tag, z definované pozice na 3' konci každého transkriptu. Sekvenováním konkatermerů tagů získáme kvalitativní i kvantitativní informaci o genové expresi v tkáni, z které byla RNA izolována.

2.4.5. Identifikované kandidátní geny pro *Hst1*

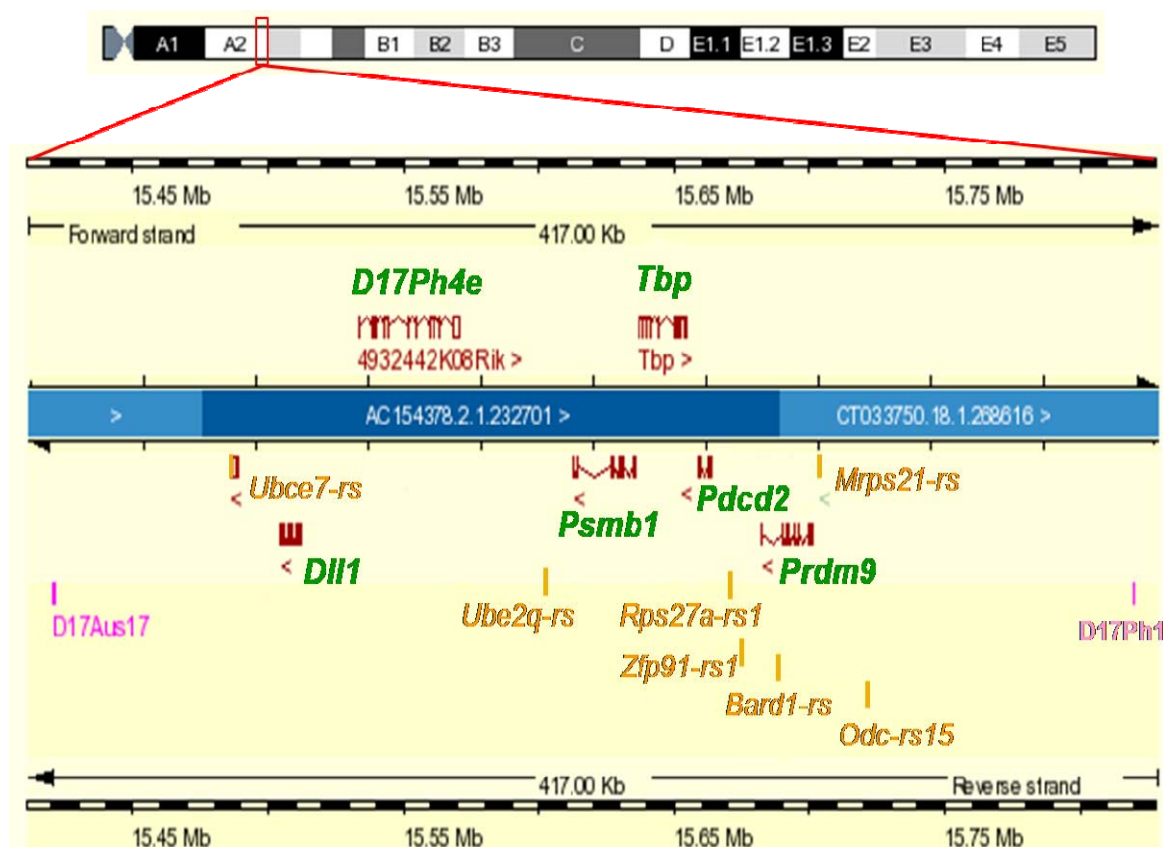
2.4.5.1. Gen *Tbp*

Gen *Tbp* (*TATA-box*¹² *binding protein*), dříve nazývaný *Gtf2d*, byl prvním genem zmapováním do *Hst1* oblasti (Trachtulec et al., 1994). Patří mezi tzv. udržovací (*housekeeping*) geny, které jsou nezbytné pro všechny myší buňky, a jsou proto exprimovány konstitutivně ve všech myších tkáních. Gen *Tbp* kóduje TATA-box vazebný protein, faktor řídící transkripci většiny eukaryotických genů (Hernandez, 1993). Ve varlatech se jeho exprese výrazně zvyšuje v průběhu spermatogeneze, zvýšená akumulace *Tbp* proteinu byla zaznamenána zejména v buněčných jádrech spermatid (Schmidt and Schibler, 1997; Schmidt and Schibler, 1995). Dva *Tbp* transkripty vznikající alternativní polyadenylací byly zaznamenány u kuřete (Yamauchi et al., 1997).

2.4.5.2. Gen *Pdcd2*

Myší gen *Pdcd2* (*Programmed cell death 2*), u krysy označovaný jako *Rp8*, byl mapován do *Hst1* oblasti díky znalosti lokalizace lidského homologního genu. Lidský *PDCD2* gen byl zmapován do oblasti 6q27 na dlouhém raménku 6. chromozómu, která je homologická s myší *Hst1* oblastí. Proto byly pomocí PCR s *Pdcd2* primery amplifikovány YAC klony z *Hst1* oblasti a podle výskytu nebo absence *Pdcd2* sekvence v překrývajících se klonech byla určena jeho poloha na *Hst1* mapě. Na fyzikální mapě je *Pdcd2* umístěn distálně od genu pro *Tbp*, s nímž je ve vzájemné orientaci zvané *tail-to-tail*, tedy oba geny jsou k sobě orientovány svými 3' konci (Obr. 4). *Pdcd2* gen je exprimován v široké škále myších tkání stejně jako i ve varlatech (Trachtulec and Forejt, 2001). PDCD2 protein obsahuje na svém N-konci doménu zinkových prstů typu MYND, na C-konci se nachází od kvasinek po člověka konzervovaná doména neznámé funkce. Biologická funkce PDCD2 proteinu je nejasná, ale pravděpodobně hraje určitou úlohu v apoptóze, což může být teoreticky proces zodpovědný za přerušení spermatogeneze u hybridní sterility. Jeho role v apoptóze byla zjištěna v thymocytech krysy (Owens et al., 1991), kde byla zaznamenána zvýšená

¹² *TATA-box*- specifický DNA motif (TATATAATA) v promotorové oblasti většiny eukaryotických genů přepisovaných RNA polymerázou II. Místo vazby transkripčního faktoru TBP.



Obr. 4. Schéma *Hst1* oblasti na 17. myším chromozómu exportované z databáze Ensembl. V horní části obrázku jsou znázorněno fyzické umístění *Hst1* oblasti na 17. myším chromozómu (v Mb). Geny jsou znázorněny hnědou se zeleným popisem, pseudogeny žlutou a genetické markery barvou růžovou.

přítomnost mRNA homologního genu *Rp8* po indukci apoptózy thymocytů dexamethazonem. Nicméně u lidského a myšího *Pdcd2* orthologa taková závislost zjištěna nebyla (Chen et al., 2005; Vaux and Hacker, 1995). Homologní *Pdcd2* geny byly osekvenovány také u člověka, červa *Caenorhabditis elegans* a kvasinky *Schizosacharomyces pombe*. U všech těchto organismů mapuje gen *Pdcd2* spolu s genem *Tbp* na stejný chromozóm (Trachtulec and Forejt, 2001).

2.4.5.3. Gen *Pscmb1*

Gen *Pscmb1* byl zmapován do *Hst1* oblasti cDNA selekcí. Lidský homolog genu *Pscmb1* spolu s homology genů *Pdcd2* a *Tbp* leží na dlouhém raménku 6. chromozómu v oblasti 6q27. U myši i u lidí jsou geny *Pscmb1* a *Tbp* transkribovány ve vzájemně opačné orientaci, svými 5' konci orientovanými k sobě (tzv. *head-to-head* pozice) (Trachtulec et al., 1997b; Obr. 4). Gen *Pscmb1* kóduje proteazomální podjednotku $\beta 1$ neboli C5, která je součástí multijednotkové ATP-závislé proteázy,

kteřá se podílí na specifické degradaci proteinů (Peters, 1994). *Psmb1* patří mezi udržovací geny a je proto exprimován konstitutivně ve všech myších tkáních. V průběhu spermatogeneze se proteazómy účastní výměny histonů za protaminy a na remodelování ocásků spermií v průběhu spermiogeneze (Mochida et al., 2000; Tipler et al., 1997). Snížená *Psmb1* exprese byla zjištěna v krysích varlatech a nadvarletech, ve kterých byla poškozena spermatogeneze toxickým působením látek Theophyllin (THP) a 1,3-dinitrobenzen (DNB) (Tengowski et al., 2007).

2.4.5.4. Gen *D17Ph4e* (*Pgcc1*)

Gen *D17Ph4e*, známý také pod označením *4932442K08Rik*, byl identifikovaný jako *Hst1* kandidát pomocí cDNA selekce. Je tedy exprimovaný ve varlatech a mapuje proximálně od genu *Psmb1*, s kterým je v orientaci *tail-to-tail* (Obr. 4). Při zjišťování exprese genu metodou *Northern blot*, byly ve varlatech a mozku identifikovány dvě různé mRNA, dlouhé přibližně 3 a 5 kb (Trachtulec et al., 1997a). Funkce produktu tohoto genu není doposud zcela objasněná. V N-koncové části existuje sekvenční podobnost s exonukleázovými doménami. Proteiny s exonukleázovou aktivitou se často účastní v opravách DNA, což je proces, který se uplatňuje v průběhu myší meiózy v procesech spojených s rekombinací (souhrnné články Baarends et al., 2001; Svetlanov and Cohen, 2004). Buňky s poškozenými systémy opravující DNA jsou zpravidla v průběhu spermatogeneze směřovány k apoptóze a mohlo by tak teoreticky dojít k zástavě spermatogeneze také ve sterilních hybridech. Kmeny B6 a C3H nenesou podstatné rozdíly v sekvenci mRNA 3 kb ani 5 kb transkriptu; nalezen byl jeden synonymní SNP ve čtecím rámci a několik SNPs v intronech a 3'UTR (Trachtulec et al., nepublikovaná data).

Gen *D17Ph4e* byl nedávno identifikovaný jako *Pgcc1* (*PPARgamma constitutive coactivator 1*). Publikovaná data naznačují funkci *Pgcc1* genu jako koaktivátoru jaderných receptorů PPARgamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) účastnících se transkripční regulace při adipogenezi (Li et al., 2007).

2.4.5.5. Gen *Dll1*

Gen *Dll1* (*Delta-like 1*) mapuje do *Hst1* oblasti vedle genu *Pgcc1* a je tedy nejproximálnějším genem v oblasti (Obr. 4). Kóduje transmembránový protein, který patří mezi tzv. DSL (*Delta/Serrate/lag-2*) geny, které jsou ligandy *Notch* receptoru a svou vazbou aktivují signální *Notch* dráhu. To naznačuje široký okruh funkcí v průběhu myši gastrulace a časně organogeneze. Účastní se mezibuněčné komunikace zejména ve vyvíjejícím se nervovém systému. *Knock-out Dll1* genu je letální v embryogenezi (Hrabe De Angelis et al., 1997). V dospělých tkáních byl detekován v plicích a srdci, nikoli však ve varlatech (Bettenhausen et al., 1995; Lindsell et al., 1996).

2.4.5.6. Gen *Prdm9*

Gen *Prdm9* (*PR domain containing 9*) je posledním funkčním genem nalezeným v *Hst1* oblasti. Byl zamapován do *Hst1* oblasti jako poslední pomocí náhodného sekvenování BAC klonů a porovnání získaných sekvencí s dbEST (viz kap. 2.4.4.2). Gen *Prdm9* leží v její distální části 16,7 kb od genu *Pdcd2* (Obr. 4). Byl popsán také jako *Meisetz*, gen exprimovaný v průběhu meiózy a kódující specifickou histon H3 methyltransferázu, katalyzující trimethylaci histonu H3 dimethylovaného na lysinu 4 (Hayashi et al., 2005). Tato epigenetická modifikace histonu H3 je spojena s transkripční aktivací eukaryotických genů (Bernstein et al., 2005; Santos-Rosa et al., 2002; Schneider et al., 2004). Gen *Prdm9* je tak schopný aktivovat specifické geny potřebné ke zdárnému průběhu meiózy (Hayashi and Matsui, 2006; Matsui and Hayashi, 2007). *Knock-out* tohoto genu způsobuje u myši zástavu oogeneze a spermatogeneze ve stadiu primárních spermatocytů a je tak ideálním kandidátem na gen hybridní sterility *Hst1*.

2.4.5.7. Pseudogeny v *Hst1* oblasti

Kromě šesti funkčních genů bylo bioinformatickými analýzami identifikováno v *Hst1* oblasti i sedm pseudogenů (Obr. 4). Nejdáleji leží *Odc-rs15* (*Ornithine decarboxylase-related sequence 15*), jehož funkční homolog *Odc* kóduje ornithine dekarboxylázu, enzym, který katalyzuje dekarboxylaci ornithinu na

putrescin a mapuje na 12. myší chromozóm. *Odc-rs15* je jedním asi z dvaceti pseudogenů genu *Odc*.

Mrps21-rs byl mapován 2 kb distálně od genu *Prdm9*. Jeho sekvence vykazuje 92% shodu s funkčním genem *Mrps21* (*Mitochondrial ribosomal protein S21*) na 3. myším chromozómu. Pseudogen obsahuje nepřerušovaný čtecí rámec a mohl by tak, pokud by byl transkribován, teoreticky kódovat funkční protein.

V intronu *Prdm9* genu byl nalezen *Bard1-rs*, pseudogen funkčního genu z myšího chromozómu 1, *BRCA1 associated RING domain 1* (*Bard1*), jehož produkt tvoří in vivo heterodimer s produktem známého tumor supresorového genu *BRCA1* (Mccarthy et al., 2003). *Bard1-rs* pseudogen vykazuje pouze 74% shodu s funkčním genem *Bard1* a obsahuje přerušovaný čtecí rámec.

V *Prdm9-Pdcd2* mezigenové oblasti byli identifikovány dva pseudogeny *Zfp91-rs1* a *Rps27a-rs*. *Zfp91* (*Zinc finger protein 91*), funkční homolog *Zfp91-rs1*, je lokalizován na 19. myším chromozómu a kóduje protein neznámé funkce, který obsahuje pět domén zinkového prstu a čtená fosforylační místa (Saotome et al., 1995). *Rps27a-rs* je pseudogen funkčního genu *Rps27a* (*Ribosomal protein S27a*) z 11. myšího chromozómu. Sekvence *Rps27a-rs* nevykazuje ani 70% podobnost s svým funkčním homologem a čtené posuny čtecího rámce.

