

UNIVERZITA KARLOVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava tří myších kongenních kmenů a jejich fenotypizace

PETR FLACHS

školitel: Ing. Zdeněk Trachtulec, Ph.D.

PRAHA 2009

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2007 - 2009 na Ústavu molekulární genetiky, v.v.i., Akademie věd České republiky, v laboratoři prof. MUDr. Jiřího Forejta DrSc., pod odborným dohledem Ing. Zdeňka Trachtulce, Ph.D.

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

Rád bych poděkoval vedoucímu našeho oddělení Jiřímu Forejtovi za možnost podílet se na velmi zajímavém projektu na pracovišti takové úrovně.

Můj velký dík patří mému školiteli Zdeňku Trachtulcovi za cenné rady a zkušenosti, které se mi snažil předat po celou dobu vypracovávání mé diplomové práce a především za nekonečnou trpělivost.

Děkuji také všem spolupracovníkům za jejich pomoc a přátelskou pracovní atmosféru a mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studií.

Establishment and phenotyping of three mouse congenic strains.

Mouse congenic strains are widely used as an important genetic tool for various purposes of research. Congenic strains are special inbred strains in which part of the genome of one mouse is transferred to another by backcrossing the donor mouse to the recipient strain with appropriate selection. The classical ten-generation breeding protocol is commonly utilized and adapted for different experimental needs. Our department is focused on the study of hybrid sterility between two related mouse strains *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*. The first aim of this work was the utilization of congenics to stabilize three transgenic lines, which previously helped to identify first mammalian hybrid sterility gene *Hst1* as *Prdm9* (Mihola *et al*, 2009). Bacterial artificial chromosomes (BACs) present in transgenes encompassed several genes including *Prdm9*. The second goal was to look for some new phenotypes of our congenic strains, which may be causally associated with genes encoded by the BACs, as well as an additional research on the hybrid sterility phenomena. We established three new congenic strains on C57BL/6J (B6) background and found significant differences between transgenics versus their littermate controls in weights of testis, gonadal fat, body, liver, and heart.

Keywords: mouse congenic strains, hybrid sterility, mammalian hybrid sterility gene *Prdm9*, genotyping, BAC transgenes, phenotyping

Klíčová slova: myši kongenní kmeny, hybridní sterilita, savčí gen hybridní sterility *Prdm9*, genotypizace, BAC transgeny, fenotypizace

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Základní pojmy	10
2.1.1	Myš jako modelový organismus	10
2.1.2	Křížení a standardní myší kmeny.....	11
2.1.2.1	Typy křížení	11
2.1.3	Typy myších kmenů.....	12
2.1.3.1	Inbrední kmen	12
2.1.3.2	Kongenní kmen	12
2.1.3.3	Chromozomálně substituční kmen.....	12
2.1.3.4	Rekombinantní inbrední kmen.....	13
2.1.3.5	Rekombinantní kongenní kmen	13
2.1.3.6	Ostatní typy kmenů	14
2.2	Kongenní kmen	14
2.2.1	Příprava myšího kongenního kmene.....	14
2.2.1.1	Matematický výpočet.....	15
2.2.2	Vývoj inbredních kmenů.....	16
2.2.2.1	První kongenní kmen	17
2.2.3	Vylepšení technologie šlechtění pomocí marker-asistované strategie a příprava tzv. ‚rychlých kongenů‘	17
2.2.3.1	Marker-asistované chovné strategie pro myší kongenní kmeny	19
2.2.3.2	Produkce kongenů ‚nadzvukovou‘ rychlostí.....	20
2.2.4	Další aspekty šlechtění a práce s kongenními kmeny.....	21
2.2.4.1	Vliv genetického pozadí recipientního kmene.....	21
2.2.4.2	Vliv okolní zbytkové genetické informace donora	21

2.2.4.3	Určení homozygotů pro další usnadnění šlechtění kongenních kmenů	22
2.2.5	Využití.....	22
2.2.5.1	Kongenní kmeny	22
2.2.5.2	Rekombinantní kongenní kmeny	23
2.2.5.3	Srovnání s postupem přípravy kongennů použitých jako model pro autoimunitní onemocnění SLE.....	23
	Další varianty kongenizace	25
2.3	Hybridní sterilita a konstrukce kongenních kmenů	25
2.3.1	Hybridní sterilita	25
2.3.2	Gen hybridní sterility <i>Hst1</i>	26
2.3.2.1	Mapování <i>Hst1</i>	27
2.3.2.2	Potvrzení <i>Hst1 = Prdm9</i>	28
2.3.3	Stabilizace transgenů konstrukcí kongenních linií.....	29
3	Materiál a metody	30
3.1	Materiál	30
3.1.1	Chemikálie	30
3.1.2	Roztoky a pufrы.....	30
3.1.3	Enzymy	30
3.1.4	Chemikálie pro PCR	31
3.1.4.1	PCR – primery	31
3.1.5	Přístrojové vybavení	31
3.1.6	Programy a databáze	32
3.2	Metody	32
3.2.1	Příprava kongenního kmene.....	32
3.2.1.1	Chov myší	32
3.2.1.2	Genotypizace.....	33

3.2.1.3	Izolace vysokomolekulární DNA SNP analýzu.....	34
3.2.2	Pitva a fenotypizace	34
3.2.3	Použité výpočetní a statistické metody	35
3.2.3.1	Pitva a fenotypizace	35
4	Výsledky	36
4.1	Genotypizace.....	36
4.1.1	Hlavní kongenní linie	36
4.1.1.1	Kontrola pozadí kongenních transgenů.....	37
4.1.1.2	Záložní linie	37
4.1.1.3	Odečítání genotypů	37
4.2	Fenotypizace	38
4.2.1	Tabulky s výsledky	39
4.2.2	Grafické znázornění nejdůležitějších výsledků.....	46
4.2.2.1	Shrnutí výsledků fenotypizace	54
5	Diskuze.....	55
5.1	Kongenizace transgenních linií	55
5.2	Záložní linie	56
5.3	Fenotypizace	57
6	Závěr	60
7	Seznam použitých zkratk.....	61
8	Seznam citované literatury	63

1 ÚVOD

Tato diplomová práce vznikala v rámci širšího projektu hybridní sterility, kterým se dlouhodobě zabývá naše laboratoř myši molekulární genetiky. Hybridní sterilita je stav, který způsobuje neplodnost potomků křížení dvou plně plodných rodičovských forem a může tak hrát důležitou speciální roli jako jedna z postzygotických reprodukčních bariér. U myši postihuje především samčí potomky křížení některých standardních laboratorních kmenů (C57BL/6J) *Mus musculus domesticus* (*Mmm*) původu s kmeny odvozenými od poddruhu *Mus musculus domesticus* (*Mmd*) (PWD/Ph). Pro identifikaci prvního savčí genu hybridní sterility *Prdm9* v naší laboratoři (Mihola *et al*, 2009) byly použity tři transgenní linie s překrývajícími se BACy (bacterial artificial chromosomes), které obsahovaly kandidátní geny včetně *Prdm9*.

Prvním cílem této diplomové práce bylo tedy pokračování v práci s transgenními liniemi, především stabilizace jejich vlastností vytvořením kongenních kmenů na genetickém pozadí standardního inbredního kmene C57BL/6J (B6). Kongenní kmen je speciální inbrední kmen, na jehož definované genetické pozadí je deseti-generačním protokolem zpětných křížení přenesen tzv. diferenciální chromozomální segment.

Během šlechtění kongenů se v rámci orientačního měření váhy objevovaly výraznější rozdíly ve váze těla myši stejných genotypů a podobného stáří. Tento jev by mohl souviset s faktem, že linie BAC 5 obsahuje gen *Pgcc1*, což je konstitutivní kostimulátor genu *Ppar γ* , který hraje důležitou roli v regulaci růstu tukových buněk-adipocytů (Dechun Li *et al*, 2007). Začali jsme tedy s fenotypizací zaměřenou na poměr tuku v těle transgenních a netransgenních zvířat. Fenotypizace byla prováděna komplexními pitvami, kdy byly kromě tukové tkáně odebírány a váženy i další dobře definované tělní orgány a tkáně. Dalším cílem práce bylo tedy vypitvat zvířata již nepotřebná k vytváření kongenů, hlavně ve snaze nalézt signifikantní rozdíly a popsat tak nový fenotyp, který by bylo možno příčinně spojit s některým z genů v BAC transgenech.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Základní pojmy

2.1.1 *Myš jako modelový organismus*

Cílem každého výzkumu je, aby jeho poznatky vedly v důsledku k poznání světa kolem nás, nebo přímo k prospěchu člověka. Myš se pro tuto úlohu hodí dokonale, s člověkem sdílí přibližně 99% svých genů (Waterson *et al*, 2002). Navíc myš trpí stejnými chorobami jako člověk, ať už způsobených jedním genem nebo polygenních (např. diabetes, atheroskleróza, srdeční choroby, anemie, hypertenze, obezita, osteoporóza, poruchy krvácivosti, astma a různé neurologické potíže). Krátká generační doba (zhruba pět týdnů od narození do reprodukčního věku), malé tělesné rozměry a relativně nízké náklady na chov dělají z myši ideální modelový organismus. K tomu přispívají genetické znalosti a informační i zvířecí zdroje získané za sto let výzkumu (Luanne *et al*, 2007). Myš je také jediný obratlovec, u kterého jsou dostupné tzv. „knock-out“ technologie, při ní lze gen buď vyřadit z funkce celý a trvale ("knock-out") nebo dočasně či v určité tkáni ("conditional knock-out") či jen jeho část.

Laboratorní myš se dnes používá v nejrůznějších odvětvích lidského bádání. Snad největší přínos má v experimentech farmakologických, toxikologických, chemoterapeutických a genetických. Poprvé byla myš využita k vědeckým účelům v roce 1664 v Anglii, kdy na ni byly sledovány účinky zvýšeného tlaku vzduchu (Knotek, 1999).

Myš je poměrně plaché laboratorní zvíře, které váží v dospělosti 40 až 50 gramů a měří asi 15 až 20 centimetrů. Dožívá se v průměru dvou let, přičemž do pohlavní zralosti dospěje během dvou až pěti měsíců. Po 20 dnech březosti vrhne samice nejčastěji 6 až 12 mlád'at. Během jednoho roku může vrhnout až dvanáctkrát

2.1.2 Křížení a standardní myší kmeny

2.1.2.1 Typy křížení

Pro zvířata, která mají mezi sebou daný genetický vztah, existuje několik základních typů křížení.

První typ křížení, který bývá i obvykle na začátku experimentu, je tzv. outcross. Nazývá se tak křížení mezi dvěma nepříbuznými kmeny zvířat. Potomci takového křížení se nazývají první filiální generace, nebo také F_1 generace. Z faktu, že členové inbredního kmene jsou v celém svém genotypu homozygoti, vyplývá důležitý poznatek. Jestliže se při outcrossu jedná právě o jedince dvou inbredních kmenů a křížení je prováděno stejným směrem (tzn., samice z jednoho a samec z druhého kmene), pak jejich potomci budou navzájem identičtí a heterozygoti ve všech znacích rozdílných mezi rodičovskými kmeny. F_1 generace z opačných křížení se mohou lišit pohlavními chromosomy a mitochondriální DNA. Ovšem nebudou-li oba jedinci pocházet z inbredního kmene, pak samozřejmě F_1 potomci identičtí být nemohou.

Další typ křížení se nazývá zpětné křížení (backcross). V tomto křížení se F_1 generace zkříží s jedním z kmenů, z něhož pocházeli jejich rodiče. Podle prvního Mendelova zákona o segregaci alel potom můžeme určit, že potomci generace zpětného křížení budou zhruba v 50% znaků, rozdílných mezi rodičovskými kmeny, heterozygoti a v 50% znaků homozygoti.

Pokud se jedná o potomky první filiální generace, jejichž oba rodiče byli členové inbredního kmene, pak bude mezi jejich potomky opět přibližně 50% heterozygotů. Potomci zvířat intercrossu F_1 se nazývají druhá filiální generace (F_2 generace). Pro křížení mezi sourozenci se používá termín příbuzenské křížení (incross).

Incross je termín označující křížení mezi jedinci téhož inbredního kmene, kdy potomci budou homozygoti ve všech znacích jako jejich rodiče. Tento typ křížení se používá právě pro udržení inbredních kmenů, aby byla zachována homozygotita a genetická definovanost zvířat v celém genomu.

2.1.3 Typy myších kmenů

2.1.3.1 Inbrední kmen

Inbrední kmen je svou přesnou genetickou definovaností základní kamenem a nástrojem genetického výzkumu.

Bude-li se pokračovat v křížení potomků F_1 generace, pak se další generace bude nazývat F_2 , následující F_3 a tak dále, dokud budou křížení stále jen potomci stejné generace. Postupně tak narůstá procento homozygosity a celý tento proces se označuje jako inbreeding, neboli soustavné příbuzenské křížení. Jak se podíl homozygosity genomu jednotlivých po sobě následujících generací zvyšuje, přibližuje se chovatel k vytvoření nového inbredního kmene. Dvacátá filiální generace se již někdy považuje za inbrední kmen, ovšem podíl homozygosity genomu F_{20} generace ještě není absolutní.

2.1.3.2 Kongenní kmen

Kongenní kmen je takový kmen, který má díky cílenému křížení téměř stejnou genetickou výbavu s rodičovským inbredním kmenem. Jediný rozdíl je v tzv. diferenciálním chromozomálním segmentu. Tímto segmentem na chromozomu může být například lokus, který obsahuje nějaký fenotypový znak. Kongenní myš se pak bude vyznačovat tímto znakem na fenotypovém pozadí zvoleného inbredního kmene. Tento kmen se nazývá recipientní a kmen, ze kterého pochází přenášený segment, je dárcovský neboli donorový. Pro přípravu kongenního kmene je v klasickém protokolu třeba asi deseti generací zpětných křížení. Podrobný popis přípravy kongenního kmene je probrán níže.

2.1.3.3 Chromozomálně substituční kmen

Chromozomálně substituční neboli konzomický kmen je speciální varianta kongenních kmenů. Zpětným křížením se však v tomto případě přenáší specificky jeden kompletní chromozom na pozadí jiného inbredního kmene. Pro přípravu chromozomálně substitučního kmene je opět potřeba přibližně 10 generací zpětných křížení. V určitých případech může být vhodnější použít místo kongenních kmenů kmene chromozomálně substituční neboli konzomické. Pro některé kmene jsou již připraveny panely konzomických linií pro každý chromozom a jejich výběr tak může

ušetřit spoustu času a výdajů, jinak potřebných pro naplnění deseti-generačního protokolu přípravy kongenního kmene (Gregorová *et al.*, 2008).

2.1.3.4 Rekombinantní inbrední kmen

Při produkci rekombinantních inbredních kmenů se vychází z křížení dvou odlišných inbredních kmenů. V první filiální generaci - F_1 jsou jedinci z definice identičtí, heterozygotní v celém rozsahu genomu. Křížením jedinců F_1 se získá druhá filiální generace, ve které dojde k segregaci alel obou parentálních kmenů, i například včetně vloh pro zkoumané znaky. Náhodně vybraná dvojice samec-samice z F_2 populace se stane základem pro jednotlivé budoucí rekombinantní inbrední kmene. Dále se pokračuje klasickým inbreedingem, tedy opakovaným křížením bratr x sestra po více než 20 generací. Výsledkem jsou inbrední kmene, které ve svém genomu nesou specifickou kombinaci alel rodičovských kmenů, při zachovaném poměru 50% alel jednoho a 50% alel druhého kmene.

2.1.3.5 Rekombinantní kongenní kmen

Příprava rekombinantního kongenního kmene se zahajuje obdobně jako příprava kmene kongenního. První krok představuje opět křížení dvou odlišných inbredních kmenů. Znovu se přistupuje ke zpětnému křížení, tentokrát se ovšem s jedním vybraným rodičovským kmenem provádí jen dvakrát. Dále následuje 14 generací incrossu, tedy křížení mezi bratrem a sestrou. Tímto bude inbreeding kompletní a nový kmen je hotov. Tento nový kmen bude obsahovat úseky dárcovského kmene tvořící přibližně jednu osminu genomu. Zbylých sedm osmin bude patřit recipientnímu kmeni a bude tak představovat genetické pozadí pro přenášené segmenty (Demant a Hart, 1986).

Při mapování nějakého genu či souboru genů se často tvoří celé skupiny rekombinantních inbredních kmenů pro jeden typ úvodního křížení. Každý nový kmen z celé skupiny bude obsahovat jiné fragmenty dárcovské genetické informace a proto je možné tímto způsobem obsáhnout většinu genotypu dárce.

Při úvodních zpětných kříženích je možná i selekce, například genotypizováním, na určitý segment dárcovského podílu.

2.1.3.6 Ostatní typy kmenů

Mezi další významnější typy myších kmenů ještě patří například takzvané outbrední linie, tedy kmeny, u nichž není plemenitba cílena pouze na příbuzenské křížení. Zvířata se páří náhodně, jejich genom je převážně heterozygotní a tudíž nejsou geneticky definovaná. Jsou ovšem výrazně levnější, odolnější a mají větší vrhy, s nižším procentem novorozenecké úmrtnosti.

