

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Ing. Martina Svatoňová

Vliv PRDM9 histon H3K4 tri-metyl transferázy na chromozomální sterilitu

The influence of PRDM9 histon H3K4 tri-methyltransferase on chromosomal sterility

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Forejt, DrSc.

Praha, 2015

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, dne 2015

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala především panu Prof. Jiřímu Forejtovi za věnovaný čas, trpělivost a shovívavost a za to, že mi umožnil podílet se na tak zajímavém výzkumu. Dále bych chtěla poděkovat členům laboratoře Myší molekulární genetiky za pomoc při experimentální práci a za příjemné chvíle strávené v tomto kolektivu. V neposlední řadě pak oceňuji práci všech, kteří se různou měrou podíleli na realizaci této práce.

Abstrakt

Gen *Prdm9* kóduje meiotickou metyl-transferázu umožňující metylaci lysinu 4 na histonu H3. Metylace H3K4 je spojována s aktivací genové exprese. Stejný gen byl naší laboratoří identifikován jako gen hybridní sterility myši, *Hst1*. Jeho další funkcí zjištěnou později je regulace “hot-spots” meiotické rekombinace u myši a u člověka.

Cílem diplomové práce bylo využitím transgenních myši ověřit vliv nadpočetných kopií genu *Prdm9* na chromozomální sterilitu indukovanou chromozomální translokací T43H. Bylo zjištěno, že samotný gen *Prdm9* na pozorovanou změnu nemá vliv, ale byl potvrzen významný poziční efekt u translokace T43H. Translokace zděděná od otce způsobuje zhoršení parametrů fertility oproti té pocházející od matky.

Klíčová slova:

Myš, hybridní sterilita, *Prdm9*, T43H

Abstract

The *Prdm9* gene encodes a meiotic histone methyltransferase, which enables tri-methylation of lysine 4 on histon H3. H3K4 tri-methylation is associated with gene expression activation. The same gene was identified in the mouse as the hybrid sterility 1gene. The regulation of hotspots of meiotic recombination in mouse and human is its other function.

The aim of diploma thesis was be to verify the influence of supernumerary copies of *Prdm9* gene on chromosomal sterility using transgenic mice. Sterility will be induced by chromosomal translocation T43H. It was found that the gene *Prdm9* itself has no influence of the observed fenotyp changes. Significant position effect in T43H translocation was confirmed. Translocation inherited from the father causes downgrade of parameters of fertility compared to that derived from the mother.

Keywords:

Mouse, hybrid sterility, *Prdm9*, T43H

Obsah

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ REŠERŠE	2
2.1	GENY HYBRIDNÍ STERILITY	2
2.2	MEIOZA.....	5
2.3	MEIOTICKÁ REKOMBINACE	7
2.4	DVOJITÉ DNA ZLOMY.....	8
2.5	GEN <i>PRDM9</i>	9
2.6	MEIOTIC SILENCING OF UNSYNAPSED CHROMATIN (MSCU)	11
2.7	TRANSLOKACE T(16;17)43H	12
3	CÍL PRÁCE	15
4	MATERIÁL A METODIKA	16
4.1	CHEMIKÁLIE.....	16
4.2	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	17
4.3	SCHÉMA EXPERIMENTU A KRÍŽENÍ	18
4.4	GENOTYPIZACE	19
4.4.1	<i>Izolace DNA</i>	19
4.4.2	<i>PCR</i>	19
4.4.3	<i>Elektroforéza</i>	20
4.5	FENOTYPIZACE.....	20
4.5.1	<i>Pitva</i>	20
4.5.2	<i>Stanovení počtu spermií</i>	21
4.6	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	21
4.7	IMUNOFLUORESCENCE	21
4.7.1	<i>Použité Chemikálie:</i>	22
4.7.2	<i>Vlastní postup</i>	23
5	VÝSLEDKY	25
5.1	HMOTNOST VARLAT	27
5.2	POČET SPERMÍÍ	31
5.3	VÁHA TĚLA A RELATIVNÍ VÁHA TESTES	34
5.4	IMUNOFLUORESCENCE	39
6	DISKUSE	42
7	ZÁVĚR	45
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46

1 Úvod

Hybridní sterilita byla pozorována již Aristotelem, a to jak u rostlin, tak u živočichů. Je to zvláštní forma neplodnosti, kde obě rodičovské formy jsou plně fertillní, ale produkují neplodné potomky (Dobzhansky, 1951).

Hraje důležitou roli jako jedna z postzygotických reprodukčních bariér, které se objevují mezi nově vznikajícími druhy. U myši se hybridní sterilita týká především samců v souladu s Haldanovým pravidlem, které říká, že hybridní sterilita postihuje obvykle heterogametické pohlaví (Haldane, 1922). Fertillní samice se využívají při studiu interakcí a účinků genů, které způsobují sterilitu hybridních samců a umožňují tak studium genetických základů reprodukčně izolačního mechanismu mezi dvěma příbuznými druhy (Coyne, 1984).

Jakým způsobem dochází ke sterilitě (či letalitě) kříženců, vyřešil teoreticky ve 40. letech 19. století Dobzhansky-Mullerův model (Bateson 1909, Dobzhansky 1937, Muller 1942), podle kterého je sterilita hybridů způsobena nekompatibilitou genů. Pokud se populace na určitou dobu rozdělí na dvě dceřiné, mohou se během rozdělení v každé populaci zafixovat určité změny. Vlivem selekce populace divergují například za vzniku nových alel, které jsou sice kompatibilní v rámci jedné dceřiné populace, ale po opětovném vzájemném křížení dvou dceřiných populací může u potomků dojít k negativním epistatickým interakcím mezi nově vytvořenými či změněnými alelami, a tedy k jejich nekompatibilitě (Dobzhansky 1937, Muller 1942).

Z genomového hlediska se dají rozlišit dva základní typy hybridní sterility. Chromozomální hybridní sterilita se projeví v případě, když mají rodičovské druhy výrazné strukturní nehomologie mezi svými chromozomálními segmenty. Jako modelový příklad se u myši využívá translokace mezi chromozomy 16 a 17, T (16;17)43H, která u heterozygotních samců způsobuje neplodnost.

Druhým typem je genová hybridní sterilita, která je způsobena interakcemi mezi specifickými geny (Forejt et Iványi, 1974).

Doposud byly na molekulární úrovni identifikovány čtyři geny hybridní sterility, tři z nich u octomilek – *Odyseus*, *JYalpha*, *Overdrive* (Ting et al. 1998, Masly et al. 2006, Phadnis et Orr 2009) a jeden u myši domácí – *Prdm9*, což je doposud jediný známý gen hybridní sterility u obratlovců (Mihola et al. 2009).

2 Literární rešerše

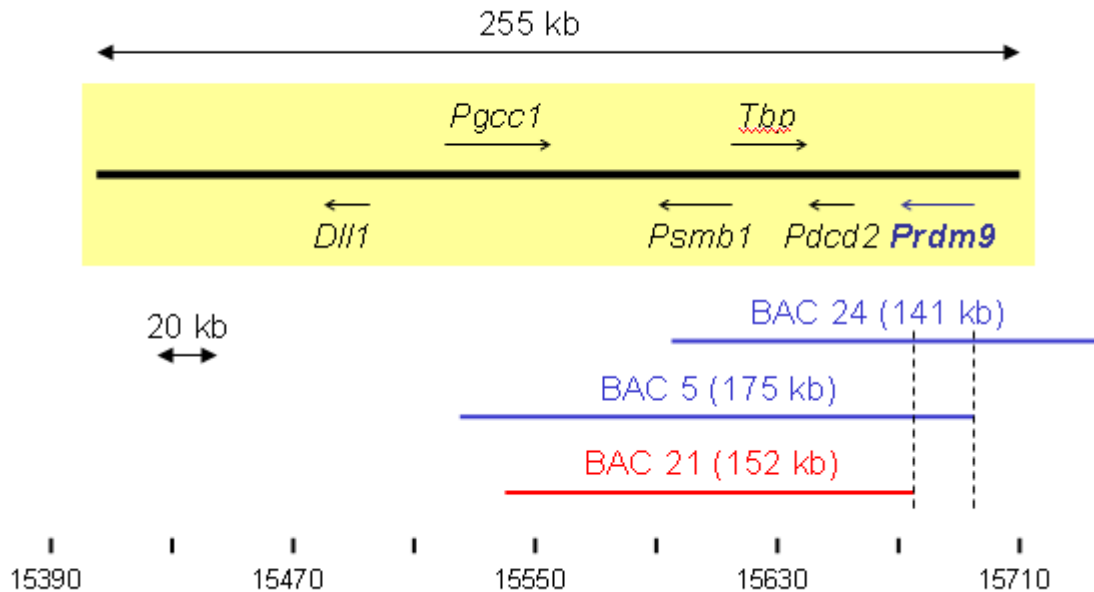
2.1 Geny hybridní sterility

První nalezený gen odpovědný za hybridní sterilitu u myši byl popsán a označen jako *Hst1* (= název odvozen z anglického hybrid sterility 1) a zmapován na chromozom 17 (FOREJT & IVÁNYI, 1974). U genu *Hst1* byly definovány 2 alely, „sterilní“ - *Hst1s* a „fertilní“ - *Hst1f*. Zatímco většina klasických laboratorních myších kmenů odvozených od poddruhu *M. m. domesticus* má *Hst1s* alelu, u některých, například u kmene C3H/DiSnPh byla zjištěna alela *Hst1f* (FOREJT, 1996).