Mezi geny *Psmb1* a *D17Ph4e* se nachází pseudogen *Ube2q1-rs*. Jeho funkční homolog *Ube2q1* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q 1*) leží na chromozómu 3 a účastní se procesu ubiquitinace proteinů, jímž se v buňce označují proteiny určené k degradaci. Stejně dráhy se účastní i funkční homolog posledního v *Hst1* oblasti identifikovaného pseudogenu, kterým je *Ubce7-rs* ležící proximálně od genu *D111*. Funkční homolog *Ubce7* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3*) leží na chromozómu 16. *Ubce7-rs* teoreticky kóduje protein dlouhý asi sto aminokyselin.

Jelikož v databázi dbEST nebyly nalezeny EST ani pro jeden z pseudogenů, předpokládáme, že nejsou u myši přepisovány a tudíž nemohou způsobovat hybridní sterilitu. Transkripce nejzachovalejšího pseudogenu *Mrps21-rs* v myších varlatech nebyla detekována ani podrobnější analýzou exprese pomocí RT-PCR. Navíc většina testovaných pseudogenů nebyla polymorfni mezi B6 a C3H (Trachtulec et al., nepublikovaná data).

2.4.6. Požadavky na *Hst1* kandidátní gen

Hst1 kandidátní geny musí splňovat několik kritérií. V první řadě musí vždy kosegregovat s *Hst1*, tedy mapovat do oblasti s nulovou rekombinací s *Hst1* fenotypem. Za tímto účelem byly testovány myši ze zpětného křížení s rekombinačními zlomy v *Hst1* oblasti pomocí sond specifických pro jednotlivé kandidátní geny. Všech šest kandidátních genů kosegreguje s *Hst1*.

Druhým požadavkem na kandidátní gen je jeho exprese v tkáni spojené se sledovaným fenotypem, v případě hybridní sterility ve varlatech. Na základě expresních dat z veřejně přístupných databází a z publikovaných prací vyplývalo, že všechny kandidátní geny, kromě genu *Dll1*, jsou ve varlatech exprimovány. Přítomnost *Dll1* transkriptů v myších varlatech byla určena experimentálně (Mihola et al., nepublikovaná data).

Dalším kritériem je odlišnost genomické sekvence u myší B10 a C3H. Než se přistoupilo k posuzování jednotlivých kandidátních genů, testovalo se, zda neexistují větší přestavby *Hst1* oblasti u B10 a C3H. Za tím účelem byla vytvořena fyzikální mapa pomocí pulzní elektroforézy PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) celkové genomické DNA z B10 a C3H myších kmenů s užitím vzácně štěpících restričních enzymů *MluI*, *NotI* a *NruI*. Na této úrovni nebyl nalezen žádný rozdíl mezi *Hst1* oblastí B10 a C3H myší (Trachtulec et al., 1997a). Přistoupilo se tedy k individuálnímu sekvenčnímu hodnocení mRNA jednotlivých *Hst1* kandidátních genů. Sekvence mRNA, případně regulačních oblastí určitého kandidátního genu, se musí lišit mezi myšími kmeny B6 a C3H, respektive jinými myšími kmeny s rozdílnými alelami *Hst1* genu. Pokud by B6/C3H rozdíl nezpůsobil změnu v sekvenci proteinu, mohla by se nekódující změna projevit na stabilitě mRNA (např. změna v 3' nepřekládané oblasti) nebo přímo v úrovni transkripce kandidátního genu (změna v promotoru nebo jiných regulačních oblastech). Museli bychom tedy zaznamenat rozdílnou hladinu mRNA kandidátního genu ve varlatech třinácti až patnácti denních sterilních a fertálních hybridů, tedy věku, kdy už byl mezi nimi zaznamenán významný rozdíl v počtu pachytenních spermatocytů (Forejt, 1981).

Případný nalezený rozdíl v sekvenci kandidátního genu mezi kmeny B6 a C3H lze dále testovat na panelu dalších inbredních kmenů se známým fenotypem hybridní sterility. Při použití dostatečného množství kmenů a SNPs pokrývající

celou *Hst1* oblast můžeme získat haplotypovou mapu, která nám může pomoci ještě více zúžit *Hst1* oblast. Máme k dispozici nejméně 11 myších inbredních kmenů dávajících s PWD sterilní samčí potomky a nesoucí tedy *Hst1^s* alelu (kromě B6 například BALB/c, DBA/1) a stejný počet kmenů s *Hst1^f* alelou (kromě C3H např. CBA/J, P/J). Pouze takový rozdíl, který na 100 % koreluje s fenotypem hybridní sterility u všech testovaných *Hst1^s* a *Hst1^f* kmenů, může být polymorfizmem způsobujícím hybridní sterilitu.

Každý z šesti *Hst1* kandidátních genů *Dll1*, *D17Ph4e*, *Psm1*, *Tbp*, *Pdcd2* a *Prdm9* byl zkoumán z hlediska těchto kritérií. Transkripční analýza genů *Pdcd2* a *Tbp* byla zkoumána podrobněji, jelikož se ukázalo, že jsou alternativně exprimovány.

2.5. Uspořádání genů na chromozómech u eukaryot

V 90. letech dvacátého století se postupně zformoval nový obor molekulární biologie, genomika, studující geny v kontextu celých genomů. V rámci tzv. genomových projektů byli postupně sekvenovány genomy rozličných organismů, počínaje jednoduchými viry, až po složité eukaryotické organismy včetně člověka. S dostupností sekvenčních dat z různých modelových organismů se rozvinul obor tzv. komparativní genomiky, který využívá těchto dat k odhalování nových relevantních informací o evoluci genomů. Srovnávací analýza genomů vedla ke zjištění, že pořadí genů na chromozómech je konstantní i u velice vzdálených druhů. Tomuto jevu říkáme syntenie¹³ nebo v užším smyslu kolinearita¹⁴. Konzervace syntenie mezi relativně vzdálenými organismy ukazuje na selekci proti oddělení genů syntenie. Studium syntení nám může odhalit společné mechanismy, které se uplatňují při regulaci exprese genů v syntenii. Obecně nám napomohou porozumět organizaci genů v eukaryotních genomech a mechanismům chromozomálních přestaveb.

Hst1 kandidátní geny *Tbp* a *Psm1* byly nalezeny v syntenii nejen u myši a člověka (zde jsou kolineární), ale i u tak vzdáleného bezobratlého živočicha jako je hlístice *Caenorhabditis elegans* (Trachtulec et al., 1997b). Dalším členem této syntenie konzervované mezi savci a bezobratlými je gen *Pdcd2*, mapující u myši

¹³ Syntenie- přítomnost orthologních lokusů u dvou druhů na stejném chromozómu

v orientaci *tail-to-tail* asi 4 kb distálně od *Tbp* genu (Trachtulec and Forejt, 2001). Všechny tři geny *Pdcd2-Tbp-Psmb1* jsou kolineární u myši a člověka a byly nalezeny v syntenii dokonce i u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Geny *Tbp* a *Pdcd2* byly nalezeny v kolinearitě i u hada *Trimeresurus gramineus* a jsou tak kolineární ve všech testovaných obratlovcích a syntenní u všech testovaných bezobratlých. Jediným testovaným bezobratlým organismem v jehož genomu byla porušena syntenie genů *Pdcd2-Tbp-Psmb1* je drozofila, kde se homolog genu *Psmb1* nachází na jiném chromozómu než geny *Pdcd2* a *Tbp* (Trachtulec and Forejt, 2001).

O možných příčinách syntenií toho zatím není mnoho známo. Obecně se míní, že možnou příčinou syntenie může být snaha zachovat takovou pozici genů v genomu, která je výhodná z hlediska regulace jejich genové exprese. Sdílení regulačních elementů řídících transkripci genů v syntenii se pak projevuje jejich společným profilem exprese například v různých tkáních, stádiích ontogeneze atd. Ve všech eukaryotických genomech bylo prokázáno, že geny s podobným expresním profilem mapují často blízko sebe (Hurst et al., 2004; Purmann et al., 2007). Bylo prokázáno sdružování *housekeeping* genů jak v genomu člověka (Lercher et al., 2002), tak i myši (Williams and Hurst, 2002) a bylo také ukázáno, že tyto shluky jsou udržovány selekcí (Singer et al., 2005). V poslední době se ukazuje, že na řízení exprese genů se ve velké míře uplatňují i regulace na úrovni chromatinu (Batada et al., 2007; Hurst et al., 2004). Exprese genů závisí na epigenetických modifikacích chromatinu, jako jsou například určité modifikace histonů, methylace DNA nebo fyzická lokalizace genu v buněčném jádře. Ukazuje se, že jádro buňky je velice organizovaná struktura, kde pouze některé domény genomické DNA jsou přístupné transkripčním faktorům, kdežto jiné naopak (De Laat and Grosveld, 2003; Dillon, 2006; Kosak and Groudine, 2004). Exprese genů tedy není závislá pouze na svých promotorech a jejich bezprostředním okolí, jak se dříve předpokládalo, ale na její regulaci se podílejí i oblasti, které mohou být stovky kilobází vzdálené. Tento nový komplexní pohled na regulaci genové exprese nám umožňuje lépe vysvětlit, jak může docházet ke konzervaci genů, které neleží v genomu bezprostředně vedle sebe, tedy genů v syntenii.

¹⁴ Kolinearita- skupina lokusů je u dvou druhů přítomna ve stejném pořadí a ve stejné orientaci

3. Výsledky

3.1. Poziční klonování genu *Hst1* (Hybrid sterility 1): jemné genetické mapování a zhodnocení kandidatury vybraných kandidátních genů

Cíle: Konstrukce fyzikální mapy *Hst1* kandidátní oblasti pomocí BAC klonů. Isolace nových genetických markerů, pomocí kterých by bylo možné zúžit *Hst1* kandidátní oblast. Mým úkolem bylo ověření kandidatury dvou vybraných genů z *Hst1* oblasti, u kterých byla zaznamenána zvýšená exprese ve spermatogenezi.

Metody: BAC klony pokrývající *Hst1* oblast byly izolovány z knihovny BAC klonů natečkované na nylonové membrány pomocí hybridizace s radioaktivně značenými próbami. Ke zmapování izolovaných BAC klonů bylo použito PCR amplifikující celkem osm známých lokusů rozložených podél celé *Hst1* oblasti. Klony lemující *Hst1* oblast byly subklonovány a náhodně vybrané úseky sekvenovány. Nově nalezené mikrosatelitové markery, amplifikované pomocí PCR a polymorfními mezi kmeny B10 a C3H, byly použity k mapování *Hst1* na zvířatech ze zpětného křížení. Allelické C3H varianty genů *Tbp* a *Psm1* byly získány sekvenováním PCR produktů amplifikovaných z C3H cDNA knihovny. Kvantifikace transkriptů obou genů byla provedena pomocí izolace RNA z patnácti-denních fertálních a sterilních hybridů, jejím přepsáním do cDNA a následným PCR v reálném čase.

Výsledky: V procesu pozičního klonování genu *Hst1* byla zkonstruována fyzikální mapa pomocí BAC klonů, stabilnějších a lépe použitelných při genetických manipulacích. Náhodným sekvenováním dvou BAC klonů lemující *Hst1* oblast byly získány celkem čtyři nové mikrosatelitové markery polymorfní mezi kmeny B10 a C3H, které byly použity k mapování *Hst1* na zvířatech ze zpětného křížení. Pouze jeden z těchto markerů 100% kosegregoval s *Hst1*, zatímco ostatní tři byly od *Hst1* odděleny shodně dvěma rekombinanty (~0.15 cM). Vzdálenost nejbližších segregujících markerů byla určena srovnáním jejich sekvence se známou

sekvencí myšního genomu v databázi Ensembl¹⁵ na 360 kb. Kandidátní oblasti pro *Hst1* gen se tak podařilo zúžit z předešlých 580 na 360 kb. Sekvenování mRNA forem dvou kandidátních genů *Tbp* a *Psm1* z myšního kmene C3H nesoucí *Hst1^f* alelu neodhalilo žádnou mutaci měnící protein jimi kódovaný oproti sekvencím mRNA z B6 myší, které nesou *Hst1^s* alelu. Nalezeno bylo po jedné synonymní nukleotidové záměně v kódující oblasti každého genu a několik dalších změn v nepřekládaných oblastech mRNA obou genů. Jelikož tyto změny mohou ovlivňovat například stabilitu mRNA a navíc oba geny mohly mít další změny v regulačních oblastech, byla kvantifikována přítomnost transkriptů obou genů ve varlatech patnácti-denních sterilních a fertálních hybridů. V tomto věku již byl v hybridech zaznamenán rozdíl v počtu pachytenních spermatocytů a tedy *Hst1* gen by měl být diferenciatně exprimován. Hladiny *Tbp* ani *Psm1* transkriptů se však ve varlatech prepubertálních hybridů nelišily. Spolu s nepřítomností B10/C3H polymorfizmu měnící sekvenci proteinu je kandidatura genů *Tbp* a *Psm1* na gen *Hst1* téměř vyloučena. Nalezené SNPs obou genů můžeme použít pro haplotypovou analýzu v klasických laboratorních a z divokých myší odvozených kmenů.

¹⁵ Ensembl- databáze schraňující informace o sekvenovaných eukaryotních genomech (<http://www.ensembl.org/index.html>)

3.2. Srovnávací analýza *PDCD2-TBP-PSMB1* oblasti u obratlovců

Cíle: Analýza významu syntenie genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* ležících u myši v kandidátní *Hst1* oblasti v genomech jiných obratlovců.

Metody: Kosmidový klon nesoucí kuřecí genomovou sekvenci, která obsahuje všechny tři zkoumané geny *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1*, byl izolován z kuřecí genomové knihovny pomocí hybridizace s radioaktivně značenými próbami z kuřecích orthologů *Tbp* a *Psemb1* genů. Mým úkolem bylo sekvenování izolovaného klonu, dlouhého 39,2 kb. Kosmid byl subklonován do plasmidu po štěpení několika restrikcí endonukleázami, subklony sekvenovány a získané sekvence následně poskládány do jediného kontigu. Homologické geny z ryb byly nalezeny *in silico* pomocí databází na NCBI¹⁶ a Ensembl.

