

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



**Eliška Škaloudová**

Geny časně meiotické profáze I spermatogeneze myši domácí  
Genes of early meiotic prophase I of spermatogenesis in house mouse

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Zdeněk Trachtulec, Ph.D.

Praha, 2013



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2013

.....  
Eliška Škaloudová

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Zdeňku Trachtulcovi, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost a cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu v průběhu celého studia.

## Abstrakt

Meiotickým dělením vznikají gamety nutné pro reprodukci sexuálně se rozmnožujících organismů. Tato práce je zaměřena na popis genů časné fáze meiotického dělení, a to u samců modelového organismu myši domácí. První část práce souhrnně popisuje meiózu s hlubším zaměřením na profázi I, která trvá déle než profáze II. Profáze I se dělí na pět stádií, jmenovitě leptotenní, zygotenní, pachytenní, diplotenní a diakinetické. Dále je stručně popsána myši spermatogeneze a její rozdíly oproti oogenezi. Druhá část práce podává výčet genů, kódujících proteiny nutné k iniciaci meiotického dělení, k párování a synapsi a k iniciaci katalýzy dvouřetězcových zlomů. Dvouřetězcové zlomy jsou opraveny procesem homologní rekombinace, která může vyústit v tzv. crossing-over, což je hlavní zdroj genetické variability. Práce se zabývá časnou fází homologní rekombinace a složkami pro tento proces nezbytnými. Umístění meiotických dvouřetězcových zlomů v genomu není náhodné a je pod kontrolou genu *Prdm9*, který patrně zastává více rolí, například při vzniku nových poddruhů myši domácí. Znalost genů, kontrolujících ranou fázi meiotického dělení, je nezbytná k pochopení některých příčin neplodnosti nejen u myši, ale i u jiných obratlovců včetně člověka.

**Klíčová slova:** meióza, myš domácí, sterilita, homologní rekombinace, dvouřetězcové zlomy, synaptonemální komplex, kohezinový komplex, hotspot, *Prdm9*

## Abstract

Meiosis is an essential cellular process that is necessary for gamete formation in all sexually reproducing organisms. This work is focused on the description of the genes of early stages of meiotic division in males of a mammalian model, the house mouse. The first part summarizes meiosis focusing on prophase I, which is longer than prophase II. Prophase I is divided into five stages, namely leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, and diakinesis. Mouse spermatogenesis and its differences from oogenesis are also briefly described. The second part provides a list of genes encoding proteins required for initiation of meiotic division, pairing and synapses of chromosomes, and initiation of the catalysis of double-strand breaks. Double-strand breaks are repaired by homologous recombination, which may result in so-called crossing-over, the major source of genetic variability. The work deals with the early stage of homologous recombination and components required for this process. Localization of meiotic double-strand breaks in the genome is not random and is under the control of the *Prdm9* gene, which seems to take multiple roles, such as the formation of new subspecies of the house mouse. Knowledge of the genes controlling the early stages of meiotic division is a prerequisite to understanding some of the causes of infertility, not only in the mouse but also in other vertebrates, including humans.

**Keywords:** meiosis, house mouse, homologous recombination, double strand breaks, synaptonemal complex, cohesin complex, hotspot, *Prdm9*

## Seznam použitých zkratk

$\gamma$ H2AX	fosforylace histonu H2AX na serinu 139 (fosforylation of histone <b>H2AX</b> on serine 139)
ATM	proteinkináza, jejíž mutace v příslušném genu způsobuje autozomálně recesivní chorobu Ataxia telangiectasia ( <b>A</b> taxia <b>T</b> elangiectasia <b>M</b> utated)
ATR	ataxia telangiectasia a Rad3 příbuzný protein ( <b>A</b> taxia <b>T</b> elangiectasia and <b>R</b> ad3 related protein)
AE	osový element ( <b>A</b> xial <b>E</b> lement)
BLM	helikáza, jehož mutace v příslušném genu způsobuje autozomálně recesivní Bloomův syndrom ( <b>B</b> Loo <b>M</b> syndrome protein)
BRCA1, BRCA2	protein rakoviny prsu 1, resp. 2 ( <b>B</b> Reast <b>C</b> ancer <b>1</b> , resp. <b>2</b> )
CE	centrální element ( <b>C</b> entral <b>E</b> lement)
CO	crossing-over ( <b>C</b> rossing- <b>O</b> ver)
CYP26b1	cytochrom P450, rodiny 26, podrodiny, polypeptid 1 ( <b>C</b> Ytochrome <b>P</b> 450, family <b>26</b> , subfamily <b>B</b> , polypeptide <b>1</b> )
DMC1	supresor dávky mck1 proteinu; homolog <i>S. cerevisiae</i> (homolog of yeast <b>D</b> osage suppressor of <b>M</b> Ck1)
<i>Dsbc1</i>	<i>kontrolní lokus dvouřetězcových zlomů 1</i> ( <b>D</b> ouble-strand-break control <b>1</b> )
DSBR	oprava dvouřetězcových zlomů ( <b>D</b> ouble- <b>S</b> trand- <b>B</b> reak <b>R</b> epair)
EN	časný uzlík ( <b>E</b> arly <b>N</b> odule)
FKBP6	fujimicin K506 vázající protein ( <b>F</b> ujimicin <b>K</b> 506 <b>B</b> inding <b>P</b> rotein)
HORMAD1, HORMAD2	HORMA ( <b>H</b> Op1p, <b>R</b> ev7p a <b>M</b> AD2 vázající) doménu obsahující protein 1, resp. 2 ( <b>H</b> ORMA <b>D</b> omain containing protein <b>1</b> , resp. <b>2</b> )
H3K4me3	trimethylace lysinu 4 na histonu H3 (tri( <b>3</b> )methylation of lysine ( <b>K</b> ) <b>4</b> of histone <b>H3</b> )
<i>Hst1</i>	gen <i>hybridní sterility 1</i> ( <b>H</b> ybrid <b>S</b> terility <b>1</b> )
KRAB	Krüppel-přidružený box ( <b>K</b> Rüppel- <b>A</b> ssociated <b>B</b> ox)
LE	laterální element ( <b>L</b> ateral <b>E</b> lement)
MEI1	defekt meiózy 1 ( <b>M</b> EIosis defective <b>1</b> )
MEI4	specifický pro meiózu 4 ( <b>M</b> EIosis-specific <b>4</b> homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))
Meisetz	faktor indukující meózu a obsahující PR/SET doménu a tandem zinkových prstů ( <b>M</b> eiosis induced factor containing PR/ <b>S</b> ET domain and <b>z</b> ing-finger motif)
MLH1,MLH3	homolog mutL <i>E.coli</i> proteinu 1, resp. 3 ( <b>M</b> ut <b>L</b> protein <b>H</b> omolog of <i>E. coli</i> <b>1</b> , resp. <b>3</b> )
MSCI	inaktivace meiotických pohlavních chromozómů ( <b>M</b> eiotic <b>S</b> ex <b>C</b> hromosome <b>I</b> nactivation)
MSH4, MSH5	homolog mutS <i>E.coli</i> proteinu 4, resp.5 ( <b>M</b> ut <b>S</b> protein <b>H</b> omolog of <i>E. coli</i> <b>4</b> , resp. <b>5</b> )

MSUC	umlčení nesynapsovaných meiotických chromozómů ( <b>M</b> eiotic <b>S</b> ilencing of <b>U</b> nsynapsed <b>C</b> hromosomes)
MUS81	kyselina methansulfonová, UV citlivý 81 ( <b>M</b> ethansulfonate, <b>U</b> V Sensitive <b>81</b> )
NANOS2	homolog proteinu Nanos <i>Drosophily melanogaster</i> 2 ( <b>N</b> ANOS homolog of <i>Drosophila melanogaster</i> <b>2</b> )
NCO	bez crossing-overu ( <b>N</b> on- <b>C</b> rossing- <b>O</b> ver)
PR/SET domain	pozitivně regulační doména/Su( <i>var</i> )3-9, zesilovač zeste, Trithorax doména ( <b>P</b> ositive <b>R</b> egulatory/ <i>Su</i> ( <i>var</i> )3-9, <b>E</b> nhancer-of-zeste, <b>T</b> rithorax <b>d</b> omain)
PRDM9	protein obsahující PR doménu 9 ( <b>P</b> R <b>D</b> omain containing protein <b>9</b> )
RA	kyselina retinová ( <b>R</b> etionic <b>A</b> cid)
RAD21, RAD21L	mutant citlivý na radiaci 21 a jemu podobný ( <b>R</b> ADiation-sensitive mutant <b>21</b> , resp. <b>L</b> ike)
RAD51	rekombináza RAD51, homolog RecA <i>E.coli</i> a RAD51 <i>S.cerevisiae</i> ( <b>R</b> AD51 homolog (RecA homolog, <i>E. coli</i> ) ( <i>S. cerevisiae</i> ))
<i>Rcr1</i>	<i>regulátor rekombinace 1</i> ( <b>R</b> ecombination <i>regulator 1</i> )
REC8, REC114	rekombinační protein 8, resp. 114 ( <b>R</b> ECombination protein 8, resp 114)
RN	rekombinační uzlík ( <b>R</b> ecombination <b>N</b> odule)
RPA	replikační protein A ( <b>R</b> eplication <b>P</b> rotein <b>A</b> )
SC	synaptonemální komplex ( <b>S</b> ynaptonemal <b>C</b> omplex)
SDSA	syntéza závislá na výměně komplementárních řetězců DNA ( <b>S</b> ynthesis- <b>D</b> eendent <b>S</b> trand- <b>A</b> nnealing)
SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ ,	podpůrný protein chromozómu 1 $\alpha$ , resp. 1 $\beta$ ( <b>S</b> tructural <b>M</b> aintenance of <b>C</b> hromosomes <b>1</b> $\alpha$ , <b>1</b> $\beta$ , )
SMC3	podpůrný proteiny chromozómu 3 ( <b>S</b> tructural <b>M</b> aintenance of <b>C</b> hromosomes <b>3</b> )
SPO11 $\alpha$ , SPO11 $\beta$	isoforma $\alpha$ , resp. $\beta$ homologní kvasinkovému sporulačnímu proteinu Spo11 (homolog of yeast <b>S</b> PORulation protein <b>11</b> $\alpha$ , resp. <b>11</b> $\beta$ )
SSDS	sekvenování jednořetězcové DNA ( <b>S</b> ingle- <b>S</b> trand <b>D</b> N <b>A</b> <b>S</b> equencing)
STAG3	stromatem tvořený antigen 3 ( <b>S</b> Tromal <b>A</b> nti <b>G</b> en <b>3</b> )
STRA8	protein stimulovaný kyselinou retinovou ( <b>S</b> Timulated by <b>R</b> etionic <b>A</b> cid protein <b>8</b> )
SYCP1 – 3	protein synaptonemálního komplexu 1 – 3 ( <b>S</b> Ynaptonemal <b>C</b> omplex <b>P</b> rotein <b>1</b> – <b>3</b> )
SYCP2t	zkrácený protein synaptonemálního komplexu 2 ( <b>S</b> Ynaptonemal <b>C</b> omplex <b>P</b> rotein <b>2</b> , truncated)
SYCE1 – 3	protein centrálního elementu synaptonemálního komplexu 1 – 3 ( <b>S</b> Ynaptonemal complex <b>C</b> entral <b>E</b> lement <b>1</b> – <b>3</b> )
TEX12, TEX15	protein exprimovaný ve varlatech 12, resp. 15 ( <b>T</b> estis <b>E</b> Xpressed protein <b>12</b> , resp. <b>15</b> )
TF	transverzální vlákno ( <b>T</b> ransverzal <b>F</b> ilament)
TN	přechodný uzlík ( <b>T</b> ransitional <b>N</b> odule)
TRIP13	protein interagující s thyroïdním receptorem 13 ( <b>T</b> hyroid <b>R</b> eceptor- <b>I</b> nteracting <b>P</b> rotein <b>13</b> )

# Obsah

## Abstrakt

## Seznam použitých zkratek

<b>1 Úvod</b>	7
<b>2 Meióza</b>	8
2.1 Meióza I	9
2.1.1 Profáze I	9
2.1.1.1 Leptotenní stádium	9
2.1.1.2 Zygotenní stádium	9
2.1.1.3 Pachytenní stádium	10
2.1.1.4 Diplotenní stádium	11
2.1.1.5 Diakineze	12
2.1.2 Metafáze I, Anafáze I, Telofáze I	12
2.2 Meióza II	12
2.3 Význam meiózy	12
<b>3 Spermatogeneze</b>	13
3.1 Mitóza spermatogonií	13
3.2 Meióza spermatocytů	13
3.3 Spermiogeneze spermatid	14
3.4 Hlavní rozdíly mezi spermatogenezí a oogenezí	15
<b>4 Geny kontrolující vstup spermatocytů do meiózy</b>	16
<b>5 Geny kódující podjednotky synaptonemálního komplexu</b>	17
5.1 Kohezinový komplex axiálního elementu	17
5.1.1 SMC ( <i>Structural Maintenance of Chromosomes</i> )	17
5.1.2 Ostatní složky kohezinového komplexu	18
5.2 Strukturní podjednotky synaptonemálního komplexu	21
5.2.1 Axiální/laterální element	21
5.2.2 Transverzální vlákna	22
5.2.3 Centrální element	23
5.3 Regulace synapse a transkripční umlčení genů	24
<b>6 Geny časné fáze homologní rekombinace</b>	26
6.1 Katalýza tvorby dvouřetězcových zlomů	28
6.2 Oprava dvouřetězcových zlomů a rekombinačních meziproductů	29
6.3 Kontrola umístění dvouřetězcových zlomů	31
<b>7 Závěr</b>	36
<b>Seznam použité literatury</b>	38
<b>Příloha</b>	45



# 1 Úvod

Výzkumem meiotického dělení se zabývají vědci již od poloviny 19. století. Lékař Rudolf Virchow tehdy vyslovil revoluční myšlenku *omnis cellula e cellula*, tedy všechny buňky, které tvoří tělo živočicha nebo rostliny, vznikají opakovaným dělením buňky mateřské, a ne spontánně z mezibuněčné hmoty, jak se předpokládalo. Frázi v roce 1882 přeformuloval Walther Flemming na *omnis nucleo e nucleo*, čímž zdůraznil, že hlavní roli při vzniku nových buněk hraje jádro buňky mateřské. V té samé době zkoumal německý zoolog Oscar Hertwig buněčné dělení při tvorbě pohlavních buněk ježovek. Tento unikátní děj se od běžného buněčného dělení (mitózy) liší tím, že mezi dvěma po sobě následujícími děleními nedochází k obnově jaderného materiálu a výsledné buňky v jádře obsahují jen jeho polovinu. V roce 1905 byl tento děj pojmenován jako redukční dělení neboli meióza (z řec. *meioun* – zmenšení). Hlavní význam meiotického dělení byl znám ještě před jeho pojmenováním díky biologovi Augustu Weismannovi (Hertwig, 1895; Petronczki *et al.*, 2003). Většina mnohobuněčných organismů tvoří tělní a pohlavní buňky. V tělních buňkách probíhá výhradně mitóza, zatímco pohlavní buňky (gamety) vznikají meiózou buněk zárodečných. Gamety ve svých jádrech nesou dědičnou informaci a v procesu oplození, kdy dochází ke spojení samčích a samicích gamet a vzniku nového jedince, ji přenesou do další generace (Snustad & Simmons, 2009). Zmíněný historický výčet je jen opravdovou špičkou ledovce výzkumu meiotického dělení a po více jak 100 letech není zcela objasněn.

Buněčné dělení je tak složitý proces, že jen nastínění rozdílů mezi meiózou a mitózou vydalo již na několik knih. Ve své bakalářské práci se zaměřím na samčí meiotickou profázi I modelového organismu myši domácí. Hlavním cílem je shrnout poznatky o genech kódujících proteiny účastnící se časné meiotické profáze I, v první řadě fází leptotene a zygotene. Důraz budu klást na nejnovější objevy genů z posledních dvou dekad, jejichž fenotypovým projevem je zástava meiotického dělení, která vede nejčastěji ke sterilitě třeba právě samců myši domácí. Díky poměrně vysokému počtu homologních genů, které s tímto modelovým organismem sdílíme, mohou nabyté informace poskytnout nástroje k obraně proti civilizačním onemocněním, jako je například mužská neplodnost.

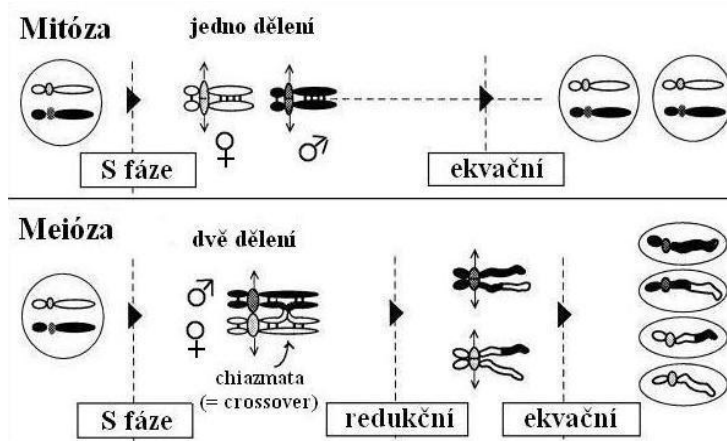
V první části této práce stručně popisují meiotické dělení a spermatogenezi. V druhé části práce pak hlavní funkce genů počátku meiotické profáze I. V příloze shrnuji ve formě tabulky všechny funkce zmíněných proteinových produktů těchto genů.

## 2 Meióza

Meióza je specializované buněčné dělení, které zajišťuje vznik gamet u všech sexuálně se rozmnožujících organismů (Petronczki *et al.*, 2003). Gamety jsou haploidní buňky vznikající v procesu gametogeneze (spermatogeneze, popř. oogeneze), kde pomocí meiózy dochází k redukci počtu chromozómů z diploidního ( $2n$ ) na haploidní ( $n$ ) počet. Meióza v sobě zahrnuje dvě buněčná dělení (meiózu I a meiózu II), z jedné buňky mateřské tak vzniknou čtyři buňky dceřiné. Bez meiózy by při oplození docházelo s každou novou generací ke zdvojnásobení počtu chromozómů, což by vzhledem ke kapacitě buněk bylo pro organizmus neúnosné (Snustad & Simmons, 2009).

Myš domácí (*Mus musculus*) nese v diploidních mateřských buňkách 20 párů chromozómů (19 párů autozómů a 1 pár gonozómů; Painter, 1928). Chromozómy jednoho páru se označují jako homologní (homology), jeden homolog pochází od otce a druhý od matky. Homology nesou stejné sady genů, které se však mohou lišit svou alternativní formou (alelou). Chromozómy různých párů se označují jako heterologní (heterology). V průběhu meiózy se homology navzájem těsně spojují, vznikají synapse a homologní rekombinace mezi homology, to je naprosto esenciální pro distribuci kompletní sady chromozómů do dceřiných buněk. Každá haploidní buňka tak obdrží právě jednoho homologa z každého páru (Petronczki *et al.*, 2003; Snustad & Simmons, 2009).