Myši poddruhu *M. m. musculus* a od nich odvozené laboratorní kmeny, mají rovněž gen hybridní sterility, označený jako *Hstw*, který je taktéž polymorfni – byla zjištěna fertální *Hstw^f* alela a sterilní *Hstw^s* alela. Lokus *Hstw* nemusí být nutně identický s lokusem *Hst1*, nicméně byl také mapován na 17. chromozom a to do stejné oblasti, kde se nachází *Hst1* (FOREJT, 1996). Sterilní fenotyp dostaneme, pokud křížíme laboratorní kmen nesoucí *Hst1s* alelu s kmeny odvozených *M. m. musculus*, získáme kombinaci *Hstw^s/Hst1s*. Všechny ostatní ať už heterozygotní (*Hst1^s/Hst1^f*, *Hstw^s/Hst1^f*) nebo homozygotní alelické kombinace jsou plně fertální (Forejt, 1996; Forejt et Ivanyi, 1974)

Cesta k identifikaci genu *Hst1* neboli *Prdm9*, či *Meisetz*, který kóduje histon 3 lysin 4 trimethyltransferázu začala už před několika desetiletími. Nejprve byla oblast *Hst1* lokalizována do první třetiny Chr 17 genetickým mapováním (Forejt *et al.* 1991). V dalším kroku pozičního klonování genu *Hst1* byl pomocí specifických DNA sond a oligonukleotidových primerů izolován soubor DNA klonů, který pokrýval přibližně 2 Mbp myšího Chr 17 nesoucí i oblast *Hst1* (Trachtulec *et al.* 1994). Kombinací dat získaných z této fyzické mapy a jemnější genetické mapy (Gregorova *et al.* 1996) bylo možné zúžit oblast nesoucí *Hst1* gen pouze do 580 kbp. Následné sekvenování a expresní analýzy genů dále zúžily tuto oblast *Hst1* do úseku o délce 360 kb (Trachtulec *et al.* 2005). Tento úsek obsahoval šest kandidátních genů *Dll1*, *Pgcc1*, *Psmbl1*, *Tbp*, *Pdcd2*, a *Prdm9*. Tyto kandidátní geny byly ověřovány zkoumáním jejich schopnosti zvrátit fenotyp hybridní sterility přenesením těchto genů z kmene s fertální alelou (C3H) na kmen se sterilní alelou B6. Byla použita technika transgeneze překrývajícími se bakteriálními arteficiálními chromozomy

(BACy, Osoegawa *et al*, 2000): CHORI-34-45F17 – dále jen BAC 5, CHORI-34-289M8 – BAC 21 a CHORI-34-331G23 – BAC 24 (obrázek 1). Tyto BACy byly transfekovány do embryonálních kmenových buněk F₁(129 x B6). Kmeny 129 i B6 jsou převážně *Mmd* původu. Při křížení transgenních linií BAC 5 a BAC 24 se samicemi PWD vznikali plně plodní potomci a fenotyp hybridní sterility byl tedy změněn. Na rozdíl od toho transgen BAC 21 při stejném křížení dával vzniknout potomkům, kteří zůstali neplodní (Mihola *et al*, 2009).



Obrázek 1: Úsek kritický pro *Hst1* definovaný genetickým mapováním se schematickým vyjádřením polohy kandidátních genů a překrývajících se BAC transgenů. Modře jsou zvýrazněny BACy zachraňující plodnost hybridů (BAC 5 a 24) a červeně BAC 21, který změnu fenotypu hybridní sterility nezpůsobil. Přerušované čáry označují úsek obsahující *Hst1* definovaný BAC transgeny. Stupnice pod obrázkem označuje polohu celého úseku na chromosomu 17 v kb (NCBI m37 verze myšního genomu).

Z výše uvedených výsledků křížení BAC transgenů vyplynulo zúžení úseku zodpovědného za změnu hybridní sterility na asi 15,9 kb dlouhý region obsahující 5' konec genu *Prdm9*. Předchozí expresní a sekvenační analýzy také ukázaly, že geny *Dll1*, *Pgcc1*, *Psmb1*, *Tbp* a *Pcd2* jsou velmi nepravděpodobní kandidáti *Hst1* (Trachtulec *et al*, 2005, 2008; Mihola *et al*, 2007). Jako další důkaz byly použity expresní analýzy transgenní linie BAC 21 pro potvrzení, že integrované geny nebyly umlčeny a mohly se projevit fenotypem hybridní sterility (Mihola *et al*, 2009). Ve stejném článku bylo také publikováno srovnání fenotypů myši s nulovou alelou (knock-out) *Prdm9* genu, již dříve připravených v jiné laboratoři (Hayashi *et al*, 2005) a sterilních hybridů.

Gen *Prdm9* kóduje trimethyltransferázu, která specificky methyluje dimethylovaný histon H3 na lysinu v pozici 4 (H3K4) a jejíž exprese byla zaznamenána zejména v pachytenních spermatocytech myších varlat (Hayashi et al., 2005). Tato epigenetická modifikace histonu H3 je spojena s transkripční aktivací eukaryotických genů (Bernstein et al., 2005). Gen *Prdm9* je tak schopný aktivovat specifické geny potřebné ke zdárnému průběhu meiózy (Hayashi and Matsui, 2006; Matsui and Hayashi, 2007).

Knock-out tohoto genu způsobuje u myši zástavu oogeneze a spermatogeneze ve stadiu primárních spermatocytů. Spermatocyty sterilních hybridů se projevují meiotickou zástavou v pachytene, kdy jsou některé chromozómy asynapsované a netvoří se pohlavní tělísko (angl. sex body) nesoucí transkripčně umlčené pohlavní chromozómy XY (Mihola et al. 2009, Bhattacharyya et al. 2013). Alela *Prdm9* z kmene C57BL/6J (dále B6) negativně interaguje s Chr X z kmene PWD/Ph (dále PWD; zástupce poddruhu *Mmm*), a je tedy jedním z dominantních negativních faktorů způsobující sterilitu samčích hybridů (Flachs et al. 2012). Nedávno byla oblast na Chr X, se kterou alela *Prdm9^{B6}* negativně interaguje, identifikována jako lokus *Hstx2* (angl. hybrid sterility, X chromosome 2) lokalizovaný do úseku o délce 4,7 Mb (Bhattacharyya et al. 2014). Existují však patrně i další lokusy způsobující sterilitu samčích hybridů, jelikož u *Prdm9^{B6}*-deficientních hybridů nedošlo k úplné obnově samčí fertility (Flachs et al. 2012); stejně tak při použití jiných kmenů z poddruhu *Mmm* a *Mmd* byl fenotypový projev odlišný (pouze snížená míra fertility, ne kompletní sterilita), což může být způsobeno jak dalšími neznámými geny hybridní sterility, tak i polymorfismem mezi alelami genu *Prdm9* či oblastmi *Hstx2*. Vliv polymorfismu jiného než v *Prdm9* byl potvrzen při použití kmene PWK/Ph (dále PWK) jako jiného zástupce poddruhu *Mmm*, kdy hybridní samci (PWK x B6)F1 nebyli kompletně sterilní, měli nepatrné množství spermií a dokonce byli v určitém věku schopni produkovat potomstvo (Flachs et al. 2014). Je tudíž zřejmé, že hybridní sterilita myši domácí je multigenová záležitost.

PARVANOV et al. (2010) prokázali, že gen *Prdm9* je zároveň genem, který kontroluje aktivaci rekombinačních hotspotů u savců (rekombinační hotspot = oblast genomu, s velmi častým výskytem rekombinací), k podobnému zjištění souběžně dospěli BAUDAT et al. (2010)

2.2 Meioza

Meióza je specializované buněčné dělení, které zajišťuje vznik gamet u všech sexuálně se rozmnožujících organismů. 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.

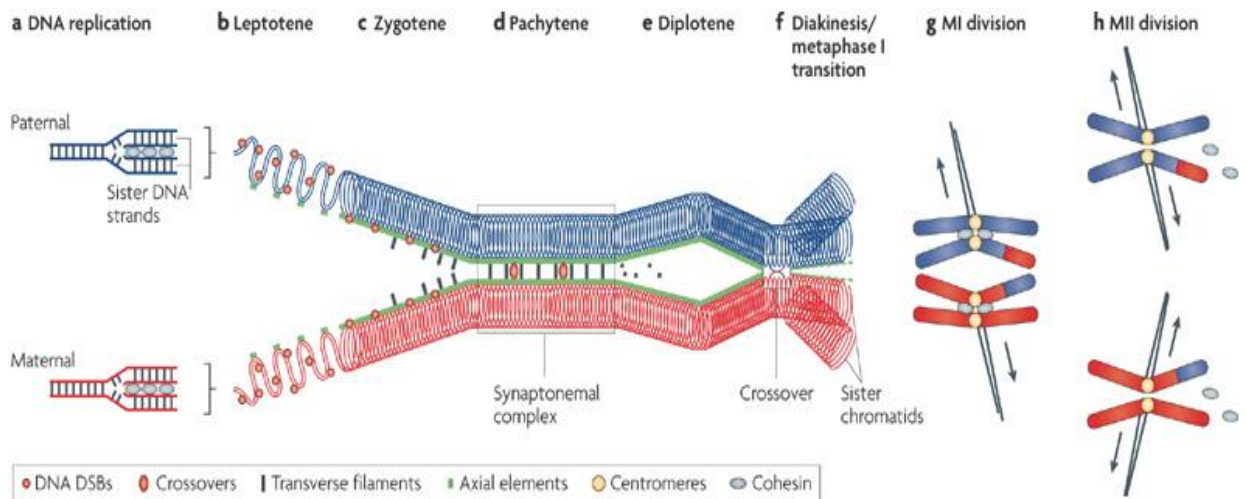
- Meioza I.