Výsledky: Kandidátní *Hst1* geny *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* byly sledovány z hlediska jejich distribuce v genomu savců a jiných obratlovců. Analýza homologických genů z kura domácího, člověka, hada *Trimeresurus gramineus* a ryb *Fugu rubriceps*, *Danio rerio* a *Tetraodon nigroviridis* ukázala, že tyto tři geny jsou nenáhodně rozloženy v genomu obratlovců. Ve všech sedmi zkoumaných organismech byla nalezena kolinearita genů *Pdcd2* a *Tbp*, což znamená, že tyto geny se nacházejí na chromozómu vedle sebe a ve stejné orientaci. Gen *Psemb1* byl s geny *Pdcd2* a *Tbp* shledán kolineární u člověka, myši a kura domácího, u ryb se pak nacházel vždy na stejném chromozómu, tedy byl syntenní, ale nacházel se v opačné orientaci než u savců a ptáků. Distálně od 5' konce *Pdcd2* genu byl nalezen syntenní zlom opakovaně použitý v evoluci.

Zjištěná konzervace syntenie genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* u obratlovců, která přežila téměř půl miliardy let oddělené evoluce zjevně ukazuje na udržování této syntenie selekcí. Možnými důvody této konzervace může být sdílení některých regulačních DNA elementů, případně sdílení určité chromatinové struktury, řídících expresi těchto genů.

¹⁶ NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)- soubor molekulárně biologických databází organisovaných a spravovaných NIH. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.3. Konzervované alternativní a antisense transkripty v *Pdcd2* (Programmed cell death 2) lokusu

Cíle: Molekulární analýza genu *Pdcd2* s cílem posouzení jako kandidáta na gen *Hst1*, imprintovaný lokus a osvětlení důvodů syntenie konzervované u obratlovců.

Metody: Alternativní transkript *Pdcd2*, stejně jako alternativní transkripty *Tbp* genu byly identifikovány pomocí sekvenace nalezených EST klonů. Jejich 3' konce jsem určil pomocí rychlé amplifikace cDNA konců (RACE- PCR) a jejich přítomnost v myších a kuřecích varlatech potvrdil pomocí reverzní transkripce spojené s PCR (RT- PCR). Kvantitativní analýzu jejich transkripce v myších tkáních, vývojových stádiích varlat a v sortovaných populacích respektive jaderné a cytoplasmatické frakci spermatogenních buněk jsem provedl pomocí kvantitativního RT- PCR v reálném čase. Buněčné populace spermatogenních buněk jsem isoloval pomocí metody průtokové cytometrie FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*).

Výsledky: Byly nalezeny tři nové myší transkripty, alternativní *Pdcd2* mRNA, které chybí sekvence posledních dvou kódujících exonů a dva *Pdcd2*-antisense transkripty, přesahující buď pouze alternativní *Pdcd2* exon nebo celý *Pdcd2* gen. Ukázalo se, že *Pdcd2*-antisense transkripty jsou alternativními mRNA sousedního genu *Tbp* a jsou lokalizovány hlavně v buněčném jádře. Biologický význam zkráceného PDCD2 proteinu naznačuje fakt, že obdobný alternativní *Pdcd2* transkript byl nalezen kromě myši, i u člověka a kuřete. Tyto alternativní transkripty vznikly v evoluci konvergentně, jelikož v každém druhu je vzniklý zkrácený produkt generován odlišným způsobem, u člověka předčasnou alternativní polyadenylací, u kuřete a myši vzájemně odlišným alternativním sestřihem. Funkce identifikovaných alternativních *Tbp* transkriptů, které přesahují do *Pdcd2* genu může být zásadní pro regulaci genové exprese z *Pdcd2-Tbp* lokusu. Nebyla sice nalezena jednoznačná korelace mezi transkripcí alternativních *Tbp* transkriptů a jejich překrývajícími *Pdcd2* transkripty, nicméně poměr hladiny alternativních *Tbp* transkriptů a konstitutivního, respektive alternativního *Pdcd2* transkriptu, se liší ve zkoumaných tkáních. Stejně jako u myši se kuřecí alternativní transkripty genů *Pdcd2* a *Tbp* překrývají.

Alelické sekvenování a sledování úrovně transkripce všech nalezených transkriptů u prepubertálních sterilních a fertálních hybridů neodhalilo žádný důkaz, že by gen *Pdcd2* byl *Hst1* genem. Stejně tak nebyl nalezen vztah v expresi *Pdcd2* transkriptů s geny *Psm1* a *Tbp*, který by vysvětloval nalezenou syntenii těchto tří genů konzervovanou u obratlovců. Nebyl potvrzen imprinting genu *Pdcd2*, naznačovaný v publikaci Nikaido et al. (2003), ani dalších genů z *Hst1* oblasti v myším 9,5 denním embryu. Výsledky prezentované v této práci také naznačují, že některé cDNA, v databázích vedené jako nekódující, mohou být ve skutečnosti neúplné části alternativních transkriptů sousedících genů kódujících proteiny.

3.4. Jemná haplotypová struktura oblasti na 17. myším chromozómu

Cíle: Zúžení kandidátní oblasti pro *Hst1* gen pomocí konstrukce podrobné haplotypové mapy. Zjištění vlivu použití neklasických myších kmenů na haplotypovou analýzu. Porovnání haplotypů u myší (pod)druhů *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*.

Metody: DNA ze 80 myších kmenů byla izolována z ocasků nebo zakoupena. Jednotlivé lokusy (celkem 33) byly amplifikovány pomocí PCR a sekvenovány na kapilárním sekvenátoru ABI310. Mým úkolem bylo nalézt polymorfnní lokusy a dále sekvenace, editace a analýza dvou lokusů. Haplotypové bloky byly počítány programem Haploview.

Výsledky: Silná vazebná nerovnováha mezi klasickými laboratorními kmeny představuje překážku v mapování myších genů s vysokým rozlišením pomocí SNP haplotypů. Ve snaze o zúžení kandidátní oblasti genu *Hst1* jsme zkonstruovali haplotypovou mapu 250-kb oblasti na 17. myším chromozómu obsahující tento gen. Kromě klasických laboratorních myších kmenů bylo k haplotypové analýze použita i řada kmenů odvozených od divokých *M. m. domesticus* myší, dále pak kmeny *M. m. musculus* původu a kontroly z dalších tří myších (pod)druhů. Celkem bylo osekvenováno 33 lokusů až z 80 chromozómů. Haplotypy u *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* se liší a tak nemohou být společně použity pro haplotypové mapování. U klasických laboratorních myších kmenů byla nalezena korelace mezi *Hst1* alelami a haplotypem, ale délka haplotypu (~200 kb) přesahovala téměř celou zkoumanou *Hst1* oblast. Tato data tedy potvrzují výsledky předchozího genetického mapování, nepomohla však více zúžit *Hst1* oblast. Délka haplotypových bloků se při použití myších kmenů odvozených od divokých *M. m. domesticus* myší zmenšila na zhruba desítky kilobází. Nejdelší haplotypový blok u *M. m. domesticus* obsahuje geny *Pdcd2*, *Tbp* a *Psm1*, tedy členy syntenie konzervované u obratlovců. Použití klasických kmenů pro haplotypovou analýzu může být užitečné pro vyloučení delších úseků genomu, na jemnější mapování však je nezbytné použít kmenů odvozených od divokých myší. Dalším krokem v haplotypovém mapování genu *Hst1* je tedy určení fenotypu hybridní sterility těchto neklasických myších kmenů.

3.5. Myší *Hst1* lokus kóduje meiotický gen pro histon H3 methyltransferázu

Cíle: Zúžení *Hst1* kandidátní oblasti pomocí transgenních BAC linií. Přenosem překrývajících se úseků C3H genomické DNA s fertillní *Hst1^f* alelou do genomu sterilních hybridů nesoucích kombinaci alel *Hst^{W^S}/Hst1^S* docílit změny fenotypu hybridní sterility (tzv. *transgenic rescue*) a potvrdit finální kandidátní gen pro *Hst1* lokus.

Metody: BAC klony pokrývající *Hst1* oblast byli izolováni, opatřeni neomycinovou resistencí a transfekováni do myších embryonálních kmenových (ES) buněk. ES buňky nesoucí BAC byly injikovány do blastocyst, které byly vloženy do pseudopregnantních samic. Vzniklé chiméry byly testovány pomocí PCR s primery hybridizujícími v BAC vektorech a patřičnými SSLP z *Hst1* oblasti. Tvorbu XY tělíska¹⁷ jsem analyzoval pomocí imunofluorescenční analýzy na rozprostřených chromozómech spermatocytů s použitím protilátek proti synaptonemálnímu komplexu 1 (anti-SCP1) a fosforylovanému histonu H2AX (anti- γ H2AX). Kvantifikace hladiny mRNA genů z *Hst1* oblasti a *Morc2b*, stejně jako kvantifikace BAC kopií v jednotlivých BAC liniích jsem provedl pomocí PCR v reálném čase.

Výsledky: Celkem tři BAC klony CHORI-34-45F17 (dále BAC5), CHORI-34-289M8 (BAC21) a CHORI-34-331G23 (BAC24) byly úspěšně vneseny do myší nesoucích *Hst1^S* alelu. Získali jsme tak tři transgenní BAC linie, z nichž dvě, nesoucí BAC5 nebo BAC24, byly schopné po nakřížení na PWD kmen změnit fenotyp hybridní sterility ze sterilního na fertillní. Naopak BAC21 linie dávala po křížení s PWD sterilní samčí potomky. Na základě překryvu jednotlivých BACových klonů a expresní analýzy transgenů bylo zřejmé, že se *Hst1* gen nachází ve 25-kb úseku, které je společný BAC5 a BAC24, ale chybí v sekvenci BAC21. Tato oblast obsahuje kromě pseudogenu *Mrps21-rs* začátek jediného funkčního genu- *PR domain containing 9 (Prdm9)*. Celá oblast *Prdm9* genu byla osekvenována. Celkem bylo identifikováno 57 změn mezi C3H a B6 sekvencí,

¹⁷ XY tělísko- (XY nebo *sex body*) kondenzovaný chromatin transkripčně inaktivních pohlavních chromozomů, který se u samic formuje v průběhu pachytenní fáze prvního meiotického dělení.

z čehož 35 tvořily rozdíly v délce mikrosatelitových repetic, 21 SNPs v nekódující *Prdm9* sekvenci a jedna kódující změna v počtu repetic v doméně zinkových prstů (ZF) *Prdm9*. Tato doména se u C3H skládá ze čtrnáctkrát opakovaného motivu ZF na rozdíl od pouze třinácti opakování u B6. Pseudogen *Mrps21-rs* nebyl polymorfní mezi C3H a B6, a tak jediným kandidátem na gen *Hst1* se stal *Prdm9*.

Gen *Prdm9* kóduje trimethyltransferázu, která specificky methyduje dimethylovaný histon H3 na lysinu v pozici 4 (H3K4) a jejíž exprese byla zaznamenána zejména v pachytenních spermatocytech myších varlat (Hayashi et al., 2005). Epigenetická značka trimethyl-H3K4 je spojována s aktivně transkribovanými geny. K ověření faktu, že *Prdm9* způsobuje hybridní sterilitu, jsme využili porovnání fenotypu našich F1(PWD x B6) sterilních hybridů s publikovaným fenotypem myši s vyřazeným *Prdm9* genem. Jak F1(PWD x B6) hybridi tak *Prdm9*^{-/-} myši vykazují zmenšenou váhu varlat neobsahující žádné spermie. V obou případech k zástavě spermatogeneze dochází na úrovni pachytenních spermatocytů se zjištěnou poruchou párování homologických chromozómů a formování XY tělíska. Dalším společným znakem hybridů i *Prdm9*^{-/-} myši je chybějící aktivace genu *Morc2b* (*Microrchidia 2b*). Tento gen specifický pro germinální buňky byl popsán jako gen přímo regulovaný PRDM9 proteinem (Hayashi et al., 2005). Zvýšená hladina mRNA pro gen *Morc2b* byla naopak zaznamenána u BAC linií způsobujících zvrát fenotypu hybridní sterility. Fenotypovým rozdílem nalezeným mezi F1(PWD x B6) a *Prdm9*^{-/-} myšmi je sterilita samic, která se u hybridů řídí Haldanovým pravidlem a hybridní samice zůstávají fertillní, kdežto u *Prdm9*^{-/-} jsou samice sterilní. Tento rozdíl mezi fenotypy F1(PWD x B6) a *Prdm9*^{-/-} myši může být vysvětlen, pokud si uvědomíme, že gen *Hst1* nezpůsobuje hybridní sterilitu samců sám o sobě, ale v interakci s dalšími geny. Nekompatibilní epistatické interakce produktu *Prdm9* genu v hybridech mohou vykazovat trochu jiný fenotyp, než absence PRDM9 proteinu v *Prdm9*^{-/-} myších. Výsledky BAC transgeneze a fenotypové analýzy hybridů *Prdm9*^{-/-} myši ukazují, že gen *Prdm9* je námi hledaným genem *Hst1* účastníkem se hybridní sterility v křížencích myších kmenů PWD a B6, tedy kmenů s rozdílným poddruhovým původem. Gen *Hst1* alias *Prdm9* je prvním vyklonovaným genem hybridní sterility u obratlovců.

4. Diskuze

Předkládaná dizertační práce shrnuje kroky, které byly učiněny k identifikaci genu *Hst1*, prvního genu hybridní sterility popsaného u obratlovců. Tato práce, založená na čtyřech přijatých a jedné k recenzi předložené publikaci, se kromě pozičního klonování genu *Hst1* snaží přispět k objasnění některých obecnějších biologických otázek, jako je rozložení genů v eukaryotických genomech, regulace genové exprese pomocí přirozených antisense transkriptů nebo využití neklasických myších inbredních kmenů ke genovému mapování.