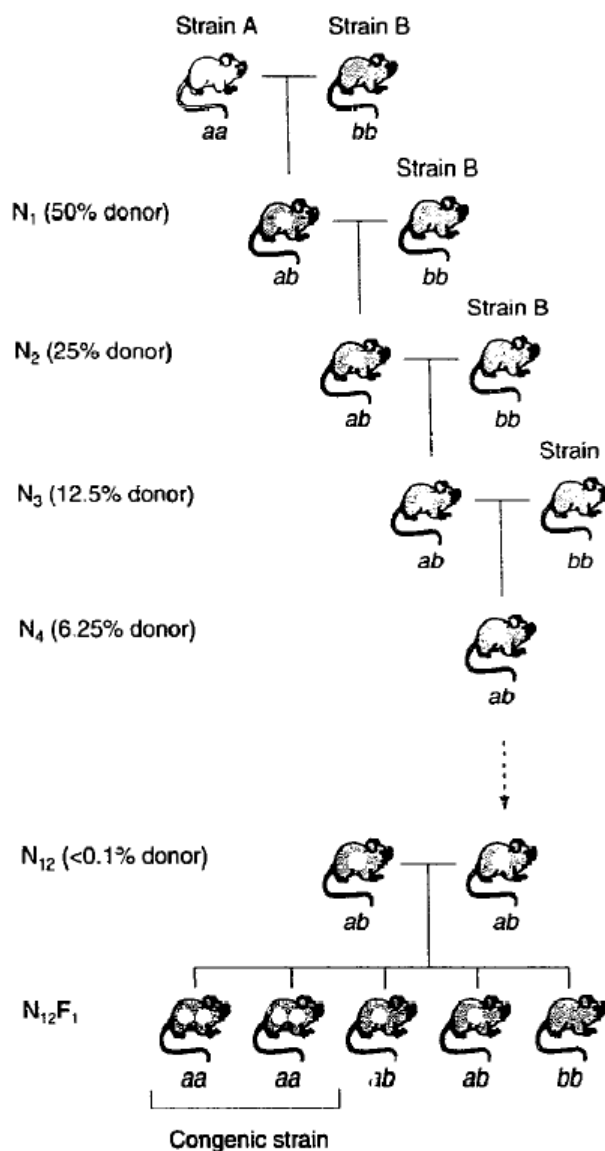
Mutantní a koizogenní kmeny jsou odvozeny od kmenů inbredních cíleným zafixováním nějaké mutace. V případě koizogenních linií nastala mutace spontánně, kdežto mutantní kmeny jsou mutagenizovány záměrně.

Je-li do myšího genomu transgenními technikami zaveden nový gen, jedná se o kmen transgenní. Vnesený gen nemusí nutně pocházet ze stejného druhu. Není-li transgen vnášen do inbredního kmene, z transgenních zvířat se často připravují kongenní kmeny, aby se minimalizoval vliv pozadí genomu na fenotyp transgenu.

2.2 Kongenní kmen

2.2.1 Příprava myšího kongenního kmene

Pro odstartování přípravy kongenního kmene je jako první křížení uskutečňován outcross mezi dvěma inbredními kmeny nebo inbredním kmenem a outbrední linií či divokou myší (obrázek 1). Pro účely vytváření kongenních zvířat bývá obvykle recipientní kmen inbrední. Všechna následující křížení jsou zpětná (backcross) a uskutečňují se s původním recipientním inbredním kmenem. Pro tato křížení se vždy vybírá zvíře, které obdrželo přenášenou alelu, jež je součástí onoho diferenciálního chromozomálního lokusu. Při selekci se z časových i ekonomických důvodů zpravidla upřednostňuje samec, protože může oplodnit hned několik samic recipientního kmene. Po dokončení předepsaných zpětných křížení se mezi sebou zkříží příslušníci poslední generace zpětného křížení. Při tomto křížení jsou vybráni dva homozygotní jedinci a následným incrossem (tj. křížením mezi bratry a sestrami) se vytvoří stálý inbrední kongenní kmen (Silver, 1995).



◀ **Obrázek 1:** Na obrázku je popsána situace, kdy se z kmene A (dárce) přenáší alela *a* na genetické pozadí kmene B (recipient). Jednotlivé generace jsou značeny N₁ až N₁₂, alternativně se značí první generace F₁ a další BC1 až BC11. U každé generace je ještě vyznačeno postupně se zmenšující teoretické procento dárcovského genomu (Wakeland *et al*, 1997). První generace je ze 100% heterozygotní, druhá z 50% atd.

2.2.1.1 Matematický výpočet

Z teoretických výpočtů je patrné, kolik zpětných křížení je třeba provést pro vytvoření kvalitního kongenního kmene. Podíl zbývající DNA donorového kmene se spočítá podle vzorce:

$$(1/2)^N = (1/2)^{BC+1}$$

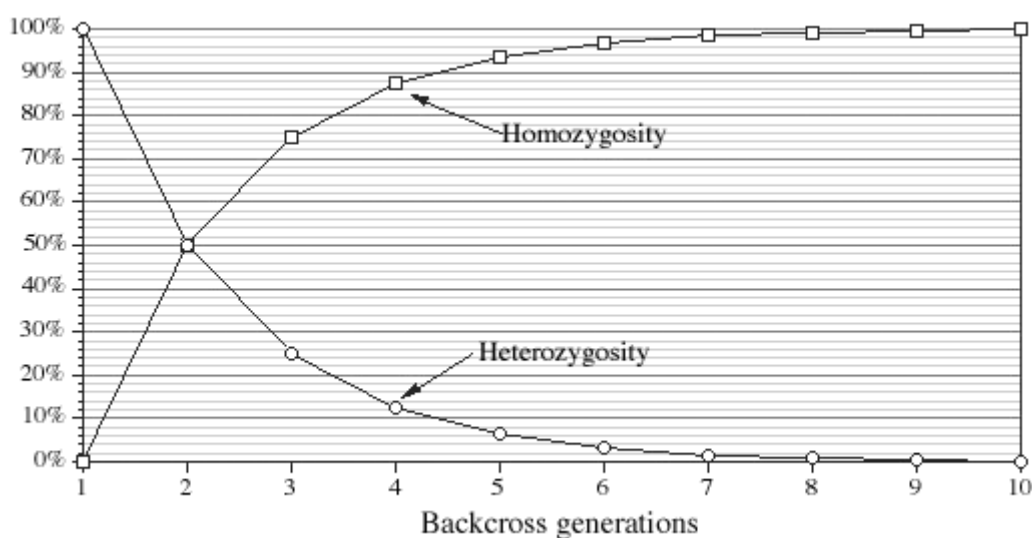
kde *N* je počet křížení a *BC* počet zpětných křížení. Podíl úseků, které jsou při zvyšujícím se počtu zpětných křížení stále ještě heterozygotní, se spočítá podle vzorce:

$$(1/2)^{N-1} = (1/2)^{BC}$$

Analogicky se potom vyvozuje zbylá, tedy homozygotní část:

$$1-(1/2)^{N-1}.$$

Znamená to například, že již po čtvrtém zpětném křížení ($N_4 = BC_3$) bude nová kongenní linie přibližně z 94% identická s rodičovským inbredním kmenem. Po desátém křížení se tento podíl zvýší přibližně na 99,8%, a to už je hranice, při níž se může nově vzniklý kmen považovat za kongenní. Změny podílů heterozygotních a homozygotních oblastí při přípravě kongenního kmene jsou znázorněny na grafu 1.



▲ **Graf 1:** Křivky, znázorňující procentuální podíl (osa y) heterozygotních a homozygotních oblastí. Osa x udává počet zpětných křížení (Silver, 1995).

2.2.2 Vývoj inbredních kmenů

Na počátku 20. století byla velká pozornost soustředěna na výzkum dědičnosti některých myších nádorových onemocnění, který vyžadoval existenci geneticky uniformních kmenů a možnosti provádět reprodukovatelné křížení. Základy výzkumu myší genetiky byly položeny v roce 1909, kdy byl připraven C. C. Littleovou první myší inbrední kmen (Paigen, 2003).

Od roku 1909 až do roku 1980 bylo vytvořeno a popsáno přes 300 nových inbredních kmenů (Staats, 1980). U žádného jiného eukaryotního organismu není zatím k dispozici tolik typů geneticky jednotných kmenů.

2.2.2.1 První kongenní kmen

Pojmový základ pro vytvoření kongenního kmene podal ve čtyřicátých letech George Snell (Snell, 1944; citováno v Silver, 1995), který pracoval na tzv. histokompatibilních lokusech (H lokusech; Klein, 2001). Při transplantaci tkáně jsou tyto lokusy zodpovědné za to, že imunitní systém organismu rozezná tělu cizí tkáň a tu se snaží odhojit. Snell se pokoušel popsat do té doby neznámý počet a typ jednotlivých genů, patřících do skupiny histokompatibilních lokusů. Díky poznatkům té doby se soudilo, že k odlišení všech jednotlivých nepříbuzných jedinců je třeba velké množství těchto lokusů. Předpokládalo se totiž, že jednotlivé lokusy se vyznačují zhruba stejným polymorfním charakterem a že jsou většinou jen dvou- až tříalelické (Silver, 1995). Pro experimentátory tedy vyvstával problém, jakým způsobem izolovat jednotlivé lokusy od všech ostatních, aby je bylo možno identifikovat a charakterizovat.

Pro vyřešení tohoto úkolu bylo použito právě více-generačního protokolu, založeného na opakovaném zpětném křížení. Pro další šlechtění byli vybíráni vždy jedinci tkánově nekompatibilní s recipientním inbredním kmenem. Dosáhlo se tak řady kongenních kmenů, u kterých se vytřídily jednotlivé H lokusy dárcovského kmene na genetickém pozadí recipientního kmene.

Nakonec se ukázalo, že se ve většině kmenů izoloval tentýž lokus, pojmenovaný *H-2* lokus. Dnes se tento určující prvek histokompatibility, obsahující množinu velice úzce spjatých genů, nazývá *H2* komplex. Navzdory předpokladům se v rámci tohoto komplexu nachází skupina tzv. genů I. třídy a tyto geny vykazují obrovskou míru polymorfismu se stovkami alel v jednotlivých lokusech. Pro označení tohoto komplexu se u myši a všech ostatních savců užívá obecný termín MHC - major histocompatibility complex. Z historických důvodů se u lidí také někdy používá termín HLA – human leukocyte antigen.

2.2.3 *Vylepšení technologie šlechtění pomocí marker-asistované strategie a příprava tzv. ‚rychlých kongenů‘*

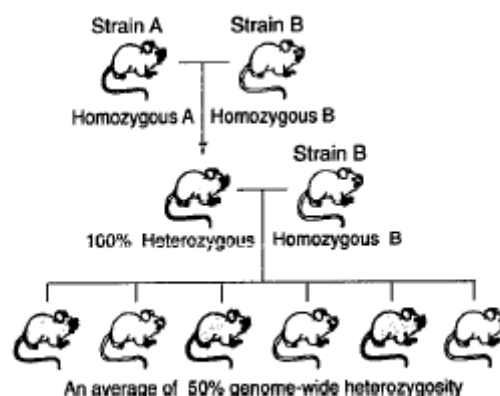
Klasický protokol přípravy myších kongenních kmenů je časově velmi náročný. Pro dosažení přibližně 99,9 % podílu genetické informace recipientního kmene v úseku

asi 20 cM je zapotřebí minimálně 10 generací zpětného křížení. Tento proces trvá obvykle 2,5 – 3 roky. Existují proto postupy, které zkracují dobu potřebnou pro vyšlechtění kongenního kmene asi o 18 - 24 měsíců (Markel *et al*, 1997).

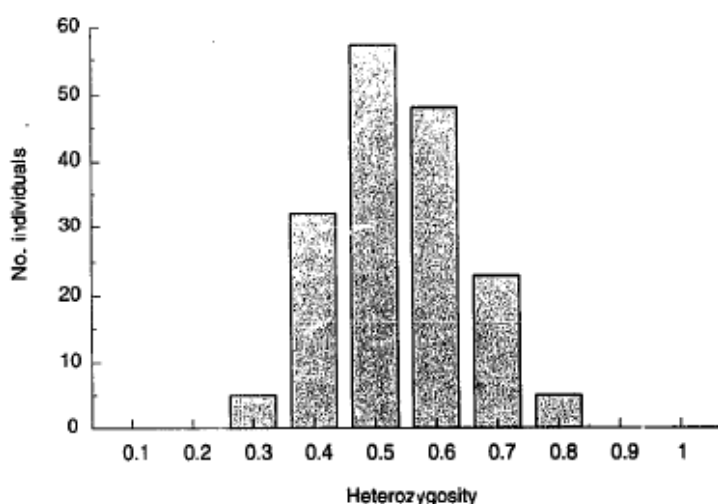
Tyto chovatelské postupy jsou založeny na tzv. marker-asistované selekci zvířat vhodných pro další křížení. Při této metodě se využívá tzv. mikrosatelitů - polymorfních genetických markerů rozestých po myším genomu. Díky zmapovaným myším mikrosatelitům je možné stopovat zděděné geny nebo celé úseky genetické informace (Love *et al*, 1990). Polymorfismus v délce mikrosatelitů se snadno rozlišuje pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR – Polymerase chain reaction) a gelové elektroforézy. Ještě rychlejší, ale finančně náročnější, by bylo paralelní genotypování zmapovanými jednonukleotidovými polymorfismy (SNP - single nucleotide polymorphism) na DNA čipu (např. Petkov *et al*, 2004). Při použití marker-asistované strategie šlechtění není chovatel při výběru chovného zvířete odkázán jen na fenotypové projevy daného znaku. Genotypizací totiž může přímo určit, které zvíře nese kýžený lokus ve svém genomu. Navíc může experimentátor vybrat zvíře s nejvyšším podílem genetické informace recipientního inbredního kmene. Tímto způsobem se pak může snížit počet generací nutných pro výrobu kongenního kmene.

U potomků první backcrossové generace se ze statistiky předpokládá, že podíl heterozygotních genotypů (dárcovský kmen / recipientní kmen) a homozygotních genotypů (recipientní kmen) bude přibližně 50 na 50 (Obrázek 2).

► **Obrázek 2:** Graficky znázorněná situace prvního - outcrossového křížení a druhého - backcrossového, tedy zpětného křížení. Potomci N_1 generace jsou přibližně z 50% heterozygotní. Skutečné rozložení popisuje graf 2 (Wakeland *et al*, 1997).



Tato průměrná hodnota vyjadřuje, že počet potomků s 50% podílem heterozygotnosti bude nejvyšší, ale také to znamená, že malá část potomků bude obsahovat 30%, respektive 80% heterozygotnosti, jak ukazuje graf 2.



◀ **Graf 2.** Grafické znázornění rozložení heterozygotnosti v potomcích prvního zpětného křížení. Osa x vyjadřuje podíl heterozygotních úseků a osa y udává počet jedinců (Wakeland *et al.*, 1997).

Chovatel pak při výběru pro další křížení zvolí zvíře, které obsahuje žádaný přenášený gen a které vykazuje nejnižší podíl heterozygotních úseků v genomu. Takto se postupuje i u dalších křížení a při čtvrté až páté generaci jsou potomci z méně než jednoho procenta heterozygotní (Markel, 1997), a tato část představuje přenášený gen z dárcovského kmene a jeho nejbližší okolí. Výsledný počet nutných generací přitom závisí na hustotě rozmístění použitých markerů a počtu typizovaných zvířat.

2.2.3.1 Marker-asistované chovné strategie pro myší kongenní kmene

Maximální nutný počet generací potřebný pro přípravu kvalitního kongenního kmene je měřítkem účinnosti jednotlivých chovných strategií. Kvalita vyprodukovaného kmene je určena pravděpodobností výskytu neidentifikovaných heterozygotních oblastí na pozadí recipientního inbredního kmene. Je zřejmé, že při snaze co nejvíce snížit podíl neidentifikovaných heterozygotních oblastí, musí být zcela zachován kýžený úsek genetické informace dárcovského kmene.

Byly publikovány počítačové simulace vlivu rekombinace a účinnosti jednotlivých marker-asistovaných chovných protokolů. Tato chovná schémata se například lišila použitím různých poměrů množství zpětných křížení, mláďat jednotlivých generací a genotypizací na myš. Jedna z těchto simulací byla navržena pro různou hustotu použitých polymorfních markerů. Rozložení markerů bylo navrženo přibližně v úsecích po 5 cM, 10 cM a 20 cM. Potřebné množství nově narozených zvířat se uvažovalo od 10 do 50 mláďat.

Z výsledků je patrné, že se ekonomicky a časově vyplatí používat markery s densitou okolo 10 cM, protože výsledky pokusů s vyšší densitou (5 cM) se podstatně nelišily, zato finanční a časová náročnost byla neporovnatelně vyšší. Z obdobných důvodů nemá smysl produkovat více než 50 potomků jednotlivých křížení (Armstrong, 2006).

Významný vliv na výsledek má také velikost hledaného úseku genotypu dárcovského kmene. Mohou to být celé chromozomy u chromozomálně substitučních (konzomických) kmenů nebo například QTL, tedy soubory genů pro kvantitativní znaky (quantitative trait loci). U kongenních kmenů se může jednat právě o QTL nebo jednotlivé, případně geny knock-outované (vyřazené z funkce). Míra vlivu rekombinace je dána délkou přenášené DNA. Čím delší úsek, tím se v něm nerekombinantní zvířata hledají hůře, a musí se tedy typizovat větší počet myší.