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. 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.

- 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, k sesterským chromatidám se s každé jedné strany připojí dělicí vřeténko. V anafázi II se sesterské chromatidy rovnoměrně rozcházejí k opačným pólům buňky. Nakonec se v telofázi II znovu vytvoří jaderná membrána a chromozómy dekonduzují

Přehled meiozy je znázorněn na obrázku 2 (převzato z Burgoyne *et al.* 2009)



Nature Reviews | Genetics

Obrázek 2: Přehled meiózy.

a) Během S fáze buněčného cyklu dochází k duplikaci chromozómů procesem replikace DNA. Každý chromozóm se tak skládá ze dvou sesterských chromatid spojených centromerou

b) Profáze I se dělí na 5 stadií. V prvním z nich, Leptotene, začíná kondenzace duplikovaných chromozómů. Homologní chromozómy se k sobě volně přibližují a jednotlivé chromatidy mají tvar dlouhých nitkovitých vláken (Zickler *et* Kleckner, 1998). Mezi sesterskými chromatidami se formuje centrální osové vlákno bílkovinné povahy, které je později nutné pro synapsi homologů. Centrální osové 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 *et* Schimenti, 2012).

Na DNA se objevují dvouřetězcové zlomy (Double stranded breaks – DSB)

c) V Zygotene dochází k velmi těsnému párování (synapsi) homologních chromozómů.

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).

d) V Pachytene jsou chromozómy již maximálně kondenzovány a synapse je dokončena. Dvouřetězcové zlomy jsou 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.

e) Během stádia Diplotene dochází k rozpadu synaptonemálního komplexu. Homologní chromozomy jsou spojeny pouze v místech překřížení.

F) Během přechodu přes fázi Diakineze do Metafáze I. jsou chromozomy maximálně kondenzovány, axiální elementy se rozpadají. Bivalenty se pohybují do středu jádra, kde se řadí kolmo na osu dělicího vřeténka.

G) 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).

H) V druhém Meiotickém dělení se rozpadají kohesiny mezi sesterskými chromatidami. Způsob připevnění centromery na dělicí vřeténko zajišťuje, aby každá dceřiná buňka dostala jednu kopii z páru chromatid.

2.3 Meiotická rekombinace

Meiotické rekombinace vytváří různorodost uvnitř populace. Stejně důležitou funkcí je vytváření spojení mezi homologními chromozomy a zajišťování jejich přesné segregace. Správné provedení meiózy je nezbytné pro plodnost, pro zachování integrity genomu a pro zajištění normálního vývoje potomstva. Ve většině organismů je pro zajištění přesné segregace homologních chromozomů v prvním meiotickém dělení požadována crossing-over (CO) rekombinace. Absence CO může mít za následek náhodné disjunkce a aneuploidie, což vede ke smrti embrya nebo vývojovým vadám. (Handel *et* Schimenty, 2010)

Během profáze meiózy I, probíhá párování a synapse homologních chromozomů, což je proces, který je zprostředkován unikátní meiotickou strukturou - synaptonemálním komplexem (SC). V jednotlivých stádiích profáze I probíhá skládání chromozomů a jejich

párování, ke kterému dochází v průběhu leptotene a zygotene; synapse, která je kompletní na počátku stádia pachytene; a desynapse, která nastane během fáze diplotene. Tento složitý proces chromozomálních změn doprovází události rekombinace, které jsou iniciovány z dvojitých DNA zlomů (DSB).

Během rekombinace jsou tyto zlomy opraveny buď procesem zvaným crossing-over (výměna části chromatidových ramen nejčastěji mezi homologními chromozómy; CO), či non-crossing-over (bez výměny chromatidových ramen; NCO). CO i NCO jsou doprovázeny jevem nazývaným genová konverze, což je jednosměrný přenos genetické informace z chromatidy donora na chromatidu recipienta.

U DSB opravených jako CO dochází k překřížení chromatid mateřského a otcovského původu a k reciproké výměně homologních částí mezi překříženými chromatidami, navíc tato výměna tedy může být doprovázena genovou konverzí. Naopak při NCO k fyzické výměně částí chromatid nedochází, pouze jedna z chromatid například mateřského homologa (donora) předá, či lépe „překopíruje“ právě krátký úsek své genetické informace na jednu z chromatid homologa otcovského původu (recipienta). Při opravě DSB, jejichž výsledkem je NCO, tedy nedochází k reciproké výměně genetické informace, změna se odehrává pouze na jedné ze dvou sesterských chromatid recipienta. V souhrnu je většina (okolo 90 %) meiotických DSB opravena jako NCO. Současně je však na každém chromozómu alespoň jeden DSB opraven způsobem, který vyústí v CO, protože fyzické spojení homologních chromatid při CO je naprosto nezbytné pro přesné řazení a správný rozchod chromozómů v průběhu meiózy I. Porucha v homologní rekombinaci, která nedokáže zajistit tento obligátní CO, způsobuje sterilitu nebo různé chromozomální poruchy, například aneuploidie (review Allers & Lichten 2001, Handel & Schimenti 2010, Paigen & Petkov 2010, Cole *et al.* 2014, Crichton *et al.* 2014).

2.4 Dvojité DNA zlomy

Zahájení rekombinací geneticky naprogramovaným vznikem DSB je základní událost, která vede k rekombinaci a synapsi.

DSB, které jsou opraveny pomocí homologně rekombinačního aparátu, nevznikají v genomu lidí, myši a dalších eukaryotických organismů náhodně, ale jsou soustředěny do oblastí o šířce 1 až 2 kbp označovaných jako „hotspoty“ (review Arnheim *et al.* 2007).

Co přesně určuje pozici hotspotů a DSB v genomu, je předmětem řady výzkumů již více než 25 let. Umístění hotspotů a míru rekombinace ovlivňuje několik faktorů, které musí navzájem spolupracovat, protože ani jeden z nich není sám o sobě dostatečně silný pro to, aby zajistil přesnou pozici a správný počet všech hotspotů v genomu (Smagulova *et al.* 2011). Mezi tyto faktory patří například strukturní a funkční stavba chromozómů či epigenetické modifikace. Zdá se totiž, že se rekombinační události sice vyskytují blízko genů (do 50 kbp), ale mimo jejich oblast transkripce (Myers *et al.* 2005).

Všechny DSB, které jsou opraveny homologně rekombinačním aparátem, jsou ještě před samotným vznikem DSB označeny epigenetickou značkou – trimethylací lysinu 4 histonu H3 (H3K4Me3; Buard *et al.* 2009).

Pozici hotspotů určuje i samotná sekvence DNA uvnitř hotspotů, kdy byl u lidí nalezen degenerovaný 13 bp dlouhý DNA motiv (CCNCCNTNNCCNC), který se vyskytuje přibližně u 41 % lidských hotspotů (Myers *et al.* 2008). Jelikož se ale tato sekvence vyskytuje ve velké míře i mimo oblast hotspotů, není pro přesné určení jejich pozice a aktivity u lidí dostačující (Berg *et al.* 2010).

Na základě srovnání rekombinačních aktivit několika myších kmenů byl objeven lokus na Chr 17, který reguluje pozici myších rekombinačních hotspotů (Grey *et al.* 2009, Parvanov *et al.* 2009). Jako nejvhodnější kandidátní gen z této oblasti se nabízel *Prdm9*, protože jako jediný ze studované oblasti kódoval protein s H3K4-methyltransferázovou aktivitou a dvě různá křížení, která se lišila typem haplotypu lokusu na Chr 17, se současně lišila i mírou H3K4Me3 ve sledovaných hotspotech (Buard *et al.* 2009, Parvanov *et al.* 2010, Baudat *et al.* 2010).

Na základě již zmíněného degenerovaného 13 bp dlouhého DNA motivu, který byl nalezen u 41 % lidských hotspotů, byl odvozen kandidátní DNA-vazebný protein, který by tento motiv mohl rozpoznávat, PRDM9 (Myers *et al.* 2010). Vazba lidského PRDM9 proteinu na jednom z hotspotů byla potvrzena také *in vitro* (Baudat *et al.* 2010). Tímto byl PRDM9 odhalen jako faktor regulující rozmístění rekombinačních hotspotů v myším a lidském genomu.

2.5 Gen *Prdm9*

Gen *Prdm9*, je u myší exprimován výhradně v pohlavních orgánech, v případě samců v buňkách meiotické profáze I od preleptotene po časně/střední zygotene. Jedná se zatím o jedinou známou tkáňově specifickou H3K4-trimethyltransferázu kontrolující průběh meiózy. Protein PRDM9 z kmene C57BL/6J je tvořen 862 aminokyselinami a má několik funkčních domén. Na

N-konci proteinu se nachází KRAB (angl. Krüppel-associated box) doména a SSXRD (angl. Synovial sarcoma, X breakpoint repression domain), v centrální části je PR/SET doména obklopená zleva jedním zinkovým kolenem (angl. zinc knuckle) a zprava jedním zinkovým prstem (angl. zinc-finger) a na C-konci PRDM9 proteinu je tandemová repetice C₂H₂ zinkových prstů (obrázek3; Hayashi *et al.* 2005, Birtle *et al.* Ponting 2006, Buard *et al.* 2014).