4.1. Poziční klonování genu *Hst1*

Ústředním motivem této práce je poziční klonování genu *Hst1*, genu, který byl jako první popsaný gen hybridní sterility u obratlovců mapován na 17. myší chromozóm již před více než třiceti lety (Forejt and Ivanyi, 1974). Gen *Hst1* způsobuje hybridní sterilitu mezi myšimi poddruhy *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*, která se projevuje u hybridních samců zástavou meiotického dělení primárních spermatocytů (Forejt, 1981). Pozice genu *Hst1* na chromozómu 17 byla postupně zpřesňována prostředky pozičního klonování (Forejt et al., 1991; Gregorova et al., 1996; Trachtulec et al., 1994). Kombinací genetického a fyzikálního mapování se dosáhlo vysokého rozlišení mapy a *Hst1* gen byl lokalizován v chromozomálním úseku dlouhém pouhých 360 kb, který obsahoval šest kandidátních genů (Trachtulec et al., 2005; Trachtulec et al., 1997a). Molekulární analýza kandidátních genů, sestávající zejména z alelického sekvenování mRNA forem z myší lišící se *Hst1* fenotypem a kvantitativní analýzy exprese kandidátních genů ve varlatech prepubertálních fertálních a sterilních hybridů, neumožnila identifikovat *Hst1* gen (Mihola et al., 2007; Trachtulec et al., 2005). Stejně tak se nepodařilo podstatně omezit *Hst1* oblast haplotypovou analýzou, ačkoliv byly potvrzeny výsledky získané genetickým mapováním (Trachtulec et al., 2008). Jelikož *Hst1* kandidátní oblast byla i tak již dostatečně úzká, bylo možné přistoupit ke transgenezi pomocí BAC klonů pokrývajících tuto oblast. Dvě ze tří získaných BAC linií byly schopné změnit fenotyp hybridní sterility. Na základě překryvu jednotlivých BAC klonů a expresní analýzy transgenů bylo možné omezit oblast s hledaným *Hst1* genem na pouhých 25 kb, obsahující

začátek jediného funkčního genu, *Prdm9* (Mihola et al., 2008). Pro potvrzení *Prdm9* genu jako *Hst1* byl porovnán fenotyp sterilních F1(PWD x B6) hybridů s publikovanými fenotypy myší s vyřazeným *Prdm9* genem (Hayashi et al., 2005; Tabulka 1). Shoda byla zaznamenána u snížené hmotnosti varlat a počtu populací spermatogenních buněk ve varlatech. Jen v F1 hybridních jsou vyjimečně zaznamenány i spermatidy, což u *Prdm9*^{-/-} nebylo pozorováno (Hayashi et al., 2005; Tab. 1). Tento drobný rozdíl však může být způsoben nedostatkem pozorování nebo odlišným genetickým pozadím. Zdá se tedy, že v obou případech k zástavě spermatogeneze dochází na úrovni pachytenních spermatocytů, což potvrzují i zjištěné poruchy párování homologních chromozómů, formování XY tělíska a výskyt rozvětvených (*branching*) chromozómů jak u F1(PWD x B6), tak u *Prdm9*^{-/-} myší (Forejt, 1981; Forejt and Ivanyi, 1974; Hayashi et al., 2005; Mihola et al., 2008; Mihola, nepublikovaná data). Shodná pro oba typy sterilních myší je také chybějící aktivace transkripce testes-specifického genu *Morc2b*, který byl popsán jako gen přímo regulovaný PRDM9 proteinem (Hayashi et al., 2005). Analýza trimethylace histonu 3 na lysinu 4 (H3K4me3) na promoteru *Morc2b* ukazuje poruchu u obou typů sterility (Trachtulec et al., nepublikovaná data).

Byly také zaznamenány dva fenotypické rozdíly mezi F1(PWD x B6) a *Prdm9*^{-/-} myšmi. Jelikož protein PRDM9 katalyzuje trimethylaci histonu H3 dimethylovaného na lysinu 4, měla být ve spermatocytech sterilních myší detekovatelná snížená úroveň trimethylace a naopak zvýšená dimethylace H3K4 v porovnání s odpovídajícími fertilitními kontrolami. To bylo prokázáno, i když v případě dimethylace na hranici významnosti, ve spermatocytech myší *Prdm9*^{-/-}. Nám se podařilo prokázat pouze slabé snížení trimethylace H3K4, nebyla však prokázána zvýšená hladina dimethylovaného H3K4 ve spermatocytech sterilních F1(PWD x B6) samců (Tab.1; Mihola, nepublikovaná data). Druhým nalezeným fenotypovým rozdílem mezi F1(PWD x B6) a *Prdm9*^{-/-} myšmi je sterilita samic, která se u hybridů řídí Haldanovým pravidlem a hybridní samice zůstávají fertilitní, kdežto u *Prdm9*^{-/-} jsou samice sterilní. Oba zjištěné rozdíly mezi fenotypy F1(PWD x B6) a *Prdm9*^{-/-} myší mohou být vysvětleny, pokud si uvědomíme, že gen *Hst1* nezpůsobuje hybridní sterilitu samců sám o sobě, ale jen v interakci s dalšími geny. Kromě interakcí alel *Hst*^{WS}/*Hst*^S se uplatňuje nejméně jeden další významný lokus, který byl v naší laboratoři mapován na chromozóm X (Storchova et al., nepublikovaná data). Nekompatibilní epistatické interakce produktu *Prdm9*

genů v hybridních myších mohou vykazovat trochu jiný fenotyp, než absence PRDM9 proteinu v *Prdm9*^{-/-} myších. Stejný „pohlavně specifický“ meiotický efekt byl zaznamenán pro *Dmc1*, autosomální gen účastnící se v průběhu rekombinace výměny DNA řetězců mezi homologními chromozómy. Nulová alela *Dmc1* genu také způsobuje zástavu vývoje pohlavních buněk v pachytene u obou pohlaví (Pittman et al., 1998), narozdíl od mutantní „missense“ *Dmc1* alely nazvané *Mei11* (*Meiosis defective 11*), která způsobuje sterilitu pouze u samců (Bannister et al., 2007).

Genotyp→ ↓Fenotyp/	<i>Prdm9</i> ^{-/-} →	F1(PWD x B6)
Hmotnost varlat	redukována	redukována
Počet pachytenních spermatocytů	redukován	redukován
Spermatidy	žádné	(většinou) žádné
Spermie	žádné	žádné
Párování chromozómů	částečně poškozeno	časté univalenty
"Rozvětvené" chromozómy	ano	ano
Formování XY tělíska	poškozeno	poškozeno (63%)
H3K4me2 ve spermatocytech	zvýšena (o 60%)	téměř stejná
H3K4me3 ve spermatocytech	redukována (na 30%)	redukována (na 80%)
Indukce <i>Morc2b</i> genu	porušena	porušena
H3K4me3 <i>Morc2b</i> promoteru	porušena	porušena
Sterilita samic	Ano	Ne

Tab. 1. Porovnání fenotypů *Prdm9*^{-/-} a sterilních hybridů F1(PWD x B6); porovnání je vždy vztažené k fertilitním *wild-type* kontrolám (*Prdm9*^{+/+}, respektive F1(PWD x C3H)).

H3K4me3, trimethylace histonu 3 na lysinu 4; H3K4me2, dimethylace H3 na lysinu 4

Výsledky BAC transgeneze a fenotypové analýzy hybridů *Prdm9*^{-/-} myší nás opravňují k závěru, že gen *Prdm9* je námi hledaným genem *Hst1* účastnící se hybridní sterility v křížencích myších kmenů PWD a B6, tedy kmenů s rozdílným

poddruhovým původem. Zbývá objasnit přesnou úlohu *Prdm9* genu při vzniku hybridní sterility a také to, zda se tento gen uplatňuje také v divokých populacích při reprodukční izolaci poddruhů *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*.

Identifikace kauzálního polymorfizmu v *Prdm9* genu, který způsobuje genovou nekompatibilitu v neplodných hybridech, by nám měla pomoci rozkrýt celý mechanismus jeho působení. Jednou z cest vedoucí k identifikaci kritického polymorfizmu je testování identifikovaných B6/C3H polymorfizmů v *Prdm9* genu na panelu jiných inbredních kmenů se známým fenotypem hybridní sterility. To bude provedeno v první řadě s jediným nalezeným polymorfizmem v kódující oblasti *Prdm9* genu, a to polymorfizmem v délce ZF repetice. Pouze takový rozdíl, který bude zcela korelovat s fenotypem hybridní sterility u všech testovaných *Hst1^s* a *Hst1^f* kmenů, může být polymorfizmem způsobujícím hybridní sterilitu. Je ale třeba mít na zřeteli, že pokud shoda nebude úplná, nemůžeme takový polymorfizmus zcela vyloučit, protože teoreticky v některých kombinacích kmenů může být mechanismus hybridní sterility jiný. Pouze u kmenů, které byly použity ke genetickému mapování, si můžeme být jisti *Hst1* alelou, u ostatních kmenů známe pouze fenotyp hybridní sterility po jejich křížení s kmeny původu *M. m. musculus*.

Nalézt kritický polymorfizmus by nám také mohlo pomoci studium genové exprese *Prdm9* genu v prepubertálních sterilních a fertálních hybridech. Rozdíl na transkripční úrovni by ukazoval na B6/C3H polymorfizmus v promotorové oblasti *Prdm9* genu, rozdíl v expresi na proteinové úrovni by ukazoval na B6/C3H polymorfizmus v nepřekládaných oblastech *Prdm9* mRNA, které rozhodující o translatovatelnosti. Na transkripční úrovni nebyl nalezen významný rozdíl v prepubertálních sterilních a fertálních hybridech (Mihola et al., 2008), analýza exprese *Prdm9* genu na proteinové úrovni metodou *Western blot* pomocí polyklonální protilátky proti PRDM9 nebyla ještě dokončena. Definitivním potvrzením úlohy *Prdm9* genu v hybridní sterilitě by mohla být záměna sterilní alely na fertální záměnou kandidátního polymorfizmu pomocí homologní rekombinace v ES buňkách.

Gen *Hst1* alias *Prdm9* je prvním vyklonovaným genem hybridní sterility u obratlovců. Hlubší porozumění role *Prdm9* genu v procesech hybridní sterility přispěje k pochopení molekulárních mechanismů vzniku nových druhů, speciace. Detailní objasnění funkce genů podílejících se na speciaci bylo zatím popsáno jen několik, v naprosté většině u drozofily (Barbash et al., 2003; Sun et al., 2004)

(Brideau et al., 2006; Presgraves, 2007). Role *Hst1* genu v hybridní sterilitě myší se nápadně podobá zejména roli genu *Lhr* způsobujícího hybridní inviabilitu mezi druhy *Drosophila simulans* a *Drosophila melanogaster* (Brideau et al., 2006). V obou případech se jedná o autozomální gen, který způsobuje inkompatibilitu hybridů v součinnosti s genetickým faktorem vázaným na X chromozóm. V obou případech se navíc na vzniku hybridní sterility podílejí i další lokusy.

Na X chromozóm mapuje i jediný doposud identifikovaný gen hybridní sterility, gen *OdysseusH* (*OdsH*) (Perez and Wu, 1995; Perez et al., 1993). Tento gen způsobující hybridní sterilitu mezi *Drosophila mauritiana* a *Drosophila simulans* (Coyne and Charlesworth, 1986), kóduje homeoboxový transkripční faktor (Perez et al., 1993; Ting et al., 1998), je exprimovaný ve varlatech, ale jeho přesná funkce ve spermatogenezi je neznámá. Samci s vyřazeným *OdsH* jsou plodní, pouze mají v mládí mírně snížený počet spermií (Sun et al., 2004). To je v kontrastu s myši s vyřazeným *Prdm9* genem, který u nich způsobuje kompletní sterilitu. Společným znakem identifikovaných speciálních genů je také jejich rychlá evoluce (Orr et al., 2004), což lze vysledovat i u *Prdm9* genu. Sledujeme-li rozložení polymorfismů mezi myšimi poddruhy i dalšími savci, je zřejmé, že se jich většina koncentruje v oblasti ZF domény. Zdá se tedy, že tato část *Prdm9* genu vykazuje rychlejší evoluci, a proto bychom se měli zaměřit při hledání *Hst1* kauzálního polymorfismu právě na tuto oblast.

Jak již bylo řečeno, *Hst1* gen nezpůsobuje hybridní sterilitu sám o sobě, ale v součinnosti s nejméně dalšími dvěma lokusy. Identifikace těchto genů je tedy dalším krokem vedoucím k porozumění mechanismu hybridní sterility. Toho můžeme dosáhnout identifikací genů, které gen *Prdm9* svojí trimethylační aktivitou reguluje, případně s kterými *Prdm9* interaguje. Identifikace genů regulovaných PRDM9 proteinem může být provedena například expresní analýzou na DNA čípech ve varlatech prepubertálních sterilních a fertálních hybridů. Další možností je použití metody chromatinové imunoprecipitace¹⁸ s protilátkou proti PRDM9, spojenou s analýzou získaných DNA sekvencí na čípech (tzv. „ChIP-on-chip“) nebo jejich sekvenováním (ChIP-seq). Geny interagující s PRDM9 proteinem by se daly identifikovat pomocí kvasinkového dvouhybridového systému.

¹⁸ Chromatinová Imunoprecipitace (ChIP)- metoda umožňující izolaci oblastí genomické DNA, které jsou vázány určitými proteiny, např. transkripčním faktory nebo které mají určitou chromatinovou strukturu (např. určité histonové modifikace).

4.2. Funkce nově identifikovaných transkriptů v *Hst1* lokusu a konzervace syntenie genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psmb1* u obratlovců

K posouzení kandidatury všech genů na gen *Hst1* bylo třeba provést detailní analýzu jejich transkripce. Tato analýza odhalila alternativní transkript jak pro gen *Pdcd2*, kde byla nalezena alternativní mRNA, která kóduje zkrácený PDCD2 protein, neobsahující konzervovanou doménu na svém C-konci, tak pro gen *Tbp*, pro který byly identifikovány nejméně dva nové transkripty vznikající alternativní polyadenylací. Jaké mohou být funkce těchto nově objevených transkriptů? Ze studie zkoumající úlohu *Pdcd2* genu v regulaci buněčného cyklu (Scarr and Sharp, 2002) můžeme usuzovat, že funkce zkráceného PDCD2 proteinu je pravděpodobně opačná než funkce konstitutivní PDCD2 formy. Biologický význam tohoto zkráceného PDCD2 proteinu naznačuje také fakt, že obdobný alternativní *Pdcd2* transkript byl nalezen, kromě myši, i u člověka a kuřete. Tyto alternativní transkripty vznikly v evoluci konvergentně, jelikož v každém druhu je vzniklý zkrácený produkt generován odlišným způsobem: u člověka předčasnou alternativní polyadenylací, u kuřete a myši vzájemně odlišným alternativním sestřihem (Mihola et al., 2007). Z kvantitativní analýzy transkripce *Pdcd2* forem vyplývá, že poměr konstitutivního a alternativního *Pdcd2* transkriptu se liší ve zkoumaných myších tkáních. Objevení alternativní formy *Pdcd2* genu může přispět k objasnění biologické funkce tohoto genu.