2.2.3.2 Produkce kongenů „nadvukovou“ rychlostí

Rychlost šlechtění kongenů se dá také zvýšit pomocí metody superovulace, která spočívá v hormonální stimulaci tří-týdenních nedospělých samic ke zvýšené ovulaci. Získaná vajíčka se oplodní *in vitro* a použijí se k embryonálnímu přenosu do těla jiné dospělé samičky. Od oplození vajíčka k porodu mláďete je třeba třech týdnů a pro postnatální vývoj dalších třech týdnů, kdy je opět možnost odebrat samicím vajíčka. Znamená to, že od oplození až do další generace zpětného křížení uplyne šest týdnů. Je-li podle klasického protokolu na vyšlechtění kongenního kmene potřeba minimálně deset zpětných křížení, pak by tento kmen mohl být hotov již za něco málo přes rok (šedesát týdnů). V kombinaci s marker-asistovanou chovnou strategií by se potřebná doba zkrátila ještě více (Behringer, 1998).

2.2.4 Další aspekty šlechtění a práce s kongenními kmeny

2.2.4.1 Vliv genetického pozadí recipientního kmene

Velmi důležitým aspektem práce s kongenními liniemi je efekt genetického pozadí, do kterého je přenášený segment vložen. Případná interakce pozadí se zkoumaným genem či geny může pozměnit fenotypový projev sledovaného znaku a ztížit práci s tímto modelem (například selekci, Qui *et al*, 2001; Al-Saktawi *et al*, 2003).

Další možnou komplikací mohou být i takzvané modifikátorové geny. Jsou to geny recipientního zvířete, které interagují se sledovaným znakem a mění jeho fenotypové projevy. Změny mohou nastat v penetranci (pronikavosti), míře exprese, změně dominantního postavení alely a nebo mohou tyto geny společně vytvořit zcela nový fenotypový výraz (Nadeau *et al*, 2001).

Efekt genetického pozadí lze využít při hledání vhodných modelů ke studiu lidských chorob. Díky tomuto efektu je po přenesení genů potenciálně způsobujících určitou chorobu na více recipientních inbredních kmenů možno vybrat ten, na jehož genetickém pozadí se projevy choroby nejvíce shodují s průběhem u člověka. (Fleming *et al*, 2001).

Volba nejvhodnějšího recipientního kmene je v současnosti velice složitá. V budoucnu by mohl daný výběr usnadnit projekt myšího fenomu, jehož cílem je podrobné fenotypizace různých inbredních kmenů (<http://www.jax.org/phenome>).

2.2.4.2 Vliv okolní zbytkové genetické informace donora

Díky existenci genové vazby obsahuje vytvořený kongenní kmen mimo sledovaného segmentu také úseky okolní DNA. Tyto úseky mohou činit v průměru až 20 cM neboli 40 Mb (Montagutelli *et al*, 2004). Takto spojené a přenesené alely mohou výrazně ovlivnit výsledný fenotyp nově vytvořených kongenních linií (Bolivar *et al*, 2009).

Znalost přesné pozice přenášeného segmentu a přítomnost vhodných genetických markerů v jeho nejbližším okolí umožňuje alespoň částečně odstranit okolní nežádoucí genetickou informaci. Během předposlední generace zpětného křížení se dá pomocí speciální selekce s výhodou zúžit přenášený segment. Na několika desítkách potomků této generace se testují markery v blízkosti přenášeného segmentu. Nejvhodnější je najít samce (produkuje větší množství potomků)

heterozygotního pro přenášenou alelu (donorová) a homozygotního alespoň pro jeden ze dvou okolních markerů (recipientní DNA). V další generaci vyprodukované tímto samcem hledáme homozygota pro druhý marker v blízkosti. (Montagutelli *et al*, 2004). Tímto způsobem lze výrazně snížit efekt poměrně velkého množství genů, které zbyly v okolí přenášeného segmentu - při průměrné hustotě genů v celém genomu to může činit až 400 genů (Montagutelli *et al*, 2004).

2.2.4.3 Určení homozygotů pro další usnadnění šlechtění kongenních kmenů

Během závěrečné fáze šlechtění kongenních linií se dá s výhodou využít selekce homozygotů pro přenášený segment. V této fázi je cílem pomocí inbreedingu získat jedince, kteří mají téměř celý genom v homozygotním stavu (Montagutelli *et al*, 2004). Jestliže se podaří hned zpočátku najít homozygoty pro náš transgenní úsek, další genotypizace již není nutná a může se pokračovat mnohem snáze a rychleji prostým křížením potomků nalezeného homozygota. To je relativně snadné u křížení, kde selektujeme endogenní polymorfni segment, mnohem obtížnější je typizování zygozity u transgenů. Ne vždy se nalezení homozygotů pro transgen zdaří. Jeho integrace totiž může porušit důležitý gen a nebo může potíže způsobit nadměrná dávka přenášeného genu.

Existuje několik způsobů relativně nenáročného stanovení zygozity u transgenních myši. Nejjednodušší a nejlevnější, ale nejdéle trvající metodou, jak nalézt homozygotní zvíře, je rozkřížit zvířata na inbrední kmen a pro další inbreeding kongenního kmene použít pouze myši, které měly 100% transgenních (z alespoň osmi) potomků. Další, rychlejší možností pro nalezení homozygotů je kvantitativní real-time PCR s použitím SYBR[®] Green fluorescenčního barvení, specifických primerů a kontrolních DNA (Mitrečič *et al*, 2005; Haurogné *et al*, 2007; Shitara *et al*, 2004; Tesson *et al*, 2002; Ballester *et al*, 2004; Sakurai *et al*, 2008).

2.2.5 Využití

2.2.5.1 Kongenní kmeny

Kongenní kmeny představují velice důležitý prostředek při zkoumání znaků, jejichž projev závisí na složité interakci mnoha genů, tedy především tzv. QTL (quantitative trait loci). Tato metoda umožňuje specifickým šlechtěním odděleně zkoumat všechny úseky genomu, které společně utvářejí sledovaný znak a zbytek genetického pozadí

organizmu. Je tak možné jednotlivé, předtím neznámé, geny identifikovat a mapovat (Rogner a Avner, 2004). V případě komplexnějšího QTL lze nejen jednotlivé geny nebo soubory genů oddělit do kongenních linií a studovat samostatně, ale tyto linie lze také kombinovat křížením a tak ještě hlouběji porozumět vzájemné interakci. Příkladem takové disekce QTL pomocí kongenních kmenů je studium myšního modelu lidské autoimunitní choroby systémový lupus erythematosus (Morel *et al*, 1997, 2000).

Další příklad využití kongenních kmenů je částečné objasnění příčin IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus), lidské autoimunitní onemocnění způsobující cukrovku typu I. Speciální myší kmen NOD (non-obese diabetic) trpí podobnými poruchami jako lidé s cukrovkou typu I. Vytvořením kongenů z tohoto kmene na genetickém pozadí rezistentních inbredních kmenů umožnilo sledovat geny určující tento znak (Adorini *et al*, 2002).

Byly také konstruovány myší kongenní linie, u kterých se sledovala zvýšená citlivost na uspávací účinky ethanolu (Benett *et al*, 2000). Tento efekt je totiž také projevem komplexního působení několika genů (Benett a Johnson, 1998).

2.2.5.2 Rekombinantní kongenní kmeny

Rekombinantní kongenní kmeny jsou v některých experimentech vhodnější. Pomocí těchto kmenů byl například sledován průběh a interakce genů u tzv. diaobezity, to je obezity spojené s cukrovkou typu II (Reifsnnyder, 2002).

Dalším příkladem může být použití rekombinantních kongenů při mapování tzv. TMGs (tumor modifying genes). Nádorové bujení je nejvíce studovaný komplexní znak a na rezistenci nebo naopak náchylnosti k této nemoci mají významný vliv i TMGs. Jsou to geny organismu, které mohou měnit projevy tohoto znaku a zdánlivě s ním nesouvisí (Müllerová, 2004).

2.2.5.3 Srovnání s postupem přípravy kongennů použitých jako model pro autoimunitní onemocnění SLE

Systémový lupus erythematosus (SLE)

Systémový lupus erythematosus (SLE) je lidské polygenní autoimunitní onemocnění způsobující rozsáhlé poškození vnitřních orgánů a může nakonec způsobit i jejich úplné selhání. Jako většina autoimunitních chorob je charakteristická souborem

jednotlivých defektů imunitního systému, které dohromady tvoří výsledný destruktivní průběh onemocnění. Nejtypičtější a dobře popsane fenotypy jsou produkce antinukleárních autoprotilátek (proti dsDNA a chromatinu), glomerulonefritida a aktivované B a T lymfocyty.

Studie tohoto onemocnění započaly již v šedesátých letech minulého století. Stěžejní nástroj, ze kterého vycházely téměř veškeré nové poznatky o SLE, byly modelové inbrední kmeny BWF1, MRL/lpr, BXSB, SNF1 a NZM2410 (Theofilopoulos *et al*, 1985). Tyto kmeny spontánně vyvíjely symptomy podobné lidskému průběhu nemoci SLE a umožnily tak studium tohoto onemocnění.

Marker-asistovaná produkce kongenů

Významným posunem při zkoumání SLE byla možnost použití kongenních kmenů. Umožnily tzv. „geneticky rozpitvat“ spletité interakce působení vícero genů, které jsou charakteristické nejen pro SLE, ale i pro většinu autoimunitních chorob (Xie a Mohan, 2004). Kongenní kmeny totiž dovolují oddělit od sebe několik genetických lokusů, podílejících se na onemocnění a dále je rozčlenit na kratší intervaly, potažmo na jednotlivé geny. Tyto pak lze přesněji mapovat a popsat jejich dílčí účinky. Z dřívějších studií na myších modelových inbredních kmenech byly již popsány úseky segregující s fenotypem SLE (Morel *et al*, 1994; Drake *et al*, 1994, 1995; Kono *et al*, 1994). Selekcce myší ke šlechtění kongenů tak mohla probíhat pomocí specifických markerů na přesně definovaný úsek nebo úseky genomu, které bylo zapotřebí přenést. V tomto smyslu byl tedy použit stejný postup jako v této diplomové práci, protože i v našem případě jsme převáděli specifický úsek - transgen - bez přímých výrazných fenotypových projevů na použitém genetickém pozadí za pomoci specifických mikrosatelitových markerů.

Na druhou stranu byl pro produkci SLE modelových kongenních kmenů použit modifikovaný urychlený postup šlechtění marker-asistovanou metodou. Byly tak za téměř poloviční dobu připraveny nové kongenní kmeny pro jednotlivé základní lokusy podmiňující SLE: B6.Sle1, B6.Sle2, B6.Sle3, B6.Sle4, B6.Sle5 B6.Nba2 a B6.NZW-Sgp3. (Morel *et al*, 1996, 1997; Atencio *et al*, 2004; Kong *et al*, 2004; Laporte *et al*, 2003).

Pro práci na SLE bylo také zásadní, že kmen B6 je lupus - rezistentní a většina imunologických modelů se připravuje na B6 pozadí, a to včetně knock-outů a

transgenů. Různé modely se pak dají kombinovat, či porovnávat a tak ještě hlouběji proniknout do systémů interakcí polygenních znaků.

Další varianty kongenizace

Zajímavým přístupem je použití tzv. reverzních kongenních kmenů, kdy se naopak na pozadí „náchylných“ kmenů (BALB/c) přenáší „odolné“ alely (B6). Tento postup pomohl určit charakter onemocnění, kdy záleží na počtu predispozičních lokusů pro překročení jisté prahové hodnoty a následnému plnému projevu nemoci (Rigby *et al*, 2004a, 2004b; Waters *et al*, 2004).

Pro ještě hlubší analýzu interakce predispozičních alel a určení prahových hodnot k jednotlivým dílčím fenotypovým projevům SLE se používaly také tzv. polykongeny (bi, tri kongeny). Kombinoval se tak počet a sestavy jednotlivých alel, aby se dále prozkoumaly epistatické vztahy jednotlivých segmentů zapříčiňujících chorobu (Crocker *et al*, 2003; Mohan *et al*, 1999; Morel *et al* 2000).

Pro závěrečné klonování a sekvenování jednotlivých genů byly využity také tzv. subkongeny, kterými se ještě více rozčlenily a separovaly intervaly zodpovědné za projevy SLE (Morel *et al*, 2001).

Tento výčet základních variant modifikací a rozšíření práce s kongeny na příkladu zkoumání autoimunitní choroby představuje nástin budoucích možností využití kongenních linií, které se v naší laboratoři podařilo připravit. Snažil jsem se tak naznačit fakt, že přestože se zatím jedná o kongenizaci transgenních linií, nelze podcenit budoucí potenciál této práce.

2.3 Hybridní sterilita a konstrukce kongenních kmenů

2.3.1 Hybridní sterilita

Hybridní sterilita byla pozorována již Aristotelem, a to jak u rostlin, tak u živočichů. Hraje důležitou roli jako jedna z postzygotických reprodukčních bariér. O hybridní sterilitě mluvíme tehdy, když zkřížením dvou plně plodných rodičovských forem vzniká neplodné potomstvo (Dobzhansky, 1951; Orr, 2005). U myši se hybridní sterilita týká především samců v souladu s Haldanovým pravidlem, které říká, že

hybridní sterilita postihuje obvykle heterogametické pohlaví (Haldane, 1922). Fertilní samice se využívají při studiu interakcí a účinků genů, které způsobují sterilitu hybridních samců a umožňují tak studium genetických základů reprodukčně izolačního mechanismu mezi dvěma příbuznými druhy (Coyne, 1984). Z evolučního hlediska je zajímavé, že se sterilita samčích hybridů objevuje velmi rychle po oddělení dvou příbuzných druhů a neživotoschopnost hybridních samců je v této fázi evoluce poměrně vzácná (Perez *et al*, 1993).

Z genomového hlediska se dají rozlišit dva základní typy hybridní sterility. Chromozomální hybridní sterilita se projeví v případě, když mají rodičovské druhy výrazné strukturní nehomologie mezi svými chromozomálními segmenty. Druhým typem je genová hybridní sterilita, která je způsobena interakcemi mezi specifickými geny (Forejt a Iványi, 1974).

Objasnění mechanismu hybridní sterility by mohlo pomoci k lepšímu porozumění evolučního vzniku druhů. Přes dlouholeté snahy se však donedávna podařilo identifikovat jen několik genů hybridní sterility a to pouze u *Drosophily* (Ting *et al*, 1998; Masly *et al*, 2006; Phadnis a Orr, 2008).

2.3.2 Gen hybridní sterility *Hst1*

V laboratoři Dr. Forejta byl nedávno vyklonován první gen hybridní sterility u obratlovců *Hst1* (Hybrid sterility 1, Míhola *et al*, 2009). Gen *Hst1* neboli *Prdm9* (PR-domain containing 9) je jedním z hlavních genů způsobujících zástavu spermatogeneze u hybridů *Mus m. musculus* (*Mmm*) - *Mus m. domesticus* (*Mmd*). Křížením kmene PWD/Ph (*Mmm* původu) a několika standardních laboratorních kmenů (převážně *Mmd* původu) byl *Hst1* geneticky mapován na 17. chromozom (Forejt a Iványi, 1974). Jedná se o gen několika alelických forem, které jsou odpovědné za rozdíly mezi dvěma typy hybridů. U většiny myších laboratorních kmenů včetně C57BL/6J (B6) byla popsána alela *Hst1^s*, zajišťující sterilitu, ale některé z nich, například C3H/DiSnPh (C3H) nebo P/J nesou “fertilní“ alelu *Hst1^f* (Forejt a Iványi, 1974).

Divoké myši a od nich odvozené inbrední kmeny, které jsou *Mmm* původu, mají také hybridně sterilní gen na chromozomu 17, označený *Hstw*, který je možná identický s *Hst1* lokusem *M. m. domesticus* (Forejt, 1996). Samčí potomci homozygotní pro *Hst1^s*, *Hst1^f* a *Hstw^s* alely jsou plně fertillní. Křížíme-li kmen B6 s C3H, dostaneme

zvířata genotypu $HstI^S / HstI^f$ a samci narození v tomto křížení jsou fertilní. Sterilní hybridní samci se rodí pouze při křížení laboratorního kmene nesoucího $HstI^S$ alelu, např. B6, s kmeny divokých myší *M. m. musculus* původu (tabulka 1). Tito samci mají genotyp $HstI^S / Hstw^S$ (Forejt a Iványi, 1974).

Tabulka 1: Tabulka fenotypů hybridů z křížení třech výchozích inbredních kmenů (převzato z Mihola *et al*, 2009).