Obrázek3. Schéma proteinu PRDM9 a jeho funkčních domén. N-konec proteinu s KRAB (Krüpel-associated box) doménou a SSXRD (Synovial sarcoma, X breakpoint repression domain). Centrální část nese PR/SET doménu zleva obklopenou jedním zinkovým kolenem a zprava jedním zinkovým prstem. C-konec proteinu s tandemem repetice C₂H₂ zinkových prstů. Převzato a upraveno z Buard *et al.* (2014).

Tandemová repetice zinkových prstů, který má α -helikální strukturu, určuje specifickou vazbu k DNA. Alely genu *Prdm9* se nejčastěji liší počtem a proteinovou sekvencí jednotlivých zinkových prstů v C-koncovém tandemu repetice. Počet repetice zinkových prstů v tandemu se u hlodavců a primátů pohybuje většinou v rozmezí 7–16 (Oliver *et al.* 2009, Kono *et al.* 2014).

Baudat *et al.* 2010, Parvanov *et al.* 2010 se domnívají, že důvodem proč jsou domény zinkových prstů silně divergované, může být například díky schopnosti C₂H₂ domén určovat pozici hotspotů. Tato teorie je podporována několika důkazy. Byly objeveny obrovské variace v pozici DSB hotspotů mezi myšimi poddruhy a v pozici rekombinačních hotspotů mezi lidmi v rámci jedné populace. Vybrané myší poddruhy se na totožném genetickém pozadí lišily pouze alelou genu *Prdm9* (Brick *et al.* 2012). Variabilita alel lidského genu *PRDM9* lišící se doménou zinkových prstů je v signifikantním vztahu s měnícím se rozmístěním hotspotů v lidské populaci, kde bylo identifikováno devět hlavních alel lidského genu *PRDM9* (Baudat *et al.* 2010). Pozitivní selekce, která je vyvíjena na doménu zinkových prstů genu *Prdm9* tedy pravděpodobně vede k velké variabilitě v lokalizaci hotspotů mezi i v rámci druhů (Baudat *et al.* 2010, Myers *et al.* 2010, Parvanov *et al.* 2010, Auton *et al.* 2012). Aktivní rekombinační hotspoty jsou u myší ve spermatocytech obohaceny epigenetickou značkou H3K4Me3 (Buard *et al.* 2009, Smagulova *et al.* 2011) a při změně *Prdm9* domény zinkových prstů zároveň dochází ke změně míry H3K4Me3, aktivity hotspotů a pozice homologní rekombinace (Grey *et al.* 2011).

Podle všeho je tedy gen *Prdm9* zodpovědný za umístění rekombinačních hotspotů u myši i lidí (Baudat *et al.* 2010, Berg *et al.* 2010), a to prostřednictvím své DNA vazebné domény v podobě zinkových prstů.

Porovnáním rekombinačních map dvou myších kmenů se stejným genetickým pozadím lišícím se pouze alelami genu *Prdm9* (rozdílný počet repetice a sekvence zinkových prstů v tandemu) se ukázalo, že spolu tyto myši kongeni sdílí pozice pouze 1,1 % hotspotů. Pokud se spolu naopak porovnávaly dva myší kmeny s odlišným genetickým pozadím ale se stejnou alelou genu *Prdm9*, sdílely spolu až 98 % hotspotů (Brick *et al.* 2012). Jednalo se o první důkaz, že pozice prakticky všech hotspotů jsou pod kontrolou *Prdm9*. Pokud se spolu křížily dva myší kmeny se stejným genetickým pozadím ale jinou alelou genu *Prdm9*, nedošlo u jejich potomků v F1 (první filiální) generaci ke zdvojnásobení počtu hotspotů. Zároveň hotspoty myši z F1 generace nejsou sumou hotspotů z parentální generace a neplatí zde zisk 50 % hotspotů od jednoho rodiče a 50 % od druhého (Smagulova *et al.* 2011, Brick *et al.* 2012). Počet CO (a DSB) na buňku (angl. recombination rate) není ale ovlivněn genem *Prdm9* (Dumont *et al.* 2011).

Přesná funkce epigenetického značení hotspotů je u myši zatím neznámá, neboť H3K4Me3 se nachází i v oblastech, kde se meiotické DSB netvoří. Trimethylace H3K4 se také nachází v hotspotech myši, které mají nefunkční gen *Spo11*, jehož produkt indukuje tvorbu DSB. Proto tato značka není následkem vzniku a/nebo opravy DSB, ale je přítomna ještě před jejich vznikem, což potvrzuje funkci PRDM9 právě v iniciaci myši homologní rekombinace (Smagulova *et al.* 2011).

Jeden z možných scénářů regulace umístění DSB a hotspotů u myši je takový, že po navázání proteinu PRDM9 prostřednictvím domény zinkových prstů ke specifickému úseku DNA dojde k H3K4Me3 okolních nukleozómů a díky vzniklé otevřené konformaci jsou do této oblasti navedeny další komponenty nezbytné pro tvorbu DSB včetně SPO11 (Grey *et al.* 2011, Baker *et al.* 2014). Zahájení tvorby DSB sice není závislé na funkčním proteinu PRDM9, ale naopak je nezbytný pro přesnou a správnou lokalizaci DSB a hotspotů jako naváděcí signál dalších složek meiotické rekombinace.

2.6 Meiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSCU)

Meiotická inaktivace pohlavních chromozómů (meiotic sex chromosome inactivation - MSCI) je epigenetický proces nezbytný pro spermatogenezi, jehož porucha je spojena s pachytenní zástavou a sterilitou samců (Royo *et al.* 2010). Předpokládá se, že MSCI je specifickým případem obecnějšího mechanismu, nazvaného meiotické umlčení

asynapsovaného chromatinu (meiotic silencing of unsynapsed chromatin - MSUC), který umlčuje veškerý chromatin v asynapsi (Baarends et al 2005, Turner et al 2005, Schimenti J (2005) Homolka *et al* (2007) analyzovali meiotické důsledky autozomální asynapse, zejména pak vliv na autozomální MSUC, MSC1 a jejich vztah k zástavě spermatogeneze.

Na myších samcích heterozygotních pro T(16;17)43H translokaci ukázali, že translokační kvadrivalent často zůstává v asynapsi a asociuje s pohlavním tělískem. Asynapsi doprovázelo transkripční umlčení příslušných genů. MSUC translokovaného autozomu je následováno zvýšenou expresí X-vázaných genů naznačující selhání MSC1.

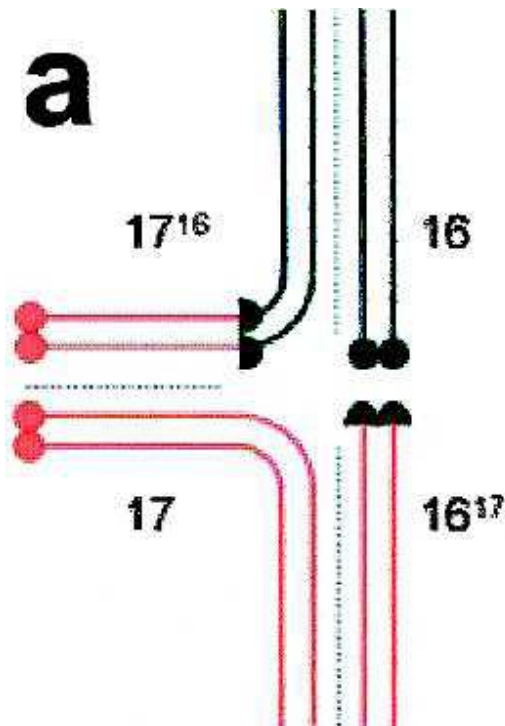
Prostřednictvím úzkého kontaktu asynapsovaných autozomů s pohlavními chromozomy dochází k interferenci autozomálního MSUC a MSC1, která následně vede k apoptóze, zástavě spermatogeneze a specificky samčí sterilitě. Homolka et al. (2007) navrhuje poruchu MSC1 jako obecný důvod chromozomální sterility, jež postihuje výlučně samce, na základě podobných meiotických fenotypů řady nezávislých autozomálních přestaveb a potvrzené roli selhání MSC1 u X autozomálních translokací (Turner et al. 2006.).

Dále pak Homolka et al 2012 genetickým rozšířením oblasti asynapse pomocí *t12* haplotypu pak ukázali, že porucha spermatogeneze i MSC1 je úměrná rozsahu asynapse a síle autozomálního MSUC. Překvapivě, transkripční umlčení asynapsované autozomální oblasti předchází poruše inaktivace X chromozomu, což naznačuje rozdíl v buněčné odpovědi na asynapsi autozomálního a gonozomálního chromatinu. Způsob, jakým autozomální asynapse vede k poruše MSC1, zůstává nejasný.

2.7 Translokace T(16;17)43H

T(16;17)43H (dále jen T43) chromozomální translokace je příkladem autozomální přestavby vedoucí k samčí sterilitě (struktura viz obrázek 4). C57BL/10-T43H/T43H kongenní kmen (B10-T43/T43) byl připraven opakovaným zpětným křížením T43 translokace na C57BL/10ScSnPh (B10) inbrední kmen a homozygotizován prostřednictvím fertálních B10-T43/B10-Rb7(16;17)Bnr dvojité heterozygotních samců (Forejt et al., 1995)

Křížení B10-T43/T43 samců s B10 samicemi vedlo k produkci sterálních B10-T43/+ samců nesoucích translokaci v heterozygotním stavu.



Obrázek 4 Schéma pachytení synapse v translokačním kvadrivalentu u B10-T43/+ samců (převzato z Homolka *et al.* 2007).