O úloze v regulaci transkripce nově identifikovaných alternativně polyadenylovaných *Tbp* transkriptů s antisense přesahem do *Pdcd2* genu můžeme pouze spekulovat. Objevů takovýchto lokusů s překryvnou transkripcí v poslední době rychle přibývá. Recentní publikace ukazují, že savčí genom je transkribován mnohem extenzivněji než se dříve předpokládalo (souhrnné články Carninci et al., 2008; Yasuda and Hayashizaki, 2008). Novější odhady uvádějí, že 63% genomové DNA u myši se nachází v silně transkribovaných oblastech tzv. transkripčních „pralesech“, s častým překryvem transkriptů v antisense orientaci (Carninci et al., 2005). Až 72% myších genů má svůj antisense transkript (Katayama et al., 2005). Bylo identifikováno velké množství alternativních počátků

transkripce (Carninci et al., 2006), u 65% transkripčních jednotek byl zaznamenán alternativní sestřih a velké množství transkriptů je také alternativně polyadenylováno (Carninci et al., 2005; Kapranov et al., 2007b). Velkým překvapením bylo také nalezení velkého množství transkriptů nekódujících proteiny (ncRNA), které svou kvantitou vysoce převyšují počet protein-kódujících genů v savčích genomech (Carninci et al., 2008; Kapranov et al., 2007a; Kapranov et al., 2007b). Například byly identifikovány krátké nekódující RNA dlouhé desítky až stovky bp, které jsou přepisovány z oblastí v promotorech, exonech i 3' nepřekládaných oblastech protein-kódujících genů (Kapranov et al., 2007a). Na druhé straně, díky novým technikám jako GIS¹⁹ (Ng et al., 2005), byly nalezeny obrovské, až několik Mb dlouhé transkripty (Kapranov et al., 2007b). Funkce všech těchto nově objevených transkriptů je zatím značně nejasná, nicméně jejich společným znakem se zdá jejich překryvná transkripce s protein-kódujícími geny jejich promotory nebo navzájem mezi sebou, ať v sense nebo antisense orientaci. Dalším znakem je, že u většiny těchto ncRNA (neplatí pro jejich promotory) nebyla nalezena velká míra mezidruhové konzervace (Engstrom et al., 2006; Numata et al., 2007; Okada et al., 2008). Přesto je regulace pomocí této překryvné transkripce považována za významnou (Pang et al., 2006), protože se předpokládá, že více než na sekvenci, která je transkribována, zde spíše záleží na transkripci samotné (Carninci et al., 2008).

Antisense transkripce může regulovat genovou expresi „sense“ transkriptů na nejrůznějších úrovních od transkripce, sestřihu hnRNA, stability mRNA, transportu mRNA do cytoplasmy až po její translatovatelnost. Při antisense regulaci se uplatňuje několik mechanismů jako jsou transkripční interference, RNA interference, RNA editace nebo methylace DNA (Carninci et al., 2008; Lavorgna et al., 2004; Werner and Berdal, 2005). Dříve se mínilo, že tyto procesy ve většině případů ve svém důsledku vedou k negativnímu ovlivnění genové exprese svých „sense“ protějšků (Lavorgna et al., 2004), nicméně dnes už je zřejmé, že regulace pomocí antisense transkripce je mnohem komplexnější než se předpokládalo. Ukazuje se, že většina antisense transkripce má spíše pozitivní vliv na genovou expresi ze „sense“ lokusu (Carninci et al., 2008; Katayama et al., 2005; Kiyosawa

¹⁹ GIS (*Gene identification signature*)- metoda založená na sekvenování a mapování tzv. DNA ditagů reprezentujících celou cDNA. Ditag je tvořen určitými přesně definovanými úseky z 5' a 3' konce kompletní cDNA. Ditagy jsou konkatemerizovány, sekvenovány a mapovány do genomu.

et al., 2005; Sun et al., 2006; Werner, 2005). Dokonce byly nalezeny transkripty, které v závislosti na dalších faktorech, mohou mít jak pozitivní tak negativní vliv na regulaci transkripce v „sense“ směru (Abarategui and Krangel, 2007). Klíčovou úlohu zde zřejmě hraje remodelace chromatinové struktury a zpřístupnění určitých segmentů DNA dalším regulačním faktorům, tzv. otvírání chromatinu (Gingeras, 2007; Kapranov et al., 2007a). V tom případě pak nezáleží na sekvenci, která je transkribována a tudíž není důvod aby byla konzervována mezi druhy.

Funkci otvírání chromatinu by mohly plnit i nalezené alternativní *Tbp* transkripty a regulovat tak transkripci z *Tbp-Pdcd2* lokusu. Jsou lokalizovány v jádře a transkribovány na podobné úrovni jako transkripty *Pdcd2* genu (Mihola et al., 2007). Jejich transkripce by teoreticky mohla mít jak pozitivní („otvíráním“ chromatinu), tak negativní (methyloací *Pdcd2* promotoru nebo siRNA) účinky na transkripci *Pdcd2* genu, případně by mohla řídit poměr konstitutivního a alternativního *Pdcd2* transkriptu (Munroe and Lazar, 1991). Nebyla sice nalezena jasná pozitivní nebo negativní korelace v expresi mezi *Pdcd2* a *Tbp* transkripty, nicméně jejich vzájemné poměry se liší v jednotlivých tkáních. O významu antisense přesahu *Pdcd2* a *Tbp* genů pro regulaci transkripce z *Pdcd2-Tbp* lokusu hovoří i jeho konzervace u myši a kuřete. Tato konzervace antisense překryvu genů *Pdcd2* a *Tbp* navíc zřejmě zapříčiňuje selekční tlak způsobující, že tyto geny se vyskytují v těsné vazbě u všech zkoumaných obratlovců. Takový vliv antisense přesahu na vazbu genů naznačuje (Dahary et al., 2005), který ukázal, že geny překrývající se u savců jsou častěji stejně organisovány i u ryby *Fugu rubriceps*.

Proč jsou ale *Pdcd2* a *Tbp* u všech sledovaných obratlovců syntenní i s *Psemb1* genem, který je vzhledem k *Tbp* genu v pozici *head-to-head*? Syntenie genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* je konzervována u všech studovaných obratlovců (Trachtulec et al., 2004) a přežila tak téměř půl miliardy let oddělené evoluce, což zjevně ukazuje na udržování této syntenie selekcí. Možnými důvody této konzervace může být sdílení některých regulačních DNA elementů, případně sdílení určité chromatinové struktury, řídících expresi těchto genů. Tato hypotéza byla nejprve testována analýzou exprese genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* v různých myších tkáních. Analýza transkripce *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* genů ukázala koexpresi těchto genů ve čtyřech sledovaných tkáních, nicméně ve varlatech vykazuje gen *Tbp* relativní, asi deseti násobné, zvýšení oproti ostatním tkáním, kdežto *Pdcd2* a

Psemb1 geny jsou transkribovány ve všech sledovaných tkáních na podobné úrovni (Mihola et al., 2007).

Hledali jsme proto jiné důvody pro konzervaci syntenii genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* u obratlovců. Jednou z možností je, že syntenie je důsledkem selekce pro vazebnou nerovnováhu, která by fixovala určitou výhodnou kombinaci alel genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1*. Taková selekce by však mohla vzniknout pouze za předpokladu, že by mezi produkty genů existovala nějaká přímá interakce nebo by se účastnily jedné metabolické dráhy. Všechny tři geny mají možnost přímé interakce, jelikož jejich produkty působí v buněčném jádře, nicméně zatím nebyla prokázána experimentálně. Hypotéza selekce pro vazebnou nerovnováhu mohla být přímo testována studiem distribuce rekombinačních zlomů v oblasti, což jsme provedli v rámci konstrukce haplotypové mapy *Hst1* oblasti (Trachtulec et al., 2008). Skutečně bylo prokázáno, že geny *Pdcd2*, *Tbp* a *Psemb1* se vyskytují v jednom haplotypovém bloku jak u myši, tak člověka. Dochází zde tedy k potlačení rekombinace, což zabraňuje oddělení těchto tří genů v evoluci. Otázkou zůstává, zda potlačení rekombinace mezi těmito geny zajišťuje skutečně fixaci určité výhodné kombinace alel těchto genů nebo zda může být potlačení rekombinace následkem něčeho jiného.

Tímto alternativním důvodem může být fakt, že všechny tři geny jsou esenciální, tedy že jejich *knock-out* je letální. Bylo totiž prokázáno, i když zatím pouze pro kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* a hlístici *Caenorhabditis elegans*, že esenciální geny (nezávisle na tom, zda jsou funkčně příbuzné či koexprimované), se z dosud neobjasněného důvodu shlukují do domén s nižší rekombinační aktivitou (Pal and Hurst, 2003). Taktéž u kvasinky bylo sledované shlukování esenciálních genů vysvětleno tím, že se geny sdružují do míst s menším expresním šumem, což jsou místa s konstitutivně otevřeným chromatinem, zajišťující rychlou a přesnou regulaci jejich transkripce (Batada and Hurst, 2007). Tato teorie také neklade žádné požadavky na koexpresi ani funkční příbuznost genů.

Sdružování funkčně nepříbuzných genů a konzervace těchto shluků v evoluci byla zaznamenána i u myši a člověka (Purmann et al., 2007). Předpokladem takového shlukování je sice podobný expresní profil, který je však autory definován koeficientem vyjadřujícím počet tkání, ve kterých se geny společně vyskytují bez ohledu na velikost exprese. V tomto pojetí jsou geny

Pdcd2, *Tbp* a *Psmb1* koexprimovány, i přes zvýšenou hladinu exprese genu *Tbp* ve varlatech. Autoři naznačují, že důvodem tohoto sdružování genů může být sdílení nespecifikované konzervované regulační oblasti fungující na úrovni remodelace chromatinu. Roli chromatinové struktury při společné regulaci exprese genů *Pdcd2*, *Tbp* a *Psmb1* naznačuje fakt, že celá oblast tvoří doménu s podobným typem histonových modifikací, a to jak v myších ES buňkách, kmenových neurálních buňkách a embryonálních fibroblastech (Mikkelsen et al., 2007), tak v lidských T-lymfocytech (Barski et al., 2007). Z tohoto hlediska by bylo zajímavé zjistit stav chromatinu ve varlatech, kde byla nalezena zvýšená hladina *Tbp* mRNA. Pokud i zde budou mít všechny tři geny stejnou chromatinovou strukturu, pak zvýšená hladina *Tbp* transkriptu ve varlatech je způsobena až na úrovni regulace transkripce pomocí specifických transkripčních faktorů.

4.3. Využití haplotypové analýzy k mapování myších genů

Primárním cílem konstrukce haplotypové mapy *Hst1* oblasti byla snaha o její zúžení. Při použití klasických laboratorních myších kmenů byla sice nalezena korelace mezi *Hst1* fenotypem a určitým haplotypem, nicméně nám to neumožnilo zkrátit *Hst1* oblast, jelikož délka haplotypů, i při použití většího počtu kmenů, přesahovala téměř celou *Hst1* oblast (Trachtulec et al., 2008). Snížení délky haplotypových bloků nám umožnilo až použití myších kmenů odvozených od divokých *M. m. domesticus* myší. Délka haplotypových bloků se snížila na zhruba desítky kilobází, což svou velikostí odpovídá délce haplotypů zjištěných u člověka (Consortium, 2007), kde se znalosti haplotypové struktury identifikované v projektu haplotypového mapování lidského genomu (projekt HapMap www.hapmap.org/) začalo s úspěchem využívat k rychlému celogenomovému mapování lidských dědičných chorob (Consortium, 2007). U neklasických myších kmenů však neznáme *Hst1* fenotyp a tak je jeho určení dalším krokem v haplotypovém mapování genu *Hst1*. Podle předběžných nepublikovaných dat nebyl ale zatím nalezen žádný SNP nebo jiná změna v DNA, která by zcela korelovala s *Hst1* fenotypem na novém setu myších kmenů.

Z našeho experimentu vyplývají i obecnější závěry užitečné pro poziční klonování myších genů. Použití klasických kmenů s dlouhými haplotypovými bloky pro haplotypovou analýzu může být užitečné pro vyloučení delších úseků genomu, na jemnější mapování je však nezbytné použít kmenů odvozených od divokých myší. Při použití dostatečného množství takových kmenů může být mapování pomocí haplotypů účinnější než genetické mapování pomocí tisíců nakřížených zvířat. Z kratší délky haplotypových bloků u myších kmenů odvozených od divokých myší vyplývá, že k zachycení kompletní struktury haplotypů je potřeba daleko hustšího pokrytí oblasti SNPs. Proto bude prozatím obtížné využít tyto kmeny pro celogenomové haplotypové mapování, nicméně velice užitečné může být použití těchto kmenů právě na zužování již definované kandidátní oblasti pozičně klonovaného genu, kdy stačí pokrýt SNPs pouze studovanou oblast a jen u kmenů se známým fenotypem.