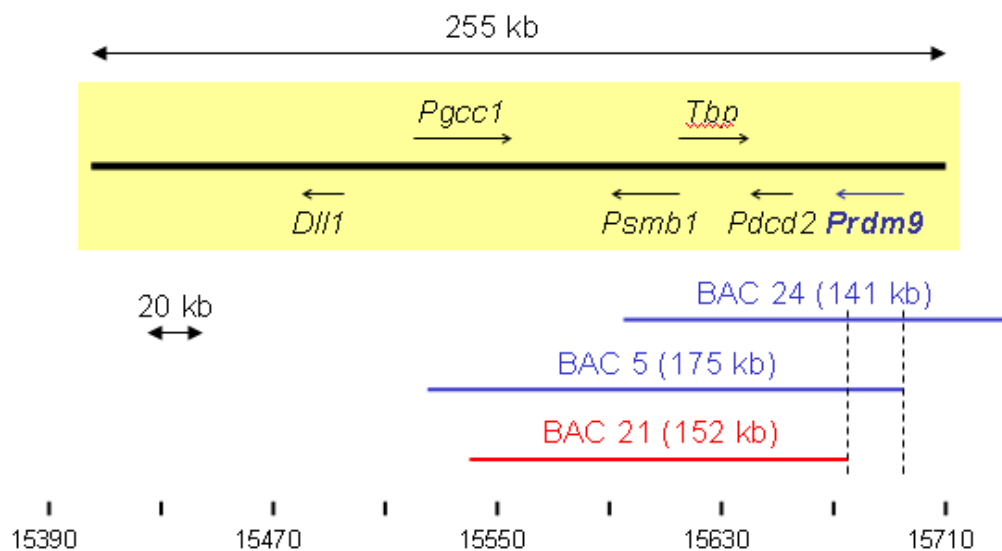
Samice*	Samec	B6** $HstI^S$	C3H*** $HstI^f$	PWD $Hstw^S$
B6		F	F	F
C3H		F	F	F
PWD		S	F	F

F = fertilní, S = sterilní. * F_1 samice jsou ve všech kříženích fertilní. ** Další inbrední kmene obsahující $HstI^S$ alelu jsou: A/Ph, Balb/c, C57BL/10 (B10), 129/J, AKR/J nebo DBA1/J. *** Další inbrední kmene obsahující $HstI^f$ alelu jsou: CBA/J, I/St or P/J

2.3.2.1 Mapování *Hst1*

Cesta k identifikaci genu *Hst1* neboli *Prdm9*, či *Meisetz*, který kóduje histon 3 lysin 4 trimethyltransferázu začala už před několika desetiletími (Forejt a Iványi, 1974). Tento gen byl postupně lokalizován sériemi genetického mapování a haplotypových analýz do jediného 255 kb dlouhého úseku na chromozomu 17 (Gregorová *et al*, 1996; Mihola *et al*, 2007; Trachtulec *et al*, 1997, 2005, 2008). Tento úsek obsahoval šest kandidátních genů *Dll1*, *Pgcc1*, *Psmbl1*, *Tbp*, *Pdcd2*, a *Prdm9*. Tyto kandidátní geny byly ověřovány zkoumáním jejich schopnosti zvrátit fenotyp hybridní sterility přenesením těchto genů z kmene s fertilní alelou (C3H) na kmen se sterilní alelou B6. Byla použita technika transgeneze překrývajícími se bakteriálními arteficiálními chromozomy (BACy, Osoegawa *et al*, 2000): CHORI-34-45F17 – dále jen BAC 5, CHORI-34-289M8 – BAC 21 a CHORI-34-331G23 – BAC 24 (obrázek 3). Tyto BACy byly transfekovány do embryonálních kmenových buněk $F_1(129 \times B6)$. Kmeny 129 i B6 jsou převážně *Mmd* původu. Při křížení transgenních linií BAC 5 a BAC 24 se samicemi PWD vznikali plně plodní potomci a fenotyp hybridní sterility

byl tedy změněn. Na rozdíl od toho transgen BAC 21 při stejném křížení dával vzniknout potomkům, kteří zůstali neplodní (Mihola *et al.*, 2009).



Obrázek 3: Úsek kritický pro *Hst1* definovaný genetickým mapováním se schematickým vyjádřením polohy kandidátních genů a překrývajících se BAC transgenů. Modře jsou zvýrazněny BACy zachraňující plodnost hybridů (BAC 5 a 24) a červeně BAC 21, který změnu fenotypu hybridní sterility nezpůsobil. Přerušované čáry označují úsek obsahující *Hst1* definovaný BAC transgeny. Stupnice pod obrázkem označuje polohu celého úseku na chromosomu 17 v kb (NCBI m37 verze myšího genomu).

2.3.2.2 Potvrzení *Hst1* = *Prdm9*

Z výše uvedených výsledků křížení BAC transgenů vyplynulo zúžení úseku zodpovědného za změnu hybridní sterility na asi 15,9 kb dlouhý region obsahující 5' konec genu *Prdm9*. Předchozí expresní a sekvenační analýzy také ukázaly, že geny *Dll1*, *Pgcc1*, *Psmb1*, *Tbp* a *Pdcd2* jsou velmi nepravděpodobní kandidáti *Hst1* (Trachtulec *et al.*, 2005, 2008; Mihola *et al.*, 2007). Jako další důkaz byly použity expresní analýzy transgenní linie BAC 21 pro potvrzení, že integrované geny nebyly umlčeny a mohly se projevit fenotypem hybridní sterility (Mihola *et al.*, 2009). Ve stejném článku bylo také publikováno srovnání fenotypů myší s nulovou alelou (knock-out) *Prdm9* genu, již dříve připravených v jiné laboratoři (Hayashi *et al.*, 2005) a sterilních hybridů.

2.3.3 Stabilizace transgenů konstrukcí kongenních linií

Transgenní linie použité pro testování kandidátních genů v *Hst1* kritické oblasti představují zajímavý nástroj, jak dále studovat nejen hybridní sterilitu a její první identifikovaný gen *Prdm9*, ale také ostatní geny obsažené v jednotlivých BAC transgenech. Transgeneze se prováděla na embryonálních kmenových buňkách F₁(B6 x 129), které jsou odolnější a snadněji manipulovatelné než buňky odvezené z B6 nebo 129 kmene (Goodwin *et al* 2001). Obvyklým a hojně využívaným nástrojem, jak vylepšit fenotypizování geneticky modifikovaných myší (knock-out nebo transgenních linií), je přenos manipulovaných genů na genetické pozadí standardních laboratorních kmenů. Tento přenos se provádí klasickým nebo různě modifikovaným více-generačním zpětným křížením, na jehož konci je ustavena nová kongenní linie na známém a dobře definovaném genetickém pozadí (Bolivar *et al*, 2009).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- Agaróza Serva
- DMSO (dimethylsulfoxid) Sigma
- EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová) Serva
- Ethanol Merck
- EtBr (etidium bromid - 10 mg / ml) Sigma
- Fenol Serva
- Hi-Di Formamid Applied Biosystems
- Chloroform Lachema
- Isoamylalkohol Lachema
- Isopropanol Merck
- NaOH (hydroxid sodný) Serva
- SDS (dodecylsulfát sodný) Sigma
- Tris (Tris (hydroxymetyl) aminometan) Serva

3.1.2 Roztoky a pufrý

- **TE pH 8,0:** 10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA pH 8,0
- **TBE:** 89 mM Tris borát, 89 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA
- **Roztok na přípravu DNA:** 100 mM TRIS-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl
- **PBS** (phosphate buffered saline) IMGcore Facility

3.1.3 Enzymy

- Proteináza K Roche

- Taq polymeráza Fermentas
- Polymeráza LightCycler[®] FastStart Roche

3.1.4 Chemikálie pro PCR

- 10 x reakční pufr pro PCR Fermentas
- 25 mM MgCl₂ Fermentas
- 100 mM dNTP Fermentas
- 10x DNA Master SYBR Green I Roche

3.1.4.1 PCR – primery

Tabulka 2: CH07 mikrosatelitové primery (genotypizace)

Název	Sekvence	Délka [bp]	T _m [°C]
CH07F	TTGCTATAAAAGGACTGTTTGAT	23	61
CH07L	ACACAAAGACAGAAGAAGAGGA	21	60

3.1.5 Přístrojové vybavení

- mikrocentrifuga Eppendorf 5415 C
- centrifuga Mikro 22R Hettich
- zdroj napětí pro elektroforézu EPS 301 APCzech
- Cyclyer AB GeneAmp 9700 PCR System
- Cyclyer Perkin Elmer GeneAmp 2400 PCR systém
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000
- inkubátor Techne Hybridiser HB-1D
- inkubátor EN 500 Trigon-plus
- prohlížeč a analyzátor gelů Syngene GeneGenius
- Biological Thermostat BT 120M - Lab system
- LightCycler 2000 Roche
- světelný mikroskop Nikon Eclipse E200

- váhy Kern EG600-2M LABsystem
- vyhřívaný blok Thermo 120/R&B

3.1.6 Programy a databáze

- GeneSnap Version 7.04 (prohlížeč gelů SynGene)
- LightCycler Software Version 3.5
- R Version 2.9.1 (program pro statistické výpočty a tvorbu grafů)
- Rweb (web pro statistické výpočty) - <http://pbil.univ-lyon1.fr/Rweb/>
- PyRAT - <https://pyrat.img.cas.cz>
- BLAST - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- BLAST 2 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>
- ENTREZ (NCBI) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

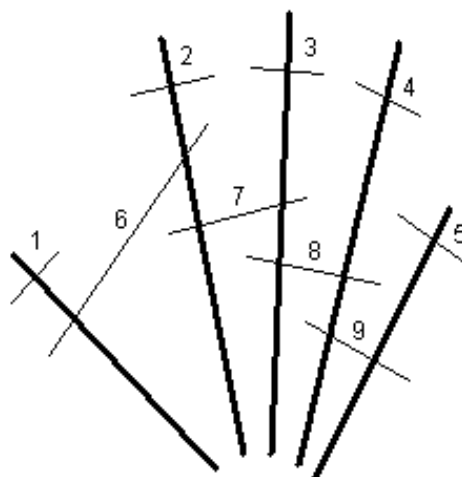
3.2 Metody

3.2.1 Příprava kongenního kmene

3.2.1.1 Chov myší

Chov myší probíhal za bariérou ve speciální (pathogen free) k tomu určené budově a většina základních úkonů, jako odstavení a připouštění prováděly ošetřovatelky na základě komunikace přes specifický program na katalogizaci myší PyRAT. Vzorke tkáně na extrakci DNA a genotypizaci se pak odebíraly v podobě 0,5 až 2 cm dlouhého kousku ocásku. Myši byly před přechodem na čtyř-písmený kód na ušních známkách aplikovaných při odstavu značeny stříháním prstíků na zadních končetinách. V případě vypadených ušních známek bylo použito stříhání jednoho až dvou prstíků (obrázek 4) na pravé zadní končetině při pohledu z ventrální části těla.

► **Obrázek 4:** Graficky znázorněný kód značení myši stříháním prstíků. Prsty jsou uštířeny celé až k chodidlu a číselné pořadí odpovídá pořadí prstíků od palce k malíku.



Řešitel úspěšně prošel kurzem práce z laboratorními zvířaty, se kterými bylo nakládáno v souladu se zákony České Republiky o ochraně zvířat: Nařízení o experimentální práci se zvířaty číslo 207/2004 Sb. a zákony číslo 246/92 Sb. a 77/2004 Sb.

3.2.1.2 Genotypizace

Selekce byla provedena genotypizací nové generace za pomoci mikrosatelitových markerů. Pro extrakci DNA bylo použito asi 2 mm ocásku a zbytek byl zamražen při -20°C . Extrakce byla provedena relativně rychlou a nenáročnou metodou digesce v 50 mM roztoku NaOH. 600 μl NaOH roztoku se 2 mm tkáň ocásku bylo inkubováno asi 90 minut při 95°C , následně zneutralizováno 50 μl 1M Tris, $\text{pH}=8$ a zcentrifugováno 6 minut při 13200 rpm. Získaná DNA byla ještě naředěna 1:1 s vodou a 1 μl byl použit do amplifikační PCR reakce. Reakce probíhala celkem ve 20 μl reakční směsi, která obsahovala: vodu, DNA templát, 1x PCR pufr, 1,65 mM MgCl_2 , 175 μM každého dNTP, 200 nM obou primerů a 0,3 U *Taq* polymerázy. Program použitý pro amplifikaci je popsán v tabulce 3. Ke genotypizaci nám sloužily speciálně navržené primery (tabulka 2) amplifikující délkově polymorfni mikrosatelitový úsek, který je obsažený jak v recipientní linii tak v transgenním (přenášeném) úseku. Amplikony byly elektroforeticky rozděleny na 4% agarosovém gelu s použitím 20bp DNA žebříčku.

Tabulka 3: Amplifikační program pro genotypizaci

Cyklus	1.krok	2.krok	3.krok
1.	94°C – 1:15	55°C – 0:05	68°C – 0:24
2.	94°C – 0:30	52,5°C – 0:05	68°C – 0:25
3.-37.	94°C – 0:30	51,5°C – 0:10	68°C – 0:26*
Závěr	68°C – 5:00	10°C - nekon.	-

* každý cyklus se čas prodlužuje o jednu vteřinu

3.2.1.3 Izolace vysokomolekulární DNA pro SNP analýzu

Na přípravu DNA bylo použito asi 1 cm myšního ocásku. Ten byl vložen do 1,5 ml mikrozkušavky eppendorf. Přidalo se 0,7 ml roztoku na přípravu DNA a 10 µl proteinázy K (o koncentraci 10 mg/ml). Ocásek byl ještě rozstříhán na menší kousky a vzorek inkubován na rotační míchačce při 50-55°C přes noc. Ráno byla zkumavka stočena 10 minut při otáčkách 10 000 rpm, supernatant přenesen do čisté zkumavky a přidáno stejné množství směsi fenolu a chloroformu (1:1). Zkumavka se důkladně protřepala (asi 5 minut), až se fáze spojily a stočily se 10 minut při otáčkách 10 000 rpm. Horní fáze byla přenesena do čisté zkumavky a bylo přidáno stejné množství chloroform : isoamylalkoholu (v poměru 24 : 1). Zkumavka byla důkladně promíchána a centrifugována 10 minut při otáčkách 10000 rpm. Opět byla odebrána horní vrstva a přenesena do nové zkumavky. Doplnilo se stejné množství isopropanolu a zkumavka byla protřepána, až se vytvořila viditelná sraženina DNA. Vzorek byl znovu stočen 10 minut při 10 000 rpm, supernatant odebrán a pro očištění bylo přidáno a vzápětí odstraněno 300 µl 70% ethanolu. DNA se nechala 5-10 minut sušit při pokojové teplotě a nakonec byla rozpuštěna ve 100 µl 1x TE (10 minut v 50°C a nejlépe ještě přes noc v +4°C). Koncentrace DNA byla měřena na nanodropu při 260 a 280 nm a jako blank byl použit 1x TE puffr.

3.2.2 Pitva a fenotypizace

Myši byly usmrceny chloroformem a před samotnou pitvou jim byly pro jistotu ještě delokalizovány krční obratle. Po zvážení celého těla následovalo otevření břišní dutiny a postupné vyjímání a vážení jednotlivých vnitřních orgánů. Dobře definované orgány jako stehenní sval, játra a srdce byly rovnou váženy, naproti tomu hnědý tuk, gonadální tuk a varlata (testes) musely být ještě očištěny od okolních

tkání. Gonadální tuk obklopuje varlata a nadvarlata (epididymis) a před samotným vážením byly všechny tyto tkáně odejmuty najednou a následně byla jedna tkáň po druhé odpreparována a očištěna. Hnědý tuk se nachází na dorsální straně mezi lopatkami předních končetin. Je kompaktně spojen s okolním bílou tukovou tkání a bylo možné ho právě díky odlišné barvě rozeznat a odpreparovat okolní tukovou tkáň.

V rámci odběru varlat byly také vyjmuty epididymis, odstříženy ve zúžení těsně za hlavičkou (cauda epididymis) a vloženy do 0,5 ml 1x PBS. Příprava preparátu na počítání spermií probíhala rozstříháním nadvarlat na menší kousky (asi 25x stříhnutí nůžkami ve zkumavce) a necháním cca 5 minut při pokojové teplotě. Vzniklý roztok byl ještě podle potřeby naředěn (většinou 1:4) a 10 μ l přeneseno na Bürkerovu počítací komůrku. Spermie se standardní morfologií byly spočítány ve čtvercích v obou diagonálách, oba výsledky zprůměrovány a přepočteny rovnicí: počet buněk v 25 čtvercích \times 10000 \times zředění = koncentrace buněk/ml. Počet spermií v cauda epididymis byl spočítán z koncentrace vynásobením objemem (0,5 ml).

3.2.3 Použité výpočetní a statistické metody

3.2.3.1 Pitva a fenotypizace

Výsledky fenotypizace představoval soubor váhových hodnot jednotlivých orgánů a tkání pro tři transgenní linie a kontrolní kmen B6 různého stáří a v různých generacích vývoje kongenního kmene. Tato data byla katalogizována a zpracována v programu MS Excel pomocí jeho základních statistických funkcí jako aritmetický průměr, směrodatná odchylka a Welschův t-test. Z této analýzy vzešly signifikantní nebo téměř signifikantní výsledky a ty byly v případě velkého rozptylu hodnot dále potvrzeny Wilcoxonovým testem na webovém rozhraní Rweb (<http://pbil.univ-lyon1.fr/Rweb/>). Nejzajímavější výsledky byly pro přehlednost zpracovány do karbiových (boxplot) grafu v programu R verze 2.9.1.

4 VÝSLEDKY

4.1 Genotypizace

Celkově šlechtíme tři kongenní linie v různých generacích a navíc od každé ještě záložní linii pro případ znemožnění dalšího pokračování (například kvůli neživotaschopným či neplodným potomkům).

4.1.1 Hlavní kongenní linie

Jak ukazuje tabulka 4, u všech tří linií jsme dokončili předepsaných deset generací zpětných křížení a pokračujeme ve stabilizaci incrosem (křížení bratr se sestrou), pro získání homozygotních jedinců i pro přenášený segment. Nová kongenní linie tak bude v celém rozsahu genomu homozygotní a tudíž stabilní. V tomto smyslu jsou hotové linie s transgeny BAC 5 a BAC 21. Dlouhodobě jsou problémy s linií BAC 24, protože se špatně reprodukuje a vyžaduje nasazení většího počtu chovných páru. Přesto je naplněno deset generací zpětných křížení a nyní se pomocí incrosu hledá homozygot pro transgen, čímž se dokončí příprava i této linie.