Homolka *et al* (2007) popisují experiment vedoucí k objasnění jejího vlivu na meiózu. Porovnávali průběh spermatogeneze mezi B10-T43/+, B10-T43/T43 a B10-+/+ samci. Jen B10-T43/+ samci, nesoucí T43translokaci v heterozygotním stavu, byli sterilní. Jak B10-T43/T43 homozygoti, tak i B10 samci bez translokace byli fertillní a sloužili jako kongenní kontroly.

Histologická analýza objevila téměř naprostou absenci spermatozoí v semenných kanálcích B10-T43/+ samců a značnou redukci počtu spermatid. Analýza zastoupení populací pre-mid pachytenních spermatocytů (zahrnujících leptoténní, zygoténní a časná pachytenní stadia), mid-late pachytenních buněk (zahrnujících střední a pozdní pachytenní stadia) a spermatid pomocí průtokové cytometrie odhalila silný pokles již v zastoupení mid-late pachytenních spermatocytů. V heterozygotních B10-T43/+ samcích tedy dochází k progresivní zástavě spermatogeneze na úrovni pachytene první meiotické profáze.

V pachytene je běžně dokončena synapse a meiotická rekombinace mezi homologními chromozomy.

Homolka ve své disertační práci (2012) dále zjišťoval, zda dochází k ovlivnění synapse u B10-T43/+ samců pomocí sledování lokalizace BRCA1 a γ H2AX, které značí asynapsovaný chromatin v jednotlivých spermatocytech.

Na základě silně asymetrického umístění translokačního zlomu u B10-T43/+ samců předpokládá problémy s párováním translokačního kvadrivalentu. Ta byla nalezena u většiny spermatocytů, zároveň s častou asociací kvadrivalentu s pohlavním tělískem.

To vedlo k formulaci hypotézy, že tato asociace může vést k interakcím mezi asynapsovanými autozomy a pohlavním tělískem, které jsou obdobou jevu popsaného jako „position effect variegation“ (Hendrich, 1995)

K posouzení vlivu na genovou expresi dále Homolka et al (2007) provedli celogenomovou analýzu genové exprese v izolovaných populacích pre-mid pachytenních spermatocytů, mid-late pachytenních spermatocytů a spermatid. U B10-T43/+ samců pozorovali převahu downregulovaných genů (tzn. genů se sníženou expresí) na chromozomu 17, který je součástí translokačního kvadrivalentu a nejvíc náchylný k problémům se synapsí. Downregulované geny byly přednostně lokalizovány v okolí translokačního zlomu, mapovaného na ~30Mb pozici (Vacik et al. 2005) který se nejčastěji nachází v asynapsi. Tento efekt byl nejvýraznější v populacích pre-mid pachytenních a mid-late pachytenních spermatocytů.

Pozorované snížení genové exprese v oblasti asynapse poskytoval první přímý důkaz, že meiotické umlčení asynapsovaného chromatinu (MSUC) ovlivňuje hladiny mRNA. V mid-late pachytenních spermatocytech fertálních samců dochází k heterochromatinizaci pohlavních chromozomů a jejich transkripčnímu umlčení prostřednictvím meiotické inaktivace pohlavních chromozomů (MSCI), která je nezbytná pro samčí fertilitu (Royo et al. 2010) Profilování genové exprese ale ukázalo, že v mid-late pachytenních spermatocytech B10-T43/+ samců dochází k zvýšení exprese řady X-vázaných genů (Homolka 2012). Pozorované selhání MSCI, které následuje po autozomálním MSUC, je pravděpodobnou příčinou zástavy spermatogeneze a možným vysvětlením specificky samčí sterility, jež je charakteristickým znakem řady autozomálních translokací.

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je využitím transgenních myši ověřit vliv nadpočetných kopií genu *PRDM9* na chromozomální sterilitu indukovanou chromozomální translokací T43H.

4 Materiál a metodika

4.1 Chemikálie

Agaróza	Serva
Kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA)	Serva
Ethanol	Merck
Ethidium bromid (EtBr)	Sigma
Orange G	Sigma
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminometan)	Roth

Pufry a roztoky

GeneRuler 20 bp Plus DNA Ladder Thermo Scientific

Hydroxid sodný (NaOH) Serva

1 x PBS (angl. phosphate buffered saline):

136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4

TE (pH 8,0): 10mM Tris·HCl, 1mM EDTA pH 8,0

0,5 x TBE: 44,5 mM Tris, 44,5 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA

Vzorková nanášecí barva: 4,78M Orange G, 25% (v/v) glycerol

Chemikálie pro PCR

10x reakční pufr s MgCl_2 Fermentas

Taq DNA polymeráza Thermo Scientific

12,5mM dNTP MIX Serva

Primery pro PCR (Tab. 1)

Tabulka 1: primery pro PCR			
Název	Sekvence	Délka [bp]	T_m [°C]
CH07F	TTGCTATAAAAGGACTGTTTGAT	23	61
CH07L	ACACAAAGACAGAAGAAGAGGA	21	60
SP6Pu	AATTCCTATGAAGATCCTT	20	60
SP6Pt	GCAGTCGTAAAAGTCAGAA	19	63

4.2 Biologický materiál

Principy zacházení s laboratorními zvířaty byly v souladu se zákony České republiky pro experimentální práci se zvířaty (vyhláška č. 207/2004 Sb., a zákony č. 246/92 Sb. a 77/2004 Sb.) Myši byly chovány v SPF (Specific Pathogen Free) bariérovém zařízení ve zvěřinci Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky. Měly řízený světelný režim 12/12 a standardizované podmínky (vlhkost vzduchu, teplota, ad libitní přístup k potravě a vodě).

V experimentu byly použity myši odvozené od laboratorních kmenů C57BL/10J (B10) a C57BL/6J (B6), u kterých je většina genomu původem z *M. m. domesticus*.

- **Linie Gbac5, Gbac21, Gbac24**

Tyto linie myši byly získány v naší laboratoři v předešlých letech, pro účely mapování genů hybridní sterility. Jejich přípravu podrobně popisují Mihola *et al.* (2009). Byla použita technika transgeneze překrývajícími se bakteriálními arteficiálními chromozomy (BACy, Osoegawa *et al.* 2000): CHORI-34-45F17 – dále jen BAC 5, CHORI-34-289M8 – BAC 21 a CHORI-34-331G23 – BAC 24. BAC24 je integrován do genomu v šesti kopiích, zatímco BAC5 jen ve dvou kopiích stejně jako BAC21, který ale neobsahuje celý gen *Prdm9*. Tyto BACy byly transfekovány do embryonálních kmenových buněk F₁(129 x B6), které jsou odolnější a snadněji manipulovatelné než buňky odvezené z B6 nebo 129 kmene (Goodwin *et al.* 2001). Dalším obvyklým krokem, jak vylepšit fenotypizování geneticky modifikovaných myši (knock-out nebo transgenních linií), je přenos manipulovaných genů na genetické pozadí standardních laboratorních kmenů. Tento přenos na kmen B6, provedený deseti-generačním zpětným křížením, popisuje ve své diplomové práci Flachs (2009). Byly tak ustanoveny nové

kongenní linie. Jejich analýza SNP potvrdila, že pozadí všech třech kmenů je skutečně vyčištěné od DNA ze 129 kmene. U každého kmene se pouze jedna oblast lišila od B6 kmene, což naznačuje, že tyto úseky mohou obsahovat integrační místo transgenů (Flachs, 2009; Flachs *et al.* 2012).

- **Linie B10-T43/T43**

Translokace mezi chromozomy 16 a 17, T(16;17)43H (Searle *et al.* 1974), je dlouhodobě studována jako nástroj pro analýzu proximálních částí chromozomu 17 (Forejt *et al.* 1980), a jako modelový příklad samčí sterility navozené autosomálními přestavbami chromozomů (Forejt *et al.* 1995). C57BL/10-T43H/T43H kongenní kmen byl připraven opakovaným zpětným křížením myši s T43 translokací na C57BL/10ScSnPh (B10) inbrední kmen přes fertilní prostředníky. Tento proces popisují Homolka *et al.* (2007). Všechny rodičovské myši použité v pokusu nesly tuto translokaci v homozygotním stavu.

4.3 Schéma experimentu a křížení

Základní schéma experimentu bylo následující:

- Křížení homozygotních samic nesoucích translokaci T43 se samci (heterozygoti) nesoucími BAC 5, 24, 21. Následně proběhlo i reciproké křížení (samci homozygoti T43 X samice nesoucí BACy)
- Genotypizace potomků (pouze samci)
- Ve věku 10 – 13 týdnů – usmrcení a pitva
- Měření vybraných fenotypových znaků (vážení testes a počet spermií)
- U vybraných jedinců příprava imunofluorescenčních preparátů
- Statistické zpracování
- Měření vybraných fenotypových znaků

4.4 Genotypizace

4.4.1 Izolace DNA

Vzorkem tkáně pro izolaci DNA byl 0,5 až 2 cm dlouhý kousek ocásku, který byl odebrán buď přímo mnou v chovu, nebo ošetřovatelem na základě požadavku v centrálním systému. Ocásek byl ihned po odstříhnutí uchován v centrifugační mikrozkuhavce (objem 2 ml) v mrazáku. Vlastní izolace byla provedena metodou HotSHOT (Truett et al. 2000). Tato extrakce je vhodná pro rychlou izolaci DNA za účelem genotypizace a amplifikace produktů o velikosti ideálně do 200 bp.