Před začátkem meiózy, stejně jako mitózy, dochází k duplikaci chromozómů procesem replikace DNA v tzv. S-fázi buněčného cyklu (obr. 1). Každý chromozóm se tak skládá ze dvou sesterských chromatid spojených centromerou. V meióze je každý homologní pár tvořen právě dvěma chromatidami mateřského a dvěma chromatidami otcovského původu, které jsou rozděleny do čtyř oddělených haploidních jader. Mezi meiózou I a meiózou II ale nedochází k další replikaci, čímž se docílí kýžené redukce genomu (Petronczki *et al.*, 2003; Zickler & Kleckner, 1998).



**Obrázek 1:** Porovnání mitotického a meiotického dělení. Převzato a upraveno z Zickler & Kleckner (1998).

## 2.1 Meióza I

První meiotické dělení, též označované jako heterotypické (redukční), je ve srovnání s druhým meiotickým (homotypickým; ekvačním) dělením delší a je charakteristické protáhlou profází I. Na konci meiózy I dochází k oddělení homologních chromozómů (Snustad & Simmons, 2009; Zickler & Kleckner, 1998).

### 2.1.1 Profáze I

Profáze I se dělí na pět stádií, která jsou označena termíny řeckého původu. Tato specifická jména jsou založena na cytologických znacích charakteristických pro danou fázi (Zickler & Kleckner, 1998).

#### 2.1.1.1 *Leptotenní stádium* (z řec. výrazu pro „tenká nit“)

Během leptotene začíná kondenzace duplikovaných chromozómů. Homologní chromozómy se k sobě volně přibližují a jednotlivé chromatidy mají tvar dlouhých nitkovitých vláken (Zickler & Kleckner, 1998). Mezi sesterskými chromatidami se formuje centrální osově vlákno bílkovinné povahy, které je později nutné pro synapsi homologů. Centrální osově vlákno nekopíruje celou délku chromatid, zárodky osového vlákna se tvoří s rozestupy a nakonec se spojí v jeden element, takže sesterské chromatidy jsou nuceny seskládat se do pravidelných smyček (Bolcun-Filas & Schimenti, 2012). Konce chromozómů se pomocí telomer přichycují k vnitřní jaderné membráně (tzv. fáze kytice; bouquet stage; shrnuto v Scherthan, 2007). Endonukleáza SPO11 (homolog of yeast sporulation protein 11) indukuje tvorbu dvouřetězcových zlomů, důležitých pro přesné nalezení homologních chromozómů a tvorbu synaptonemálního komplexu mezi homology (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000).

#### 2.1.1.2 *Zygotenní stádium* (z řec. výrazu pro „spojená vlákna“)

Jak již z názvu vyplývá, v této fázi dochází k velmi těsnému párování homologních chromozómů neboli synapsi. Pár sesterských chromatid je spojen centrálním osovým vláknem, axiálním elementem (AE), vytvořeným v leptotene. V zygotene jsou homologní chromozómy po celé své délce poutány k sobě právě axiálními elementy dvou párů sesterských chromatid. Mezi dvěma AE se tvoří třetí proteinový útvar tzv. centrální element (CE). Vše je propojeno příčnými spoji, transverzálními vlákny (TF), takže děj připomíná uzavírání zipu. Vzniklá struktura se nazývá synaptonemální komplex (SC; shrnuto v Heyting, 1996). V případě samčích gonozómů neboli heterochromozómů, se SC vytvoří o něco později pouze mezi homologními oblastmi chromozómu X a Y, v pseudoautozomálním regionu (Handel, 2004).

Na konci leptotene a v průběhu zygotene dochází v případě myších spermatocytů k formování tzv. časných rekombinačních uzlíků, jejichž počet podle všeho odpovídá počtu dvouřetězcových

zlomů, zatímco tzv. pozdní rekombinační uzlíky pozorované ve fázi diplotene odpovídají počtu a umístění crossing-overů (viz níže; Moens *et al.*, 2002). Z těchto údajů je patrné, že volné párování a rekombinace předchází synapsi. V minulosti se vědci domnívali, že právě zformování SC je nutné, aby homologní chromozómy mohly podstoupit rekombinaci, což bylo později vyvráceno několika pokusy na kvasinkách (Hawley & Arbel, 1993). V případě myši je funkční SC postradatelný při kohezi sesterských chromatid, tvorbě dvouřetězcových zlomů a v časně fázi rekombinace, ale je nezbytný pro vstup gametocytů do metafáze I (Kouznetsova *et al.*, 2011).

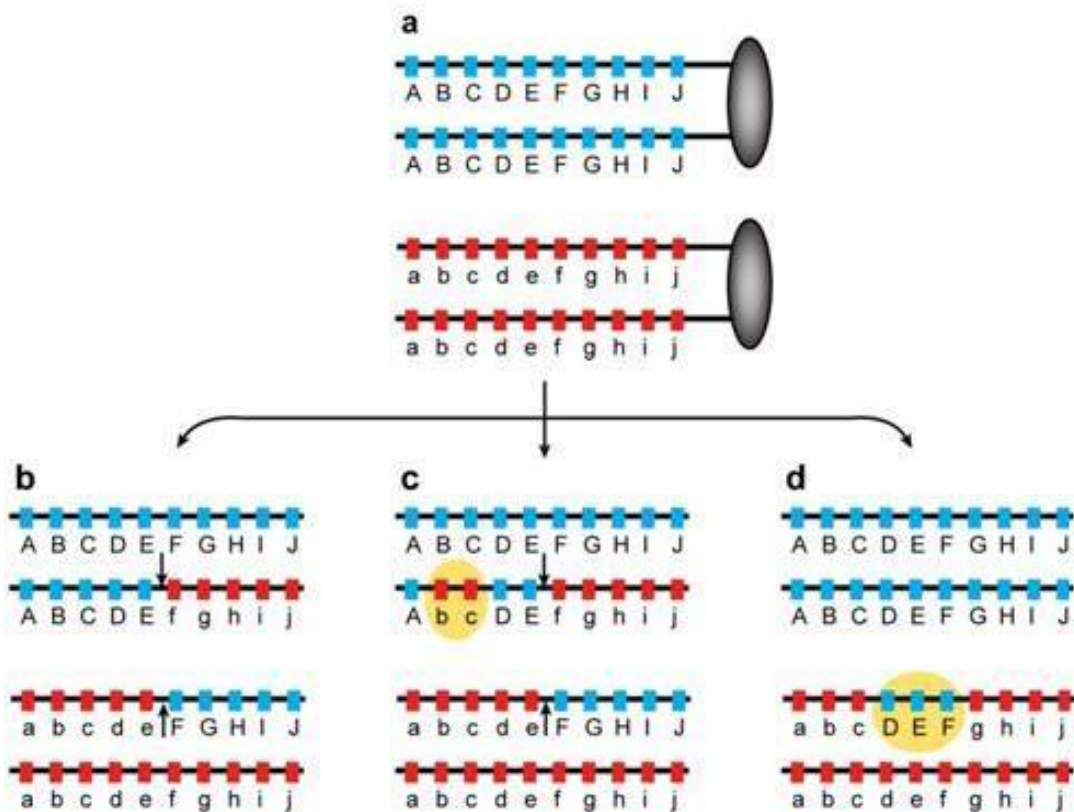
### **2.1.1.3 Pachytenní stádium** (z řec. výrazu pro „silná vlákna“)

V pachytene jsou chromozómy již maximálně kondenzovány a spárovány. Pokud počítáme spárované homology, nazýváme je bivalenty, v případě chromatid jsou to tetrády (Snustad & Simmons, 2009). V leptotene a zygotene došlo k navození dvouřetězcových zlomů (viz výše), které jsou v pachytene a pravděpodobně i o něco dříve opraveny pomocí homologní rekombinace, kdy se chromatidy v oblastech zlomů překříží, vymění si část své DNA a následně se opět spojí. Tento jev výměny úseků DNA se též nazývá jako crossing-over (CO) anebo non-crossing-over (NCO), podle výsledku homologní rekombinace. V rámci tetrády nastává překřížení v daném místě jen mezi dvěma chromatidami, zbývající chromatidy do procesu nezasahují. Výměna materiálu mezi sesterskými chromatidami je v meiotickém dělení potlačována (Snustad & Simmons, 2009; de Massy, 2003).

Mezi dva nejznámější modely oprav dvouřetězcových zlomů patří DSBR (double-strand-break repair) model a SDSA (synthesis-dependent strand-annealing) model. DSBR model byl navrhnut v roce 1983 Jackem W. Szostakem a jeho výsledkem je genová konverze a crossing-over (Snustad & Simmons, 2009). SDSA model aplikovali na meiotické dělení v roce 2001 Allers a Lichten. Tento způsob opravy také vede ke genové konverzi, avšak bez crossing-overu, tzv. non-crossing-over (Allers & Lichten, 2001). Při NCO tedy není genová konverze doprovázena reciprokou rekombinací sledovaných znaků, ale rodičovskou kombinací daných znaků. Genová konverze je patrně výsledkem opravné syntézy DNA, která rozpozná chybně zařazený nukleotid, vyštěpí ho a nahradí jej správným (obr. 2; de Massy, 2003). K CO, popř. k NCO dochází také v důsledku odlišného štěpení dvojité Hollidayovy struktury (tj. struktura, která vzniká při vytěsnění jednořetězcové smyčky (D-loop) a při současném zachycení druhého konce zlomu invazivním vláknem; viz kap. 6) Reciproká výměna (CO) nastane, pokud je jedno překřížení štěpeno horizontálně a druhé vertikálně, tedy při asymetrickém štěpení. NCO vzniká v případě symetrického štěpení (Allers & Lichten, 2001).

Distribuce CO na chromozómu není náhodná a na určitých místech označovaných jako „hotspots“ dochází k rekombinacím častěji než na jiných („coldspots“; Steinmetz *et al.*, 1982). Dvouřetězcové zlomy se častěji vyskytují v dobře přístupných oblastech chromatinu, tedy v chromatinových smyčkách, vedle promotorů a mimo axiální elementy. Výběr hotspotů je pravděpodobně ovlivněn epigenetickými modifikacemi, jelikož některá místa formování

dvouřetězcových zlomů jsou předem označena například trimethylací na lysinu 4 histonu H3 jak u kvasinek, tak u myši. (de Massy 2003; Buard *et al.*, 2009).



**Obrázek 2:** *Tři produkty homologní rekombinace.* (a) Sesterské chromatidy mateřského původu (červeně) a sesterské chromatidy otcovského původu (modře) tvoří dohromady jeden pár homologních chromozómů. Velká a malá písmena představují dva druhy alel, každé písmeno odpovídá jednomu lokusu. Zobrazený homologní pár je heterozygotní v každém z deseti lokusů. (b) Produkt meiotického dělení, který podstoupil homologní rekombinaci a byl opraven jako CO. Homologní pár je tvořen dvěma nerekombinovanými chromatidami (ABCDEF GHIJ a abcdefghij) a dvěma chromatidami, které navzájem podstoupily reciprokovou výměnu (ABCDEFghij a abcdefGHIJ). Výměna mateřských a otcovských alel proběhla mezi E/e a F/f (viz šipka). (c) Homologní rekombinace může být doprovázena genovou konverzí (žlutá oblast). Jedna z mateřských chromatid (donor) předá část svého řetězce jedné z otcovských chromatid (akceptor) v průběhu rekombinace (AbcDEFghij). Na rozdíl od CO se změna odehrává jen na akceptorové molekule DNA. (d) Genová konverze, která nedoprovází reciprokovou výměnu, tzv. NCO. Převzato z Arnheim *et al.* (2007).

#### 2.1.1.4 *Diplotenní stádium* (z řeckého termínu „dvě vlákna“)

Po ukončení rekombinace přechází buňka do fáze diplotene, při které dochází k rozpadu synaptonemálního komplexu, tedy desynapsi. Homologní chromozómy zůstávají v těsném kontaktu jen v místech překřížení, tzv. chiazmatech. Hlavní funkcí chiazmat je držet pohromadě homologní chromozómy až do jejich definitivního rozdělení v anafázi I. Na konci diplotene dochází k terminalizaci chiazmat v důsledku rostoucího napětí mezi homology; tím bivalenty získají charakteristický prstencovitý tvar (Petronczki *et al.*, 2003; Snustad & Simmons, 2009).

### 2.1.1.5 *Diakineze* (z řec. termínu „pohyb skrz“)

Homologní chromozómy jsou maximálně kondenzovány. Bivalenty se pohybují do středu jádra, kde se řadí kolmo na osu dělicího vřeténka. Rozpadá se jaderná membrána (Petronczki *et al.*, 2003; Snustad & Simmons, 2009).

### 2.1.2 **Metafáze I, Anafáze I, Telofáze I**

V metafázi I se chromozómy přichycují na mikrotubuly dělicího vřeténka. Díky totožné orientaci kinetochorů sesterských chromatid (oblast kam se přichycují chromatidy k dělicímu vřeténku) se v anafázi I od sebe oddělí právě chromozómy homologního páru. V telofázi I se rozpadá dělicí vřeténko a následně se od sebe oddělí dvě dceřiné buňky cytoplazmatickou membránou (cytokineze). Výsledkem prvního meiotického dělení jsou dvě buňky s polovičním počtem homologních chromozómů, kdy je ale každý homolog stále tvořen dvěma sesterskými chromatidami. Sesterské chromatidy již nemusí být geneticky identické díky uskutečněnému crossing-overu (Petronczki *et al.*, 2003; Snustad & Simmons, 2009).

## 2.2 **Meióza II**

Druhé meiotické dělení se označuje jako homotypické a dochází při něm k rozdělení sesterských chromatid podobně jako u mitózy. Profáze II je kratší než profáze I, na jejím konci se chromozómy připojují k dělicím vřeténkům. V metafázi II se chromozómy řadí do ekvatoriální roviny, orientace kinetochorů je v tomto případě opačná a dělicí vřeténko se k sesterským chromatidám připojí každé z jedné strany. V anafázi II se sesterské chromatidy rovnoměrně rozchází k opačným pólům buňky. Nakonec se v telofázi II znovu vytvoří jaderná membrána a chromozómy dekondenzují (Snustad & Simmons, 2009; Zickler & Kleckner, 1998).

## 2.3 **Význam meiózy**

V důsledku náhodného rozdělení homologních chromozómů do dceřiných buněk, nevznikají po prvním meiotickém dělení geneticky identické buňky (výjimkou je vzájemné křížení inbredních jedinců). Jedna buňka získá homologa mateřského původu a druhá homologa otcovského původu, avšak od každého homologního páru náhodně (Snustad & Simmons, 2009). U myši může vznikat až  $2^{20}$  možných kombinací (díky 20 párům homologních chromozómů), a pokud k nim přičteme ještě variabilitu zajištěnou crossing-overem, dostaneme nespočetné množství kombinací různých genů (Silver, 1995; Snustad & Simmons, 2009).

Meióza tedy zajišťuje kromě přenosu genetické informace z generace na generaci také genetickou variabilitu

### 3 Spermatogeneze

Gametogeneze je proces zajišťující tvorbu gamet, dle pohlaví se nazývá spermatogeneze a oogeneze.

Samčí pohlavní buňky se vyvíjejí v semenotvorných kanálcích varlat. Zralé spermie se skladují v nadvarletí, kam ústí spojené vývody semenotvorných kanálků. V průběhu spermatogeneze vznikají z diploidních samčích zárodečných buněk (spermatogonií) zralé haploidní spermie (Silver, 1995).

Bezprostředně po narození obsahují semenotvorné kanálky savců pouze gonocyty (prvopohlavní buňky, z kterých vznikají spermatogonie) a jediný typ somatických buněk, což jsou podpůrné Sertoliho buňky (Leblond & Clermont, 1952). Sertoliho buňky zajišťují hlavně výživu vyvíjejících se spermií, fagocytují poškozené zárodečné buňky a většinu vyvržené cytoplazmy spermatid, tvoří hematotestikulární bariéru a produkují řadu růstových faktorů (shrnuto v Johnson *et al.*, 2008).

Proces spermatogeneze se dělí na tři fáze (obr. 3): mitózu spermatogonií, meiózu spermatocytů a spermiogenezi haploidních spermatid (Leblond & Clermont, 1952). Spermatogeneze u myši, tedy vývoj od spermatogonií typu A až po zralé spermie, odpovídá 4,5 spermatogenním cyklům, to jest 34,5 dnům. Spermatogeneze probíhá ve vlnách a v několika vrstvách, aby se zajistila kontinuální produkce spermií. Spermatogenní vlny mají mezi sebou rozestupy jeden spermatogenní cyklus (207 hodin), což je 12 stádií odpovídajících 12 pomyslným segmentům, do kterých můžeme semenotvorné kanálky rozdělit. V každém segmentu se nachází 4 – 5 vývojových stádií, jelikož spermatogeneze zaujímá 4,5 spermatogenních cyklů (Oakberg, 1956b).