Tabulka 4: Počet dosažených generací jednotlivých transgenních linií.

	BC - generace zpětného křížení	G - generace inbreedingu
BAC 5	BC10	G9
BAC 21	BC10	G3
BAC 24	BC9 - 10	-

Šlechtění a genotypizaci u linií BAC 21 a BAC 24 jsem převzal v počátečních fázích zpětného křížení (BC3). Linie BAC 5 byla již v pokročilém stádiu a začínala se závěrečná inbredizace (BC10, G1). Celý proces si až do dnešní doby vyžádal téměř 2000 přetestovaných myší.

4.1.1.1 Kontrola pozadí kongenních transgenů

Kmeny BAC 5, BAC 24 a BAC 21 byly testovány na jednonukleotidové polymorfismy (SNP) pomocí "Illumina MD linkage panel". Tento panel zahrnuje 881 SNPů polymorfních mezi kmeny B6 a 129. Vzorky DNA kmenů (5 µg) byly odeslány do Servisní laboratoře funkční genomiky a bioinformatiky na Ústavu molekulární genetiky AVČR, v.v.i. Výsledky odhalily, že pozadí všech třech kmenů je skutečně vyčištěné od DNA ze 129 kmene. U každého kmene se pouze jedna oblast lišila od B6 kmene, což naznačuje, že tyto úseky mohou obsahovat integrační místo transgenů. Tyto úseky dosahovaly u kmene BAC 5 délky mezi 6-13 Mb (3 SNP), u BAC 21 mezi 2-7 Mb (1 SNP) a u BAC 24 mezi 6-9 Mb (2 SNP). Oblasti ležely u kmene BAC 5 a BAC 21 ve dvou různých částech chromozomu 13 a u BAC 24 na chromozomu 6.

4.1.1.2 Záložní linie

S testováním a křížením se také pokračovalo u vedlejších linií, které sloužily jako záloha v případě ztráty hlavní linie transgenů díky stoupajícímu B6 homozygotnímu genetickému pozadí. Tyto linie vznikaly přerušením kongenizace v počátečních generacích zpětného křížení a dále se křížili už jen potomci ze stejných vrhů (inbreeding). Tabulka 5 ukazuje počet dosažených generací těchto záložních linií.

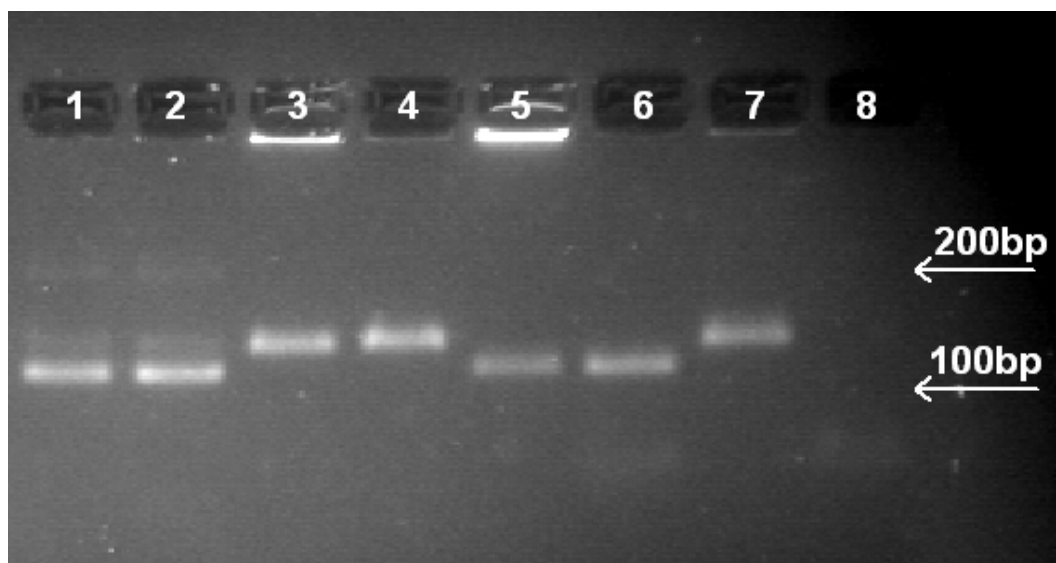
Tabulka 5: Počet dosažených generací záložních linií.

F -generace inbreedingu	
BAC 5	F19
BAC 21	F12
BAC 24	F2

4.1.1.3 Odečítání genotypů

Na obrázku 6 je příkladný snímek agarózového gelu, se dvěma transgen- pozitivními a dvěma negativními vzorky myši DNA a způsob odečítání genotypů. Odečítání probíhalo na základě délkového polymorfismu mikrosatelitového markeru CH07, který je společný pro všechny tři BAC transgeny. Délka pozitivního PCR produktu je 119 bp a délka negativního je 147 bp.

Obrázek 6: Produkty PCR reakce s CH07 primery na 4,5% agarózovém gelu obarveném etidium bromidem.



1-4 testované myši, 5-8 kontroly. Jako pozitivní kontroly pro transgen byla použita genomová DNA z kmene C3H (50 ng templátu, dráha 5) a izolovaný BAC 5 (50 pg templátu, dráha 6). Jako transgen-negativní kontrola sloužila genomová DNA z kmene B10 (50 ng templátu, dráha 7). V dráze číslo 8 je ještě kontrola kontaminace, kde nebyla do reakce přidána žádná DNA.

4.2 Fenotypizace

V rámci hledání dalších fenotypů byly na vybraných genotypovaných myších v průběhu šlechtění kongenních kmenů prováděny pitvy za účelem měření hmotnosti jednotlivých orgánů a tkání. Nefenotypizovali jsme myši záložních linií. Celkově bylo vypitváno 200 zvířat. Získané hodnoty spolu s genotypem a stářím myši byly katalogizovány a následně rozřazeny do jednotlivých srovnávacích skupin.

Výsledky analýzy dat fenotypizace jsou zobrazeny v tabulkách 6-16 po jednotlivých srovnávacích skupinách. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami (SO) v porovnání mezi transgeny a příslušnými kontrolami (většinou jejich transgen-negativní sourozenci) a statistická signifikance.

4.2.1 Tabulky s výsledky

Popisky a zkratky použité v tabulkách:

BAC 5+, 21+ a 24+ * označení genotypu myší obsahujících transgen

BAC 5-, 21- a 24- * označení genotypu negativních kontrol (bez transgenu)

* číslo v závorce za označením genotypu představuje počet zvířat daného genotypu v analýze

Wttest statistická signifikance; P hodnota Welschova t-testu

BW hmotnost těla (body weight) udávaná v gramech

GON hmotnost gonadální tukové tkáně v miligramech

TES hmotnost varlat (testes) v miligramech

LIV hmotnost jater (liver) v miligramech

HRT hmotnost srdce (heart) v miligramech

BAT hmotnost hnědé tukové tkáně (brown adipose tissue) v miligramech

SM hmotnost stehenního svalu (skeletal muscle) v miligramech

G/BW normalizace hmotnosti gonadálního tuku k hmotnosti těla

T/BW normalizace hmotnosti varlat k hmotnosti těla

L/BW normalizace hmotnosti jater k hmotnosti těla

H/BW normalizace hmotnosti gonadálního tuku hmotnosti těla

B/BW normalizace hmotnosti gonadálního tuku k hmotnosti těla

S/BW normalizace hmotnosti svalu k hmotnosti těla

Tabulka 6: Pitevní data 66 - 67 dnů starých samců kmene BAC 5

	BAC 5- (8)		BAC 5+ (9)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	24,18	1,77	23,01	1,66	0,211
GON	433,88	71,44	382,00	50,44	0,134
G/BW	17,95	2,71	16,59	1,61	0,270
TES	193,25	10,19	176,00	13,17	0,012
T/BW	8,01	0,33	7,70	0,86	0,360
LIV	1071,25	146,88	966,89	121,67	0,160
L/BW	44,17	3,81	42,08	4,76	0,360
HRT	158,75	11,07	140,00	19,46	0,037
H/BW	6,59	0,47	6,07	0,59	0,076
BAT	71,75	10,79	65,22	9,26	0,233
B/BW	2,97	0,40	2,85	0,48	0,621
SM	171,50	21,34	161,00	10,41	0,264
S/BW	7,09	0,66	7,01	0,40	0,792

Tabulka 7: Pitevní data 66 - 67 dnů starých BAC 21 samců

	BAC 21- (7)		BAC 21+ (5)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	18,27	2,81	21,48	1,62	0,046
GON	239,86	36,98	295,60	22,18	0,014
G/BW	13,14	0,56	13,79	0,98	0,270
TES	153,00	15,25	175,40	21,91	0,122
T/BW	8,45	0,56	8,16	0,78	0,541
LIV	843,14	111,75	1036,40	102,28	0,020
L/BW	46,51	4,61	48,21	2,53	0,471
HRT	93,00	9,20	112,20	15,64	0,070
H/BW	5,15	0,54	5,21	0,47	0,861
BAT	45,86	5,22	48,00	6,16	0,584
B/BW	2,57	0,47	2,24	0,27	0,188
SM	132,57	34,45	170,60	22,50	0,061
S/BW	7,15	0,80	7,93	0,68	0,135

Tabulka 8. Pitevní data 208 - 211-denních samců kmene BAC 21

	BAC 21- (9)		BAC 21+ (12)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	28,29	1,30	28,89	1,86	0,417
GON	565,22	154,87	532,08	201,09	0,690
G/BW	19,88	4,92	18,18	5,76	0,498
TES	193,00	14,51	199,83	15,23	0,334
T/BW	6,83	0,53	6,95	0,71	0,690
LIV	1241,22	102,90	1291,33	112,09	0,326
L/BW	43,88	3,07	44,74	3,24	0,563
HRT	159,89	29,21	176,33	42,68	0,332
H/BW	5,65	0,99	6,07	1,32	0,433
BAT	74,67	14,26	77,25	28,78	0,800
B/BW	2,65	0,56	2,64	0,82	0,970
SM	215,89	9,80	207,25	24,60	0,308
S/BW	7,64	0,25	7,16	0,61	0,033

Tabulka 9. Pitevní data 130-denních samců BAC 5

	BAC 5- (3)		BAC 5+ (5)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	19,30	1,31	21,54	1,75	0,139
GON	256,33	36,72	292,60	26,76	0,300
G/BW	13,22	0,98	13,60	0,79	0,663
TES	155,67	28,77	187,20	19,88	0,258
T/BW	8,00	0,92	8,69	0,57	0,410
LIV	1100,33	29,32	1169,40	56,41	0,096
L/BW	57,17	2,31	54,54	3,72	0,331
HRT	119,33	1,70	117,20	9,68	0,689
H/BW	6,21	0,38	5,47	0,53	0,105
BAT	49,67	0,94	52,00	4,05	0,326
B/BW	2,59	0,21	2,42	0,20	0,416
SM	134,00	18,02	161,20	11,96	0,152
S/BW	6,92	0,53	7,50	0,34	0,258

Tabulka 10: Pitevní data 130 dnů starých BAC 5 samců a B6 kontrol

	BAC 5- (4)		BAC 5+ (4)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	25,48	0,28	26,15	1,04	0,346
GON	348,00	45,29	398,00	76,85	0,377
G/BW	13,65	1,68	15,17	2,67	0,440
TES	178,00	8,57	189,50	15,31	0,311
T/BW	6,99	0,33	7,28	0,86	0,615
LIV	1295,50	70,46	1418,25	107,53	0,157
L/BW	50,84	2,47	54,16	2,14	0,130
HRT	153,00	22,15	175,50	31,88	0,359
H/BW	6,00	0,85	6,70	1,14	0,431
BAT	68,50	11,10	63,75	11,37	0,623
B/BW	2,69	0,44	2,42	0,34	0,443
SM	192,25	26,84	204,75	14,31	0,511
S/BW	7,54	0,97	7,83	0,44	0,657

Tabulka 11: Pitevní data 67 dnů starých samic BAC 21

	BAC 21- (5)		BAC 21+ (6)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	17,64	0,42	17,03	1,21	0,333
GON	170,60	43,70	211,50	43,98	0,199
G/BW	9,66	2,39	12,35	2,05	0,111
LIV	785,60	48,65	748,00	110,15	0,515
L/BW	44,52	2,17	43,69	3,89	0,698
HRT	98,40	10,48	82,33	8,03	0,038
H/BW	5,57	0,49	4,83	0,25	0,036
BAT	76,80	28,98	45,67	7,74	0,098
B/BW	4,33	1,58	2,67	0,35	0,104
SM	147,40	42,89	127,50	13,25	0,415
S/BW	8,36	2,43	7,47	0,30	0,508

Tabulka 12: Pitevní data 67 dnů starých samic BAC 21 a B6 kontrol

	B6 a BAC 21- (5 a 5)		BAC 21+ (6)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	17,88	0,72	17,03	1,21	0,195
GON	173,10	32,21	211,50	43,98	0,125
G/BW	9,69	1,80	12,35	2,05	0,037
LIV	869,70	96,92	748,00	110,15	0,068
L/BW	48,59	4,52	43,69	3,89	0,056
HRT	110,70	15,03	82,33	8,03	4x10⁻⁴
H/BW	6,18	0,75	4,83	0,25	3x10⁻⁴
BAT	62,70	24,98	45,67	7,74	0,084
B/BW	3,51	1,39	2,67	0,35	0,117
SM	136,10	32,89	127,50	13,25	0,502
S/BW	7,62	1,88	7,47	0,30	0,819

Tabulka 13: Pitevní data 66 - 68 dnů starých myší BAC 24

	BAC 24- (9)		BAC 24+ (5)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	21,24	2,35	22,23	1,14	0,348
GON	312,67	63,50	234,40	64,74	0,083
G/BW	14,65	1,91	10,48	2,60	0,028
TES	163,89	9,41	138,60	14,22	0,019
T/BW	7,77	0,57	6,23	0,47	0,001
LIV	1099,22	124,24	1106,00	189,19	0,950
L/BW	51,76	1,87	49,64	7,29	0,597
HRT	130,33	26,48	130,60	16,45	0,983
H/BW	6,08	0,77	5,85	0,47	0,533
BAT	58,44	5,81	64,00	11,45	0,403
B/BW	2,77	0,29	2,86	0,41	0,700
SM	155,11	24,24	153,60	9,91	0,881
S/BW	7,28	0,47	6,91	0,33	0,144

Tabulka 14: Pitevní data 67 - 72 dnů starých samců (PWD x BAC 5) s negativními kontrolami (PWD x BAC 24)

	BAC 24- (7)		BAC 5+ (5)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	22,56	1,91	19,60	1,27	0,015
GON	263,86	58,69	153,80	31,20	0,003
G/BW	11,65	2,12	7,85	1,43	0,007
TES	52,14	4,12	156,20	8,52	2x10⁻⁶
T/BW	2,33	0,25	8,02	0,82	8x10⁻⁵
LIV	1387,71	162,71	1131,00	74,87	0,008
L/BW	61,51	5,37	57,74	2,01	0,155
HRT	144,14	14,14	153,40	11,07	0,275
H/BW	6,40	0,45	7,84	0,55	0,003
BAT	61,14	10,06	48,40	3,88	0,022
B/BW	2,70	0,31	2,48	0,25	0,241
SM	180,57	19,63	151,00	13,04	0,017
S/BW	8,00	0,42	7,72	0,63	0,462

Tabulka 15: Pitevní data 254 - 264 dnů starých myší (PWD x BAC 21)

	BAC 21- (5)		BAC 21+ (6)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	40,26	8,27	50,28	3,63	0,071
GON	1714,20	773,81	2683,83	333,61	0,065
G/BW	40,25	13,04	53,29	4,66	0,117
TES	61,20	3,92	57,00	1,15	0,098
T/BW	1,61	0,47	1,14	0,08	0,111
LIV	1781,00	358,86	2391,00	317,87	0,028
L/BW	44,31	2,74	47,37	2,91	0,141
HRT	160,40	25,07	198,83	21,11	0,041
H/BW	4,06	0,49	3,96	0,37	0,749
BAT	201,20	62,69	192,83	44,72	0,828
B/BW	4,88	0,91	3,87	1,05	0,156
SM	197,80	38,76	156,50	42,81	0,164
S/BW	5,03	0,97	3,11	0,82	0,014