Fragment tkáně byl přidán do 600 μ l předem připraveného roztoku NaOH (50 mM) v 1,5ml mikrozkuhavkách. Následně byl vzorek s tkání inkubován 90 minut v 95 °C (termostat Hybridiser HB-1D, Techne). Po rozpadu tkáně byly na dně zkumavky viditelné chlupy a obrátle a v supernatantu byla rozpuštěná DNA. Po zchlazení se vzorek protřepával, aby se tkáň dokonale rozpadla. Dále bylo k lyzátu přidáno 50 μ l 1M Tris·HCl (pH 8). Poté byl vzorek lehce promíchán převrácením zkumavky a centrifugován 6 minut na maximální otáčky (16100xg, pokojová teplota; mikrocentrifuga 5415 D, Eppendorf), čímž se nečistoty a nerozpadlá tkáň usadily na dně zkumavky. Následně byl vzorek ihned použit pro genotypizaci (bez ředění), nebo byl uchován v 4 °C (do dvou týdnů) či v -20 °C (déle jak dva týdny).

4.4.2 PCR

Pro PCR reakci byly použity primery popsané v tabulce 1. Standardně byla použita první sada primerů (Ch07), amplifikující délkově polymorfní mikrosatelitový úsek, který je obsažený jak v recipientní linii tak v transgenním (přenášeném) úseku. Pro ověření některých hůře se amplifikujících vzorků byl použit druhý pár primerů (SP6), který zobrazuje pouze přítomnost, či nepřítomnost Bac vektoru. Pro oba páry byly stejné reakční podmínky.

Reakce probíhala celkem ve 20 μ l reakční směsi, která obsahovala: vodu, DNA templát 1 μ l, 1x PCR pufr, 1,65 mM MgCl₂, 175 μ M každého dNTP, 200 nM obou primerů a 0,3 U *Taq* polymerázy. Amplifikace DNA templátu pomocí PCR proběhla v 8-jamkových mikrozkuhavkách („stripech“) v jednom z našich přístrojů pro PCR (GeneAMP PCR Systém 9700, Applied Biosystems; TProfessional Basic Gradient, Biometra; XP-Cycler, Bioer) Program použitý pro amplifikaci je popsán v Tabulce 2.

Tabulka 2: Amplifikační program pro genotypizaci			
Cyklus	Denaturace	Hybridizace	Elongace
1.	94°C – 1:15	55°C – 0:05	68°C – 0:24
2.	94°C – 0:30	52,5°C – 0:05	68°C – 0:25
3.-37.	94°C – 0:30	51,5°C – 0:10	68°C – 0:26*
Závěr	68°C – 5:00	10°C - nekon.	-

* každý cyklus se čas prodlužuje o jednu vteřinu

4.4.3 Elektroforéza

Získané PCR amplikony byly rozděleny na horizontální gelové elektroforéze (zdroj napětí RPS 301, AP Czech; elektroforetická vana Model 96 Cell, Bio-Rad) za použití 4% agarosového gelu a 20bp DNA žebříčku. DNA byla zviditelněna pod UV světlem pomocí interkalační látky EtBr (10 mg/ml), který byl přidán přímo do rozpuštěného gelu před ztuhnutím, v množství 10 µl (EtBr) na 100 ml gelu. Před nanesením vzorku na gel byla ke každému vzorku přidána nanášecí barva Orange G s glycerolem v množství jedné desetiny objemu vzorku. Elektroforetická sestava byla přelita 0,5 x TBE puforem a byla puštěna pod napětím 8,4 V/cm. DNA v gelu byla zviditelněna pod UV světlem a gely vyfoceny pomocí UV-transluminátoru s kamerou (G:Box, Syngene) s dokumentačním systémem GeneSys (Syngene).

4.5 Fenotypizace

4.5.1 Pitva

Dospělí samci byli fenotypováni většinou okolo 12. týdne života. Myši byly uspány chloroformem a poté byly usmrceny dislokací krční páteře. Po zvážení celého těla následovalo otevření břišní dutiny. Nejprve byla vyjmuta celá nadvarlata, která byla vložena do 1 ml vychlazeného 1 x PBS. Poté byla vyjmuta samotná varlata, která byla po očištění a odstranění gonadálního tuku zvážena s přesností na tři desetinná místa v gramech.

4.5.2 Stanovení počtu spermií

Počet spermií byl stanoven pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Odebraná nadvarlata byla důkladně rozstříhána pitevními nůžkami v 1 ml 1 x PBS (cca čtyřicet stříhů). Poté bylo vzorkem silně zatřepáno a asi 2 minuty byl ponechán v klidu na laboratorním stole kvůli usazení tukových a tkáňových nečistot. Následně bylo z vytvořené mezivrstvy s uvolněnými spermii odebráno 10 μ l vzorku, který byl dle potřeby buď naředěn, nebo rovnou nanesen na Bürkerovu počítací komůrku rozdělenou na 12x12 čtverců (o výšce 0,1 mm). Spermie s normální morfologií byly spočítány pod světelným mikroskopem (Eclipse E200, Nikon), a to ve čtvercích v obou diagonálách Bürkerovy komůrky, celkem 24 + 1 čtverců. Počet buněk v 25 čtvercích x 10000 x zředění se rovná koncentraci buněk/ml.

4.6 Statistické zpracování dat

Databáze hodnocených dat (genotypy a fenotypové znaky u všech hodnocených zvířat) byla vytvořena v programu Microsoft Office Excel a přenesena do programu SAS 9.4 pomocí procedury Import. Byla provedena základní explorační analýza dat – procedurami Means a Univariate. Následně byly provedeny výpočty dalších statistických charakteristik – jelikož soubor nevykazoval normální rozdělení, pro vyhodnocení zda se jednotlivé skupiny od sebe liší bylo použito neparametrické období analýzy rozptylu Wilcoxonovo skóre (Kruskal – Wallisův test). Tato metoda slouží k posouzení, zda existují významné rozdíly mezi průměrnými pořadími hodnot u hodnocených proměnných.

4.7 Imunofluorescence

U vybraných jedinců byla provedena imunofluorescenční analýza nátěrů spermatocytů s použitím protilátek proti proteinům synaptonemálního komplexu 3 (SCP3) a fosforylovanému histonu H2AX (anti- γ H2AX). Pro obarvení buněčných jader bylo použito barvivo DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). Postupovalo se podle Andersonova protokolu (Anderson *et al.* 1999) s drobnými modifikacemi.

4.7.1 Použité Chemikálie:

Protilátky:

primární – králičí monoklonární protilátka proti SCP3, myší protilátka proti γ H2AX

sekundární – kozí proti-králičí IgG-Alexa488, kozí proti-myší IgG Alexa568

Roztok DAPI v nanášecím médiu (Vectashield)

RPMI médium (Sigma)

Roztok 1% Paraformaldehydu:

Na 1000 μ l:

50 mM NaBorate(pH 9.2)	927 μ l
32 % Paraformaldehyd	34 μ l
15% triton X-100	10 μ l
7 x Protease Inhibitor	29 μ l (Přidat těsně před použitím)

Sacharoza 0.1 M

Na 500 μ l:

1000 mM sacharoza	50 μ l
millipore voda	378.6 μ l
7 x Inhibitor Proteáz	71.43 μ l (Přidat těsně před použitím)

0.5x MAH-vázací pufr

Na 400 μ l:

1.5% BSA

5 % Goat serum

0.05% triton X- 100

0.2 x Inhibitor Proteáz (Přidat těsně před použitím)

1 x PBS doplnit do objemu

4.7.2 Vlastní postup

Po přípravě roztoků probíhaly následující kroky:

- Z varlat odebraných myším při pitvě byly odstraněny obaly a tkáň byla vložena do 200 μ l RPMI pufru. Intenzivním protřepáváním v ruce po dobu 5 minut byly odděleny semenotvorné kanálky od vazivové tkáně. Po následné sedimentaci byl odstraněn supernatant a procedura zopakována.
- Po usazení (2 minuty) byl suspenze rozstříhána malými nůžkami, promíchána pomocí pipetování s ustříženou špičkou (s objemem 1000 μ l) a rovnoměrně rozdělen do dvou mikrozkušavek.
- Dále byla suspenze odstředěna po dobu 5 minut při 2000 x g = 4600rpm (centrifuga Eppendorf). Během této doby, byla připravena mikroskopická sklička do plastových misek, které obsahovaly vlhkou papírovou utěrku. Na každé skličko bylo přidáno 200 μ l roztoku 1% paraformaldehydu
- Supernatanty byly odstraněny, a buněčné pelety z obou mikrozkušavek byly resuspendovány v 1000 μ l roztoku 0,1 M sacharózy
- Na každé skličko bylo umístěno 100 μ l buněčné suspenze a misky se skličky byly posléze zakryty, aby nemohlo dojít k vysušení. Inkubace probíhala po dobu 3 hodin při teplotě 4 ° C.
- Poté byla sklička jemně opláchnuta čistou vodou a sušena na vzduchu.
- Sklička byla zkontrolována pod mikroskopem a dále bylo pracováno pouze s těmi, kde byly buňky dobře rozprostřené. Ta byla ještě dodatečně dvakrát promyta v PBS (1M).
- Na sklička bylo přidáno 200 μ l MAH pufru, byla přikryta krycím skličkem a proběhla inkubace po dobu 1 hodiny ve 4 ° C.
- Dále byly na sklička přidány primární protilátky zředěné v MAH pufru a po přikrytí krycím skličkem byly inkubovány přes noc ve 4 ° C.