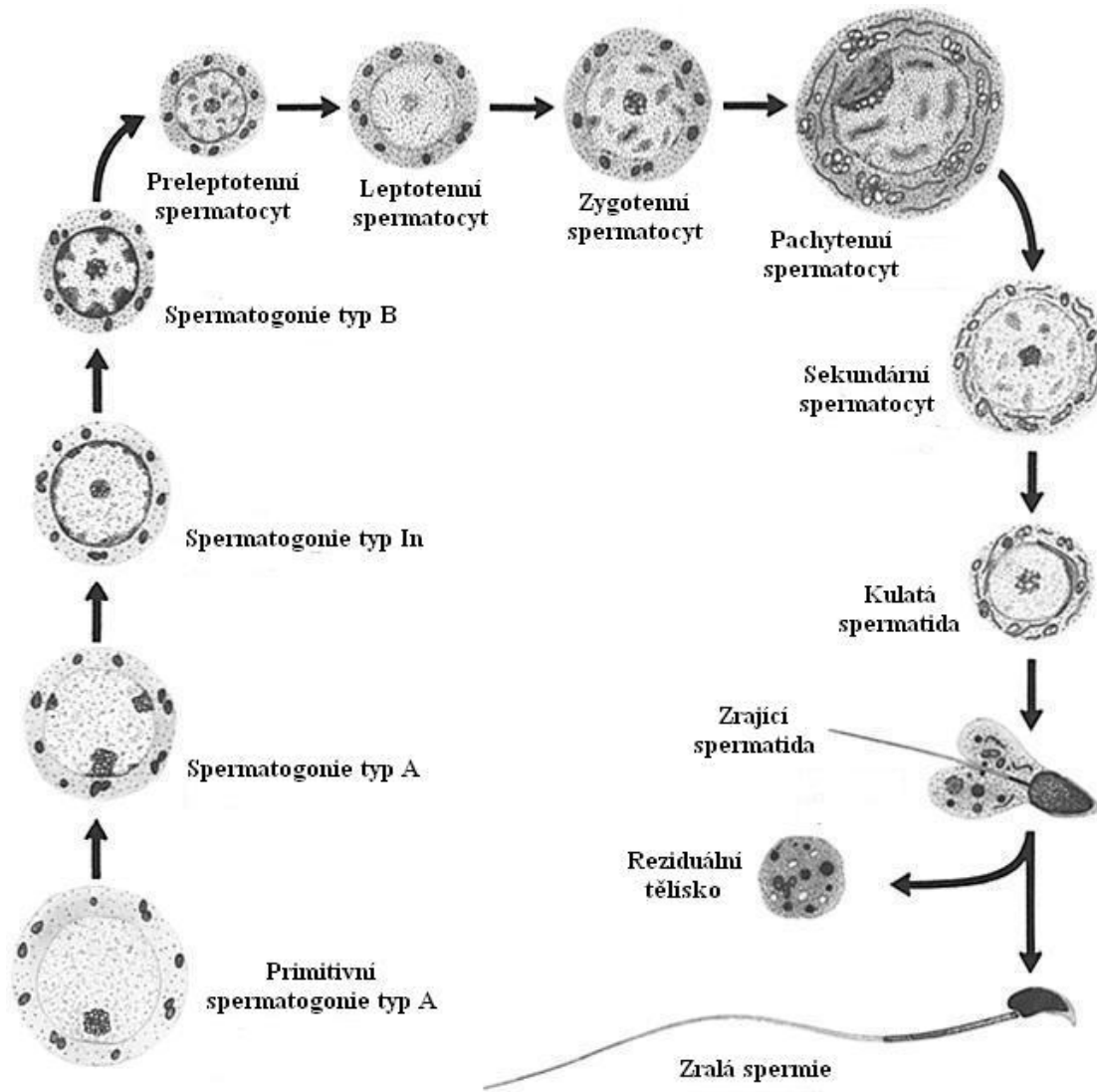
#### 3.1 Mitóza spermatogonií

Šestý den po narození se gonocyty (průměr 20 – 24  $\mu\text{m}$ ) mění na primitivní spermatogonie typu A. Spermatogonie typu A (průměr 14 – 15  $\mu\text{m}$ ) zůstávají v průběhu spermatogeneze u bazální membrány a jen některé z nich se mitoticky dělí, čímž se diferencují na podtypy  $A_1 - A_4$ , následovány přechodným typem In (angl. intermediate), až po spermatogonie typu B. Jednotlivé typy se navzájem liší přítomností a rozmístěním heterochromatinu v jádře (Oakberg, 1956a; Bellve *et al.*, 1977). Spermatogonie typu B (průměr 8 – 9  $\mu\text{m}$ ) se poprvé objevují 8. den po narození, kdy podstoupí mitózu a rozdělí se na dva primární spermatocyty (průměr 7,5 – 8,2  $\mu\text{m}$ ; Oakberg, 1956a; Bellve *et al.*, 1977).

#### 3.2 Meióza spermatocytů

Primární spermatocyty vstupují do meiózy I a ve fázi preleptotene se oddělí od bazální membrány (u myši 10. den). Následuje leptotene, zygotene (12. den) a časné (14. den) a pozdní

pachytene (18. – 20. den). Během dělení vykazují buňky charakteristické znaky zmíněné v kapitole 2.1.1 Profáze I. Primární spermatocyty se postupně zvětšují a v pachytene dosáhnou maxima 18  $\mu\text{m}$ . První meiotické dělení je dokončeno ve velmi krátkém sledu, a to 20. den po narození. Typicky se objeví sekundární spermatocyty, které následně podstoupí meiózu II. Výsledkem meiotického dělení jsou haploidní kulaté spermatidy, které jsou mnohem menší než primární spermatocyty (Bellve *et al.*, 1977).



**Obrázek 3:** Schematické znázornění spermatogeneze. Tři fáze spermatogeneze: mitóza spermatogonií (vzestupná část), meióza spermatocytů (horizontální část) a spermiogeneze spermatid (sestupná část). Převzato z Bellve *et al.* (1977).

### 3.3 Spermiogeneze spermatid

Spermiogeneze je proces přeměny kulatých spermatid ve zralé spermie, dělí se na 16 fází, které v sobě zahrnují 4 hlavní kroky (Oakberg, 1956a). V prvním kroku je v *Golgiho aparátu*



spermatidy vytvořen váček granulí. Ve druhém kroku se váček zplošťuje a nasedá na jadernou membránu, čímž se vytvoří *čepička*. Ve třetím kroku čepička pokryje celou dorzální stranu jádra směrem k bičíku za vzniku tzv. *akrozómu*, který obsahuje enzymy nezbytné k penetraci spermie do vajíčka. Mladá spermatida se akrozómem orientuje k bazální membráně kanálku. Jádro se postupně protahuje a chromozómy kondenzují. Posledním krokem spermiogeneze je *maturace* spermií, přebytek cytoplazmy je vytlačen na opačný pól spermatidy, až obklopí vznikající bičík a oddělí se ve formě reziduálního tělíska (Oakberg 1956a, Hess & de Franca, 2008). Spermie je v této fázi plně zralá a připravena k vypuštění ze semenotvorného kanálku do nadvarlete (epididymis), kde získá schopnosti nezbytné k rozpoznání a navázání vajíčka (Silver, 1995).

### 3.4 Hlavní rozdíly mezi spermatogenezí a oogenezí

Spermatogeneze a oogeneze se především liší svým časováním jednotlivých fází, počtem buněk, které ve finále produkují a životním obdobím, do kterého zasahují.

Vývoj spermií začíná přibližně 6. den po narození. Začátek oogeneze, tedy mitóza oogonií, profáze I a zástava primárního oocytu v diktyatenním stádiu, probíhá již v embryonálním vývoji před porodem, vlastní meiotické dělení začíná s pubertou (Silver, 1995)

Nedávné studie oogeneze myši zpochybnily jedno z hlavních dogmat reprodukční biologie. Myši samičky se nerodí s konečnou zásobou zárodečných buněk ve vaječnicích a i u dospělých myši dochází k obnově zárodečných buněk, ze kterých mohou vznikat nová vajíčka (Johnson *et al.*, 2004). Vývoj oogonií po primární oocyt tedy probíhá hlavně v prenatalním období, neznamena to ale striktní konec obnovy oogonií v období postnatalním.

Primární oocyt je těsně před nebo po narození pozastaven ve fázi diktyatene a meióza I je poprvé dokončena až v dosažení pohlavní zralosti (u myši většinou 6. – 8. týden po narození). Každý měsíc krátce před ovulací dokončí 6 – 16 primárních oocytů meiózu I, vzniká sekundární oocyt a první polární tělísko. V době ovulace je sekundární oocyt uvolněn z vaječníku a vstupuje do meiózy II. Druhé meiotické dělení je zastaveno v metafázi II a dokončí se jen v případě oplození sekundárního oocytu spermií (Silver, 1995).

Spermatogeneze probíhá u myši po celý život, zatímco oogeneze jen od puberty po menopauzu. Menopauza nastává 12. – 14. měsíc po narození (Silver, 1995).

V případě spermatogeneze vznikají čtyři navzájem rovnocenné produkty (spermie), zatímco výsledkem oogeneze je jedno haploidní vajíčko a tři polární tělíska.

## 4 Geny kontrolující vstup spermatocytů do meiózy

**Gen *Stra8* (*Stimulated by retionic acid gene 8*)** je považován za iniciátora meiózy u myši bez ohledu na jejich pohlaví, i když je meióza zahájena u obou pohlaví v jiné fázi vývoje (Baltus *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2008). *Stra8* podněcuje vstup zárodečných buněk do meiotické profáze I. U myších samiček je *Stra8* exprimován v ovariálních zárodečných buňkách embrya (12,5 – 16,5 dnů po koncepci) těsně před vstupem do meiózy, zatímco u samců je jeho exprese zahájena 6 – 14 dnů po narození (Koubova *et al.*, 2006). Rozdílná iniciace exprese *Stra8* je řízena kyselinou retinovou (retionic acid; RA; Koubova *et al.*, 2006; Oulad-Abdelghani *et al.*, 1996). RA je aktivní formou vitamínu A a signální molekulou, která řídí řadu fyziologických procesů (shrnuto v Livera *et al.*, 2002). V testikulárních zárodečných buňkách je RA degradována enzymem CYP26b1 (cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1; Koubova *et al.*, 2006), tudíž ve varlatech nedochází k předčasné iniciaci meiózy. *Cyp26b1* je po 12,5 dnech od koncepcie exprimován především v samčích gonádách, což dokazuje jeho roli v regulaci vstupu samčích buněk do meiózy (Bowles *et al.*, 2006). Zároveň je ale možné, že RA není jediným aktivátorem *Stra8* a CYP26b1 blokuje úplně jinou signální molekulu, která aktivuje expresi *Stra8* (Kumar *et al.*, 2011). *Stra8* pravděpodobně indukuje start meiotického dělení i u dospělých spermatocytů. Nejvyšší stupeň exprese *Stra8* byl detekován v tubulech VI – VIII, což odpovídá spermatocytům na rozhraní fází preleptotene a leptotene. V tomto případě byla exprese *Stra8* pod kontrolou RA (Zhou *et al.*, 2008).

U mladých *Stra8*<sup>-/-</sup> samců se zárodečné buňky vyvíjí bez problémů až do fáze preleptotene, starší spermatocyty se u těchto mutantů nevyskytují (Anderson *et al.*, 2008).

**Gen *Nanos2* (*Nanos homolog of Drosophila melanogaster 2*)** kóduje RNA-vazebný protein NANOS2, jehož hlavní funkcí je potlačení vstupu samčích zárodečných buněk do meiotického dělení v průběhu embryogeneze (Suzuki & Saga, 2008). Samčí *Nanos2*<sup>-/-</sup> zárodečné buňky podstupují po 15,5 dnech od koncepcie apoptózu (Tsuda *et al.*, 2003). Exprese *Nanos2* se zvyšuje po 14,5 dnech od koncepcie a ve stejné době dochází ke snížení funkce CYP26b1 (Bowles *et al.*, 2006; Suzuki & Saga, 2008). NANOS2, stejně jako CYP26b1, působí jako supresor exprese *Stra8*. Kooperace CYP26b1 a NANOS2 je tedy nezbytná ke kompletní inhibici exprese *Stra8* v průběhu embryonálního vývoje samčích gonocytů a k jejich udržení v G1/G0 fázi buněčného cyklu. Samotné působení CYP26b1 by bylo pro inhibici meiózy nedostatečné (Suzuki & Saga, 2008).

*Nanos2* má svou funkci i po narození. U dospělých samců je exprimován ve spermatogoniích typu As, což je typ spermatogonií, které nevstupují do mitózy a chovají se jako buňky kmenové. *Nanos2* pomáhá udržet tyto buňky v nediferencovaném stavu a zajistit tak dostatečnou zásobu spermatogonií (Sada *et al.*, 2009).

## 5 Geny kódující podjednotky synaptonemálního komplexu

Správné rozdělení homologních chromozómů v prvním meiotickém dělení je závislé na několika chromatinových strukturách specifických pro meiózu. Aby se zabezpečila přesná segregace chromozómů v anafázi I, měl by každý homologní pár sestroit 1 – 2 CO. CO je výsledkem opravy dvouřetězcových zlomů, které jsou generovány již od leptotene. Oprava dvouřetězcových zlomů je úzce spjata s těsným fyzickým párováním homologů pomocí synaptonemálního komplexu (SC) a koheze sesterských chromatid. Jakýkoliv defekt v genech kódujících proteiny SC, koheziny nebo proteiny dvouřetězcových zlomů vede k zástavě spermatogeneze nejčastěji v pachytene, pravděpodobně díky kontrolním/u bodu/ům (shrnuto v Bolcun-Filas & Schimenti, 2012).

### 5.1 Kohezinový komplex axiálního elementu

Axiální element (AE) je sestroyen ve fázi leptotene podél replikovaných sesterských chromatid, které tak fyzicky spojí (viz kap. 2.1.1.1). Strukturní složkou AE jsou některé proteiny synaptonemálního komplexu (SYCP2, SYCP3), které doprovází a ve stavbě podporují tzv. koheziny (SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ , SMC3, REC8, RAD21, RAD21L, STAG3), tvořící kohezinové komplexy patrně prstencového tvaru. Kohezinové komplexy zajišťují spojení (kohezi) sesterských chromatid od jejich vzniku v S-fázi buněčného cyklu až po metafázi I a některé komplexy až po metafázi II. Koheziny jsou dalšími jednotkami, které kontrolují správné rozdělení chromatid do gamet (shrnuto v Revenkova & Jessberger, 2006).

#### 5.1.1 SMC (Structural Maintenance of Chromosomes)

SMC proteiny jsou od prokaryot po eukaryota evolučně vysoce konzervovanou rodinou, účastníci se hlavně kondenzace chromatinu, koheze sesterských chromatid a rekombinace (shrnuto v Hirano, 2002).

**SMC1 $\alpha$  (structural maintenance of chromosomes 1 $\alpha$ ) protein** je přítomen jak v mitotickém, tak meiotickém savčím kohezinovém komplexu. SMC1 $\alpha$  byl do objevení isoformy beta nazýván SMC1 (Revenkova *et al.*, 2001). SMC1 $\alpha$  je exprimován v meiotické profázi I, kde tvoří spolu s SMC3 (viz níže) heterodimer SMC1 $\alpha$ /SMC3. Tento heterodimer je přerušovaně lokalizován podél AE a do oblastí chromatinových smyček, čímž přispívá ke kohezi sesterských chromatid, a to především v rané profázi I (Eijpe *et al.*, 2000). Na rozdíl od jiných kohezínů se SMC1 $\alpha$ /SMC3 nepodílí na kohezi sesterských centromer na konci profáze I (Revenkova *et al.*, 2001). Všechny tyto vlastnosti podporují představu SMC proteinů jako podpůrných složek AE, které přímo nebo nepřímo interagují se strukturními složkami SC (Eijpe *et al.*, 2000; Revenkova *et al.*, 2001).

**SMC1B (structural maintenance of chromosomes 1B) protein** je meioticky-specifickou isoformou SMC1 $\alpha$ . Beta forma je exprimována výhradně v savčích gonádách, což odráží i její hlavní funkci, a to vazbu sesterských chromatid od profáze I až po metafázi II, která v mitóze není potřebná. SMC1B se rozprostírá rovnoměrně podél AE od časně profáze I po diplotene, poté disociuje z ramen chromozómů a přesouvá se do míst okolo centromer, kde přetrvává až do metafáze II. SMC1B tvoří spolu s SMC3 heterodimer SMC1B/SMC3, zatímco s SMC1 $\alpha$  neinteraguje (Revenkova *et al.*, 2001).

Myší *Smc1b*<sup>-/-</sup> samci i samice jsou sterilní. Spermatocyty mutantních samců dosahují střední fáze pachytene, poté podstupují apoptózu a spermatogeneze je zastavena. Vazba dalších kohezinových jednotek není mutací ovlivněna. Délka AE je u mutantů zkrácená téměř na polovinu. Chromatinové smyčky, které se utváří na AE, vykazují nižší hustotu a jsou delší (Revenkova *et al.*, 2004). Vazba telomer k jaderné membráně je v mutovaných spermatocytech také narušena. *Smc1b*<sup>-/-</sup> spermatocyty mají kromě jiných abnormalit i snížený výskyt SMC3 v oblasti telomer (Adelfalk *et al.*, 2009), ačkoliv v ostatních oblastech chromozómu je lokalizace SMC3 v normálu (Revenkova *et al.*, 2004). SMC1B je převládající kohezinovou jednotkou telomer, která podporuje celkovou integritu telomer a vazbu SMC3 a dalších proteinů v této oblasti (Adelfalk *et al.*, 2009). Kromě vazby sesterských chromatid tak obecně koheziny pomáhají správně zorganizovat celkovou chromatinovou strukturu (Adelfalk *et al.*, 2009; Revenkova *et al.*, 2004).

**SMC3 (structural maintenance of chromosomes 3) protein** tvoří heterodimery jak s SMC1 $\alpha$ , tak s SMC1B, čímž přispívá ke kohezi sesterských chromatid a v případě heterodimeru SMC1B/SMC3 také ke kohezi centromer až do metafáze II. SMC3 se účastní mitotického i meiotického dělení (Eijpe *et al.*, 2000; Revenkova *et al.*, 2001).

SMC1 $\alpha$ , SMC1B a SMC3 se podílí na stavbě AE a na kohezi sesterských chromatid s několika rozdíly. SMC1 $\alpha$  a SMC3 nejsou specifické jen pro meiotické buňky, mají svou roli i v mitotických spermatogoniích, kde tvoří vlastní kohezinový komplex pravděpodobně s RAD21 kleisinem (viz níže; Lee & Hirano, 2011). V savčích varlatech existují dva SMC3 komplexy: SMC1 $\alpha$ /SMC3 a SMC1B/SMC3. První heterodimer asociuje s AE pouze po diplotene, zatímco druhý heterodimer je v kohezi v oblasti centromer až po metafázi II. SMC1 $\alpha$  /SMC3 se navíc objevuje na chromatinových smyčkách.

### 5.1.2 Ostatní složky kohezinového komplexu

Do této skupiny patří všechny ostatní proteiny, které nejsou z rodiny SMC, tedy tzv. kleisiny (REC8, RAD21 a RAD21L) a STAG3.

**REC8 (recombination protein 8)** je kleisinová jednotka kohezinového komplexu, která je funkčně konzervovaná od kvasinek až po savce (Klein *et al.*, 1999). U myší je exprimován výhradně v gonádách, v případě varlat v primárních a sekundárních spermatocytech a ve spermatidách (Lee *et al.*, 2002). REC8 asociuje s SMC1B, SMC3 a STAG3 (viz dále), ale ne s SMC1 $\alpha$ . REC8

kopíruje AE od leptotene po diplotene. Podél ramen homologních chromozómů a v okolí centromer se vyskytuje v diakinezi a metafázi I, kde přetrvává až do rozchodu homologních chromozómů v anafázi I. Poté je detekován pouze v oblasti centromer až do metafáze II a při rozchodu sesterských chromatid v anafázi II disociuje. Časování výskytu a disociace REC8 určuje některé jeho funkce. Účastní se párování mezi rameny homologních chromozómů až do metafáze I, kdy SMC1 $\beta$  je již lokalizovaný jen v oblasti centromer (Lee *et al.*, 2003).

Myši *Rec8*<sup>-/-</sup> samci i samice jsou sterilní a meióza je zastavena na konci zygotene (Xu *et al.*, 2005). Na rozdíl od *Rec8p*<sup>-/-</sup> kvasinek dochází u myších *Rec8*<sup>-/-</sup> samců částečně ke zformování AE (Klein *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2005). Přesto je ale synapse myších homologů narušena, jelikož SC vzniká unikátně mezi sesterskými chromatidami. REC8 má pod kontrolou také topologii SC (Xu *et al.*, 2005). *Rec8*<sup>-/-</sup> neovlivňuje vazbu SMC3 (pravděpodobně z heterodimeru SMC1 $\alpha$ /SMC3) a RAD21 k chromozómu (Xu *et al.*, 2005; Llano *et al.*, 2012).