S ohledem na využití haplotypových bloků k mapování myších genů je potěšitelné, že ve veřejně přístupných databázích rychle přibývá jak SNPs dat, tak fenotypů pro množství myších kmenů. V současnosti je asi nejlepším zdrojem těchto informací *Mouse Phenome Database* (<http://www.jax.org/phenome>, (Bogue et al., 2007)). Tato databáze byla vytvořena organizací *The Jackson laboratory*²⁰ v rámci projektu *Myšího Fenomu (Mouse Phenome Project)* a aktuálně obsahuje SNPs data z 10 miliónů pozic v myším genomu a množství fenotypů pro širokou škálu myších kmenů. Celkový počet myších kmenů, pro který je v databázi veden nějaký záznam, je 604. Mezi prioritními 36 myšími kmeny, které jsou přednostně genotypovány a fenotypovány, je 31 klasických laboratorních myších kmenů a pouze 5 odvozených od divokých myší, a to po dvou původu *M. m. musculus* a *M. m. molossinus* a jeden *M. m. castaneus*. Je tedy zřejmé, že naprostá většina dat zatím patří klasickým laboratorním myším kmenům. Do budoucna by tedy bylo užitečné zahrnout mnohem více kmenů recentně odvozených od divokých myší. Již nyní mohou tato data usnadnit mapování myších genů natolik, že je v některých případech možné zcela nahradit klasické genetické mapování pomocí křížení myší a celé mapování provést *in silico* (Grupe et al., 2001; Liu et al., 2007; Pletcher et al., 2004). S přibývajícím fenotypovými a SNPs daty z mnoha myších kmenů, včetně těch odvozených od divokých myší, bude možné tento přístup

²⁰ *The Jackson Laboratory*- je nezávislá, nezisková organizace jejíž cílem je využití potenciálu myšího modelu pro studium lidského zdraví (<http://www.jax.org>)

využít pro stále větší počet myších genů. Úplné obejití genetického mapování však nebude zřejmě možné, jelikož jedině křížením myší můžeme ověřit, že za sledovaný fenotyp u všech myších kmenů použitých k haplotypové analýze jsou odpovědné stejné geny.

Dalšími významnými pomůckami, které vedou ke zefektivnění pozičního klonování, jsou přibývající kompletní sekvence dalších myších kmenů a množství expresních informací. Tyto data mohou významně pomoci v identifikaci nejvhodnějšího kandidátního genu z genomového intervalu získaného ať už klasickým genetickým přístupem nebo například *in silico* mapováním. Pomocí dat v genomových databázích bude možné rychle identifikovat geny v kandidátní oblasti, které jsou polymorfní mezi kmeny s odlišným fenotypem. V expresních databázích je už dnes možné identifikovat geny, které jsou exprimované v tkáni, kde se zkoumaný fenotyp uplatňuje. Užitečné by byly kombinované databáze s genotypovými a expresními daty pro jednotlivé inbrední kmeny. Také hlubší porozumění regulaci genové exprese nám pomůže lépe identifikovat polymorfismus, který může být zodpovědný za daný fenotyp. S novými poznatky o obrovském množství regulačních RNA, které mnohonásobně převyšují počet protein-kódujících genů (souhrnný článek Carninci et al., 2008) je zřejmé, že kauzální polymorfizmy je třeba hledat i mimo čtecí rámce kandidátních genů. S přibývajícím znalostmi, daty a prostředky na jejich zpracování bude v budoucnu možné výrazně zkrátit doposud velmi trnitou cestu pozičního klonování. V extrémním případě by teoreticky mohla být identifikace genu jako je *Hst1*, která v našem případě trvala přes 30 let, záležitostí jen několika málo hodin strávených u počítače *in silico* mapováním. Experimentální práce se pak bude moci více přesunout na fázi ověřování takto identifikovaného genu metodami reverzní genetiky, které jsou u myši k dispozici, jako jsou transgeneze, cílená manipulace genů homologní rekombinací v embryonálních kmenových buňkách nebo přechodné umlčení kandidátních genů pomocí RNA interference.

5. Seznam zkratek

B6 ... C57BL/6J (laboratorní myš kmen)
 B10 ... C57Bl/10 (laboratorní myš kmen)
 BAC ... *Bacterial Artificial Chromosome*
Bard1-rs ... BRCA1 associated RING domain 1- related sequence...(pseudogen)
 bp ... *base pairs...* párů bazí
 CAGE- *Cap-analysis gene expression*
 C3H ... C3H/DiSnPh (laboratorní myš kmen)
 ChIP ... Chromatinová Imunoprecipitace
 cM ... centimorgan
 dsRNA ... *double strand RNA ... dvouřetězcová RNA*
E. coli ... Escherichia coli
 EST ... Expressed Sequence Tag
 FACS ... *Fluorescence-activated cell sorting*
 GEO ... *Gene Expression Omnibus ... databáze*
Hst1 ... Hybrid sterility 1 ... (gen)
 LD ... *Linkage Disequilibrium ... vazebná nerovnováha*
M. m. domesticus ... Mus musculus domesticus
M. m. musculus ... Mus musculus musculus
 Mp ... *megabase pairs...* 1 000 000 párů bazí
 MGI ... *Mouse Genome Informatics (databáze)*
Morc2b ... Microrchidia 2b... (gen)
Mrps21-rs ... Mitochondrial ribosomal protein S21- related sequence...(pseudogen)
 NCBI ... *National Center for Biotechnology Information*
 NIEHS ... *The National Institute of Environmental Health Sciences*
Odc-rs15 ...Ornithine decarboxylase- related sequence 15 ...(pseudogen)
OdsH ... OdysseusH ...(gen)
 ORF ... *open reading frame ... otevřený čtecí rámec*
 PCR ... *polymerase chain reaction ... polymerázová řetězová reakce*
Pdcd2 ... Programmed cell death 2 ... (gen)
Prdm9 ... PR domain containing 9 ... (gen)
 PFGE ... *Pulse Field Gel Electroforesis ... pulsní elektroforéza*
Psmb1 ... Proteasome subunit C5 ... (gen)
 RACE... *rapid amplification of cDNA ends*
 RFLP ... *Restriction Fragments Length Polymorfism*
 RNAi ... RNA interference
 RT- PCR ... *reverse transcription – PCR*
 SAGE- *Serial Analysis of gene expression*
 SSLP ... *Simple Sequence Length Polymorfism*
Tbp ... TATA binding protein ... (gen)
Ubce7-rs ... Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3-related sequence...(pseudogen)
Ube2q1-rs ... Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q 1-related sequence...(pseudogen)
 UTR ... *untranslated region ... nepřekládaná oblast*
 YAC ... *Yeast Artificial Chromosome... umělý kvasinkový chromozóm*
Zfp91-rs1... Zinc finger protein 91- related sequence 1...(pseudogen)
 ZF ... *zinc finger ... (proteinová doména)*

6. Reference

- Abarrategui, I. and Krangel, M.S.** Noncoding Transcription Controls Downstream Promoters to Regulate T-Cell Receptor Alpha Recombination. *EMBO J* **26** (2007), pp. 4380-90.
- Baarends, W.M., Van Der Laan, R. and Grootegoed, J.A.** DNA Repair Mechanisms and Gametogenesis. *Reproduction* **121** (2001), pp. 31-9.
- Bannister, L.A., Pezza, R.J., Donaldson, J.R., De Rooij, D.G., Schimenti, K.J., Camerini-Otero, R.D. and Schimenti, J.C.** A Dominant, Recombination-Defective Allele of Dmc1 Causing Male-Specific Sterility. *PLoS Biol* **5** (2007), p. e105.
- Barbash, D.A., Siino, D.F., Tarone, A.M. and Roote, J.** A Rapidly Evolving Myb-Related Protein Causes Species Isolation in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003), pp. 5302-7.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K.** High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129** (2007), pp. 823-37.
- Batada, N.N. and Hurst, L.D.** Evolution of Chromosome Organization Driven by Selection for Reduced Gene Expression Noise. *Nat Genet* **39** (2007), pp. 945-9.
- Batada, N.N., Urrutia, A.O. and Hurst, L.D.** Chromatin Remodelling Is a Major Source of Coexpression of Linked Genes in Yeast. *Trends Genet* **23** (2007), pp. 480-4.
- Beck, J.A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J.T., Festing, M.F. and Fisher, E.M.** Genealogies of Mouse Inbred Strains. *Nat Genet* **24** (2000), pp. 23-5.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L. and Lander, E.S.** Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell* **120** (2005), pp. 169-81.
- Bettenhausen, B., Hrabe De Angelis, M., Simon, D., Guenet, J.L. and Gossler, A.** Transient and Restricted Expression During Mouse Embryogenesis of Dll1, a Murine Gene Closely Related to Drosophila Delta. *Development* **121** (1995), pp. 2407-18.
- Bishop, C.E., Boursot, P., Baron, B., Bonhomme, F. and Hatat, D.** Most Classical Mus Musculus Domesticus Laboratory Mouse Strains Carry a Mus Musculus Musculus Y Chromosome. *Nature* **315** (1985), pp. 70-2.
- Bogue, M.A., Grubb, S.C., Maddatu, T.P. and Bult, C.J.** Mouse Phenome Database (Mpd). *Nucleic Acids Res* **35** (2007), pp. D643-9.
- Bonhomme, F., Guenet, J.L., Dod, B., Moriwaki, K. and Bulfield, G.** The Polyphyletic Origin of Laboratory Inbred Mice and Their Rate of Evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* **30** (1987), pp. 51-58.
- Boursot, P., Auffray, J.C., Brittondavidian, J. and Bonhomme, F.** The Evolution of House Mice. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24** (1993), pp. 119-152.
- Boursot, P., Din, W., Anand, R., Darviche, D., Dod, B., Vondeimling, F., Talwar, G.P. and Bonhomme, F.** Origin and Radiation of the House Mouse: Mitochondrial DNA Phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology* **9** (1996), pp. 391-415.
- Bozikova, E., Munclinger, P., Teeter, K.C., Tucker, P.K., Macholan, M. and Pialek, J.** Mitochondrial DNA in the Hybrid Zone between Mus Musculus Musculus and Mus Musculus

Domesticus: A Comparison of Two Transects. *Biological Journal of the Linnean Society* **84** (2005), pp. 363-378.

Brideau, N.J., Flores, H.A., Wang, J., Maheshwari, S., Wang, X. and Barbash, D.A. Two Dobzhansky-Muller Genes Interact to Cause Hybrid Lethality in *Drosophila*. *Science* **314** (2006), pp. 1292-5.

Buckler, A.J., Chang, D.D., Graw, S.L., Brook, J.D., Haber, D.A., Sharp, P.A. and Housman, D.E. Exon Amplification: A Strategy to Isolate Mammalian Genes Based on Rna Splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991), pp. 4005-9.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V.B., Brenner, S.E., Batalov, S., Forrest, A.R., Zavolan, M., Davis, M.J., Wilming, L.G., Aidinis, V., Allen, J.E., Ambesi-Impombato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R.N., Bailey, T.L., Bansal, M., Baxter, L., Beisel, K.W., Bersano, T., Bono, H., et al. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* **309** (2005), pp. 1559-63.

Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engstrom, P.G., Frith, M.C., Forrest, A.R., Alkema, W.B., Tan, S.L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., et al. Genome-Wide Analysis of Mammalian Promoter Architecture and Evolution. *Nat Genet* **38** (2006), pp. 626-35.

Carninci, P., Yasuda, J. and Hayashizaki, Y. Multifaceted Mammalian Transcriptome. *Curr Opin Cell Biol* **20** (2008), pp. 274-280.

Chen, Q., Qian, K. and Yan, C. Cloning of Cdnas with Pdc2(C) Domain and Their Expressions During Apoptosis of Hek293t Cells. *Mol Cell Biochem* **280** (2005), pp. 185-91.

Consortium, F., Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., Yamanaka, I., Kiyosawa, H., Yagi, K., Tomaru, Y., Hasegawa, Y., Nogami, A., Schonbach, C., Gojobori, T., Baldarelli, R., Hill, D.P., Bult, C., Hume, D.A., Quackenbush, J., Schriml, L.M., Kanapin, A., Matsuda, H., Batalov, S., Beisel, K.W., Blake, J.A., et al. Analysis of the Mouse Transcriptome Based on Functional Annotation of 60,770 Full-Length Cdnas. *Nature* **420** (2002a), pp. 563-73.

Consortium, I.H., Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S.M., Pasternak, S., Wheeler, D.A., Willis, T.D., Yu, F., Yang, H., Zeng, C., Gao, Y., Hu, H., Hu, W., Li, C., Lin, W., Liu, S., Pan, H., Tang, X., Wang, J., Wang, W., Yu, J., Zhang, B., Zhang, Q., et al. A Second Generation Human Haplotype Map of over 3.1 Million Snps. *Nature* **449** (2007), pp. 851-61.

Consortium, M.G.S., Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., et al. Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome. *Nature* **420** (2002b), pp. 520-62.

Consortium, T.W.T.C.C. Genome-Wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3,000 Shared Controls. *Nature* **447** (2007), pp. 661-78.

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. and Et Al. A Genetic Linkage Map of the Mouse: Current Applications and Future Prospects. *Science* **262** (1993), pp. 57-66.