- Druhý den byla sklíčka třikrát promyta v PBS (1M) a poté byly přidány sekundární protilátky taktéž zředěné v MAH pufu.
- Inkubace se sekundárními protilátkami probíhala 2 hodiny ve 4 ° C v temné místnosti.
- Skla byla opět třikrát promyta v PBS (1M) ve tmě, po uschnutí na vzduchu byl přidán roztok DAPI v nanášecím médiu (Vectashield)
- Až do pozorování byla sklíčka skladována při teplotě -20 ° C v neprůhledném obalu.

Snímky byly pořizovány a zkoumány pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 400 (Tokio, Japonsko) s Plan Fluor objektivem - zvětšení 60x (Nikon, MRH00601) a snímány DS-QiMc monochromatickou CCD kamerou (Nikon). Pro získávání a úpravu fotografií byl použit software NIS elements (verze 3.0) a snímky byly dále upraveny v programu Adobe Photoshop CS (Adobe Systems).

5 Výsledky

Prvním krokem pro analýzu vlivu nadpočetných kopií genu PRDM9 na chromozomální sterilitu bylo založení křížení. Byly vytvořeny chovné páry v dostatečném množství, tak aby počet samčích potomků v jednotlivých skupinách dosáhl aspoň 30 kusů. Samice kmene B10, obsahujících ve svém genomu translokaci T(16;17)43H v homozygotní sestavě byly kříženy s několika samci z kmenu B6 nesoucí transgeny BAC 5, BAC21 a BAC24. Samci BAC21 a BAC24 byli heterozygoti, samci BAC5 homozygoti. BAC 5 a 24 obsahují na rozdíl od BACu 21 gen hybridní sterility *Prdm9*. Navíc, jak bylo publikováno (Mihola *et al*, 2009), transgen BAC 24 se integroval v šesti kopiích na rozdíl od BACů 5 a 21, které jsou integrovány pouze ve dvou kopiích.

V druhém kole pokusů bylo pářeno 6 samců B10.T43/T43 (homozygoté) - se samicemi BAC21, BAC24 (heterozygoté) a BAC5 (homozygotní). Narození potomci byli ve věku průměrně 12 týdnů usmrceni, u samců byl určen fenotyp a genotyp. Myši z druhého reciprokého křížení jsou ve výsledcích označovány jako Bac21m, Bac24m a Bac5m. Jako kontroly sloužili transgen-negativní sourozenci z příslušných křížení. U prvního křížení (translokace zděděná od matky) nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v žádném z parametrů mezi skupinou kontrol pocházející z křížení Bac21xT43 a skupinou Bac24xT43. Byli tedy pro zjednodušení zahrnuti do jedné skupiny označované kontr. U reciprokého křížení (translokace od otce) se ale tyto skupiny sourozenců bez Bac statisticky lišily v mnoha parametrech, nelze je tedy posuzovat společně (označení kontr24m, kontr21m).

Celkově bylo zhodnoceno 206 samčích potomků z těchto křížení. U všech byl určen genotyp a změřena váha těla, váha testes a počet spermií. Souhrnné statistiky je možné vidět v tabulce 3.

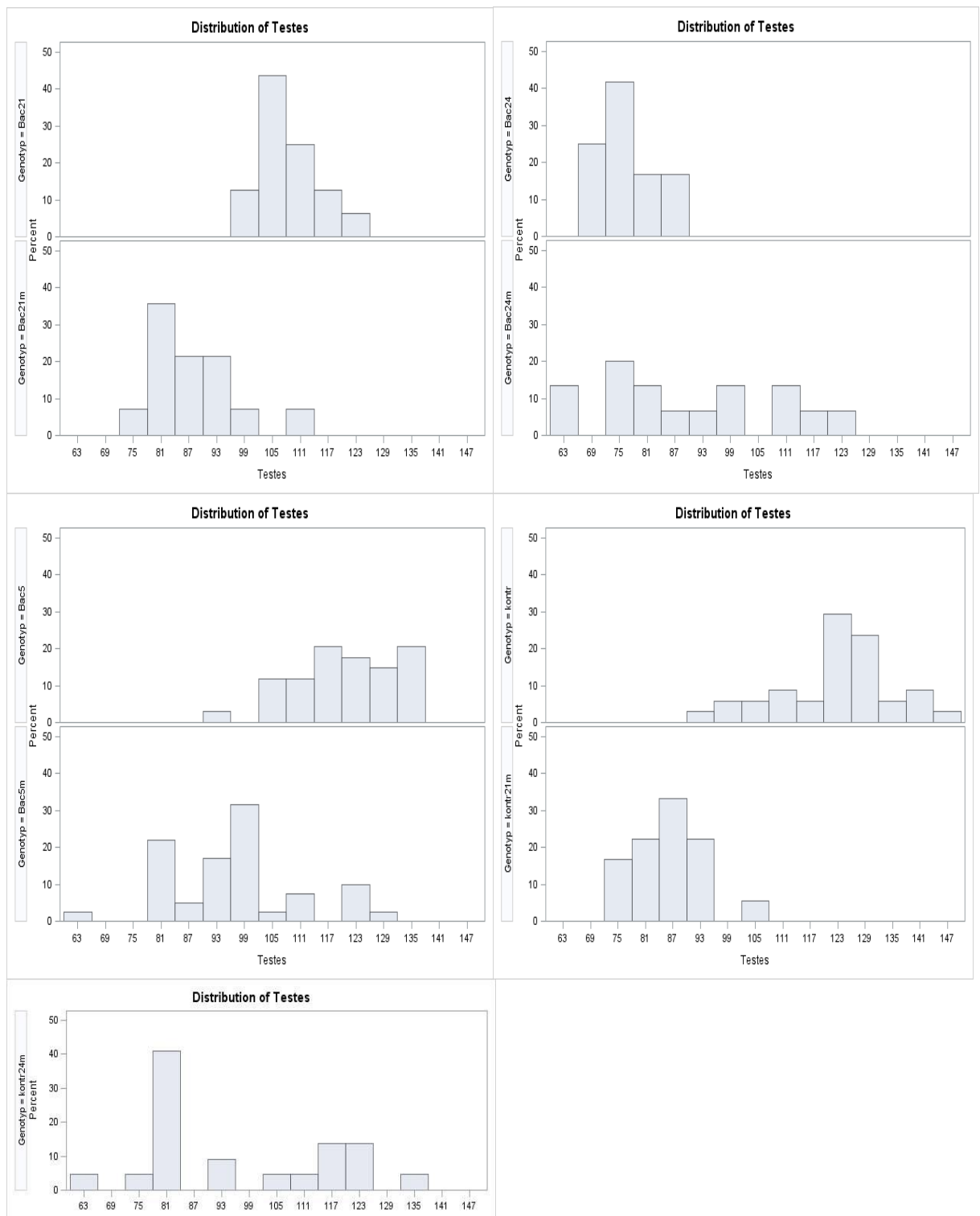
Genotyp		průměr	SO	Minimum	Maximum	N
Bac21	Testes	108,69	6,50	99,00	124,00	16
	Spermcount	1 710 875,00	1 817 766,10	260 000,00	6 300 000,00	16
	Hmotnost	25,74	2,19	22,60	29,90	16
	relat	4,24	0,33	3,55	4,69	16
Bac21m	Testes	87,86	8,90	76,00	108,00	14
	Spermcount	749 357,14	1 016 770,12	87 000,00	3 600 000,00	14
	Hmotnost	27,66	2,23	24,00	31,20	14
	relat	3,19	0,34	2,67	3,70	14
Bac24	Testes	76,58	6,08	66,00	87,00	12
	Spermcount	24 000,00	25 067,18	0,00	90 000,00	12
	Hmotnost	28,93	4,04	25,10	37,80	12
	relat	2,67	0,25	2,30	3,07	12
Bac24m	Testes	89,80	19,49	60,00	124,00	15
	Spermcount	2 211 333,33	3 584 798,99	0,00	13 000 000,00	15
	Hmotnost	34,01	4,02	27,20	39,80	15
	relat	2,63	0,45	2,04	3,45	15
Bac5	Testes	120,26	10,69	95,00	135,00	34
	Spermcount	2 320 529,41	1 880 211,42	120 000,00	7 100 000,00	34
	Hmotnost	25,41	1,79	20,20	27,60	34
	relat	4,74	0,40	3,97	5,69	34
Bac5m	Testes	96,07	14,41	65,00	127,00	41
	Spermcount	2 123 529,41	2 390 583,65	80 000,00	8 600 000,00	34
	Hmotnost	26,85	1,78	22,40	29,40	41
	relat	3,59	0,57	2,78	4,92	41
kontr	Testes	122,21	12,36	92,00	144,00	34
	Spermcount	6 751 794,12	5 388 720,41	156 000,00	23 500 000,00	34
	Hmotnost	26,62	1,82	21,90	32,20	34
	relat	4,60	0,45	3,42	5,38	34
kontr21m	Testes	85,06	8,47	73,00	105,00	18
	Spermcount	729 833,33	1 722 659,27	12 000,00	7 300 000,00	18
	Hmotnost	27,71	1,61	24,70	30,20	18
	relat	3,08	0,33	2,53	3,77	18
kontr24m	Testes	95,82	20,30	63,00	132,00	22
	Spermcount	8 780 954,55	12 396 242,90	0,00	39 100 000,00	22
	Hmotnost	32,01	4,00	22,95	40,30	22
	relat	3,02	0,63	2,06	4,44	22

Tabulka 3: Testes = hmotnost obou varlat (mg), Spermcount = absolutní počet spermií v 1ml, Hmotnost = hmotnost celého těla (g), relat = relativní váha varlat tj. absolutní váha varlat v miligramech vztažená na celkovou váhu těla v gramech, SO = směrodatná odchylka, N = počet jedinců.