**RAD21 (radiation-sensitive mutant 21) protein** je členem jak mitotického, tak meiotického kohezinového komplexu (Prieto *et al.*, 2002). Výzkumy ohledně přesné doby výskytu RAD21 v meiotickém dělení se značně rozcházejí. RAD21 byl v jedné studii detekován přechodně jen ve fázi diplotene (Prieto *et al.*, 2002), v další studii zase od leptotene po pachytene, a to podél AE a od diplotene po metafázi II v okolí centromer (Xu *et al.*, 2004). Zároveň se objevila možnost, že je RAD21 přechodně zastoupen v zygotene a pachytene svým nově objeveným paralogem RAD21L (viz níže; Lee & Hirano, 2011) a RAD21 se pak znovu objeví až na konci pachytene (Ishiguro *et al.*, 2011). Možnou funkcí této alternace je podpora rekombinace mezi homologními chromozómy namísto mezi sesterskými chromatidami (Lee & Hirano, 2011). Na druhou stranu byla přítomnost RAD21 v meióze již od leptotenního stádia potvrzena analýzou dvojitého mutantu *Rad21*<sup>-/-</sup> a *Rec8*<sup>-/-</sup> (Llano *et al.*, 2012). Vysvětlení mnoha rozdílných výsledků je zatím neznámé.

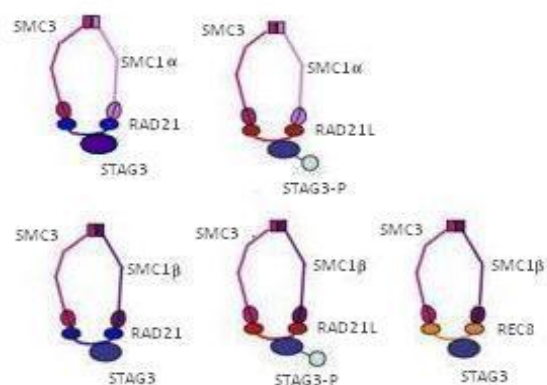
**RAD21L (radiation-sensitive mutant 21 like) protein** je nedávno popsáným paralogem RAD21 (Ishiguro *et al.*, 2011). Exprese *Rad21l* začíná při vstupu myších spermatocytů do meiotického dělení. RAD21L a REC8 spolu neinteragují a patrně oba tvoří v průběhu meiózy vlastní kohezinové komplexy. RAD21L interaguje s SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ , SMC3 a STAG3. RAD21L se opět vyskytuje podél AE od leptotene až po časnou pachytenu (Ishiguro *et al.*, 2011; Lee & Hirano, 2011). RAD21L se dle jedné studie (Ishiguro *et al.*, 2011) odděluje od AE na konci pachytene a až do metafáze II se soustřeďuje jen v okolí centromer. Dle další studie je RAD21L na konci pachytene nahrazen RAD21 a ke kohezi centromer RAD21L dále nepřispívá (Lee & Hirano, 2011). Oba výzkumy se shodují ve způsobu rozdělení REC8 a RAD21L kohezinů v časnou profázi I. Během zygotene a na počátku pachytene se tyto dva proteiny objevují symetricky u obou zatím nespárovaných homologů. Nepravidelné a vzájemně se vylučující střídání obou proteinů připomíná ve fluorescenčním mikroskopu čárový kód. Funkcí této alternace může být usnadnění párování homologních chromozómů (Ishiguro *et al.*, 2011; Lee & Hirano, 2011). Jen v případě kohezinového komplexu, který obsahuje RAD21L a STAG3, je STAG3 fosforylován (Lee & Hirano, 2011).

*Rad21*<sup>-/-</sup> myši samec je sterilní a spermatogeneze je zastavena v zygotenním stádiu. *Rad21*<sup>-/-</sup> samice jsou fertillní v závislosti na věku. Mutantní samec částečně formuje fragmentovaný AE, ale SC vzniká přednostně mezi heterologními chromozómy. Dále má mutant narušenou vazbu telomer k jaderné membráně. *Rad21*<sup>-/-</sup> spermatocyt normálně interaguje s SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ , SMC3, RAD21 i REC8. Výskyt STAG3 je ale u mutantu abnormální (Herran *et al.*, 2011). Myši mutanti *Rec8*<sup>-/-</sup> i *Rad21*<sup>-/-</sup> částečně tvoří AE se synapsí, což je ale pro úspěšný postup meiózy stále nedostatečné. Formace AE je neúspěšná pouze u myši postrádající jak REC8, tak RAD21L, spermatogeneze je u nich zastavena již ve fázi leptotene a AE se zde vůbec nesestaví (Llano *et al.*, 2012).

Ve spermatocytech se nachází několik kohezinových komplexů, z nichž každý obsahuje alespoň jeden typ kleisinu (RAD21, RAD21L, REC8). V případě cílené homozygotní mutace jednoho z genů pro RAD21L a REC8, je funkční gen schopen poškozený gen částečně nahradit, alespoň co se týká sestavení AE. Spermatocyt nesoucí homozygotní mutace v obou genech ale není schopen vytvořit kompletní AE. Přesný význam vzájemného střídání RAD21 a RAD21L je stále nevyřešen, pro stanovení počtu meiotických kohezinových komplexů a určení jejich přesné funkce je ale nezbytný. Kleisiny jsou podstatnou složkou kohezinových komplexů, které se podílí na stavbě myšního axiálního elementu (Llano *et al.*, 2012; Lee & Hirano, 2011).

**STAG3 (stromal antigen 3) protein** podporuje kohezi ramen sesterských chromatid. Opět se vyskytuje podél AE od počátku jeho formování až po diplotene, kdy dochází k rozpadu SC. V metafázi I je výhradně v oblastech mezi sesterskými chromatidami. Neúčastní se tvorby chiazmat. Na konci anafáze I a v pozdějších stádiích meiózy již není detekován. STAG3 nepřispívá ke kohezi sesterských centromer v metafázi II (Prieto *et al.*, 2001).

Meiotické dělení vyžaduje několik druhů kohezinových komplexů, které jsou sestaveny z navzájem různě interagujících jednotek. Každý komplex se vyskytuje v různých fázích meiózy a patrně zabezpečuje kohezi rozdílných oblastí chromozómů. Doposud byly objeveny: SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$ , SMC3, REC8, RAD21, RAD21L a STAG3. Každý kohezinový komplex patrně obsahuje jeden ze tří kleisinů (REC8, RAD21, RAD21L), STAG3 a buď dimer SMC1 $\alpha$ /SMC3, nebo SMC1 $\beta$ /SMC3 (obr. 5).

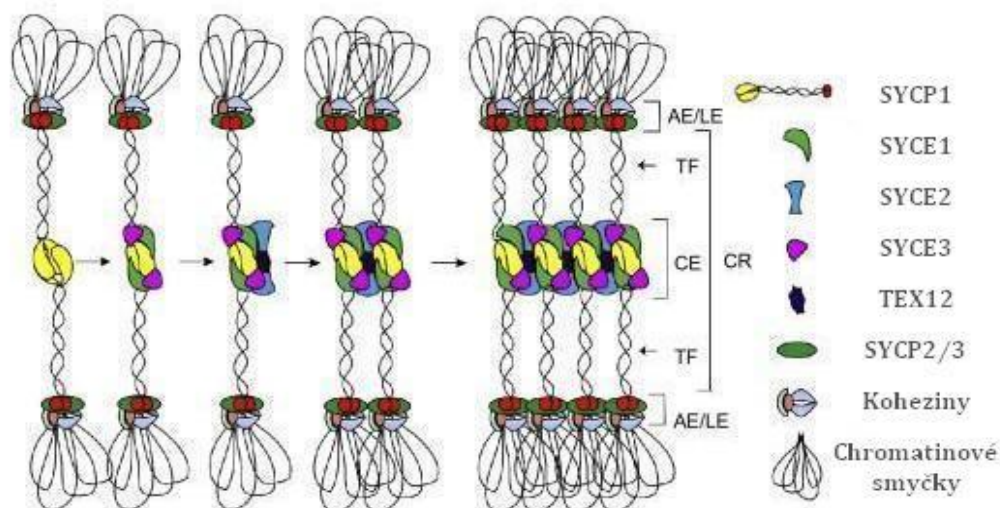


**Obrázek 5:** Potenciální kohezinové komplexy myších varlat. Každý kleisin (RAD21, RAD21L, REC8) tvoří komplex se specifickou skupinou kohezinových jednotek. RAD21 a RAD21L interagují s SMC1 $\alpha$  i SMC1 $\beta$ . REC8 je v komplexu jen s SMC1 $\beta$ . Každá kleisinová jednotka je schopná interagovat se STAG3, v případě RAD21L je STAG3 fosforylován (světle modrá kulička). Přesný čas a místo výskytu jednotlivých komplexů zatím není vyřešen. Zobrazené komplexy jsou sestaveny na základě imunofluorescenčních dat. Upraveno a převzato z Lee & Hirano (2011).

## 5.2 Strukturální podjednotky synaptonemálního komplexu

Synaptonemální komplex (SC) je sestaven ve fázi zygotene ze tří tyčkovitých proteinových útvarů, a to tzv. zipovým způsobem. Fyzicky jsou propojeny dva axiální elementy (AE) homologního páru v procesu synapse. Ve vztahu ke kompletnímu SC se AE dále označují jako laterální elementy (LE). LE jsou připojeny k centrálnímu elementu (CE) transverzálními vlákny (TF). Dva LE, CE a několik TF tvoří SC homologního páru, který je demontován v diplotene meiotické profáze I (Heyting, 1996).

Strukturální proteiny SC jsou SYCP2 – 3 (AE/LE), SYCP1 (TF) a SYCE1 – 3 s TEX12 (CE) (obr. 6). SYCP2 a SYCP3 sestavují AE v průběhu leptotene a hlavní složka TF, tedy SYCP1, spojuje AE/LE s CE během zygotene. SYCP1 – 3 mají DNA-vazebnou doménu, několik  $\alpha$ -helikálních struktur a řadu potenciálních míst fosforylace, které pravděpodobně regulují složení a rozložení SC (Offenberg *et al.*, 1998; Lammers *et al.*, 1994; Meuwissen, 1992). SYCE1 – 3 patří mezi fibrilární proteiny s řadou  $\alpha$ -helikálních struktur. Všechny jednotky CE jsou na správné místo chromozómu rekrutovány pomocí SYCP1 (Costa *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2011).



**Obrázek 6:** Schematický model stavby synaptonemálního komplexu (SC). Paralelní homodimery SYCP1 jsou svými C-konci ukotveny v axiálním/laterálním elementu (AE/LE), který je tvořen SYCP2, SYCP3 a koheziny. SYCP1 rekrutuje SYCE1 a SYCE3 (stabilizační a iniciační složky SC a synapse homologů) a SYCE2 s TEX12 (podpůrné složky synapse). Převzato a upraveno z Bolcun-Filas & Schimenti (2012).

### 5.2.1 Axiální/laterální element

**SYCP2 (synaptonemal complex protein 2)**, strukturální složka AE/LE, se prostřednictvím své  $\alpha$ -helikální domény váže k SYCP3. *Sycp2*<sup>-/-</sup> myši samci, kteří mají odstraněný úsek kódující tuto doménu, jsou dle očekávání životaschopní, ale sterilní. Spermatocyty podstupují apoptózu v přechodu fázi zygotene a pachytene. Expresce SYCP1 a SYCP3 je mutací neovlivněna. SYCP1 se normálně váže k chromatinu, zatímco SYCP3 se do AE není schopen začlenit a shlukuje se volně v jádře. SC má CE s navázanými TF, ale bez LE, takže synapse neodpovídá normě. *Sycp2*<sup>-/-</sup> produkuje zkrácený

(angl. truncated) protein SYCP2t, který je schopný vázat se na proteinovou složku chromatinu v oblasti AE (Yang *et al.*, 2006).

Souhrn vlastností SYCP2: 1) představuje primární složku AE/LE potřebnou pro vazbu SYCP3 do AE skrz svou  $\alpha$ -helikální strukturu, 2) SYCP2 se do AE váže pravděpodobně pomocí jiných proteinů než SYCP3, jelikož SYCP2t je schopen navázat se na proteinové jádro chromatinu, 3) SYCP2 neovlivňuje stavbu kohezinového komplexu, ani vazbu proteinů CE nebo SYCP1 (Yang *et al.*, 2006).

**SYCP3 (synaptonemal complex protein 3)** je výhradně v podčeledi pravých myší (Murinae), kvůli přítomnosti dvou START kodónů v *Sycp3*, zastoupen dvěma různě dlouhými isoformami (Alzheimer *et al.*, 2010). *Sycp3*<sup>-/-</sup> myší samec se normálně vyvíjí, ale je sterilní. Spermatocyty podstupují apoptózu na konci zygotene. Mutant nedokáže sestavit kompletní SC, jelikož má narušenou stavbu AE/LE, přesto ale SYCP1 rekrutuje složky CE a částečně spojuje homologní chromozómy, TF jsou však zkráceny (Yuan *et al.*, 2000). SYCP3 patrně reguluje vazbu SYCP2 k AE i přesto, že navázání samotného SYCP3 je na SYCP2 závislé (Yang *et al.*, 2006). SYCP3 nejspíš ovlivňuje kondenzaci chromatinu, jelikož u *Sycp3*<sup>-/-</sup> jsou homologní chromozómy delší (Kolas *et al.*, 2004). Dále se u *Sycp3*<sup>-/-</sup> zkoumala funkce některých rekombinačních proteinů, kdy vazba těchto proteinů k AE byla jen o něco slabší. AE proto není přímo nutný k vazbě rekombinačních proteinů (Peltari *et al.*, 2001).

AE/LE tedy stabilizuje vazbu rekombinačních proteinů, ovlivňuje míru kondenzace chromatinu, dokončuje synapsi a celkově má vliv na segregaci homologů. Při absenci SYCP2 i SYCP3 není synapse a kondenzace chromozómů z důvodů poškozeného AE/LE dokonalá a mutované spermatocyty jsou na konci zygotene odstraněny.

## 5.2.2 Transverzální vlákna

**SYCP1 (synaptonemal complex protein 1)** je hlavní složkou transverzálních vláken, které spojují AE/LE homologních chromozómů. V zygotene se dva SYCP1 spojí v paralelní homodimery, které jsou svými C-konci ukotveny do AE/LE a N-konci interagují s N-konci druhého SYCP1-homodimeru (tzv. vazba hlava k hlavě, angl. head-to-head) navázaném na AE/LE druhého homologa (Meuwissen *et al.*, 1992; de Vries *et al.*, 2005). *Sycp1*<sup>-/-</sup> myší samec se normálně vyvíjí, ale je sterilní. Spermatogeneze je zastavena v pachytene, kdy spermatocyty podstupují apoptózu. V leptotene tvoří poškozené spermatocyty normální AE, avšak nevykazují ani náznak homologní synapse nebo vznik CE. SYCP1 tedy neovlivňuje vazbu AE proteinů a zároveň je hlavní složkou TF, která rekrutuje proteiny CE. SYCP1 navíc podporuje vznik tzv. XY tělíška (angl. sex body; pachytenní pohlavní chromozómy spárované v pseudoautozomální oblasti, orientované na okraj jádra) nebo opravu dvouřetězcových zlomů, které následně vyústí v možné CO (de Vries *et al.*, 2005).



Úloha SYCP1 v myších gametocytech není, na rozdíl od SYCP2 a SYCP3, ovlivněná pohlavím (de Vries *et al.*, 2005). Mutace v *Sycp2* i *Sycp3* se u samců projevují úplnou sterilitou, zatímco u samic jen snižuje množství potomků díky vysokému počtu aneuploidií (Pelttari *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006). SYCP1 se svým C-koncem váže na DNA v AE buď přímo, nebo prostřednictvím zatím neidentifikovaného proteinu, protože v *Sycp2*<sup>-/-</sup> a *Sycp3*<sup>-/-</sup> spermatocytech se objevovaly částečně synapsované homologní páry. Vazba SYCP1 k AE je tedy nezávislá na SYCP2 a SYCP3 (Pelttari *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006). S SYCP1 dále interaguje meioticky-specifický protein FKBP6 (fujimicin K506 binding protein). FKBP6 se účastní kompletace synapse homologů výhradně v samčích spermatocytech. Delece genu *Fkbp6* vede ke sterilitě samců, zatímco ztráta *Fkbp6* v samičích oocytech nezpůsobuje sterilitu ani jiné meiotické abnormality (Crackower *et al.*, 2003).

### 5.2.3 Centrální element

**SYCE1 (synaptonemal complex central element 1) protein** je složkou CE a v průběhu spermatogeneze se vyskytuje výhradně v oblasti synapsovaných částí chromozómů, a to od zygotene po diplotene, tedy od sestavení až po rozpad SC. Společná exprese SYCP1 s SYCE1 je nutná k umístění SYCE1 do CE, v *Sycp1*<sup>-/-</sup> spermatocytech je SYCE1 nerovnoměrně roztroušen po nukleoplazmě. SYCE1 interaguje s N-konci SYCP1 dimerů v CE (Costa *et al.*, 2005). *Syce1*<sup>-/-</sup> mutant má v leptotene volně spárované homologní autozomy s nepoškozeným AE, zatímco gonozomy se svými částečně homologními oblastmi k sobě vůbec nepřiblíží a XY tělísko se tedy vůbec nezformuje. Mutantní spermatocyty nevykazují ani částečné synapse a distribuce TF i ostatních složek CE je narušená. Mutant formuje dvouřetězcové zlomy, které ale nedokáže opravit (Bolcun-Filas *et al.*, 2009).

Hlavní funkce SYCE1 je stabilizace SYCP1 dimerů v CE a spolu s SYCP1 zahájení synapse homologů. Dále je tato centrální jednotka nutná k úspěšné progresi a dokončení rekombinace a k synapsi XY chromozómů (Bolcun-Filas *et al.*, 2009).

**SYCE2 (synaptonemal complex central element 2) protein** byl objeven spolu s SYCE1 v CE savčích zygotenních až diplotenních gametocytech. SYCE2 je rekrutován do CE hlavní složkou TF stejně jako SYCE1, s kterým má i další podobné vlastnosti, jako účast na párování XY tělíska a pomoc v úspěšné progresi a zakončení rekombinace (Costa *et al.*, 2005; Bolcun-Filas *et al.*, 2007). Mutantní *Syce2*<sup>-/-</sup> spermatocyty, na rozdíl od *Syce1*<sup>-/-</sup> spermatocytů, dokážou zahájit synapsi homologů na několika místech chromozómu, i když bez úspěšného dokončení (Bolcun-Filas *et al.*, 2007).

**SYCE3 (synaptonemal complex central element 3) protein** má podobné vlastnosti jako SYCE1, přispívá ke stabilitě SYCP1 v CE a zároveň tuto složku TF potřebuje ke své správné lokalizaci v CE. SYCE3 ovlivňuje vazbu SYCE1, SYCE2 i TEX12 (viz níže) ke chromatinu. Do CE je zabudována dříve než ostatní složky CE, ale později než SYCP1. SYCE3 neovlivňuje stavbu AE

ani volné párování homologních chromozómů na začátku leptotene. SYCE3 má podobné účinky na rekombinaci i na synapsi XY jako ostatní proteiny CE (Schramm *et al.*, 2011).