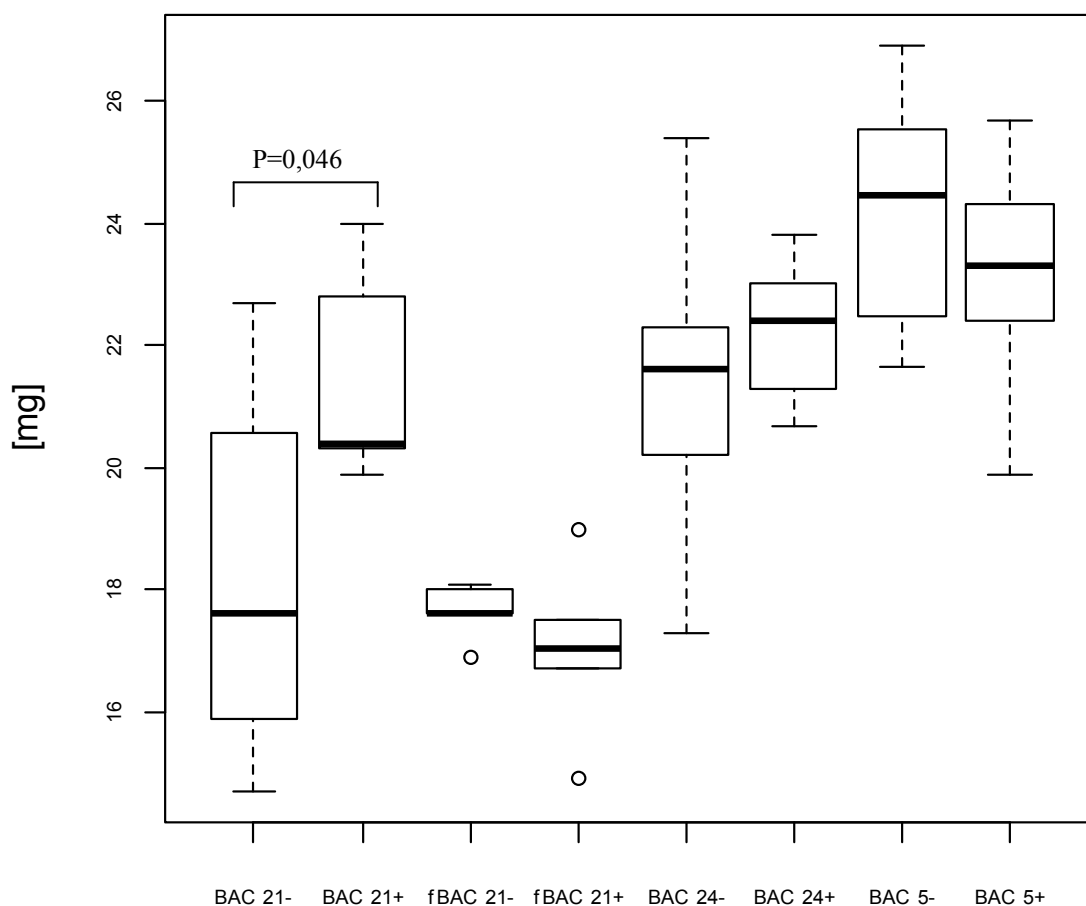
Tabulka 16: Pitevní data 66 - 72 dnů starých samců (PWD x BAC 24)

	BAC 24- (12)		BAC 24+ (11)		Wttest
	průměr	SO	průměr	SO	
BW	22,47	1,59	26,20	4,64	0,032
GON	297,67	105,34	478,18	220,09	0,033
G/BW	13,16	4,25	17,50	5,49	0,059
TES	54,67	4,90	194,45	34,07	1x10⁻⁷
T/BW	2,45	0,29	7,44	0,57	3x10⁻¹³
LIV	1308,25	178,16	1661,64	470,27	0,044
L/BW	58,16	6,41	64,52	8,47	0,081
HRT	143,00	14,35	164,91	35,00	0,088
H/BW	6,36	0,45	6,31	0,63	0,839
BAT	64,00	14,07	109,09	51,40	0,021
B/BW	2,83	0,51	3,97	1,28	0,022
SM	168,83	22,86	179,55	47,08	0,524
S/BW	7,51	0,85	6,82	1,02	0,106

4.2.2 Grafické znázornění nejdůležitějších výsledků

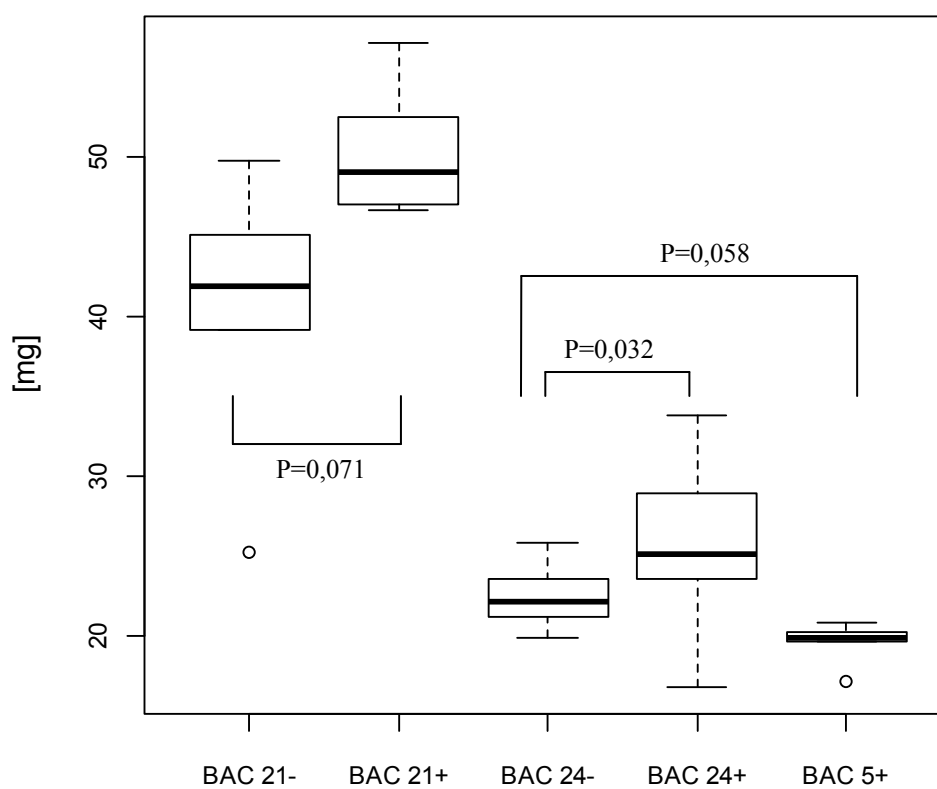
Vybrané statisticky signifikantní výsledky a jejich srovnání s ostatními BAC transgeny jsou vyneseny do krabicových (boxplot) grafů (graf 3-10).

Graf 3: Srovnání celkové hmotnosti těla u dvouměsíčních BAC 5, BAC 21 a BAC 24 samců a BAC 21 samic (viz tabulka 6, 7, 11 a 13)

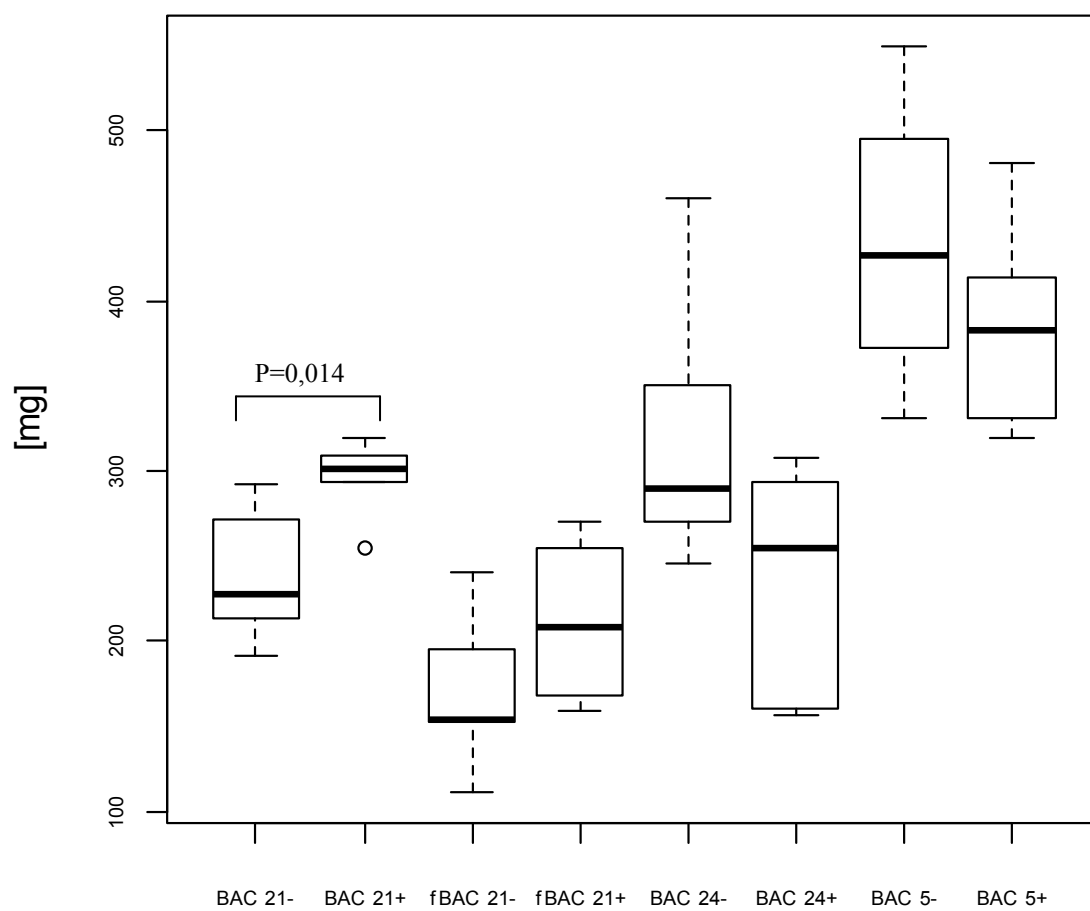


Popis krabicového grafu (boxplot): Tlustá čára reprezentuje medián, čáry obdélníku 25% kvantilu a 75% kvantilu, slabé čáry minimum a maximum, ale pouze v případě, že nejsou odlehlá pozorování (znázorněná kolečky).

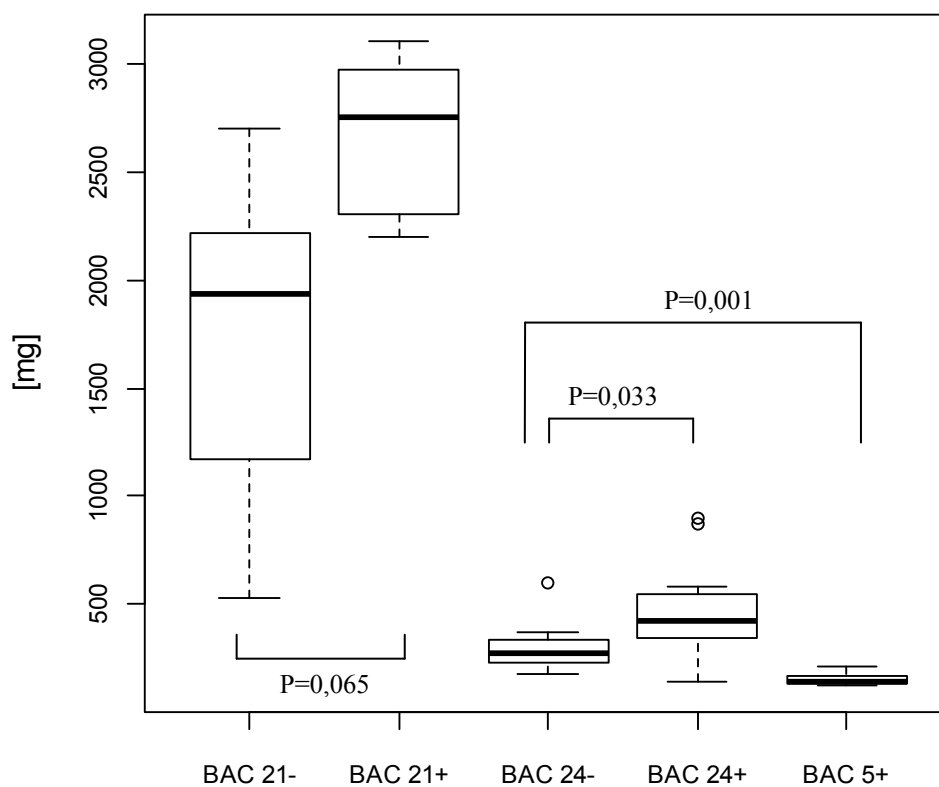
Graf 4: Srovnání celkové hmotnosti těla u 254 - 264 denních (PWD x BAC 21), 67 denních (PWD x BAC 5), a 66 - 72 denních (PWD x BAC 24) hybridních samců (viz tabulky 14, 15 a 16)



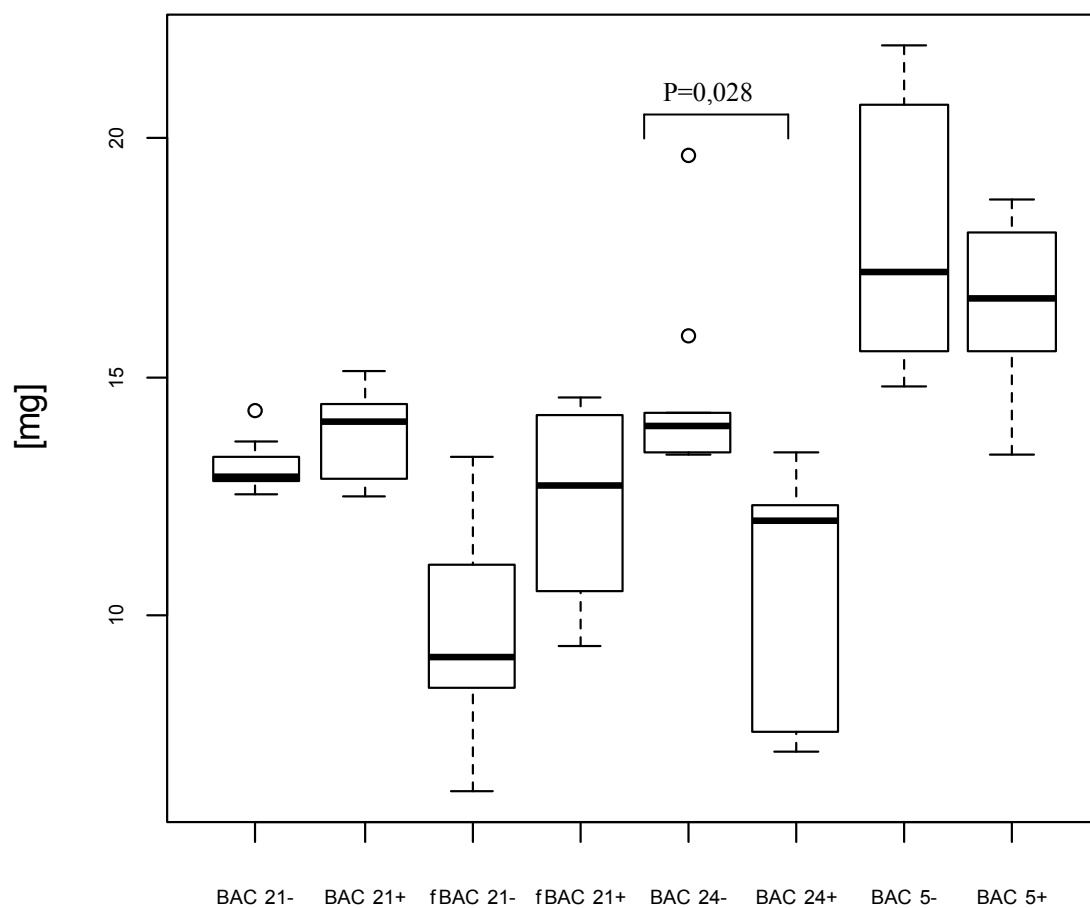
Graf 5: Srovnání hmotnosti gonadálního tuku u dvouměsíčních BAC 5, BAC 21 a BAC 24 samců a BAC 21 samic (viz tabulky 6, 7, 11 a 13).



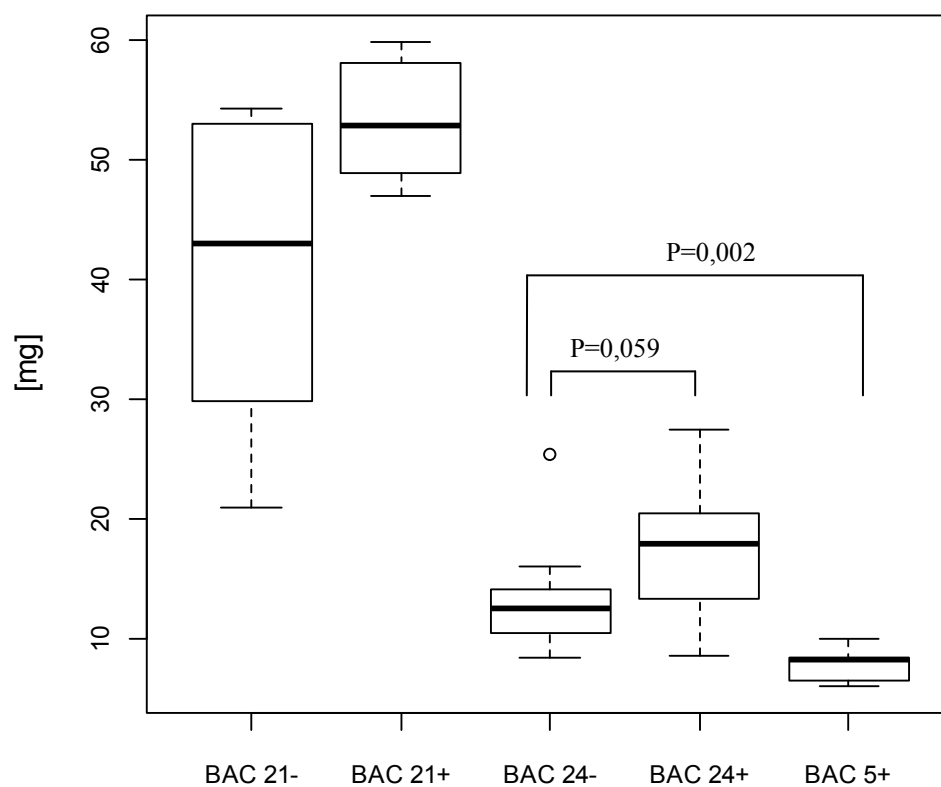
Graf 6: Srovnání hmotnosti gonadálního tuku u 254 - 264 denních (PWD x BAC 21), 67 denních (PWD x BAC 5), a 66 - 72 denních (PWD x BAC 24) hybridních samců (viz tabulky 14, 15 a 16).