- Coyne, J.A. and Charlesworth, B.** Location of an X-Linked Factor Causing Sterility in Male Hybrids of *Drosophila Simulans* and *D. Mauritiana*. *Heredity* **57** (Pt 2) (1986), pp. 243-6.
- Cuppen, E.** Haplotype-Based Genetics in Mice and Rats. *Trends Genet* **21** (2005), pp. 318-22.
- Dahary, D., Elroy-Stein, O. and Sorek, R.** Naturally Occurring Antisense: Transcriptional Leakage or Real Overlap? *Genome Res* **15** (2005), pp. 364-8.
- De Laat, W. and Grosveld, F.** Spatial Organization of Gene Expression: The Active Chromatin Hub. *Chromosome Res* **11** (2003), pp. 447-59.
- Dietrich, W.F., Miller, J.C., Steen, R.G., Merchant, M., Damron, D., Nahf, R., Gross, A., Joyce, D.C., Wessel, M., Dredge, R.D. and Et Al.** A Genetic Map of the Mouse with 4,006 Simple Sequence Length Polymorphisms. *Nat Genet* **7** (1994), pp. 220-45.
- Dillon, N.** Gene Regulation and Large-Scale Chromatin Organization in the Nucleus. *Chromosome Res* **14** (2006), pp. 117-26.
- Dipetrillo, K., Wang, X., Stylianou, I.M. and Paigen, B.** Bioinformatics Toolbox for Narrowing Rodent Quantitative Trait Loci. *Trends Genet* **21** (2005), pp. 683-92.
- Divina, P. and Forejt, J.** The Mouse Sage Site: Database of Public Mouse Sage Libraries. *Nucleic Acids Res* **32** (2004), pp. D482-3.
- Elliott, R.W., Miller, D.R., Pearsall, R.S., Hohman, C., Zhang, Y., Poslinski, D., Tabaczynski, D.A. and Chapman, V.M.** Genetic Analysis of Testis Weight and Fertility in an Interspecies Hybrid Congenic Strain for Chromosome X. *Mamm Genome* **12** (2001), pp. 45-51.
- Engstrom, P.G., Suzuki, H., Ninomiya, N., Akalin, A., Sessa, L., Lavorgna, G., Brozzi, A., Luzi, L., Tan, S.L., Yang, L., Kunarso, G., Ng, E.L., Batalov, S., Wahlestedt, C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Bajic, V.B., Orlando, V., Reid, J.F., Lenhard, B. and Lipovich, L.** Complex Loci in Human and Mouse Genomes. *PLoS Genet* **2** (2006), p. e47.
- Forejt, J.** Hybrid Sterility Gene Located in the T/T- H-2 Supergene on Chromosome 17. In: Reisfeld, S., Ferone, R. A. (Reisfeld, S., Ferone, R. A.)Reisfeld, S., Ferone, R. A.s), *Current Trends in Histocompatibility*. Plenum Press, New York (1981), pp. 103-131.
- Forejt, J.** Chromosomal and Genic Sterility of Hybrid Type in Mice and Men. *Exp Clin Immunogenet* **2** (1985), pp. 106-19.
- Forejt, J.** Hybrid Sterility in the Mouse. *Trends Genet* **12** (1996), pp. 412-7.
- Forejt, J. and Ivanyi, P.** Genetic Studies on Male Sterility of Hybrids between Laboratory and Wild Mice (*Mus Musculus* L.). *Genet Res* **24** (1974), pp. 189-206.
- Forejt, J., Vincek, V., Klein, J., Lehrach, H. and Loudova-Mickova, M.** Genetic Mapping of the T-Complex Region on Mouse Chromosome 17 Including the Hybrid Sterility-1 Gene. *Mamm Genome* **1** (1991), pp. 84-91.
- Fossella, J., Samant, S.A., Silver, L.M., King, S.M., Vaughan, K.T., Olds-Clarke, P., Johnson, K.A., Mikami, A., Vallee, R.B. and Pilder, S.H.** An Axonemal Dynein at the Hybrid Sterility 6 Locus: Implications for T Haplotype-Specific Male Sterility and the Evolution of Species Barriers. *Mamm Genome* **11** (2000), pp. 8-15.
- Frazer, K.A., Eskin, E., Kang, H.M., Bogue, M.A., Hinds, D.A., Beilharz, E.J., Gupta, R.V., Montgomery, J., Morenzoni, M.M., Nilsen, G.B., Pethiyagoda, C.L., Stuve, L.L., Johnson, F.M., Daly, M.J., Wade, C.M. and Cox, D.R.** A Sequence-Based Variation Map of 8.27 Million Snps in Inbred Mouse Strains. *Nature* **448** (2007), pp. 1050-3.
- Gingeras, T.R.** Origin of Phenotypes: Genes and Transcripts. *Genome Res* **17** (2007), pp. 682-90.

- Gregorova, S., Mnukova-Fajdelova, M., Trachtulec, Z., Capkova, J., Loudova, M., Hoglund, M., Hamvas, R., Lehrach, H., Vincek, V., Klein, J. and Forejt, J.** Sub-Millimorgan Map of the Proximal Part of Mouse Chromosome 17 Including the Hybrid Sterility 1 Gene. *Mamm Genome* **7** (1996), pp. 107-13.
- Grupe, A., Germer, S., Usuka, J., Aud, D., Belknap, J.K., Klein, R.F., Ahluwalia, M.K., Higuchi, R. and Peltz, G.** In Silico Mapping of Complex Disease-Related Traits in Mice. *Science* **292** (2001), pp. 1915-8.
- Guenet, J.L. and Bonhomme, F.** Wild Mice: An Ever-Increasing Contribution to a Popular Mammalian Model. *Trends Genet* **19** (2003), pp. 24-31.
- Guenet, J.L., Nagamine, C., Simon-Chazottes, D., Montagutelli, X. and Bonhomme, F.** Hst-3: An X-Linked Hybrid Sterility Gene. *Genet Res* **56** (1990), pp. 163-5.
- Haldane, J.B.S.** Sex Ratio and Unisexual Sterility in Animal Hybrids. *Journal of Genetics* **12** (1922), pp. 101-109.
- Hale, D.W., Washburn, L.L. and Eicher, E.M.** Meiotic Abnormalities in Hybrid Mice of the C57bl/6j X Mus Spretus Cross Suggest a Cytogenetic Basis for Haldane's Rule of Hybrid Sterility. *Cytogenet Cell Genet* **63** (1993), pp. 221-34.
- Hayashi, K. and Matsui, Y.** Meisetz, a Novel Histone Tri-Methyltransferase, Regulates Meiosis-Specific Epigenesis. *Cell Cycle* **5** (2006), pp. 615-20.
- Hayashi, K., Yoshida, K. and Matsui, Y.** A Histone H3 Methyltransferase Controls Epigenetic Events Required for Meiotic Prophase. *Nature* **438** (2005), pp. 374-8.
- Hernandez, N.** Tbp, a Universal Eukaryotic Transcription Factor? *Genes Dev* **7** (1993), pp. 1291-308.
- Hrabe De Angelis, M., Mcintyre, J., 2nd and Gossler, A.** Maintenance of Somite Borders in Mice Requires the Delta Homologue Dii1. *Nature* **386** (1997), pp. 717-21.
- Hurst, L.D., Pal, C. and Lercher, M.J.** The Evolutionary Dynamics of Eukaryotic Gene Order. *Nat Rev Genet* **5** (2004), pp. 299-310.
- Ideraabdullah, F.Y., De La Casa-Esperon, E., Bell, T.A., Detwiler, D.A., Magnuson, T., Sapienza, C. and De Villena, F.P.** Genetic and Haplotype Diversity among Wild-Derived Mouse Inbred Strains. *Genome Res* **14** (2004), pp. 1880-7.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Dutttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermuller, J., Hofacker, I.L., Bell, I., Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H. and Gingeras, T.R.** Rna Maps Reveal New Rna Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* **316** (2007a), pp. 1484-8.
- Kapranov, P., Willingham, A.T. and Gingeras, T.R.** Genome-Wide Transcription and the Implications for Genomic Organization. *Nat Rev Genet* **8** (2007b), pp. 413-23.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., Suzuki, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Frith, M., Ravasi, T., Pang, K.C., Hallinan, J., Mattick, J., Hume, D.A., Lipovich, L., Batalov, S., Engstrom, P.G., Mizuno, Y., Faghihi, M.A., Sandelin, A., Chalk, A.M., Mottagui-Tabar, S., Liang, Z., Lenhard, B., et al.** Antisense Transcription in the Mammalian Transcriptome. *Science* **309** (2005), pp. 1564-6.

- Kawaji, H., Kasukawa, T., Fukuda, S., Katayama, S., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P. and Hayashizaki, Y.** Cage Basic/Analysis Databases: The Cage Resource for Comprehensive Promoter Analysis. *Nucleic Acids Res* **34** (2006), pp. D632-6.
- Kiyosawa, H., Mise, N., Iwase, S., Hayashizaki, Y. and Abe, K.** Disclosing Hidden Transcripts: Mouse Natural Sense-Antisense Transcripts Tend to Be Poly(a) Negative and Nuclear Localized. *Genome Res* **15** (2005), pp. 463-74.
- Kosak, S.T. and Groudine, M.** Gene Order and Dynamic Domains. *Science* **306** (2004), pp. 644-7.
- Laurie, C.C., Nickerson, D.A., Anderson, A.D., Weir, B.S., Livingston, R.J., Dean, M.D., Smith, K.L., Schadt, E.E. and Nachman, M.W.** Linkage Disequilibrium in Wild Mice. *PLoS Genet* **3** (2007), p. e144.
- Lavorgna, G., Dahary, D., Lehner, B., Sorek, R., Sanderson, C.M. and Casari, G.** In Search of Antisense. *Trends Biochem Sci* **29** (2004), pp. 88-94.
- Lercher, M.J., Urrutia, A.O. and Hurst, L.D.** Clustering of Housekeeping Genes Provides a Unified Model of Gene Order in the Human Genome. *Nat Genet* **31** (2002), pp. 180-3.
- Li, D., Kang, Q. and Wang, D.M.** Constitutive Coactivator of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Ppargamma), a Novel Coactivator of Ppargamma That Promotes Adipogenesis. *Mol Endocrinol* **21** (2007), pp. 2320-33.
- Lindsell, C.E., Boulter, J., Disibio, G., Gossler, A. and Weinmaster, G.** Expression Patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 Genes Identify Ligand-Receptor Pairs That May Function in Neural Development. *Mol Cell Neurosci* **8** (1996), pp. 14-27.
- Liu, P., Vikis, H., Lu, Y., Wang, D. and You, M.** Large-Scale in Silico Mapping of Complex Quantitative Traits in Inbred Mice. *PLoS ONE* **2** (2007), p. e651.
- Lovett, M.** Fishing for Complements: Finding Genes by Direct Selection. *Trends Genet* **10** (1994), pp. 352-7.
- Macholan, M., Munclinger, P., Sugerkova, M., Dufkova, P., Bimova, B., Bozikova, E., Zima, J. and Pialek, J.** Genetic Analysis of Autosomal and X-Linked Markers across a Mouse Hybrid Zone. *Evolution Int J Org Evolution* **61** (2007), pp. 746-71.
- Matsuda, Y., Hirobe, T. and Chapman, V.M.** Genetic Basis of X-Y Chromosome Dissociation and Male Sterility in Interspecific Hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991), pp. 4850-4.
- Matsuda, Y., Moens, P.B. and Chapman, V.M.** Deficiency of X and Y Chromosomal Pairing at Meiotic Prophase in Spermatocytes of Sterile Interspecific Hybrids between Laboratory Mice (*Mus Domesticus*) and *Mus Spretus*. *Chromosoma* **101** (1992), pp. 483-92.
- Matsui, Y. and Hayashi, K.** Epigenetic Regulation for the Induction of Meiosis. *Cell Mol Life Sci* **64** (2007), pp. 257-62.
- Mccarthy, E.E., Celebi, J.T., Baer, R. and Ludwig, T.** Loss of Bard1, the Heterodimeric Partner of the Brca1 Tumor Suppressor, Results in Early Embryonic Lethality and Chromosomal Instability. *Mol Cell Biol* **23** (2003), pp. 5056-63.
- Mihola, O., Forejt, J. and Trachtulec, Z.** Conserved Alternative and Antisense Transcripts at the Programmed Cell Death 2 Locus. *BMC Genomics* **8** (2007), p. 20.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J.C. and Forejt, J.** Hybrid Sterility 1 Locus Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase Gene. *Nature* (2008), p. zasláno do tisku.

- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S. and Bernstein, B.E.** Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells. *Nature* (2007).
- Mochida, K., Tres, L.L. and Kierszenbaum, A.L.** Structural Features of the 26s Proteasome Complex Isolated from Rat Testis and Sperm Tail. *Mol Reprod Dev* **57** (2000), pp. 176-84.
- Moritani, M., Togawa, K., Yaguchi, H., Fujita, Y., Yamaguchi, Y., Inoue, H., Kamatani, N. and Itakura, M.** Identification of Diabetes Susceptibility Loci in Db Mice by Combined Quantitative Trait Loci Analysis and Haplotype Mapping. *Genomics* **88** (2006), pp. 719-30.
- Munroe, S.H. and Lazar, M.A.** Inhibition of C-Erba Mrna Splicing by a Naturally Occurring Antisense Rna. *J Biol Chem* **266** (1991), pp. 22083-6.
- Nagamine, C.M., Nishioka, Y., Moriwaki, K., Boursot, P., Bonhomme, F. and Lau, Y.F.** The Musculus-Type Y Chromosome of the Laboratory Mouse Is of Asian Origin. *Mamm Genome* **3** (1992), pp. 84-91.
- Ng, P., Wei, C.L., Sung, W.K., Chiu, K.P., Lipovich, L., Ang, C.C., Gupta, S., Shahab, A., Ridwan, A., Wong, C.H., Liu, E.T. and Ruan, Y.** Gene Identification Signature (Gis) Analysis for Transcriptome Characterization and Genome Annotation. *Nat Methods* **2** (2005), pp. 105-11.
- Nikaido, I., Saito, C., Mizuno, Y., Meguro, M., Bono, H., Kadomura, M., Kono, T., Morris, G.A., Lyons, P.A., Oshimura, M., Hayashizaki, Y. and Okazaki, Y.** Discovery of Imprinted Transcripts in the Mouse Transcriptome Using Large-Scale Expression Profiling. *Genome Res* **13** (2003), pp. 1402-9.
- Numata, K., Okada, Y., Saito, R., Kiyosawa, H., Kanai, A. and Tomita, M.** Comparative Analysis of Cis-Encoded Antisense Rnas in Eukaryotes. *Gene* **392** (2007), pp. 134-41.
- Oka, A., Mita, A., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Takagi, N., Takano-Shimizu, T., Toshimori, K., Moriwaki, K. and Shiroishi, T.** Hybrid Breakdown Caused by Substitution of the X Chromosome between Two Mouse Subspecies. *Genetics* **166** (2004), pp. 913-24.
- Okada, Y., Tashiro, C., Numata, K., Watanabe, K., Nakaoka, H., Yamamoto, N., Okubo, K., Ikeda, R., Saito, R., Kanai, A., Abe, K., Tomita, M. and Kiyosawa, H.** Comparative Expression Analysis Uncovers Novel Features of Endogenous Antisense Transcription. *Hum Mol Genet* **17** (2008), pp. 1631-40.
- Orr, H.A. and Irving, S.** Complex Epistasis and the Genetic Basis of Hybrid Sterility in the *Drosophila Pseudoobscura* Bogota-USA Hybridization. *Genetics* **158** (2001), pp. 1089-100.
- Orr, H.A., Masly, J.P. and Presgraves, D.C.** Speciation Genes. *Curr Opin Genet Dev* **14** (2004), pp. 675-9.
- Owens, G.P., Hahn, W.E. and Cohen, J.J.** Identification of Mrnas Associated with Programmed Cell Death in Immature Thymocytes. *Mol Cell Biol* **11** (1991), pp. 4177-88.
- Pal, C. and Hurst, L.D.** Evidence for Co-Evolution of Gene Order and Recombination Rate. *Nat Genet* **33** (2003), pp. 392-5.
- Palopoli, M.F. and Wu, C.I.** Genetics of Hybrid Male Sterility between *Drosophila* Sibling Species: A Complex Web of Epistasis Is Revealed in Interspecific Studies. *Genetics* **138** (1994), pp. 329-41.
- Pang, K.C., Frith, M.C. and Mattick, J.S.** Rapid Evolution of Noncoding Rnas: Lack of Conservation Does Not Mean Lack of Function. *Trends Genet* **22** (2006), pp. 1-5.