**TEX12 (testis expressed 12) protein** interaguje s SYCE2 a společně se podílí na postupné synapsi homologního páru, zároveň žádný z nich neovlivňuje iniciaci synapse. TEX12 působí dříve než SYCE2, ale později než SYCP1 a SYCE3. *Tex12*<sup>-/-</sup> spermatoocyty tvoří AE s částečně párujícími se homology, bez úspěšně dokončené rekombinace a synapse autozómů i gonozómů (Hamer *et al.* 2006; 2008).

Souhrnně řečeno, mutace v genech kódujících SYCP1, SYCE1 – 3 a TEX12 způsobují sterilitu myších samic i samců a apoptózu spermatoocytů v pachytene, efekt pohlaví zde není zřejmý. Díky narušenému párování homologních chromozómů není ani jeden z těchto mutantů schopen vytvořit charakteristické pachytenní XY tělísko. Strukturální proteiny AE (SYCP2, SYCP3) neovlivňují vstup do procesu rekombinace ani její dokončení. Zbývajících pět jednotek SC se sice neuplatňuje ve vazbě iniciačních proteinů rekombinace, ale při absenci jakéhokoliv proteinu CE nebo TF není homologní rekombinace dokončena. SYCP1, SYCE1 a SYCE3 iniciují synapsi homologních chromozómů, zatímco TEX12 a SYCE2 se uplatňují v její progresi. Proteiny TF a CE se s proteiny AE navzájem neovlivňují, vyjma možného efektu SYCP2 na C-konec SYCP1 (Bolcun-Filas *et al.*, 2007).

Interakce mezi všemi dosud známými jednotkami SC nejsou zcela objasněny, jejich důležitost v meiotickém dělení a myší fertilitě je ale nezpochybnitelná. Mutace v kterékoliv známé jednotce SC neprojde v případě meiózy spermatoocytů přes kontrolní bod/y na konci zygotene, popř. v průběhu pachytene.

### 5.3 Regulace synapse a transkripční umlčení genů

**HORMAD1 a 2 (HORMA domain containing proteins)** se preferenčně váží do prozatím nespárovaných oblastí leptotenních a zygotenních chromozómů, později do fosforylované a transkripčně umlčené heterologní oblasti XY chromozómu a nesynapsovaných defektních autozómů časného pachytene. Uvolnění HORMAD proteinů ze spárovaných úseků je pod kontrolou TRIP13 (thyroid receptor-interacting protein 13) a není závislé na žádném proteinu SC (Wojtasz *et al.*, 2009). HORMAD1 hraje důležitou roli hlavně v časném párování a synapsi homologů, zatímco HORMAD2 je v tomto případě postradatelný, společně HORMAD proteiny kontrolují kompletaci synapse a podílejí se na stavbě a dokončení XY tělíska. Mutace v genech *Hormad1* i *2* způsobují myší sterilitu, spermatogeneze je zastavena v pachytene (Daniel *et al.*, 2011; Kogo *et al.*, 2012; Wojtasz *et al.*, 2012).

Transkripční umlčení heterologní části XY chromozómu (meiotic sex chromosome inactivation, MSCI) je samčí meioticky-specifickou událostí, která byla poprvé prozkoumána již před skoro 40 lety (Solari, 1974; cit. dle Handel, 2004). Umlčení heterologní oblasti XY v sobě zahrnuje,

kromě jiných histonových modifikací (sumoylace a ubikvitinace), i zygotenní fosforylaci histonu H2AX pomocí kinázy ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related protein), jejíž aktivita je pod kontrolou BRCA1 (breast cancer 1; Turner *et al.*, 2004). ATR kináza fosforyluje i nesynapsované oblasti autozómů. Pokud homologní pár obsahuje heterologní oblasti například v důsledku translokace, homologové v těchto oblastech nesynapsují a jsou zde transkripčně umlčeny (meiotic silencing of unsynapsed chromosomes, MSUC; Turner *et al.*, 2005). Takové spermatocyty neprojdou pachytenním kontrolním bodem a buňka je degradována (Daniel *et al.*, 2011). Fosforylaci H2AX na serinu 139 (fosforylation of histone H2AX on serine 139;  $\gamma$ H2AX) však vykazují myší spermatocyty bez rozdílu pohlaví již v leptotene, a to na místech dvouřetězcových zlomů. Tato první vlna fosforylace je ale indukována ATM (Ataxia telangiectasia mutated) kinázou (Mahadevaiah *et al.*, 2001; Burma *et al.*, 2001). HORMAD proteiny jsou pravděpodobně adaptorovými proteiny, které rekrutují některé proteiny specifické pro MSCI a MSUC na XY chromozómy a nesynapsované autozómy. Tvzení je podloženo delecemi *Hormad1* a *2* a jejich fenotypovými projevy (Shin *et al.*, 2010; Daniel *et al.*, 2011; Kogo *et al.*, 2012; Wojtasz *et al.*, 2012).

HORMA proteiny jsou patrně součástí dodnes málo prozkoumaného meiotického záchranného systému, který monitoruje kvalitu gamet časné meiotické profáze I. Včasná oprava dvouřetězcových zlomů, párování homologních chromozómů a přesná stavba SC je požadována ke zkoušce spermatocytů v kontrolním bodě, popř. bodech meiotické profáze I. Je také nutné zmínit, že časové umístění kontrolních mechanismů v rámci meiotického dělení je v závislosti na pohlaví různé. Samčí kontrola spermatocytů je přísnější a dřívější než u samic (Hunt & Hassold, 2002).

## 6 Geny časné fáze homologní rekombinace

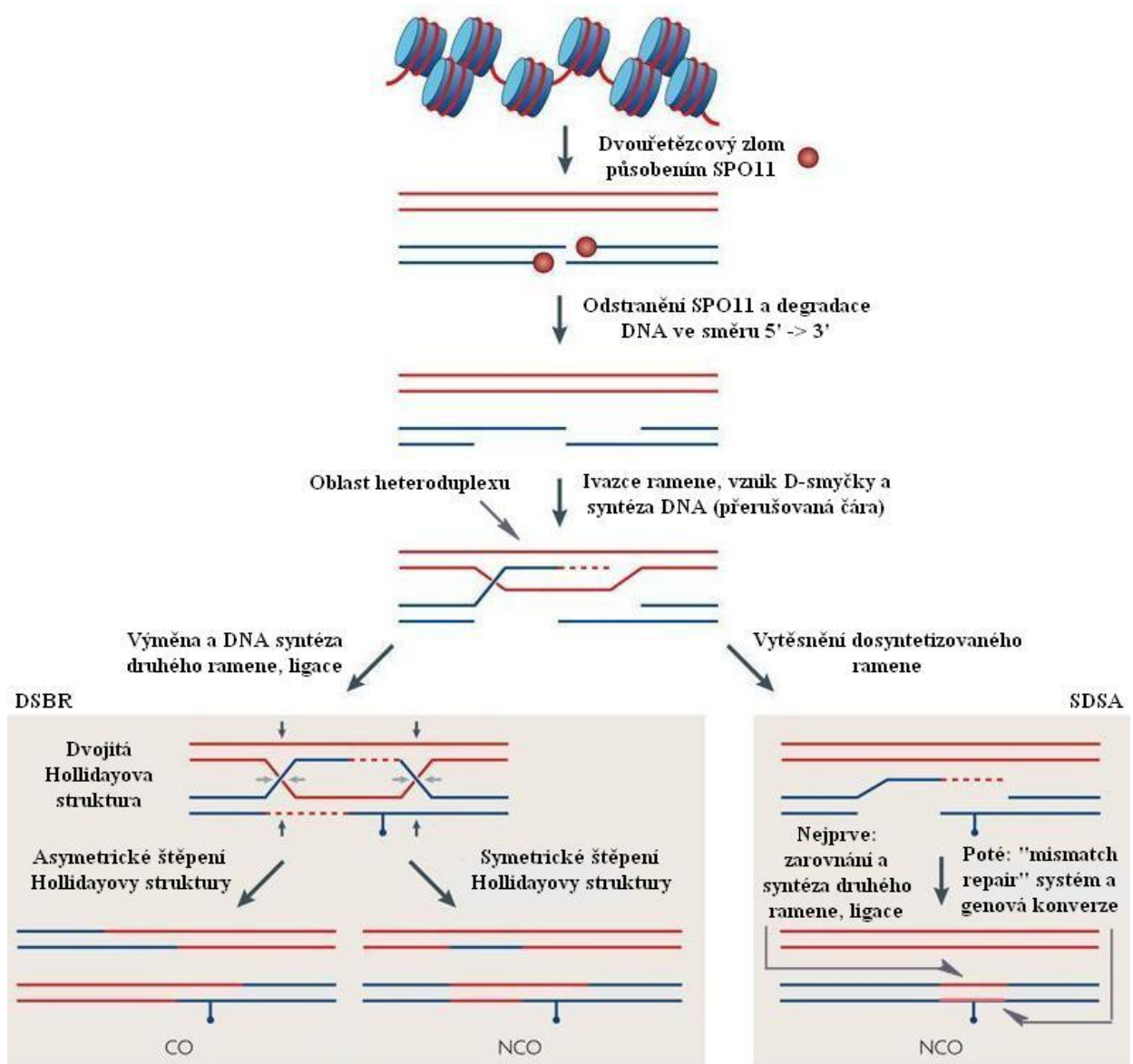
Chromozóm je lineárně organizovaná struktura nesoucí jednotky dědičnosti, geny, uspořádaný v řadě za sebou. Dle Morganovy teorie jsou geny jednoho chromozómu vzájemně vázány a meiotickým dělením by se jejich alely měly dědit jako celek. Genová vazba ale není absolutní a v průběhu meiózy se od sebe mohou jednotlivé alely oddělit rekombinací, za vzniku nových kombinací (Snustad & Simmons, 2009).

Podstatou výměny alel je proces homologní rekombinace mezi párujícími se homology (obr. 7). Na počátku meiotické profázi I dojde k enzymaticky katalyzovanému dvouřetězcovému zlomu na jedné ze čtyř chromatid homologního páru. V místě zlomu jsou degradovány oba řetězce DNA ve směru 5' → 3' za vzniku 3' přečnívajících konců. Jeden z těchto jednovláknových DNA konců vytěsňuje DNA vlákno molekuly druhého neporušeného homologa za vzniku tzv. D-smyčky, tedy útvaru podobného písmenu D. Podle vytěsňeného vlákna se na základě komplementarity DNA dosyntetizuje druhý 3' přečnívající konec, stejně tak i první invazivní konec. Mezery mezi nově syntetizovanými částmi se za pomoci DNA-ligázy znovu spojí, takže vznikne molekula s dvěma jednořetězcovými můstky (dvojitá Hollidayova struktura) a s heteroduplexy, tedy dvouvláknovými úseky DNA, kde každé vlákno je od různého homologa. Tyto můstky jsou enzymaticky štěpeny a jednotlivé DNA řetězce znovu spojeny DNA ligázou (Snustad & Simmons, 2009; de Massy, 2003).

Výše popsaný opravný systém dvouřetězcových zlomů vede nejčastěji, dle modelu DSBS, ke genové konverzi a CO. SDSA opravný model se liší ve způsobu opravy mezery druhého 3' přečnívajícího konce. V DSBS modelu se tato mezera opraví podle druhého homologa, zatímco v SDSA modelu podle právě dosyntetizovaného 3' invazivního vlákna. U SDSA modelu dojde ke genové konverzi pouze na invazivní chromatidě, ale oprava je bez CO. Vzorem pro opravu dvouřetězcových zlomů by mohly být samozřejmě i sesterské chromatidy, tato cesta je však v meiotickém dělení potlačována (Allers & Lichten, 2001; de Massy, 2003).

Homologní rekombinace je esenciální pro přesnou synapsi a rozchod homologních chromozómů v meióze I (Petronczki *et al.*, 2003). Místa překřížení na začátku profázi I se označují jako časné uzlíky (angl. early nodules, EN). EN se ve fázi zygotene mění na přechodné uzlíky (angl. transitional nodules, TN) a v pachytene na rekombinační uzlíky (angl. recombination nodules, RN) a budoucí chiazmata. Typy uzlíků se liší svým proteinovým složením (Moens *et al.*, 2002).

Stavební složky počátku homologní rekombinace, tedy proteiny exprimované v leptotene a zygotene, charakterizují v následující podkapitole.



**Obrázek 7:** Dva modely (DSBR, SDSA) homologní rekombinace. V páru homologních chromozómů (modře a červeně znázorněny dvoušroubovice DNA vždy poze jedné sesterské chromatidy z homologního páru) je navozen dvouřetězcový zlom. Degradací DNA v daném směru jsou vytvořeny jednořetězcové přečnívající vlákna DNA. Jedno z vláken vnikne do nepoškozené molekuly druhého homologa (červeně), čímž vytlačí jeho homologní část (vznikne D-loop), podle které je dle modelu DSBR, opraveno druhé neinvazivní vlákno poškozeného homologa (modře). Přečnívající vlákno DNA, které vytlačilo část nepoškozeného homologa, je podle jeho druhé nevytlačené chromatidy též dosyntetizováno a opraveno. Pomocí DNA ligázy jsou mezery v DNA molekule spojeny za vzniku dvojitě Hollidayovy struktury. Na základě typu štěpení (symetrické, asymetrické) je oprava poškozené DNA doprovázena crossing-overem (CO), popř. non-crossing-overem (NCO). V SDSA modelu je invazivní vlákno opraveno podle druhého homologa a vytěsněno zpět ke své poškozené molekule. Druhé poškozené rameno je poté dosyntetizováno podle vlastní opravené chromatidy. DNA ligáza opět spojí mezery v DNA. Oprava poškozené DNA může být doprovázena genovou konverzí (viz obr. 2 a tento), kdy donorová chromatida (červeně) předá část svého řetězce akceptorové chromatidě (modře), resp. pouze jednomu DNA řetězci z akceptorové molekuly. V dalším kroku je druhý řetězec této molekuly pravděpodobně opraven „mismatch repair“ opravným systémem buňky, čímž se vyrovná disbalance mezi řetězci na akceptorové molekule. Upraveno a převzato z Paigen & Petkov (2010).

## 6.1 Katalýza tvorby dvouřetězcových zlomů

**SPO11 (homolog of yeast sporulation protein 11)** patří mezi DNA-topoizomerázy typu II, katalyzující tvorbu dvouřetězcových zlomů za spotřeby ATP (adenosine triphosphate). Funkce SPO11 je evolučně vysoce konzervovaná (Keeney *et al.*, 1997; Metzler-Guillemain & de Massy, 2000; Mahadevaiah *et al.*, 2001). Dvouřetězcové zlomy jsou jednou z nejnebezpečnějších poškození DNA. Vznikají působením řady exogenních (UV, chemoterapeutika) i endogenních (volné kyslíkové radikály, SPO11) činitelů (Snustad & Simmons, 2009). SPO11-dvouřetězcové zlomy se poprvé tvoří v časném leptotene a musí být proto velmi rychle opraveny pomocí homologní rekombinace. Dvouřetězcové zlomy aktivují ATM kinázu, která fosforyluje histon H2AX na serinu 139 ( $\gamma$ H2AX) v jejich okolí (Burma *et al.*, 2001). Aktivace ATM spustí patrně negativní zpětnou odpověď, vedoucí k inhibici vzniku dalších SPO11-dvouřetězcových zlomů (Lange *et al.*, 2011). ATM protein kontroluje kromě počtu CO, také jejich rozmístění a vzájemné ovlivňování neboli interferenci CO (Barchi *et al.*, 2008).

*Spo11* je exprimován ve dvou isoformách. SPO11 $\beta$  je pravděpodobně hlavní katalyzátor časných dvouřetězcových zlomů. SPO11 $\alpha$  isoforma je patrně zodpovědná za pozdní dvouřetězcové zlomy v pseudoautozomální oblasti XY (Bellani *et al.*, 2010; Kauppi *et al.*, 2011).

Funkce SPO11 byly potvrzeny cílenými mutacemi. Myši *Spo11*<sup>-/-</sup> samci i samice jsou sterilní. Spermatoocyty jsou odstraněny v pachytene, zatímco oocyty dosáhnou i pozdějších fází (diplotene), po narození samic jsou ale tyto oocyty stejně degradovány, což je další důkaz sexuální dimorfie v umístění a přesnosti meiotických kontrolních bodů. Myší mutant neváže opravný komplex RAD51/DMC1 (viz níže), takže neinicuje invazi jednořetězcových ramen a rekombinaci. Synapse homologních chromozómů nebyla vůbec pozorována, koheze sesterských chromatid však byla nenarušená. SPO11-dvouřetězcové zlomy předcházejí synapsi, kterou samy ovlivňují (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000).

*Spo11* není jediným katalyzátorem meiotických dvouřetězcových zlomů. V kvasinkách bylo identifikováno až 15 genů, které ovlivňují indukci rekombinace (shrnutí v Keeney, 2001), řada z nich však není evolučně konzervovaná a u myši tak byla identifikována jen malá hrstka pomocníků SPO11. Mezi tyto geny patří *Mei1* (*Meiosis defective 1*), *Mei4* (*Meiosis-specific 4 homolog (S. cerevisiae)*) a *Rec114* (*Recombination protein 114*; Libby *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2010). I když byla provedena řada pokusů, jejich přesná biochemická funkce je zatím neznámá. *Mei1* je meioticky-specifický gen, jehož mutace způsobuje sterilitu myši, snižuje množství dvouřetězcových zlomů i vazbu RAD51 (Libby *et al.*, 2003). MEI1 patrně usnadňuje vazbu rekombinačních proteinů k chromatinu a buď přímo, nebo nepřímo ovlivňuje iniciaci dvouřetězcových zlomů a modifikaci (fosforylaci) jejich okolí (Reinholdt & Schimenti, 2005). MEI4 i REC114 jsou lokalizovány na chromozóm nezávisle na SPO11, delece jejich genů vykazují podobné fenotypové projevy jako u *Spo11*<sup>-/-</sup> a *Mei1*<sup>-/-</sup> (Kumar *et al.*, 2010).

Po navození dvouřetězcových zlomů se SPO11 uvolňuje jako oligonukleotid. Odpadnutí SPO11-komplexu a první kroky meiotické rekombinace jsou pod kontrolou celé řady známých i neznámých genů, mezi které patří i opravný komplex RAD51/DMC1 (pro přehled viz Bannister & Schimmenti, 2004). RAD51/DMC1 komplex slouží jako marker počtu dvouřetězcových zlomů v SSDS (single-strand DNA sequencing) metodě, která byla vyvinuta při mapování myších rekombinačních oblastí (Khil *et al.*, 2012).