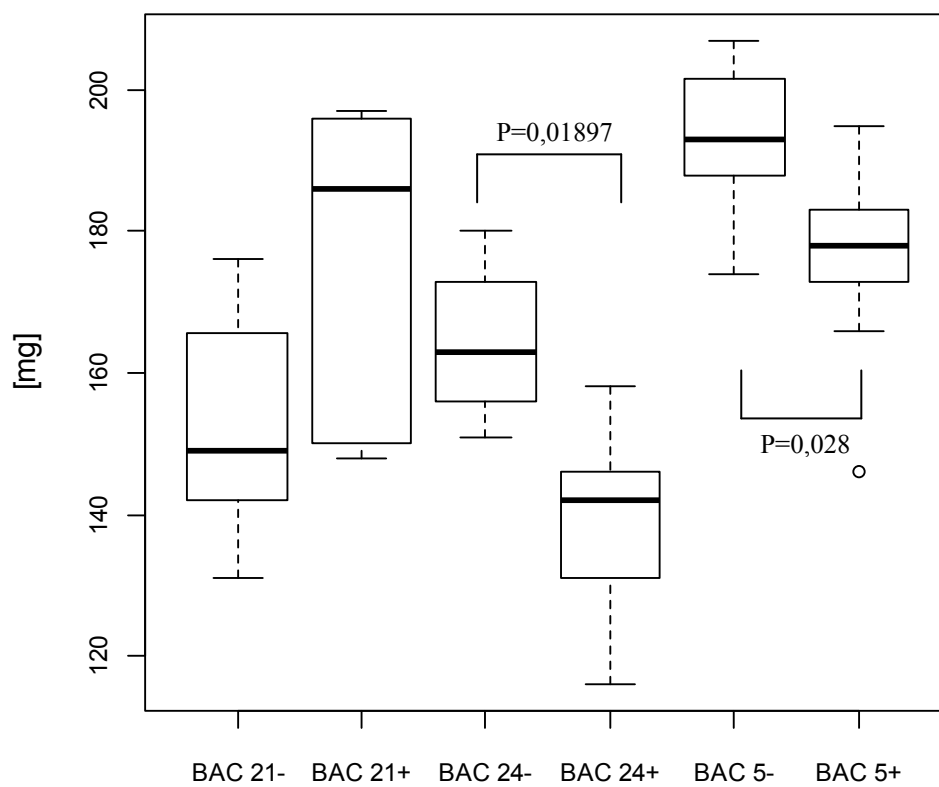
Graf 7: Srovnání hmotnosti gonadálního tuku normalizované na celkovou hmotnost těla u dvouměsíčních BAC 5, BAC 21 a BAC 24 samců a BAC 21 samic (viz tabulky 6, 7, 11 a 13).



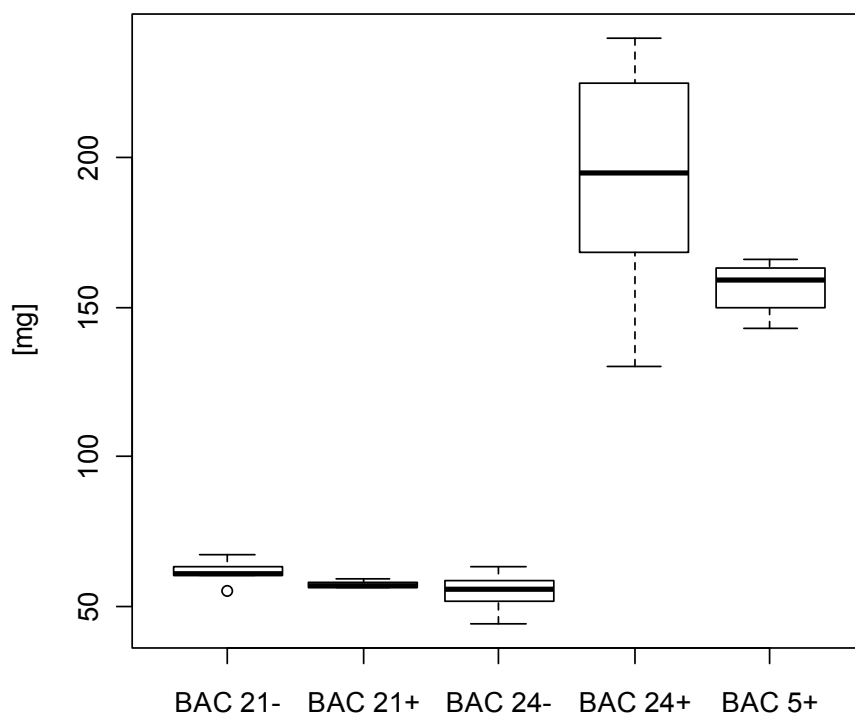
Graf 8: Srovnání hmotnosti gonadálního tuku normalizované k celkové hmotnosti těla u 254 - 264 denních (PWD x BAC 21), 67 denních (PWD x BAC 5), a 66 - 72 denních (PWD x BAC 24) hybridních samců (viz tabulky 14, 15 a 16).



Graf 9: Srovnání hmotnosti varlat u dvouměsíčních BAC 5, BAC 21 a BAC 24 samců (viz tabulky 6, 7 a 11).



Garf 10: Srovnání hmotnosti varlat u 254 - 264 denních (PWD x BAC 21), 67 denních hybridů (PWD x BAC 5), a 66 - 72 denních (PWD x BAC 24) hybridů (viz tabulky 14, 15 a 16).



4.2.2.1 Shrnutí výsledků fenotypizace

Z uvedených výsledků vyplývá, že se nám u všech tří transgenních linií podařilo předběžně nalézt alespoň jeden nový fenotyp.

U dvouměsíčních kongenních BAC 5 transgenů se podařilo nalézt signifikantní rozdíly ve váze varlat a srdce; tato signifikance se v obou případech ztratila po normalizaci hodnot na celkovou váhu tělu.

Po křížení s inbredním kmenem PWD se podle očekávání projevil fenotyp hybridní sterility a s tím spojená vysoce signifikantní redukce hmotnosti varlat u netransgenních control. Navíc přibyly statisticky významné rozdíly v hmotnosti těla, obou typů tukové tkáně i po normalizaci na váhu těla, váhy jater a stehenního svalu.

V rámci linie BAC 21 transgenů se podařily stanovit především signifikantní rozdíly v hmotnosti srdce, které se pak potvrdily i u samic téhož kmene, kde se navíc jeví rozdílná i hmotnost gonadálního tuku.

PWD hybridy BAC 21 rovněž vykazovaly změny hmotnosti srdce a navíc hmotnosti jater a stehenního svalu. U všech tří znaků se významnost ztrácí po normalizaci na celkovou váhu těla.

V analýze BAC 24 linie se ukázal statisticky významný pokles hmotnosti varlat u transgen pozitivních myší a také signifikantní rozdíly v hmotnosti gonadální tukové tkáně normalizované k váze těla. Dále se podařilo sestavit dostatečně velkou srovnávací skupinu u (PWD x BAC 24) kříženců. Tato skupina odhalila mimo fenotypu hybridní sterility také statisticky významné rozdíly v hmotnosti těla, obou typů tukové tkáně a jater.

5 DISKUZE

5.1 Kongenizace transgenních linií

Pro přípravu kongenních kmenů existují různé přístupy a modifikace, které lze kombinovat podle potřeb a možností experimentátora. V naší situaci, kdy byl cíl stabilizovat transgeny, se jako nejvýhodnější jevil klasický neurychlený postup - naplnění deseti-generačního protokolu zpětných křížení. Přestože to nebyl původní záměr, použitím tohoto klasického protokolu jsme také získali větší soubor zvířat pro fenotypizaci.

Selekce probíhala testováním zvířat na přítomnost transgenů pomocí mikrosatelitového markeru společného všem třem BAC transgenům. V tomto smyslu byl náš zvolený způsob selekce obdobný jako v několika publikovaných pracích, např. zaměřených na studium SLE. Jako modely této nemoci byly vytvářeny kongenní kmeny, kde byly pomocí genetických markerů přeneseny konkrétní lokusy zapříčiňující některé projevy choroby na pozadí rezistentního kmene (např. Morel *et al.*, 1996, 1997).

V našem případě sice byl k dispozici fenotyp hybridní sterility, ale pro jeho vyjádření by se musela připustit každá testovaná myš s kmenem PWD a čekalo by se na první projevy sterility u potomků. Takovýto způsob selekce by byl velmi přesný, ale nejevil se ekonomicky ani časově výhodný. V rámci širšího projektu hybridní sterility se ovšem skutečně transgen-pozitivní myši z jednotlivých generací zpětných křížení připouštěly pro získání PWD hybridů potřebných pro navazující experimenty. Tímto způsobem byla přímo ověřována přítomnost genu *Prdm9*, a tak i celistvost BAC transgenů u jednotlivých linií.

Velmi důležitý faktor práce s kongeny byl výběr recipientního kmene. V této diplomové práci, stejně jako ve většině případů u studia SLE padla volba na standardní inbrední kmen B6. V obou případech bylo důležité, že kmen B6 je hojně využívaný, dostupný a velmi dobře prostudovaný kmen, s kompletně osekvenovaným genomem. Je tudíž k dispozici široký výběr různých typů genetických markerů nezbytných například pro marker-asistovanou reprodukci nebo pro možnost zúžení přenášeného segmentu. Co se týká budoucího potenciálu využití námi vyprodukovaných kongenních kmenů, za zmínku stojí množství expresních a

proteomických analýz provedených na tomto kmenu, což například znamená, že jakákoliv eventuelní změna je s největší pravděpodobností zapříčiněna přenesenými geny, či jejich interakcí s genetickým pozadím (Laporte *et al*, 2003).

Byla také provedena analýza SNPů polymorfních pro B6 a 129 kmene, která ukázala, že pozadí všech tří kmenů je skutečně zbavené DNA ze 129 kmene. Pouze jedna oblast u každého kmene (obsahující jeden až tři SNPy) se liší od B6 kmene, což naznačuje, že tyto oblasti obsahují integrační místo transgenu (jsou selektované). Alternativním vysvětlením je, že tyto oblasti jsou nespecifické (neselektované, nevyčištěné) a SNPy kolem skutečných integračních míst nebyly detekovány, protože se transgen integroval do B6 části genetické informace F1 embryonálních buněk (B6 x 129). Polymorfní SNPy byly u všech tří kmenů v heterozygotním stavu, i když jsme pro kmene BAC21 a BAC5 použili myši, které jsou podle křížení homozygotní pro transgen. Tyto oblasti ovšem stále mohou být integračními místy, protože myši dávající vznik těmto homozygotům mohli mít různě dlouhé 129 úseky obklopující integrační místo. Tyto úseky se tedy mohou přesahovat, tzn. vytvářet heterozygotní oblasti. Hypotéza integračních míst v místech SNPů může být potvrzena mapováním integračních míst pomocí *in situ* DNA hybridizace na metafázových chromozomech nebo přetestováním DNA myši z předchozích generací kongenizace či záložních linií na mikrosatelitový marker polymorfní mezi B6 a 129 a specifický pro heterozygotní místo na chromozomu.

5.2 Záložní linie

Jako vedlejší produkt přípravy kongennů byly vytvořeny také další rekombinantní linie obsahující jednotlivé transgeny, z čehož jedna je již téměř inbredizována 19 generacemi. Jejich genetické pozadí představuje rekombinantní směs B6 a 129 DNA. Konkrétní poměr B6 a 129 genetické informace jednotlivých linií se liší v závislosti na počtu zpětných křížení na B6, které proběhly než se začalo s inbreedingem, tedy se vzájemným křížením sourozenců. Obecně lze tento poměr odhadnout výpočtem $(1/2)^{BC+1}$, kde BC je počet zpětných křížení. BAC 5 záložní linie se začala šlechtit hned zpočátku paralelně z prvními zpětnými kříženími, a její genetická informace je tak tvořena z 50% B6 a z 50% 129. Záložní linie BAC 21 vycházela ze třetí generace kongenizace (po druhém BC2, respektive N3) a poměr tak činí 12,5% B6 a 87,5% 129. U záložní linie BAC 24 byla situace složitější v souvislosti se zhoršenou

schopnosti reprodukce, která se stupňovala s postupnou inbredizací. Původní záložní linii se nepodařilo udržet a tak byla vytvořena nová zkřížením sedmé generace zpět na kmen 129, ve snaze zlepšit zpět reprodukční schopnosti. Riziko ztráty kongenní linie bylo totiž také vysoké, i když způsobené jiným faktorem (stoupání podílu B6 genetické informace).

V budoucnu se mohou tyto linie využít k podrobnějšímu zkoumání vlivu genetického pozadí na jednotlivé transgeny, např. mapování modifikátorů genu *Prdm9* křížením BAC 24 na B6 a sledování plodnosti.

5.3 Fenotypizace

Celý proces kongenizace si vyžádal velké množství zvířat pro testování a připouštění, což poskytlo možnost získat pitevnická data z celkem velké skupiny zvířat. Na druhou stranu, protože zvířata nebyla chována *ad hoc* pro hledání fenotypů, ale pro šlechtění tří kongenních linií, vznikla tak variabilita v genetickém pozadí a věku myši.

V této práci jsme zanedbali vliv změny sterilizace krmení (autoklávování na ozařování), ke které došlo během dubna a května roku 2008.

Důležité bylo také zvolit vhodné statistické zpracování pitevnických dat. V rámci prevence před vědomou či nevědomou manipulací s daty byl zvolen Welchův t-test a jen v případě více odlehlých pozorování byla P hodnota potvrzena Wilcoxonovým testem.

V rámci přípravy kongenů byly větší požadavky na počet samic pro jednotlivá křížení, protože samci mohou oplodnit více samic najednou. Z tohoto důvodu byly v dostatečném množství k dispozici samice pouze u kmene BAC 21, protože se velice snadno a rychle rozmnožoval. PWD hybridní vznikaly především pro navazující širší experimenty k projektu hybridní sterility. K dispozici byli pouze samci, samice se z ekonomických důvodů vůbec neudržovaly, a proto nemáme žádná data z fenotypizace PWD hybridních samic.

Obecně vzato jsme u většiny srovnávacích skupin ze všech tří transgenních linií našli signifikantní rozdíly. Hlavní část analýzy ovšem spočívala ve správné interpretaci dat, v kombinování jednotlivých výsledků a jejich vkládání do širší vzájemné souvislosti.

Očekávaný výsledek poskytlo srovnání hmotnosti varlat. U PWD hybridů se podle předpokladu projevil fenotyp hybridní sterility jako výrazné snížení hmotnosti varlat pod 75 miligramů (graf 10), což je kritická hranice pro plodnost těchto hybridů (Forejt a Iványi, 1975). Zajímavé srovnání je hmotnost varlat u čistých kongenů, kde se ukázaly signifikantní změny mezi všemi BAC transgenními liniemi a jejich negativními kontrolami (graf 9). Rozdíl byl i ve smyslu změn, kdy BAC 21 pozitivní zvířata vykazovala signifikantně vyšší hmotnost varlat než negativní kontroly a naopak BAC 5 a BAC 24 pozitivní myši měly významně nižší hmotnost varlat proti jejich negativním kontrolám. BAC 24 pozitivní myši vykazovaly zdaleka nejnižší hmotnost varlat i ve srovnání se všemi ostatními transgen-pozitivními či negativními zvířaty. Jak je popsáno v kapitole literárního přehledu, BAC 5 a 24 obsahují na rozdíl od BACu 21 gen hybridní sterility *Prdm9*. Navíc, jak bylo publikováno (Mihola *et al.*, 2009), transgen BAC 24 se integroval v šesti kopiích na rozdíl od BACů 5 a 21, které jsou integrovány pouze ve dvou kopiích. Ve stejné publikaci (Mihola *et al.*, 2009) bylo dále uvedeno, že tato zvýšená dávka *Prdm9* genu způsobuje na pozadí PWD hybridů zvýšenou hmotnost varlat a zvýšené množství spermií. Tato fakta korelují se zkušenostmi ze šlechtění těchto linií, protože BAC 21 se rozmnožuje nejlépe, zatímco BAC 24 má dlouhodobé reprodukční potíže, které zapříčinily celkové zpoždění kongenizace této linie. Výsledky analýzy pitevnických dat tedy dále potvrzují významnou roli genu *Prdm9* v regulaci hmotnosti varlat úzce související s plodností.