- Park, Y.G., Clifford, R., Buetow, K.H. and Hunter, K.W.** Multiple Cross and Inbred Strain Haplotype Mapping of Complex-Trait Candidate Genes. *Genome Res* **13** (2003), pp. 118-21.
- Payseur, B.A., Krenz, J.G. and Nachman, M.W.** Differential Patterns of Introgression across the X Chromosome in a Hybrid Zone between Two Species of House Mice. *Evolution Int J Org Evolution* **58** (2004), pp. 2064-78.
- Perez, D.E. and Wu, C.I.** Further Characterization of the Odysseus Locus of Hybrid Sterility in *Drosophila*: One Gene Is Not Enough. *Genetics* **140** (1995), pp. 201-6.
- Perez, D.E., Wu, C.I., Johnson, N.A. and Wu, M.L.** 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** (1993), pp. 261-75.
- Peters, J.M.** Proteasomes: Protein Degradation Machines of the Cell. *Trends Biochem Sci* **19** (1994), pp. 377-82.
- Peters, L.L., Robledo, R.F., Bult, C.J., Churchill, G.A., Paigen, B.J. and Svenson, K.L.** The Mouse as a Model for Human Biology: A Resource Guide for Complex Trait Analysis. *Nat Rev Genet* **8** (2007), pp. 58-69.
- Pialek, J., Vyskocilova, M., Bimova, B., Havelkova, D., Pialkova, J., Dufkova, P., Bencova, V., Dureje, L., Albrecht, T., Haufler, H.C., Macholan, M., Munclinger, P., Storchova, R., Zajicova, A., Holan, V., Gregorova, S. and Forejt, J.** Development of Unique House Mouse Resources Suitable for Evolutionary Studies of Speciation. *J Hered* **99** (2008), pp. 34-44.
- Pilder, S.H.** Identification and Linkage Mapping of Hst7, a New M. Spretus/M. M. Domesticus Chromosome 17 Hybrid Sterility Locus. *Mamm Genome* **8** (1997), pp. 290-1.
- Pilder, S.H., Hammer, M.F. and Silver, L.M.** A Novel Mouse Chromosome 17 Hybrid Sterility Locus: Implications for the Origin of T Haplotypes. *Genetics* **129** (1991), pp. 237-46.
- Pilder, S.H., Olds-Clarke, P., Phillips, D.M. and Silver, L.M.** Hybrid Sterility-6: A Mouse T Complex Locus Controlling Sperm Flagellar Assembly and Movement. *Dev Biol* **159** (1993), pp. 631-42.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A. and Schimenti, J.C.** Meiotic Prophase Arrest with Failure of Chromosome Synapsis in Mice Deficient for Dmc1, a Germline-Specific RecA Homolog. *Mol Cell* **1** (1998), pp. 697-705.
- Pletcher, M.T., McClurg, P., Batalov, S., Su, A.I., Barnes, S.W., Lagler, E., Korstanje, R., Wang, X., Nusskern, D., Bogue, M.A., Mural, R.J., Paigen, B. and Wiltshire, T.** Use of a Dense Single Nucleotide Polymorphism Map for in Silico Mapping in the Mouse. *PLoS Biol* **2** (2004), p. e393.
- Presgraves, D.C.** Speciation Genetics: Epistasis, Conflict and the Origin of Species. *Curr Biol* **17** (2007), pp. R125-7.
- Purmann, A., Toedling, J., Schueler, M., Carninci, P., Lehrach, H., Hayashizaki, Y., Huber, W. and Sperling, S.** Genomic Organization of Transcriptomes in Mammals: Coregulation and Cofunctionality. *Genomics* **89** (2007), pp. 580-7.
- Raufaste, N., Orth, A., Belkhir, K., Senet, D., Smadja, C., Baird, S.J.E., Bonhomme, F., Dod, B. and Boursot, P.** Inferences of Selection and Migration in the Danish House Mouse Hybrid Zone. *Biological Journal of the Linnean Society* **84** (2005), pp. 593-616.
- Samant, S.A., Fossella, J., Silver, L.M. and Pilder, S.H.** Mapping and Cloning Recombinant Breakpoints Demarcating the Hybrid Sterility 6-Specific Sperm Tail Assembly Defect. *Mamm Genome* **10** (1999), pp. 88-94.

- Samant, S.A., Ogunkua, O., Hui, L., Fossella, J. and Pilder, S.H.** The T Complex Distorter 2 Candidate Gene, *Dnahc8*, Encodes at Least Two Testis-Specific Axonemal Dynein Heavy Chains That Differ Extensively at Their Amino and Carboxyl Termini. *Dev Biol* **250** (2002), pp. 24-43.
- Samant, S.A., Ogunkua, O.O., Hui, L., Lu, J., Han, Y., Orth, J.M. and Pilder, S.H.** The Mouse T Complex Distorter/Sterility Candidate, *Dnahc8*, Expresses a Gamma-Type Axonemal Dynein Heavy Chain Isoform Confined to the Principal Piece of the Sperm Tail. *Dev Biol* **285** (2005), pp. 57-69.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T.** Active Genes Are Tri-Methylated at K4 of Histone H3. *Nature* **419** (2002), pp. 407-11.
- Saotome, Y., Winter, C.G. and Hirsh, D.** A Widely Expressed Novel C2h2 Zinc-Finger Protein with Multiple Consensus Phosphorylation Sites Is Conserved in Mouse and Man. *Gene* **152** (1995), pp. 233-8.
- Sawamura, K., Roote, J., Wu, C.I. and Yamamoto, M.T.** Genetic Complexity Underlying Hybrid Male Sterility in *Drosophila*. *Genetics* **166** (2004), pp. 789-96.
- Scarr, R.B. and Sharp, P.A.** *Pdcd2* Is a Negative Regulator of Hcf-1 (C1). *Oncogene* **21** (2002), pp. 5245-54.
- Schmidt, E.E. and Schibler, U.** High Accumulation of Components of the Rna Polymerase Ii Transcription Machinery in Rodent Spermatids. *Development* **121** (1995), pp. 2373-83.
- Schmidt, E.E. and Schibler, U.** Developmental Testis-Specific Regulation of Mrna Levels and Mrna Translational Efficiencies for Tata-Binding Protein Mrna Isoforms. *Dev Biol* **184** (1997), pp. 138-49.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C. and Kouzarides, T.** Histone H3 Lysine 4 Methylation Patterns in Higher Eukaryotic Genes. *Nat Cell Biol* **6** (2004), pp. 73-7.
- Sheehan, S., Tsaih, S.W., King, B.L., Stanton, C., Churchill, G.A., Paigen, B. and Dipetrillo, K.** Genetic Analysis of Albuminuria in a Cross between *C57bl/6j* and *Dbal/2j* Mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **293** (2007), pp. F1649-56.
- Shiraki, T., Kondo, S., Katayama, S., Waki, K., Kasukawa, T., Kawaji, H., Kodzius, R., Watahiki, A., Nakamura, M., Arakawa, T., Fukuda, S., Sasaki, D., Podhajaska, A., Harbers, M., Kawai, J., Carninci, P. and Hayashizaki, Y.** Cap Analysis Gene Expression for High-Throughput Analysis of Transcriptional Starting Point and Identification of Promoter Usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003), pp. 15776-81.
- Silver, L.M.**, Mouse Genetics. Oxford University Press (1995).
- Singer, G.A., Lloyd, A.T., Huminiecki, L.B. and Wolfe, K.H.** Clusters of Co-Expressed Genes in Mammalian Genomes Are Conserved by Natural Selection. *Mol Biol Evol* **22** (2005), pp. 767-75.
- Storchova, R., Gregorova, S., Buckiova, D., Kyselova, V., Divina, P. and Forejt, J.** Genetic Analysis of X-Linked Hybrid Sterility in the House Mouse. *Mamm Genome* **15** (2004), pp. 515-24.
- Sun, M., Hurst, L.D., Carmichael, G.G. and Chen, J.** Evidence for Variation in Abundance of Antisense Transcripts between Multicellular Animals but No Relationship between Antisense Transcription and Organismic Complexity. *Genome Res* **16** (2006), pp. 922-33.
- Sun, S., Ting, C.T. and Wu, C.I.** The Normal Function of a Speciation Gene, *Odysseus*, and Its Hybrid Sterility Effect. *Science* **305** (2004), pp. 81-3.

- Svetlanov, A. and Cohen, P.E.** Mismatch Repair Proteins, Meiosis, and Mice: Understanding the Complexities of Mammalian Meiosis. *Exp Cell Res* **296** (2004), pp. 71-9.
- Tengowski, M.W., Feng, D., Sutovsky, M. and Sutovsky, P.** Differential Expression of Genes Encoding Constitutive and Inducible 20s Proteasomal Core Subunits in the Testis and Epididymis of Theophylline- or 1,3-Dinitrobenzene-Exposed Rats. *Biol Reprod* **76** (2007), pp. 149-63.
- Ting, C.T., Tsaor, S.C., Wu, M.L. and Wu, C.I.** A Rapidly Evolving Homeobox at the Site of a Hybrid Sterility Gene. *Science* **282** (1998), pp. 1501-4.
- Tipler, C.P., Hutcheon, S.P., Hendil, K., Tanaka, K., Fishel, S. and Mayer, R.J.** Purification and Characterization of 26s Proteasomes from Human and Mouse Spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **3** (1997), pp. 1053-60.
- Trachtulec, Z. and Forejt, J.** Synteny of Orthologous Genes Conserved in Mammals, Snake, Fly, Nematode, and Fission Yeast. *Mamm Genome* **12** (2001), pp. 227-31.
- Trachtulec, Z., Hamvas, R.M., Forejt, J., Lehrach, H.R., Vincek, V. and Klein, J.** Linkage of Tata-Binding Protein and Proteasome Subunit C5 Genes in Mice and Humans Reveals Synteny Conserved between Mammals and Invertebrates. *Genomics* **44** (1997b), pp. 1-7.
- Trachtulec, Z., Mihola, O., Vlcek, C., Himmelbauer, H., Paces, V. and Forejt, J.** Positional Cloning of the Hybrid Sterility 1 Gene: Fine Genetic Mapping and Evaluation of Two Candidate Genes. *Biological Journal of the Linnean Society* **84** (2005), pp. 637-641.
- Trachtulec, Z., Mnukova-Fajdelova, M., Hamvas, R.M., Gregorova, S., Mayer, W.E., Lehrach, H.R., Vincek, V., Forejt, J. and Klein, J.** Isolation of Candidate Hybrid Sterility 1 Genes by Cdna Selection in a 1.1 Megabase Pair Region on Mouse Chromosome 17. *Mamm Genome* **8** (1997a), pp. 312-6.
- Trachtulec, Z., Vincek, V., Hamvas, R.M., Forejt, J., Lehrach, H. and Klein, J.** Physical Map of Mouse Chromosome 17 in the Region Relevant for Positional Cloning of the Hybrid Sterility 1 Gene. *Genomics* **23** (1994), pp. 132-7.
- Trachtulec, Z., Vlcek, C., Mihola, O. and Forejt, J.** Comparative Analysis of the Pcd2-Tbp-Psmb1 Region in Vertebrates. *Gene* **335** (2004), pp. 151-7.
- Trachtulec, Z., Vlcek, C., Mihola, O., Gregorova, S., Fotopulosova, V. and Forejt, J.** Fine Haplotype Structure of a Chromosome 17 Region in the Laboratory and Wild Mouse. *Genetics* **178** (2008), pp. 1777-84.
- Vaux, D.L. and Hacker, G.** Cloning of Mouse Rp-8 Cdna and Its Expression During Apoptosis of Lymphoid and Myeloid Cells. *DNA Cell Biol* **14** (1995), pp. 189-93.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.** Serial Analysis of Gene Expression. *Science* **270** (1995), pp. 484-7.
- Vyskocilova, M., Trachtulec, Z., Forejt, J. and Pialek, J.** Does Geography Matter in Hybrid Sterility in House Mice? *Biological Journal of the Linnean Society* **84** (2005), pp. 663-674.
- Wade, C.M. and Daly, M.J.** Genetic Variation in Laboratory Mice. *Nat Genet* **37** (2005), pp. 1175-80.
- Wade, C.M., Kulbokas, E.J., 3rd, Kirby, A.W., Zody, M.C., Mullikin, J.C., Lander, E.S., Lindblad-Toh, K. and Daly, M.J.** The Mosaic Structure of Variation in the Laboratory Mouse Genome. *Nature* **420** (2002), pp. 574-8.
- Werner, A.** Natural Antisense Transcripts. *RNABiology* **2** (2005), pp. 053-062.

Werner, A. and Berdal, A. Natural Antisense Transcripts: Sound or Silence? *Physiol Genomics* **23** (2005), pp. 125-31.

Williams, E.J. and Hurst, L.D. Clustering of Tissue-Specific Genes Underlies Much of the Similarity in Rates of Protein Evolution of Linked Genes. *J Mol Evol* **54** (2002), pp. 511-8.

Yamauchi, J., Sugita, A., Fujiwara, M., Suzuki, K., Matsumoto, H., Yamazaki, T., Ninomiya, Y., Ono, T., Hasegawa, T., Masushige, S., Muramatsu, M., Tamura, T. and Kato, S. Two Forms of Avian(Chicken) Tata-Binding Protein Mrna Generated by Alternative Polyadenylation. *Biochem Biophys Res Commun* **234** (1997), pp. 406-11.

Yang, H., Bell, T.A., Churchill, G.A. and Pardo-Manuel De Villena, F. On the Subspecific Origin of the Laboratory Mouse. *Nat Genet* **39** (2007), pp. 1100-7.

Yasuda, J. and Hayashizaki, Y. The Rna Continent. *Adv Cancer Res* **99** (2008), pp. 77-112.

Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Miyashita, N., Matsushima, Y., Shi, L.M., Cho, W.S., Zhen, X.L. and Tagashira, Y. Hybrid Origin of Japanese Mice "Mus Musculus Molossinus": Evidence from Restriction Analysis of Mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* **5** (1988), pp. 63-78.