## 6.2 Oprava dvouřetězcových zlomů a rekombinačních meziproductů

**RAD51 (RAD51 homolog (RecA homolog, *E. coli*) (*S. cerevisiae*)) protein** tvoří ústřední opravný komplex s DMC1, který plní svou funkci zejména v leptotene a zygotene, a poté jeho aktivita klesá. *Rad51* gen je homologem *RecA* genu *Escherichia coli* a *RAD51* kvasinek (Shinohara *et al.*, 1993). Výzkum fenotypových projevů myšního *Rad51* je značně ztížen tím, že mutace *Rad51*<sup>-/-</sup> je života neschopná a embrya umírají již v časném vývoji. Buňky nejsou schopné proliferace, jelikož se *Rad51* účastní mitotického i meiotického dělení (Tsuzuki *et al.*, 1996). Na základě imunolokalizace RAD51 byla odvozena jeho evolučně konzervovaná funkce, tedy podpora výměny jednořetězcových vláken DNA za spotřeby ATP. RAD51 se patrně váže na místa dvouřetězcových zlomů dříve než DMC1 (viz níže; Yoshida *et al.*, 1998). Jedním z důkazů vazby RAD51 k meziproductům rekombinace byla analýza *Spo11*<sup>-/-</sup> a *Mei1*<sup>-/-</sup> spermatocytů. Ve spermatocytech se RAD51 k chromatinu vůbec nevázal právě díky absenci dvouřetězcových zlomů (Baudat *et al.*, 2000; Romanienko & Camerini-Otero, 2000; Libby *et al.*, 2003). RAD51 asociuje také se složkami SC (SYCP1 a SYCP3; Tarsounas *et al.*, 1999).

**DMC1 (homolog of yeast dosage suppressor of mck1) protein** je exprimován výhradně v meioticky aktivních buňkách. *Dmc1* myší gen je evolučně vysoce konzervovaným homologem bakteriálního *RecA* genu a *DMC1* genu kvasinek (Pittman *et al.*, 1998). Fenotypový projev myšního *Dmc1*<sup>-/-</sup> spermatocytu potvrzuje jeho ústřední funkci ve výměně jednořetězcových homologních úseků DNA a v hledání správné homologní sekvence (Tarsounas *et al.*, 1999). Dominantní sterilní alela *Dmc1* genu – *Dmc1*<sup>mei11</sup> způsobuje sterilitu samců, zatímco samičky mají oocyty se zvýšeným počtem chromozómových defektů a jinak jsou plodné. I přes vysokou konzervaci meiotických genů může v populaci myší a třeba i lidí vzniknout nový polymorfismus jako *Dmc1*<sup>mei11</sup>, který je obzvláště nebezpečný tím, že samice jsou pouze přenašečkami a mutace postihuje výhradně samce (Bannister *et al.*, 2007). *Dmc1*<sup>-/-</sup> spermatocyt je degradován v zygotene. Vazba RAD51 na chromozóm odpovídá normálu a mutací je neovlivněna. DMC1 protein patrně kontroluje synapsi přímo homologních chromozómů, protože mutantní spermatocyt tvoří SC maximálně mezi nehomologními chromozómy. U velmi dlouhých savčích chromozómů je tedy nemožné, aby se homologní chromozómy bez pomoci DMC1 vůbec našly a správně spárovaly (Pittman *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998).

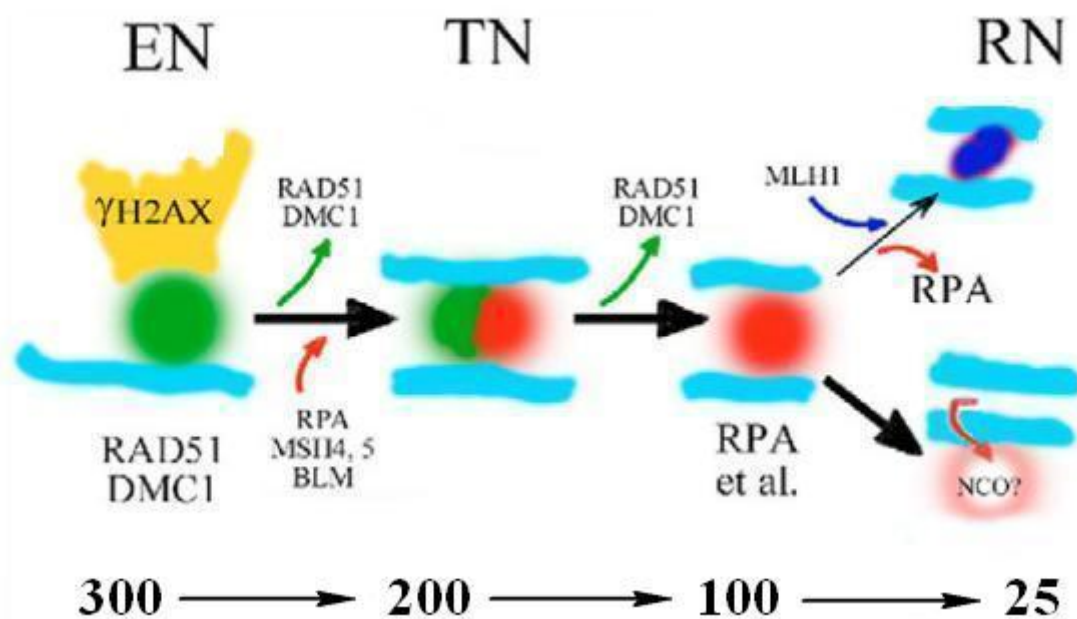
**TEX15 (testis expressed 15)** patří ke skupině proteinů, která kontroluje vazbu komplexu RAD51/DMC1 na jednořetězcové úseky DNA (Yang *et al.*, 2008). Mezi takové proteiny patří i BRCA1 a 2 (breast cancer 1 a 2; Sharan *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2003). *Tex15* gen je exprimován výhradně v meioticky aktivních buňkách a jeho mutace způsobuje sterilitu jen u samců (Yang *et al.*, 2008).

RAD51 nemůže nahradit DMC1 ani naopak, jelikož každý z nich zajišťuje rozdílné kroky v opravě rekombinačních meziproduktů a účastní se jiných proteinových interakcí (Yoshida *et al.*, 1998). RAD51 asociuje s SYCP1 a 3, BRCA1 a 2 nebo RPA (viz níže), zatímco DMC1 jen s SYCP3 a BRCA2 (Sharan *et al.*, 2004; Tarsounas *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2003).

I když přesná biochemická funkce RAD51/DMC1 nebyla zcela u myši prokázána, výše zmíněné experimenty a evolučně konzervované sekvence ji jen potvrzují.

#### *Vývoj rekombinačních překřížení v časně meiotické profázi I*

RAD51/DMC1 komplex je využíván jako genetický marker časných homologních interakcí, neboli časných uzlíků (EN), kterých má myší spermatocyt ve fázi leptotene 250 – 300 (Moens *et al.*, 2007). EN podporují hlavně vyhledávání a párování homologních chromozómů a jen nepatrná část z nich je nakonec opravena jako CO (20 – 50 na myší genom; obr. 8).



**Obrázek 8:** Interakce rekombinačních proteinů v průběhu časně meiotické profázi I. Časné uzlíky (EN; zeleně) mají v průměru 100 nm a při asociaci s RAD51/DMC1 jich je na chromozómech (modře) 250 – 300. Histony jsou po navození dvouřetězcových zlomů v okolí EN fosforylovány (žlutě). EN postupně ubývá (200) a přeměňují se na přechodné uzlíky (TN), na které jsou navázány různé proteiny (RPA, MSH4 a 5, BLM) a zároveň se z oblastí TN postupně ztrácí RAD51/DMC1 a histonová fosforylace γH2AX. Počet TN postupně klesá až na konečných cca. 25 rekombinačních uzlíky (RN), které představují oblasti chiazmat (označeny MLH1 proteinem). Oblasti TN, které nenavážou MLH1 jsou opravena jako non-crossing-over (NCO). Převzato a upraveno z Moens (2007).



V průběhu zygotene homologní chromozómy synapsují a RAD51/DMC1 komplex je postupně nahrazován skupinou dalších proteinů. RPA (replication protein A), BLM (Bloom syndrome protein), MSH4 a MSH5 (MutS protein Homolog of *E. coli* 4, resp. 5) proteiny představují tzv. přechodné uzlíky (TN). V časném pachytene jsou chromozómy plně synapsovány, v genomu nejsou přítomné žádné EN a počet TN klesá na 200 uzlíků na myší genom. Ani jeden známý protein TN není meioticky-specifický. Většina TN je nakonec opravena jako NCO patrně pomocí proteinů jako RPA a BLM, tedy systémem helikáz a topoizomeráz (podle SDSA modelu). TN se vyskytují v počátcích synapse a kontrolují její progresi. S nárůstem synapse mezi chromozómy počet TN ubývá. Když klesne přibližně na 100, začne se na některých místech TN objevovat MLH1/MLH3 (MutL protein Homolog of *E. coli* 1, resp. 3) opravný komplex. Podmnožina takto označených TN se přemění v rekombinační uzlíky (RN), jejichž oprava následně vyústí v CO a chiazmata. Na jednom myším chromozómu je přibližně 10 – 15 TN a jen 2 – 3 z nich se přemění v RN. Zbytek MLH1/MLH3 neoznačených TN se z centra chromozómu přesouvá na okraj. Právě přesun TN patrně aktivuje RPA/BLM/MSH4/MSH5 komplex, kterým jsou TN opraveny jako NCO (Moens *et al.*, 2002; 2007). MLH1/MLH3 komplex nezasahuje do opravné cesty SDSA a nepodílí se na vzniku NCO (Guillon *et al.*, 2005). Oprava dvouřetězcových zlomů, která vyústí v CO, není závislá jen na MLH1/MLH3. Myší organismus musí vytvářet CO ještě jinou alternativní cestou. Jedna z nich by mohla být zprostředkována pomocí MUS81 (methansulfonate, UV Sensitive 81) proteinu (Holloway *et al.*, 2008).

Rovnováha počtu a rozdělení CO v genomu je v myším organismu přísně regulována, jedná se o další kontrolní mechanismus vzniku aneuploidii. CO na sebe vzájemně působí. Přítomnost jednoho obligátního CO na chromozómu velmi snižuje možnost vzniku dalšího CO v jeho blízkém okolí; tento jev se nazývá interference CO. Síla interference postupně narůstá, mezi TN (pozdní zygotene) je slabší než mezi RN (de Boer *et al.*, 2006). Ruku v ruce s interferencí CO jde i homeostatická kontrola rekombinace, která je také postupná. Počet EN (v leptotene) se mezi jednotlivými spermatocyty výrazně liší, ale počet RN (střední pachytene) je již téměř konstantní. Kontrola homologní rekombinace tak nastává ve dvou úrovních, první je po vzniku všech EN a druhá při maturaci RN v CO (Cole *et al.*, 2012).

### **6.3 Kontrola umístění dvouřetězcových zlomů**

Rozdělení dvouřetězcových zlomů v genomu není během meiózy náhodné a je pod kontrolou různých regulačních mechanismů. Dvouřetězcové zlomy se přednostně nachází v místech nazývaných „hotspot“ (Steinmetz *et al.*, 1982). Hotspoty jsou hlavní oblastí tvorby dvouřetězcových zlomů a tedy i rekombinace, která vyústí buď v CO, nebo NCO (Guillon & de Massy, 2002). Umístění hotspotů je v genomu silně nerovnoměrné a může být ovlivněno genetickým pozadím, pohlavím i individuální variabilitou okolí hotspotu. Samčí chromozómy rekombinují hlavně v subtelomerických oblastech,

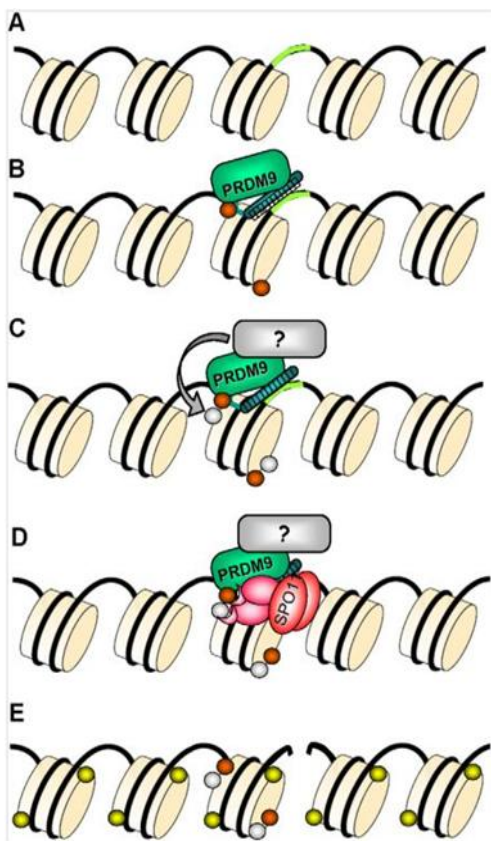
zatímco rekombinace samičích chromozómů je více rovnoměrná (Paigen *et al.*, 2008). Většina myších hotspotů je koncentrovaná v oblastech o velikosti 60 – 330 kb, které se střídají s oblastmi s téměř nulovou rekombinací, dlouhými více jak 3 Mb (Smagulova *et al.*, 2011). Zároveň platí, že rekombinace na chromozomech podléhá interferenci CO (viz kap. 6.2). Samotný hotspot má velikost 1 – 2 kb a v jeho středu je hustota rekombinace nejvyšší (Guillon & de Massy, 2002). Rekombinační aktivita jednotlivých hotspotů se liší až tisíckrát (Jeffreys *et al.*, 2001).

Regulační mechanismy umístění a aktivace hotspotů nejsou zcela známy. Určité histonové modifikace ovlivňují umístění dvouřetězcových zlomů. Trimethylace lysinu 4 histonu H3 (H3K4me3) je epigenetickou značkou transkripčních promotorů (Schneider *et al.*, 2004) a zároveň první objevenou epigenetickou modifikací, která se podílí na umístění a aktivaci dvouřetězcových zlomů v hotspotech. Nezávisle na SPO11 topoizomeráze jsou iniciační místa obohacena o H3K4me3, a to od leptotene po pachytene (Buard *et al.*, 2009).

Dvě na sobě nezávislé studie identifikovaly genetický lokus, který kontroluje umístění myších hotspotů (Grey *et al.*, 2009; Parvanov *et al.*, 2009). Tento lokus, ležící na chromozómu 17, pojmenovali *Dsbc1* (*Double strand break control 1*), popř. *Rcr1* (*Recombination regulator 1*). Na základě křížení různých myších kmenů (odvozených z *Mus musculus molossinus*, *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus*), které se lišily alelou *Dsbc1/Rcr1* a současně i mírou H3K4me3 ve dvou různých hotspotech, byl objeven první gen, regulující umístění myších rekombinačních hotspotů – *Prdm9* (Baudat *et al.*, 2010; Parvanov *et al.*, 2010).

***Prdm9 (PR domain containing 9; Meisetz – Meiosis induced factor containing PR/SET domain and zing-finger motif)*** gen kóduje protein s třemi funkčními doménami: N-koncovou KRAB (Krüppel-associated box) doménu, centrálně umístěnou PR/SET (Positive Regulatory/ *Su(var)3-9*, Enhancer-of-zeste, Trithorax) doménu a C-koncový tandem tzv. zinkových prstů (angl. zinc finger domain). KRAB doména je patrně zodpovědná za vazbu proteinů, PR/SET doména katalyzuje trimethylaci lysinu 4 histonu H3 a tandem zinkových prstů určuje specifickou vazbu k DNA. Výčetem těchto potenciálních vlastností potvrzuje PRDM9 svou regulační úlohu v hotspotech (Baudat *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2005; Parvanov *et al.*, 2010). *Prdm9* je exprimován výhradně v pohlavních orgánech, kde probíhá meiotická profáze I (od preleptotene po pachytene). Jedná se o první tkáňově specifickou methyltransferázu, kontrolující průběh meiózy. Myši s genotypem *Prdm9*<sup>-/-</sup> jsou sterilní a meióza je zastavena v pachytene. Spermatocyty mají narušené párování homologních chromozómů a tvorbu XY tělíška (Hayashi *et al.*, 2005). Díky alternativnímu sestřihu vznikají v buňkách ještě další dvě zkrácené mRNA formy genu *Prdm9*, které postrádají tandem zinkových prstů (Hayashi *et al.*, 2005). Analýzou těchto zkrácených forem byla odhalena další funkce zinkových prstů, kterou je směřování PRDM9 do jádra buněk (Hayashi & Matsui, 2006).

Myši samci i samice s deletovaným *Prdm9* jsou sterilní (Hayashi *et al.*, 2005). U samců s *Prdm9*<sup>-/-</sup> dochází ve spermatocytech ke snížení množství H3K4me3 a poklesu exprese některých genů na autozómech, takže PRDM9 by mohl být transkripčním aktivátorem, který katalyzuje



**Obrázek 9:** Schéma označení hotspotů pomocí PRDM9. (A) Úsek DNA, který je obtočený okolo nukleozómů. Oblast DNA, na kterou se naváže PRDM9 je označena zeleně. (B) Vazba PRDM9 k DNA prostřednictvím tandemu zinkových prstů, H3K4me3 katalyzovaná PRDM9 (oranžově). (C) Vazba neznámého proteinu (šedivě), který se naváže na DNA prostřednictvím PRDM9 a katalyzuje další histonové modifikace (bíle). (D) PRDM9, nebo jiné partnerské proteiny, mohou zprostředkovat vazbu komplexu SPO11, který katalyzuje tvorbu dvouřetězcových zlomů. (E) Vytvořený dvouřetězcový zlom a fosforylace histonu H2AX (žlutě). Převzato z Grey *et al.* (2011).

zinkových prstů *in vitro*. Myší kmeny, které měly jinak rozmístěné hotspoty se zároveň lišily i v počtu zinkových prstů. Právě polymorfismus v počtu a sekvenci těchto repetitů specifikuje oblast vazby PRDM9 k DNA (Baudat *et al.*, 2010; Grey *et al.*, 2011). Po vazbě PRDM9 k DNA je okolní oblast chromatinu obohacena o H3K4me3. PRDM9 by poté mohl zprostředkovat vazbu dalších faktorů, které pozměňují chromatin nebo navádí jiné faktory dvouřetězcových zlomů, ale jak tento proces probíhá, není zatím známo (obr. 9; Grey *et al.*, 2011).