Zaměřili jsme se také na podrobnější analýzu srovnání výsledků u hmotnost těla a gonadálního tuku. Celková hmotnost těla na PWD pozadí byla signifikantně změněna pouze u linie BAC 24, nicméně zbývající dvě transgenní linie BAC 5 a 21 byly také na hranici statistické významnosti (graf 4). Na pozadí B6 se tato změna slabě projevila pouze u linie BAC 21 (graf 3). Obdobné výsledky mohou být pozorovány i ve srovnání hmotnosti gonadálního tuku (graf 5 a 6). Zdá se tedy, že tyto změny jsou způsobeny především interakcí s PWD genetickým pozadím. Velmi významný výsledek je signifikantní snížení hmotnosti gonadálního tuku u linie BAC 5, a to i po normalizaci na celkovou hmotnost těla, která byla také na hranici statistické významnosti (graf 8 a 7). Tyto výsledky normalizace naznačují, že myši jsou celkově spíše hubenější nežli menší. Můžeme tedy předpokládat, že BAC 5 na PWD pozadí způsobuje statisticky výraznou ztrátu tuku. Tyto výsledky tak potvrdily

původní hypotézu, kvůli které jsme s pitvami a fenotypizací začínali, že gen *Pgcc1* se účastní tvorby tukové tkáně. Gen *Pgcc1* je totiž v kompletní formě obsažen pouze v BACu 5.

Poměrně častou signifikantní odlišností byla dále změna hmotnosti srdce. Ve srovnání výsledků analýz hmotnosti srdce pro více srovnávacích skupin a jednotlivé BAC transgeny se nám však zatím nepodařilo najít širší souvislosti. Stojí za úvahu i fakt, že během pitvy se srdce sice jeví jako dobře definovaný orgán, ale mohou nastat problémy s kompletním odstraněním krve, což má u tolik prokrveného orgánu významný vliv na celkovou hmotnost. Musíme tedy počítat i s možností, že výsledná variabilita může být větší než pro jiné orgány.

Podobně jako u hmotnosti srdce jsme nacházeli signifikantní rozdíly ve hmotnosti jater. Smysl změn byl v částečné shodě se změnami gonadálního tuku, takže příčinou by opět mohl být gen *Pgcc1*, protože v játrech probíhají důležité procesy v rámci hospodaření a celkového nakládání organismu s tuky. Velikost (hmotnost) tohoto metabolického orgánu je však často závislá na celkové váze těla a nalezené rozdíly se po normalizaci ve většině případů ztrácely, což znamená, že změna velikosti jater je úměrná změně velikosti těla.

Všechny tyto fenotypické znaky mohou být ovšem ovlivněny interakcemi vícero genů, genetického pozadí v místě integrace a negenetickými i vnějšími faktory, což vyžaduje další podrobnější analýzy a zvýšení počtu sledovaných zvířat. Tato předběžná analýza nám tedy spíše napověděla, na které fenotypy se máme v budoucnu podrobněji zaměřit.

6 ZÁVĚR

Převod transgenů na B6 pozadí jako výchozí cíl práce je hotov u všech tří transgenních linií. Pouze u linie BAC 24 zbývá určit homozygotní jedince pro přenášený segment. Po eliminaci tohoto teoreticky posledního heterozygotního úseku v genomu příbuzenským křížením bude plně stabilizována i tato kongenní linie.

Fenotypizace přinesla výsledky pro všechny tři transgenní linie, ať už čistě kongenní nebo na PWD genetickém pozadí. Analýza získaných fenotypů přinesla částečně očekávané prohloubení důkazů určujících gen *Prdm9* jako významný článek ve vývoji a funkci reprodukčních schopností samců. Díky této předběžné komplexní analýze se také může do budoucna soustředit úsilí na další konkrétní nalezené signifikantní změny a dále tak potvrdit a do větší hloubky prozkoumat nové fenotypy a jejich determinaci geny obsaženými v jednotlivých BAC transgenních liniích.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

B/BW	normalizace váhy gonadálního tuku váze těla
B10	kmen C57BL/10
B6	kmen C57BL/J6
BAC 5-, 21- a 24-	označení genotypu negativních kontrol (bez transgenu)
BAC 5+, 21+ a 24+	označení genotypu myši obsahujících transgen
BAC	bacterial artificial chromosome
BAT	váha hnědé tukové tkáně (brown adipose tissue) v miligramech
BW	váha těla (body weight) udávaná v gramech
G/BW	normalizace váhy gonadálního tuku k váze těla
GON	váha gonadální tukové tkáně v miligramech
H/BW	normalizace váhy gonadálního tuku váze těla
HLA	human leukocyte antigen
HRT	váha srdce (heart) v miligramech
IDDM	insulin-dependent diabetes melitus
L/BW	normalizace váhy jater k váze těla
LIV	váha jater (liver) v miligramech
MHC	major histocompatibility complex
<i>Mmd</i>	<i>Mus musculus domesticus</i>
<i>Mmm</i>	<i>Mus musculus musculus</i>
NOD	non-obese diabetic
P	aritmetický průměr
PCR	polymerase chain reaction
QTL	quantitative trait loci

S/BW	normalizace váhy svalu k váze těla
SM	váha stehenního svalu (skeletal muscle) v miligramech
SNP	single nucleotide polymorphism
SO	směrodatná odchylka
T/BW	normalizace váhy varlat k váze těla
TES	váha varlat (testes) v miligramech
TMGs	tumor modifying genes
Wttest	statistická signifikance; P hodnota Welschova t-testu

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adorini, L., Gregori, S., Harrison, L., C., (2002): Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends in molecular medicine*. 8: 31 – 38.
- Al-Saktawi, K., McLaughlin, M., Klugmann, M., (2003): Genetic background determines phenotypic severity of the Plp rumpshaker mutation. *J Neurosci Res*. 72: 12 - 24.
- Armstrong, N., J., Brodnicki, T., C., Speed, T., P., (2006): Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains. *Mammalian genome*. 17: 273 - 287.
- Atencio, S., Amano, H., Izui, S. and Kotzin, B. (2004): Separation of the New Zealand Black genetic contribution to lupus from New Zealand Black-determined expansions of marginal zone B and B1a cells. *J. Immunol*. 172: 4159 – 4166.
- Ballester, M., Castello, A., Ibanez, E., Saanchez, A., Folch, J., M. (2004): Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques*. 37: 610 - 613.
- Behringer, R., (1998): Supersonic congenics?, *Nature genetics*. 18: 108.
- Bennett, B., Johnson, T., E., (1998): Development of congenics for hypnotik sensitivity to ethanol by QTL-marker-assisted counter selection. *Mammalian genom*. 9: 969 – 974.
- Bolivar, V.,J., Cook, M.,N., Flaherty, L. (2001): Mapping of quantitative trait loci with knockout/congenic strains. *Genome Res*. 11: 1549 - 1552.
- Croker, B., Gilkeson, G. and Morel, L. (2003): Genetic interactions between susceptibility loci reveal epistatic pathogenesis networks in murine lupus. *Genes Immun*. 4: 575 – 585.

- Demant, P., Hart, A., A., (1986): Recombinant congenic strains-a new tool for analyzing genetic trakte determined by more than one gene. *Immunogenetics*. 24: 416 – 422.
- Dobzhansky, T. (1951): Experiments on sexual isolation in *Drosophila*: X. reproductive isolation between *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis* under natural and under laboratory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 37: 792 - 796.
- Drake, C., G., Babcock, S., K., Palmer, E., Kotzin, B., L. (1994): Genetic analysis of the NZB contribution to lupus-like autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 4062 – 4066.
- Drake, C., G., Rozzo, S., J., Hirschfeld, H., P., Smamworawong, N., P., Palmer, E. a Kotzin, B., L. (1995): Analysis of the NZB contribution to lupus-like renal disease: multiple genes that operate in a threshold manner. *J. Immunol*. 154: 2441 - 2447.
- Eisener-Dorman, A., F., Lawrence, D., A., Bolivar, V., J. (2009): Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? *Brain Behav Immun*. 23: 318 -324.
- Fleming, R.,E., Holden, C.,C., Tomatsu, S., (2001): Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in Hfe knockout model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 2707 - 2711.
- Forejt, J. (1996): Hybrid sterility in the mouse. *Trends Genet* 12: 412 – 417
- Forejt, J., Iványi, P. (1975): Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genetical Research*. 24: 189 – 206.
- Goodwin, N., C., Ishida, Y., Hartford, S., Wnek, C., Bergstrom, R., A., Leder, P., Schimenti, J., C. (2001): DelBank: a mouse ES-cell resource for generating deletions. *Nat Genet*. 28: 310 - 311.

- Gregorová, S., Divina, P., Storchova, R., Trachtulec, Z., Fotopulosova, V., Svenson, K.,L., Donahue, L.,R., Paigen, B., Forejt, J. (2008): Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Res.* 18: 509 – 515.
- Haldane, J., B., S. (1922): Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *Journal of Genetics.* 12: 101 - 109.
- Haurogne, K., Bach, J.,M., Lieubeau, B. (2007): Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis. *Transgenic Res.* 16: 127 - 131.
- Hayashi, K., Yoshida, K., Matsui, Y. (2005): A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature.* 17;438(7066): 374 - 378.
- Henry, T., Mohan C., (2005): Systemic lupus erythematosus - recent clues from congenic strains. *Arch Immunol Ther Exp.* 53: 207 – 212.
- Klein, J., (2001): George Snell's first forey into the unexplored territory of the major histocompatibility complex. *Genetics.* 159: 435 – 439.
- Knotek, Z., Chov a využití pokusných zvířat, Ediční středisko veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 1999.
- Kong, P., Morel, L., Croker, B. and Craft, J. (2004): The centromeric region of chromosome 7 from MRL mice (Lmb3) is an epistatic modifier of Fas for autoimmune disease expression. *J. Immunol.* 172: 2785 – 2794.
- Kono, D., H., Burhngame, R., W., Owens, D., Kurnmochi G., A., Balderas, R., S., Balomenos, D. and Theofilopoulos, A., N. (1994): Lupus susceptibility loci in New Zealand mice. *Proc. Nutl. Acad. Sci. USA.* 91: 1016 - 1018.
- Laporte, C., Ballester, B., Mary, C., Izui, S. and Reininger, L. (2003): The *Sgp3* locus on mouse chromosome 13 regulates nephritogenic gp70

autoantibody expression and predisposes to autoimmune. *J. Immunol.* 171: 3872 – 3877.

- Li, D., Kang, Q., Wang, D., M. (2007): Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ), a novel coactivator of PPAR γ that promotes adipogenesis. *Mol. endocrinol.* 21: 2320 – 2333.
- Love, J., M., Knight, A., M., McAleer, M., A., Todd, J., A., (1990): Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic acid research.* 18: 4123 – 4130.
- Markel, P., Shu, P., Ebeling, Ch., Carlson, G., A., Nagle, D., L., Smutko, J., S., Moore, K., J., (1997): Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics.* 17: 280 – 284.
- Masly, J., P., Jones, C., D., Noor, M., A., Locke, J., Orr, H., A. (2006): Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science.* 313: 1448 - 1450.
- Mihola, O., Forejt, J., Trachtulec, Z. (2007): Conserved alternative and antisense transcripts at the programmed cell death 2 locus. *BMC Genomics.* 18;8:20.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, C., Forejt, J. (2009): A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science.* 323: 373 - 375.
- Mitrecic, D., Huzak, M., Curlin, M., Gajovic, S. (2005): An improved method for determination of gene copy numbers in transgenic mice by serial dilution curves obtained by real-time quantitative PCR assay. *J Biochem Biophys Methods.* 31;64: 83 - 98.
- Mohan, C., Morel, L., Yang, P., Watanabe, H., Croker, B., Gilkeson, G. and Wakeland, E. (1999): Genetic dissection of lupus pathogenesis: a recipe for nephritogenic autoantibody. *J. Clin. Invest.* 103: 1685 – 1695.

- Montagutelli, X. (2000): Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol.* 11: 5101 - 5105.
- Montagutelli, X., Abitbol, M. (2004): Applications of congenic strains in the mouse. *Med Sci.* 20: 887 - 893.
- Morel, L., Blenman, K., Croker, B. and Wakeland E. (2001): The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, *Sle1*, is a cluster of functionally related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 1787 – 1792.
- Morel, L., Croker, B., Blenman, K., Mohan, C., Huang, G., Gilkeson, G. and Wakeland, E. (2000): Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathogenesis with polycongenic murine strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6670 – 6675.
- Morel, L., Mohan, C., Yu, Y., Croker, B., Tian, N., Deng, A. and Wakeland, E. (1997): Functional dissection of systemic lupus erythematosus using congenic mouse strains. *J. Immunol.* 158: 6019 – 6028.
- Morel, L., Rudofsky, U., H., Longmate, J., Schiffenbauer, A., J., Wakeland, E., K. (1994): Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 1: 219 – 229.
- Morel, L., Yu, Y., Blenman, K., Caldwell, R. and Wakeland, E. (1996): Production of congenic mouse strains carrying genetic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain. *Mamm. Genome.* 7: 335 – 339.
- Müllerová, J., Hozák, P., (2004): Use of recombinant congenic strains in mapping disease-modifying genes. *News physiol sci.* 19: 105 – 109.
- Nadeau, J., H., (2001): Modifier genes in mice and humans. *Nature reviews. Genetics.* 2: 165 – 174.

- Orr, H., A., Irving, S. (2005): Segregation distortion in hybrids between the Bogota and USA subspecies of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 169: 671 - 682.
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P., Y., Frengen, E., Mammoser, A., G., Catanese, J., J., Hayashizaki, Y., de Jong, P., J. (2000): Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res*, 10: 116 - 128.
- Perez, D., E., Wu, C., I., Johnson, N., A., Wu. M., L., (1993): Genetics of reproductive isolation in the *Drosophila simulans* Clade: DNA marker-assisted mapping and characterization of a hybrid-male sterility gene, *Odysseus* (Ods). *Genetics*. 133: 261 – 275.
- Peters, L., L., Robledo, R., F., Bult, C., J., Churchill, G., A., Pangen, B., J., Svenson, K., L., (2007): The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis, *Nature reviews. Genetics*. 8: 58 – 69.
- Petkov, P.,M., Ding, Y., Cassell, M.,A., Zhang, W., Wagner, G., Sargent, E.,E., Asquith, S., Crew, V., Johnson, K.,A., Robinson., P., Scott., V.,E., Wales, M.,V., (2004): An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome research*. 14: 1806 – 1811.
- Paigen, K., (2003): One hundred years of mouse genetics: an intellectual history, *Genetics*. 163: 1 – 7.
- Qiu, J., Ogus, S., Mounzih, K., (2001): Leptin-deficient mice backcrossed to BALB/cJ genetic background have reduced adiposity, enhanced fertility, normal body temperature, and severe diabetes. *Endocrinology*. 142: 3421 - 3425.
- Reifsnyder, P., C., Leiter, E., H. (2002): Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabesity) in mice. *Diabetes*. 51: 825 - 832.
- Reifsnyder, P., C., Liter, E., H., (2002): Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabesity) in mice. *Diabetes*. 51: 825 – 832.

- Rigby, R., Rozzo, S., Boyle, J., Lewis, M., Kotzin, B. and Vyse, T. (2004a): New loci from New Zealand Black and New Zealand White on chromosomes 4 and 12 contribute to lupus-like disease in the context of BALB/c. *J. Immunol.* 172: 4609 – 4617.
- Rigby, R., Rozzo, S., Gill, H., Fernandez-Hart, T., Morley, B., Izui S., Kotzin, B. and Vyse, T. (2004b): A novel locus regulates both retroviral glycoprotein 70 and anti-glycoprotein 70 antibody production in new zealand mice when crossed with BALB/c. *J. Immunol.* 172: 5078 – 5085.
- Rogner, U., C., Avner, P., (2004): Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nature reviews. Immunology* 3: 243 – 252.
- Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Watanabe, S., Sato, M., Shindo, T. (2008): Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res.* 17: 149 - 155.
- Shitara, H., Sato, A., Hayashi, J., Mizushima, N., Yonekawa, H., Taya, C. (2004): Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res.* 13: 191 - 194.
- Silver, L.,M., *Mouse genetics, concepts and applications*, Oxford University press, 1995.
- Staats, J., (1980): Standardized nomenclature for inbred strains of mice: seventh listing. *Cancer research.* 40: 2083 – 2128.
- Tesson, L., Heslan, J., M., Menoret, S., Anegon, I. (2002): Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res.* 11: 43 - 48.
- Theofilopoulos, A., N., Dixon, F., J. (1985): Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.* 37: 269 – 390.

- Theofilopoulos, A., N., Prud'Homme, G., J., Dixon, F., J. (1985): Autoimmune aspects of systemic lupus erythematosus. *Concepts Immunopathol.* 1: 190 - 218.
- Ting C.-T., Tsaur, S., Wu, M., Wu, C. (1998): A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science.* 282: 1501 – 1504.
- Trachtulec, Z., Mňuková-Fajdelová, M., Hamvas, R. M. J., Gregorová, S., Mayer, W. E., Lehrach, H. R., Vincek, V., Forejt, J., Klein, J. (1997): Isolation of candidate Hybrid sterility 1 genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse Chromosome 17. *Mammalian Genome.* 8: 312 – 316.
- Trachtulec, Z., Vlcek, C., Mihola, O., Gregorova, S., Fotopulosova, V., Forejt, J. (2008): Fine haplotype structure of a chromosome 17 region in the laboratory and wild mouse. *Genetics.* 178: 1777 - 1784.
- Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., Longmate, J., (1997): Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking), *Imunnology today.* 18: 472 - 477.
- Waters, S., McDuffie, M., Bagavant, H., Deshmukh, V., Gaskin, F., Jiang, C., Tung, K. and Fu, S. (2004): Breaking tolerance to double stranded DNA, nucleosomes, and other nuclear antigens is not required for the pathogenesis of lupus glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 199: 255 – 264.
- Waterson, R., H., (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genom. *Nature* 420: 520 - 562.
- Xie, S. and Mohan, C., (2004): Divide and conquer – the power of congenic strains. *Clin. Immunol.* 110: 109 – 111.