H3K4me3 je umístěna na chromatin prostřednictvím PRDM9 ještě před navozením dvouřetězcových zlomů pomocí SPO11 (Buard *et al.*, 2009; Brick *et al.*, 2012) a i přes důležitost

epigenetickou modifikaci H3K4me3 v promotorech určitých meiotických genů (Hayashi *et al.*, 2005; Hayashi & Matsui, 2006; Mihola *et al.*, 2009). Vysoká variabilita zinkových prstů mezi myšími kmeny a různými druhy organismů však spíše naznačuje, že PRDM9 není transkripčním regulátorem, protože s variabilitou zinkových prstů by se musela velmi rychle vyvíjet i DNA-vazebná doména pro PRDM9 v promotorové oblasti, která je naopak evolučně konzervovaná. Rychlý vývoj oblasti zinkových prstů (Oliver *et al.*, 2009) spíše podporuje úlohu PRDM9 ve vývoji druhů (viz níže) a v tzv. „hotspot paradoxu“. Aktivní hotspoty, jako iniciační místa rekombinace, jsou opraveny podle druhého homologa, který však postrádá aktivní oblast hotspotu. Tento stav by tak měl postupně vést k úbytku hotspotů v genomu a ztrátě rekombinační aktivity, což se paradoxně neděje. Díky rychlému evolučnímu vývoji zinkových prstů PRDM9 může totiž „vzniknout“ mnoho oblastí nových hotspotů najednou, a tím se vyřeší výše zmíněná paradoxní situace (Paigen & Petkov, 2012). Navíc právě označení hotspotů H3K4me3 prostřednictvím PRDM9 neodpovídá H3K4me3 v oblastech promotorů i přesto, že se některé hotspoty nachází velmi blízko těmto transkripčním startům. Proto H3K4me3 zprostředkovaná PRDM9 je pravděpodobně rekombinačně specifická a nepodílí se na aktivaci promotorů (Smagulova *et al.*, 2011).

Lokalizace rekombinačních hotspotů je dána vazbou PRDM9 k DNA prostřednictvím tandemu

PRDM9 v iniciaci rekombinace byly u *Prdm9*<sup>-/-</sup> spermatocytů dvouřetězcové zlomy vyvolány (Hayashi *et al.*, 2005). Další analýza *Prdm9* mutantů odhalila, že i při absenci PRDM9 jsou hotspoty označeny H3K4me3, ale 99 % těchto hotspotů se neshoduje s umístěním hotspotů u normálních spermatocytů nesoucí nepoškozený PRDM9. V případě mutantů jsou hotspoty lokalizovány do funkčních genomických oblastí jako jsou například promotory, zatímco u normálních spermatocytů tuto oblast okupovaly pouze 3 % hotspotů. Iniciace rekombinace ve funkčních oblastech genomu je pravděpodobně nekompatibilní se spermatogenezí a je cíleně vynechávána. Samotná H3K4me3 je tedy pro správnou lokalizaci hotspotů nedostatečná. *Prdm9* je sám o sobě pro H3K4me3 a iniciaci rekombinace postradatelný, ale je esenciální pro přesné určení pozice hotspotů. Všechny hotspoty (98 %) u normálních myších spermatocytů jsou označeny H3K4me3 prostřednictvím PRDM9 s výjimkou pseudoautozomální oblasti XY chromozómu (Brick *et al.*, 2012).

V neposlední řadě byl *Prdm9* gen identifikován jako první savčí gen speciace neboli procesu vzniku nových druhů (Mihola *et al.*, 2009). Vznik nových druhů je výsledkem působení různých reprodukčně izolačních mechanismů. Vlivem těchto mechanismů, mezi které patří i hybridní sterilita, dochází k omezení genového toku mezi nově vznikajícími druhy, což může vyústit v rozdělení populace na dvě dceřiné. Hybridní sterilita je stav, kdy fertilní rodiče z různých populací produkují sterilní potomstvo (Coyne & Orr, 1998). Dle Dobzhanského a Mullerova modelu je sterilita hybridů způsobena inkompatibilitou genů (Dobzhansky, 1951; Muller & Pontecorvo, 1942; cit. dle Bhattacharyya *et al.*, 2013). Určité geny se po oddělení populací mohly odlišným vývojem změnit. Pokud se tyto nové alely sejdou u hybridních potomků, mohou se navzájem negativně ovlivnit. Takové negativní vzájemné interakce nebo ztráta jiných důležitých interakcí se v hybridech může projevit sterilitou nebo smrtí křížence (Coyne & Orr, 1998).

Křížením určitých myších kmenů (např. PWD a B6) odvozených ze dvou poddruhů (*M. m. musculus* s *M. m. domesticus*) myši domácí vznikají sterilní samci, v tomto případě (PWD x B6)F<sub>1</sub>. Jednou z oblastí zodpovědných za sterilitu samčích hybridů *M. m. musculus* x *M. m. domesticus* je *Hst1* (*Hybrid sterility 1*; Forejt, 1996). Na základě křížení myší s různými transgeny z oblasti *Hst1* byla určena přesná poloha lokusu zodpovědného za sterilitu myších samců. Tato oblast odpovídá genu *Prdm9* (Mihola *et al.*, 2009). Podobně jako u *Prdm9*<sup>-/-</sup> spermatocytů je meióza sterilních hybridů zastavena v pachytene. Stejně jako mutanti nedokážou hybridizovat zajistit korektní synapsi homologů a tvorbu sexuálního tělíska (Mihola *et al.*, 2009). Charakterizace inkompatibility *Prdm9* v rámci samčí sterility (PWDxB6)F<sub>1</sub> hybridů dle Dobzhanského a Mullerova modelu odhalila, že alely genu *Prdm9* v kmenech C3H a B6 (*M. m. domesticus*) odpovídají alelám *Hst1*, ovšem zda alela *Prdm9* z kmene PWD (*M. m. musculus*) hraje roli v hybridní sterilitě, zatím není známo (Mihola *et al.*, 2009). Částečným obnovením fertility (PWD x B6)F<sub>1</sub> hybridů pomocí cílené delece alely *Prdm9*<sup>B6</sup> a zvýšení dávky *Prdm9*<sup>B6</sup> ve formě transgenů, byla potvrzena teorie, že jedním z dominantních negativních faktorů způsobujících sterilitu (PWD x B6)F<sub>1</sub> hybridů je alela *Prdm9*<sup>B6</sup> (Flachs *et al.*, 2012). *Prdm9*<sup>B6</sup> negativně interaguje s chromozómem X<sup>PWD</sup> a s jinými neznámými

autozomálními lokusy kmene PWD, mezi kterým by mohla být i oblast chromozómu 17<sup>PWD</sup>, jenž ale doposud nebyla ztotožněna s genem *Prdm9*<sup>PWD</sup>. Jelikož delecí *Prdm9*<sup>B6</sup> nebyla fertilita hybridů plně obnovena (Flachs *et al.*, 2012), nezpůsobuje inkompatibilitu kmenů PWD a B6 jen alela *Prdm9*<sup>B6</sup>, ale i další lokusy, např. na chromozómu 19 (Dzur-Gejdosova *et al.*, 2012).

Jedním z fenotypových projevů samčích sterilních (PWD x B6)F<sub>1</sub> hybridů je asynapse homologních chromozómů ve fázi pachytene (Mihola *et al.*, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2013). Homologní chromozómy hybridů jsou heterospecifické a právě heterospecifické chromozómy myších hybridů selhávají v procesu synapse přednostně. U hybrida, jehož některé chromozómy pocházejí ze stejného myšího poddruhu, asynapse totiž postihne přednostně spíše heterospecifické chromozómy než chromozómy z téhož poddruhu. Nekódující oblasti chromozómů jsou důležité v párování a synapsi homologních chromozómů a jejich rozdílný a rychlý vývoj je pravděpodobně důvodem selhání párování a/nebo synapse homologů. Tyto nekódující oblasti možná představují primární důvod, který spouští zástavu spermatogeneze v pachytene hybridních potomků. Právě *Prdm9* a další oblasti genomu, které přispívají k inkompatibilitě hybridů, mohou přímo nebo nepřímo ovlivnit stabilitu párování heterologních oblastí (Bhattacharyya *et al.*, 2013).

*Prdm9* gen je hlavním regulátorem umístění myších rekombinačních hotspotů a je zodpovědný za H3K4me3 v těchto oblastech autozómů. Dále byl *Prdm9* odhalen jako první gen hybridní sterility u obratlovců, čímž naznačil možnou úlohu epigenetických modifikací v procesu speciace a poskytl tak nové nástroje ve výzkumu hybridní sterility.

## 7 Závěr

Genů, které zajišťují bezproblémový průběh časné meiotické profáze I myší spermatogeneze, je dodnes popsáno více než padesát. Zdaleka však nejsou identifikovány všechny, o čemž svědčí i nedávný objev *Syce3* nebo *Rad21l*, tedy genů kódujících poměrně významné jednotky kohezinového a synaptonemálního komplexu. Neznámým tedy zůstává nejen konečný počet a složení kohezinového a synaptonemálního komplexu, ale i celková koordinace a vzájemná interakce těchto systémů. Ačkoliv jednotky těchto dvou komplexů zastávají specifické role v synapsi chromozómů, ovlivňují navíc do velké míry i funkčně odlišný děj, jakým je homologní rekombinace. To potvrzují i vzájemné interakce RAD51 s SYCP1 a SYCP3, či DMC1 s SYCP3. Nadruhou stranu je tato spolupráce velmi logická, protože bez koordinace synapse a rekombinace chromozómů by gamety vůbec nevznikaly, nebo by ve svém jádře nesly aneuploidie.

Správně dokončená synapse a počátek homologní rekombinace je pod přísnou buněčnou kontrolou pravděpodobně několika meiotických kontrolních bodů (angl. checkpoint). Rozdílné fenotypové projevy mutací (aneuploidie nebo úplná degradace gamet) v meioticky specifických genech mezi samčí a samičí meiózou, patrně úzce souvisí právě s těmito kontrolními body, jejichž počet i časové umístění je pohlavně odlišné. Vzhledem k výrazně rozdílnému konečnému počtu spermatocytů a oocytů, by se zdálo logické, že oogeneze je pod přísnější kontrolou (vedoucí k apoptóze oocytů) než spermatogeneze, ale je to právě naopak. Navíc relativně vysoký počet genů, které hrají roli u obou pohlaví (nejsou specifické jen pro jedno pohlaví) by mohly vést k myšlence, že mutace ve stejných genech povedou u obou pohlaví k podobným defektům. Výjimky však potvrzují pravidlo a nejenže si některé projevy mutací navzájem neodpovídají (viz např. mutace v *Sycp2*, *Sycp3*, *Tex15*, či *Fkbp6*), navíc většina defektů v samičích meiotických genech vedou spíše k aneuploidiím v oocytech a sníženému množství potomků, než celkové eliminaci oocytů (Hunt & Hassold, 2002). Důvod zůstává z velké části zatím neznámý. Jedním z možných vysvětlení jsou rozdílné požadavky na úspěšnou synapsi a opravu poškozené DNA, kdy na rozdíl od oocytů musí spermatocyty do konce pachytenního stádia transkripčně umlčet pohlavní chromozómy XY (Morelli & Cohen, 2005; Bolcun-Filas & Schimenti, 2012). Porozumění těmto sexuálními odlišnostem by mohlo odhalit nové nástroje v léčbě různých lidských chorob způsobených non-disjunkcí.

Genové produkty, které se účastní homologní rekombinace v meiotickém dělení, se zároveň podílí i na opravě poškozené DNA v tělních buňkách. Mezi takové geny patří např. *Msh4*, *Msh5*, *Mlh1*, *Mlh3*, *Atm*, nebo *Blm*. Poruchy lidských ortologů těchto genů vedou nejen ke sterilitě, ale i k závažným poruchám v opravném systému DNA, která může vyústit i v nesnášenlivost slunečního záření (UV jako exogenní mutagen) nebo chromozómové defekty a mentální retardaci (porucha *Blm* genu, tzv. Bloomův syndrom; Ellis *et al.*, 1995; German, 1993) nebo vznik nádorů

(porucha *Atm* genu, tzv. Ataxia telangiectasia; Lavin & Khanna, 1999). Výzkum meiotických genů tak přispívá nejen k obraně proti neplodnosti, ale i proti dalším dědičným lidským chorobám a naopak.

V poslední kapitole jsem se zabývala genem *Prdm9*, který zastává významnou roli v časně fázi meiotického dělení a zároveň je prvním identifikovaným genem hybridní sterility obratlovců. *Prdm9* se pravděpodobně podílel na rozdělení dvou myších poddruhů *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*, čímž se stal významným nástrojem evoluční genetiky (Mihola *et al.*, 2009). Jeho výzkum by mohl pomoci objasnit některé otázky ohledně mechanismů speciace, což je od poloviny 19. století, tedy dob Charlese R. Darwina, velmi diskutované téma.

Meióza je příkladem velmi komplexního děje, kde vzájemné interakce jsou klíčové pro pochopení celého procesu, proto by se budoucí výzkum měl zaměřit na vzájemné působení meiotických proteinů i na jejich možné interakce s DNA a RNA. Tato práce podává širší přehled současných poznatků některých významných genů časně meiotické profáze I (viz Příloha – tab. 1) a nastiňuje nové interakce genů, které nebyly zcela prokázány nebo byly jinými experimenty vyvráceny. Nezbyvá než nově nabyté znalosti prohloubit a vytvořit odrazový můstek pro další výzkum meiotického dělení. Vždyť právě díky meióze je lidstvo schopné reprodukce a vývoje!

## Seznam použité literatury

- Adelfalk C, Janschek J, Revenkova E, Blei C, Liebe B, et al. (2009) Cohesin SMC1 beta protects telomeres in meicytes. *Journal of Cell Biology* 187: 185-199.
- Allers T, Lichten M (2001) Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106: 47-57.
- Alsheimer M, Baier A, Schramm S, Schutz W, Benavente R (2010) Synaptonemal Complex Protein SYCP3 Exists in Two Isoforms Showing Different Conservation in Mammalian Evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 128: 162-168.
- Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, de Rooij DG, et al. (2008) Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14976-14980.
- Arnheim N, Calabrese P, Tiemann-Boege I (2007) Mammalian meiotic recombination hot spots. *Annual Review of Genetics* 41: 369-399.
- Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, et al. (2006) In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics* 38: 1430-1434.
- Bannister LA, Pezza RJ, Donaldson JR, de Rooij DG, Schimenti KJ, et al. (2007) A dominant, recombination-defective allele of Dmc1 causing male-specific sterility. *Plos Biology* 5: 1016-1025.
- \*Bannister LA, Schimenti JC (2004) Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenetic and Genome Research* 107: 191-200.
- Barchi M, Roig I, Di Giacomo M, de Rooij DG, Keeney S, et al. (2008) ATM promotes the obligate XY crossover and both crossover control and chromosome axis integrity on autosomes. *Plos Genetics* 4(5): e1000076.
- Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, et al. (2010) PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science* 327: 836-840.
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S (2000) Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell* 6: 989-998.
- Bellani MA, Boateng KA, McLeod D, Camerini-Otero RD (2010) The Expression Profile of the Major Mouse SPO11 Isoforms Indicates that SPO11 beta Introduces Double Strand Breaks and Suggests that SPO11 alpha Has an Additional Role in Prophase in both Spermatocytes and Oocytes. *Molecular and Cellular Biology* 30: 4391-4403.
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, et al. (1977) Spermatogenic cells of prepuberal mouse – isolation and morphological characterization. *Journal of Cell Biology* 74: 68-85.
- (\*)Bhattacharyya T, Gregorova S, Mihola O, Anger M, Sebestova J, et al. (2013) Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: E468-E477.
- Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, et al. (2007) SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *Journal of Cell Biology* 176: 741-747.
- (\*)Bolcun-Filas E, Schimenti JC (2012) Genetics of Meiosis and Recombination in Mice. In: Jeon KW, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 298. San Diego: Elsevier Academic Press Inc. pp. 179-227.
- Bolcun-Filas E, Speed R, Taggart M, Grey C, de Massy B, et al. (2009) Mutation of the Mouse Syce1 Gene Disrupts Synapsis and Suggests a Link between Synaptonemal Complex Structural Components and DNA Repair. *Plos Genetics* 5(2): e1000393.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, et al. (2006) Retinoid signaling determines

---

\* sekundární zdroj

(\*) primární a zároveň sekundární zdroj



- germ cell fate in mice. *Science* 312: 596-600.
- Brick K, Smagulova F, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV (2012) Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* 485: 642-645.
- Buard J, Barthes P, Grey C, de Massy B (2009) Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *Embo Journal* 28: 2616-2624.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 276: 42462-42467.
- Cole F, Kauppi L, Lange J, Roig I, Wang R, et al. (2012) Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nature Cell Biology* 14: 424-430.
- Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, et al. (2005) Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *Journal of Cell Science* 118: 2755-2762.
- Coyne JA, Orr HA (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 353: 287-305.
- Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, et al. (2003) Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 300: 1291-1295.
- Daniel K, Lange J, Hached K, Fu J, Anastassiadis K, et al. (2011) Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse HORMAD1. *Nature Cell Biology* 13: 599-U232.
- de Boer E, Stam P, Dietrich AJJ, Pastink A, Heyting C (2006) Two levels of interference in mouse meiotic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 9607-9612.
- \*de Massy B (2003) Distribution of meiotic recombination sites. *Trends in Genetics* 19: 514-522.
- de Vries FAT, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, et al. (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination., and XY body formation. *Genes & Development* 19: 1376-1389.
- Dobzhansky T, editor (1951) *Genetics and the Origin of Species*. 3rd ed. New York: Columbia Univ. Press. 364 p.
- Dzur-Gejdosova M, Simecek P, Gregorova S, Bhattacharyya T, Forejt J (2012) Dissecting the Genetic Architecture of F-1 Hybrid Sterility in House Mice. *Evolution* 66: 3321-3335.
- Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R (2000) Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *Journal of Cell Science* 113: 673-682.
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, et al. (1995) The Blooms-Syndrome Gene-Product is Homologous to RecQ Helicases. *Cell* 83: 655-666.
- Flachs P, Mihola O, Simecek P, Gregorova S, Schimenti JC, et al. (2012) Interallelic and Intergenic Incompatibilities of the Prdm9 (Hst1) Gene in Mouse Hybrid Sterility. *Plos Genetics* 8(11): e1003044.
- \*Forejt J (1996) Hybrid sterility in the mouse. *Trends in Genetics* 12: 412-417.
- German J (1993) Bloom-Syndrome – A Mendelian Prototype of Somatic Mutational Disease. *Medicine* 72: 393-406.
- Grey C, Barthes P, Chauveau-Le Friec G, Langa F, Baudat F, et al. (2011) Mouse PRDM9 DNA-Binding Specificity Determines Sites of Histone H3 Lysine 4 Trimethylation for Initiation of Meiotic Recombination. *Plos Biology* 9(10): e1001176.
- Grey C, Baudat F, de Massy B (2009) Genome-Wide Control of the Distribution of Meiotic Recombination. *Plos Biology* 7: 327-339.
- Guillon H, Baudat F, Grey C, Liskay RM, de Massy B (2005) Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Molecular Cell* 20: 563-573.
- Guillon H, de Massy B (2002) An initiation site for meiotic crossing-over and gene conversion in the mouse. *Nature Genetics* 32: 296-299.
- Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, et al. (2006) Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science* 119: 4025-4032.

---

\* sekundární zdroj

- Hamer G, Wang H, Bolcun-Filas E, Cooke HJ, Benavente R, et al. (2008) Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science* 121: 2445-2451.
- \*Handel MA (2004) The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Experimental Cell Research* 296: 57-63.
- \*Hawley RS, Arbel T (1993) Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72: 301-303.
- Hayashi K, Matsui Y (2006) Meisetz, a novel histone tri-methyltransferase, regulates meiosis-specific epigenesis. *Cell Cycle* 5: 615-620.
- Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438: 374-378.
- Herran Y, Gutierrez-Caballero C, Sanchez-Martin M, Hernandez T, Viera A, et al. (2011) The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *Embo Journal* 30: 3091-3105.
- (\*)Hertwig O (1895) *The Cell. Outlines of General Anatomy and Physiology*. London, New York: Sonnenschein and Co., Macmillan and Co.
- \*Hess RA, de Franca LR (2008) Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* 636: 1-15.
- \*Heyting C (1996) Synaptonemal complexes: Structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 389-396.
- \*Hirano T (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion and repair. *Genes & Development* 16: 399-414.
- Holloway JK, Booth J, Edelmann W, McGowan CH, Cohen PE (2008) MUS81 Generates a Subset of MLH1-MLH3-Independent Crossovers in Mammalian Meiosis. *Plos Genetics* 4(9): e1000186.
- Hunt PA, Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296: 2181-2183.
- Ishiguro K, Kim J, Fujiyama-Nakamura S, Kato S, Watanabe Y (2011) A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *Embo Reports* 12: 267-275.
- Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R (2001) Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nature Genetics* 29: 217-222.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150.
- \*Johnson L, Thompson DL, Varner DD (2008) Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science* 105: 23-51.
- Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, et al. (2011) Distinct Properties of the XY Pseudoautosomal Region Crucial for Male Meiosis. *Science* 331: 916-920.
- \*Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 52 52: 1-53.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-384.
- Khil PP, Smagulova F, Brick KM, Camerini-Otero RD, Petukhova GV (2012) Sensitive mapping of recombination hotspots using sequencing-based detection of ssDNA. *Genome Research* 22: 957-965
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SBC, Michaelis C, et al. (1999) A central role for cohesions in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98: 91-103.
- Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T, Kiyonari H, et al. (2012) HORMAD2 is essential for synapsis surveillance during meiotic prophase via the recruitment of ATR activity. *Genes to Cells* 17: 897-912.
- Kolas NK, Yuan L, Hoog C, Heng HHQ, Marcon E, et al. (2004) Male mouse meiotic chromosome cores deficient in structural proteins SYCP3 and SYCP2 align by homology but fail to synapse and have possible impaired specificity of chromatin loop attachment. *Cytogenetic and*

---

\* sekundární zdroj

(\*) primární a zároveň sekundární zdroj

- Genome Research 105: 182-188.
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, et al. (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2474-2479.
- Kouznetsova A, Benavente R, Pastink A, Hoog C (2011) Meiosis in Mice without a Synaptonemal Complex. *Plos One* 6(12): e28255.
- Kumar R, Bourbon HM, de Massy B (2010) Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes & Development* 24: 1266-1280.
- Kumar S, Chatzi C, Brade T, Cunningham TJ, Zhao XL, et al. (2011) Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nature Communications* 2.
- Lammers JHM, Offenbergh HH, Vanaalderen M, Vink ACG, Dietrich AJJ, et al. (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Molecular and Cellular Biology* 14: 1137-1146.
- Lange J, Pan J, Cole F, Thelen MP, Jasin M, et al. (2011) ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* 479: 237-241.
- Lavin LF, Khanna KK (1999) Review: ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *International Journal of Radiation Biology* 75: 1201-1214.
- Leblond CP, Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 55: 548-573.
- Lee J, Hirano T (2011) RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *Journal of Cell Biology* 192: 263-276.
- Lee J, Iwai T, Yokota T, Yamashita M (2003) Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* 116: 2781-2790.
- Lee J, Yokota T, Yamashita M (2002) Analyses of mRNA expression patterns of cohesin Subunits rad21 and rec8 in mice: Germ cell-specific expression of rec8 mRNA in both male and female mice. *Zoological Science* 19: 539-544.
- Libby BJ, De La Fuente R, O'Brien MJ, Wigglesworth K, Cobb J, et al. (2002) The mouse meiotic mutation mei1 disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Developmental Biology* 242: 174-187.
- Libby BJ, Reinholdt LG, Schimenti JC (2003) Positional cloning and characterization of Mei1, a vertebrate-specific gene required for normal meiotic chromosome synapsis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15706-15711.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R (2002) Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124: 173-180.
- Llano E, Herran Y, Garcia-Tunon I, Gutierrez-Caballero C, de Alava E, et al. (2012) Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *Journal of Cell Biology* 197: 877-885.
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, et al. (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature Genetics* 27: 271-276.
- Metzler-Guillemain C, de Massy B (2000) Identification and characterization of an SPO11 homolog in the mouse. *Chromosoma* 109: 133-138.
- Meuwissen RLJ, Offenbergh HH, Dietrich AJJ, Riesewijk A, Vaniersel M, et al. (1992) A coiled-coil related protein-specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo Journal* 11: 5091-5100.
- Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, Forejt J (2009) A Mouse Speciation Gene Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase. *Science* 323: 373-375.
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, et al. (2002) The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *Journal of Cell Science* 115: 1611-1622.

- Moens PB, Marcon E, Shore JS, Kochakpour N, Spyropoulos B (2007) Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *Journal of Cell Science* 120: 1017-1027.
- Morelli MA, Cohen PE (2005) Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130: 761-781.
- Muller HJ, Pontecorvo G (1942) Recessive genes causing interspecific sterility and other disharmonies between *Drosophila melanogaster* and *simulans*. *Genetics* 27(1): 157.
- Oakberg EF (1956a) A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy* 99: 391-413.
- Oakberg EF (1956b) Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy* 99: 507-516.
- Offenberg HH, Schalk JAC, Meuwissen RLJ, van Aalderen M, Kester HA, et al. (1998) SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Research* 26: 2572-2579.
- Oliver PL, Goodstadt L, Bayes JJ, Birtle Z, Roach KC, et al. (2009) Accelerated Evolution of the Prdm9 Speciation Gene across Diverse Metazoan Taxa. *Plos Genetics* 5(12): e1000753.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, et al. (1996) Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *Journal of Cell Biology* 135: 469-477.
- Paigen K, Petkov P (2010) Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nature Reviews Genetics* 11: 221-233.
- Paigen K, Petkov P (2012) Meiotic DSBs and the control of mammalian recombination. *Cell Research* 22: 1624-1626.
- Paigen K, Szatkiewicz JP, Sawyer K, Leahy N, Parvanov ED, et al. (2008) The Recombinational Anatomy of a Mouse Chromosome. *Plos Genetics* 4(7): e1000119.
- Painter TS (1928) A Comparison of the Chromosomes of the Rat and Mouse with Reference to the Question of Chromosome Homology in Mammals. *Genetics* 13: 180-189.
- Parvanov ED, Ng SHS, Petkov PM, Paigen K (2009) Trans-Regulation of Mouse Meiotic Recombination Hotspots by *Rcr1*. *Plos Biology* 7: 340-349.
- Parvanov ED, Petkov PM, Paigen K (2010) Prdm9 Controls Activation of Mammalian Recombination Hotspots. *Science* 327: 835-835.
- Peltari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, et al. (2001) A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Molecular and Cellular Biology* 21: 5667-5677.
- (\*)Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K (2003) Un menage a quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-440.
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, et al. (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Molecular Cell* 1: 697-705.
- Prieto I, Pezzi N, Buesa JM, Kremer L, Barthelemy I, et al. (2002) STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *Embo Reports* 3: 543-550.
- Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martinez C, et al. (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nature Cell Biology* 3: 761-766.
- Reinholdt LG, Schimenti JC (2005) *Mei1* is epistatic to *Dmc1* during mouse meiosis. *Chromosoma* 114: 127-134.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R (2001) Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Molecular and Cellular Biology* 21: 6984-6998.
- Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, et al. (2004) Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biology* 6: 555-562.

---

(\*) přímární a zároveň sekundární zdroj

- \*Revenkova E, Jessberger R (2006) Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* 115: 235-240.
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell* 6: 975-987.
- Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y (2009) The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. *Science* 325: 1394-1398.
- \*Scherthan H (2007) Telomeres and meiosis in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 117-124.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, et al. (2004) Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature Cell Biology* 6: 73-77.
- Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Hoog C, et al. (2011) A Novel Mouse Synaptonemal Complex Protein Is Essential for Loading of Central Element Proteins, Recombination, and Fertility. *Plos Genetics* 7(5): e1002088.
- Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, et al. (2004) BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 131: 131-142.
- Shin YH, Choi Y, Erdin SU, Yatsenko SA, Kloc M, et al. (2010) Hormad1 Mutation Disrupts Synaptonemal Complex Formation, Recombination, and Chromosome Segregation in Mammalian Meiosis. *Plos Genetics* 6(11): e1001190.
- Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, et al. (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to Rad51 and RecA. *Nature Genetics* 4: 239-243.
- Silver LM (1995) *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. New York: Oxford Univ. Press.
- Smagulova F, Gregoret IV, Brick K, Khil P, Camerini-Otero RD, et al. (2011) Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature* 472: 375-378.
- \*Snustad DP, Simmons MS (2009) *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. 871 p.
- Solari AJ (1974) Behavior of XY pair in mammals. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* 38: 273-317.
- Steinmetz M, Minard K, Horvath S, McNicholas J, Srelinger J, et al. (1982) A molecular map of the immune-response region from the major histocompatibility complex of the mouse. *Nature* 300: 35-42.
- Suzuki A, Saga Y (2008) Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes & Development* 22: 430-435.
- Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *Journal of Cell Biology* 147: 207-219.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, et al. (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301: 1239-1241.
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, et al. (1996) Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6236-6240.
- Turner JMA, Aprelikova O, Xu XL, Wang RH, Kim SS, et al. (2004) BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Current Biology* 14: 2135-2142.
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu XL, et al. (2005) Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genetics* 37: 41-47.
- Wojtasz L, Cloutier JM, Baumann M, Daniel K, Varga J, et al. (2012) Meiotic DNA double-strand breaks and chromosome asynapsis in mice are monitored by distinct HORMAD2-independent and -dependent mechanisms. *Genes & Development* 26: 958-973.
- Wojtasz L, Daniel K, Roig I, Bolcun-Filas E, Xu HL, et al. (2009) Mouse HORMAD1 and HORMAD2, Two Conserved Meiotic Chromosomal Proteins, Are Depleted from Synapsed Chromosome Axes with the Help of TRIP13 AAA-ATPase. *Plos Genetics* 5(10): e1000702.
- Xu HL, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GTJ, McKay MJ (2005) Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Developmental Cell* 8: 949-961.

---

\* sekundární zdroj

- Xu HL, Beasley M, Verschoor S, Inselman A, Handel MA, et al. (2004) A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse. *Embo Reports* 5: 378-384.
- Xu XL, Aprelikova O, Moens P, Deng CX, Furth PA (2003) Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* 130: 2001-2012.
- Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, et al. (2006) Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *Journal of Cell Biology* 173: 497-507.
- Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ (2008) Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *Journal of Cell Biology* 180: 673-679.
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, et al. (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Molecular Cell* 1: 707-718.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, et al. (2000) The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell* 5: 73-83.
- Zhou Q, Nie R, Li Y, Friel P, Mitchell D, et al. (2008) Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: An in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biology of Reproduction* 79: 35-42.
- \*Zickler D, Kleckner N (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics* 32: 619-697.

---

\* sekundární zdroj

## Příloha

**Tabulka 1:** Shrnutí všech zmíněných proteinů a jejich funkcí.

Symbol proteinu	Funkce v meiotickém dělení myších spermatocytů*	Citace
STRA8	Indukce meiotického dělení v zárodečných buňkách.	(Baltus <i>et al.</i> , 2006)
CYP26b1 a NANOS2	Potlačení vstupu samčích zárodečných buněk do meiózy v průběhu embryogeneze.	(Suzuki & Saga 2008; Koubova <i>et al.</i> , 2006)
SMC1 $\alpha$	Koheze sesterských chromatid v časně profázi I; podpora AE a tvorby SC.	(Eijpe <i>et al.</i> , 2000)
SMC1 $\beta$	Koheze sesterských chromatid až do metafáze II; integrita chromozómu v oblasti telomer; kontrola kondenzace chromatinové struktury.	(Revenkova <i>et al.</i> , 2001; Adelfalk <i>et al.</i> , 2009; Revenkova <i>et al.</i> , 2004)
SMC3	Koheze sesterských chromatid spolu s SMC1 $\alpha$ a SMC1 $\beta$ .	(Eijpe <i>et al.</i> , 2000; Revenkova <i>et al.</i> , 2001)
REC8	Koheze sesterských chromatid až do metafáze II; výpomoc v párování ramen homologních chromozómy do metafáze I; správné umístění SC mezi homologními chromozómy.	(Lee <i>et al.</i> , 2003; Xu <i>et al.</i> , 2005)
RAD21	Koheze sesterských chromatid v profázi I.	(Xu <i>et al.</i> 2005)
RAD21L	Koheze sesterských chromatid v profázi I; podpora rekombinace mezi homologními chromozómy.	(Ishiguro <i>et al.</i> , 2011; Lee & Hirano, 2011)
STAG3	Koheze sesterských chromatid v oblasti ramen po diplotene; koheze sesterských chromatid v oblasti centromer po metafázi I.	(Prieto <i>et al.</i> , 2001)
SYCP1	Primární složka TF; regulace vazby SYCE1 – 3 a TEX12 do CE; iniciace synapse; dokončení rekombinace a synapse XY tělíska.	(de Vries <i>et al.</i> , 2005; Bolcun-Filas <i>et al.</i> , 2009)
SYCP2	Primární složka AE; regulace vazby SYCP3 do AE.	(Yang <i>et al.</i> , 2006)
SYCP3	Primární složka AE; regulace vazby SYCP2 do AE; kondenzace chromatinu; stabilizace rekombinačních proteinů při vazbě k chromatinu.	(Yang <i>et al.</i> , 2006; Kolas <i>et al.</i> , 2004; Peltari <i>et al.</i> , 2001)
SYCE1	Primární složka CE; iniciace synapse homologů; dokončení rekombinace a synapse XY tělíska; stabilizace SYCP1 ve vazbě k proteinům CE.	(Costa <i>et al.</i> , 2005; Bolcun-Filas <i>et al.</i> , 2009)
SYCE2	Primární složka CE; progrese synapse homologů; dokončení rekombinace a synapse XY tělíska.	(Costa <i>et al.</i> , 2005; Bolcun-Filas <i>et al.</i> , 2007)
SYCE3	Primární složka CE; stabilizace SYCP1 ve vazbě k proteinům CE a stabilizace ostatních primárních složek CE; dokončení rekombinace a synapse XY tělíska.	(Schramm <i>et al.</i> , 2011)
TEX12	Primární složka CE; progrese synapse homologů; dokončení rekombinace a synapse XY tělíska.	(Hamer <i>et al.</i> , 2006; 2008)
SPO11 $\alpha$	Katalýza dvouřetězcových zlomů v pseudoautozomální oblasti XY chromozómů.	(Kauppi <i>et al.</i> , 2011)
SPO11 $\beta$	Katalýza časných dvouřetězcových zlomů v oblasti autozómů.	(Bellani <i>et al.</i> , 2010)

MEI1, MEI4, REC114	Indukce meiotické homologní rekombinace.	(Libby <i>et al.</i> , 2002; Kumar <i>et al.</i> , 2010)
PRDM9	Hlavní regulátor umístění rekombinačních hotspotů; katalyzátor H3K4me3 v okolí autozomálních hotspotů; regulace dalších proteinů rekombinační mašinérie; gen hybridní sterility obratlovců.	(Brick <i>et al.</i> , 2012; Baudat <i>et al.</i> , 2010; Grey <i>et al.</i> , 2011; Mihola <i>et al.</i> , 2009)
FKBP6	Dokončení synapse homologů; interakce s SYCP1.	(Crackower <i>et al.</i> , 2003)
HORMAD1	Kontrola počtu dvouřetězcových zlomů a kompletace synapse; vazba klíčových proteinů v procesu MSCI a MSUC k chromozómu.	(Daniel <i>et al.</i> , 2011)
HORMAD2	Vazba klíčových proteinů v procesu MSCI a MSUC k chromozómu.	(Kogo <i>et al.</i> , 2012)
TRIP13	Uvolnění HORMA proteinů ze synapsovaných úseků chromozómu.	(Wojtasz <i>et al.</i> , 2009)
ATR	Fosforylace chromatinu v MSCI a MSUC.	(Turner <i>et al.</i> , 2004; 2005)
ATM	Fosforylace histonu H2AX v oblastech dvouřetězcových zlomů; kontrola počtu dvouřetězcových zlomů.	(Mahadevaiah <i>et al.</i> , 2001; Lange <i>et al.</i> , 2011)
BRCA1	Kontrola vazby rekombinačních opravných proteinů (RAD51, MLH1 aj.) do oblasti dvouřetězcových zlomů; aktivace ATR při MSCI, popř MSUC.	(Xu <i>et al.</i> , 2003; Turner <i>et al.</i> , 2004; 2005)
BRCA2	Kontrola vazby rekombinačních opravných proteinů (RAD51, DMC1) do oblasti dvouřetězcových zlomů.	(Sharan <i>et al.</i> , 2004)
RAD51	Katalýza výměny jednořetězcových vláken DNA v oblastech dvouřetězcových zlomů.	(Yoshida <i>et al.</i> , 1998)
DMC1	Katalýza výměny jednořetězcových vláken DNA v oblastech dvouřetězcových zlomů; vyhledání odpovídající homologní sekvence.	(Tarsnounas <i>et al.</i> , 1999)
TEX15	Kontrola vazby RAD51/DMC1 komplexu do oblastí dvouřetězcových zlomů podobně jako BRCA1 – 2.	(Yang <i>et al.</i> , 2008)
RPA a BLM	Oprava přechodných uzlíků (TN), která vyústí v NCO.	(Moens <i>et al.</i> , 2002; 2007)
MSH4 a MSH5	Oprava chybného párování bází v oblastech heteroduplexu TN, tzv. „mismatch repair“ systém, tato oprava způsobí NCO	(Snustad & Simmons 2009; Moens <i>et al.</i> , 2002; 2007)
MLH1 a MLH3	Oprava chybného párování bází v oblastech heteroduplexu TN, tzv. „mismatch repair“ systém, tato oprava způsobí CO	(Snustad & Simmons 2009; Moens <i>et al.</i> , 2002; 2007)
MUS81	Alternativní endonukleáza k MLH1/MLH3 komplexu vedoucí ke CO.	(Holloway <i>et al.</i> , 2008)

\*Vyjmenované funkce jsou podloženy řadou experimentů, to však neznamená, že je funkce na 100 % definitivní a správná, je pouze pravděpodobná jako u každého výzkumu.

**Vysvětlivky barev:** *Tm. modrá* – Proteiny iniciace a kontroly vstupu spermatocytů do meiotického dělení; *Červená* – Proteiny koheziového komplexu; *Fialová* – Proteiny synaptonemálního komplexu; *Zelená* – Katalyzátory a regulátory dvouřetězcových zlomů; *Oranžová* – Regulátory synapse a transkripčního umlčení genů; *Sv. modrá* – Oprava dvouřetězcových zlomů a rekombinačních meziproductů.