5.1 Hmotnost varlat

Závislost mezi hmotností varlat a sterilitou myších samců byla zjištěna porovnáním počtu potomků zplozených samci za měsíc a hmotností varlat jednotlivých samců. Hybridní samci, kteří mají varlata lehčí než 75 mg nemají spermie v nadvarlatech a neplodí potomky. U zcela fertlních samců přesahuje hmotnost varlat 120 mg. Samci, kteří měli varlata v rozmezí 75 - 120 mg, vykazovali plynulý přechod fenotypu od úplné sterility až po normální fertilitu (Forejt *et* Ivanyi, 1974).

Pro lepší znázornění distribuce jedinců v jednotlivých genotypových kategoriích a kontrolu normálnosti rozdělení důležité pro další postup, byl pro každý odečítaný fenotyp vytvořen histogram (obrázek 5).



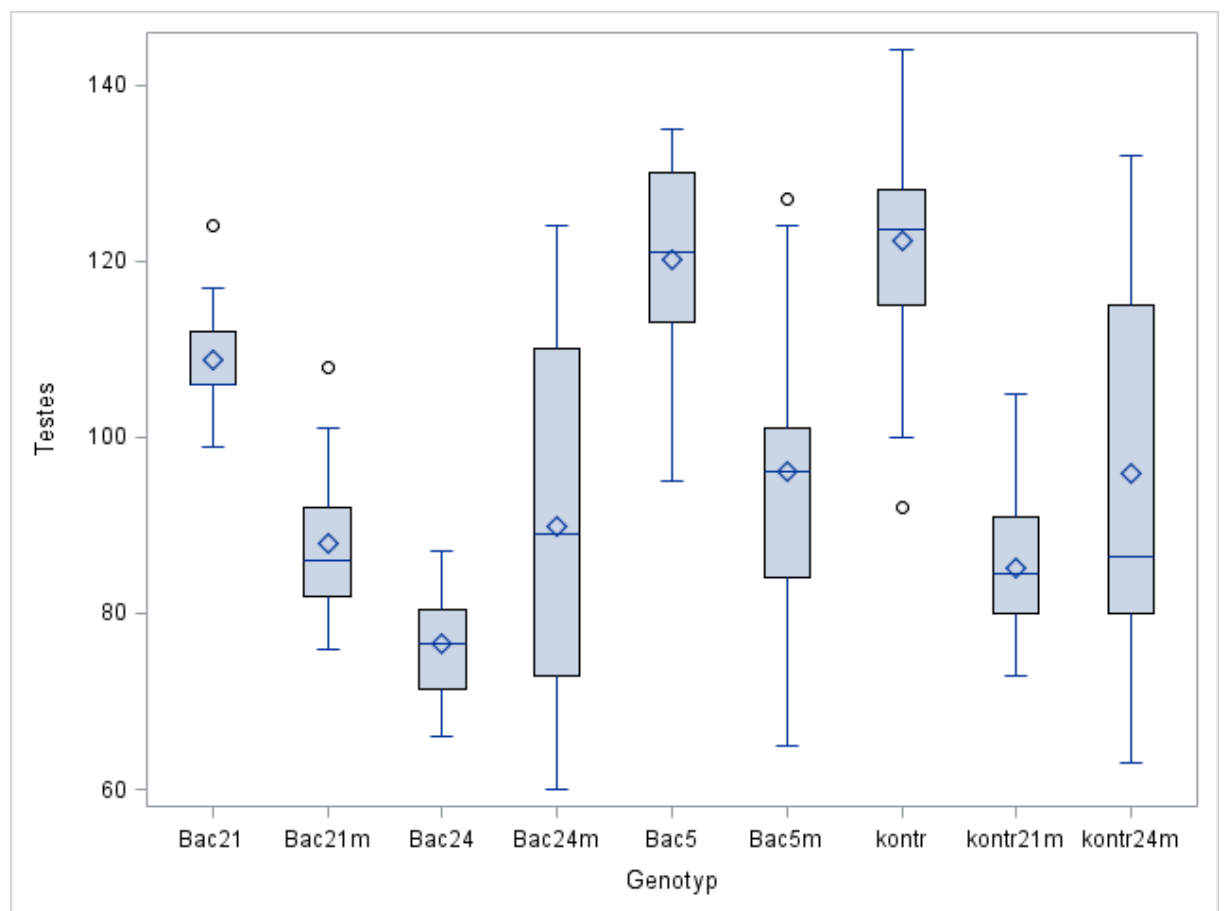
Obrázek 5: histogram četností fenotypu váha varlat (testes, mg) v závislosti na genotypu. Testes = hmotnost varlat (mg)

Protože hodnocený soubor dat má méně než 2000 pozorování, použijeme pro hodnocení normality Shapiro - Wilkův test. Ve skupinách Kontr24m, Bac5m, pro který je hodnota

$p < 0,05$ tzn., že v tomto případě zamítáme nulovou hypotézu. Proměnná hmotnost testes tudíž nemá normální rozdělení a pro další zpracování je nutno použít neparametrické testy.

Dalším názorným zhodnocením popisu dat jsou krabicové grafy (boxplot). Tlustá čára reprezentuje medián, kosočtverec průměr. Čáry obdélníku 25% kvantilu a 75% kvantilu, slabé čáry minimum a maximum, kolečka jsou odlehlá pozorování.

Obrázek 6 – krabicový graf (boxplot) pro porovnání hmotnosti testes (mg) u jednotlivých skupin.



Z tohoto grafu je na pohled patrné že se skupiny mezi sebou výrazně liší, zvláště pokud porovnáváme jedince z reciprokých křížení.

Jelikož jsme u některých sledovaných proměnných výběrového souboru neprokázali normální rozdělení četnosti, pro vyhodnocení zda se jednotlivé skupiny od sebe liší, bylo použito neparametrické období analýzy rozptylu Wilcoxonovo skóre (Kruskal – Wallisův test). Tato metoda slouží k posouzení, zda existují významné rozdíly mezi průměrnými pořadími hodnot u hodnocených proměnných.

Kruskal-Wallis Test:

Chi-Square 117.7588

DF 8

Pr > Chi-Square <.0001

Z hodnocení podle Kruskal-Wallisova testu vyplývá, že je průkazný rozdíl mezi skupinami (p - hodnota je nižší než 0,05). Následovalo mnohonásobné porovnání (tabulka 4)

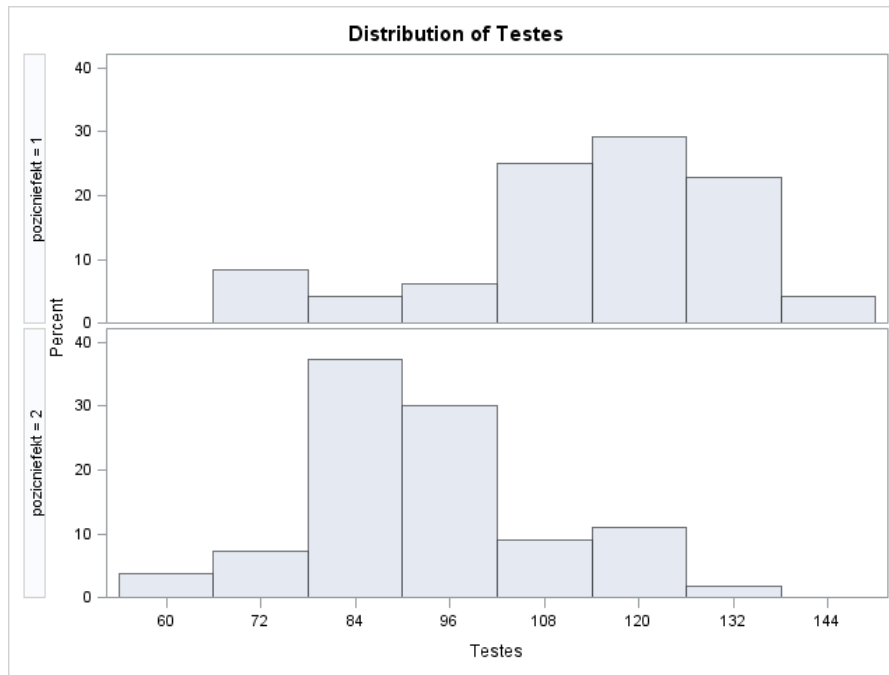
Tabulka 4: statistická průkaznost rozdílů hodnot u jednotlivých genotypů, na hladinách významnosti *= 0,05 **=0,01***=0,001

	bac24	bac24m	bac21	bac21m	bac5	bac5m	kontrl	kontrl21m	kontrl24m
bac24			***		***	**	***		**
bac24m			**		***		***		
bac21	***	**		***			*	***	
bac21m			***		***		***		
bac5	***	***		***		***		***	***
bac5m	**				***		***		
kontrl	***	***	*	***		**		***	***
kontrl21m			***		***		***		
kontrl24m	**				***		***		

Z grafů a tabulek vyplývá, že se jednotlivé genotypy od sebe signifikantně odlišují. Nejvíce patrné jsou rozdíly mezi reciprokými kříženci. Samci, kteří zdělili translokaci od otce, měli průměrně nižší váhu testes ve všech skupinách.

Poziční efekt pro hmotnost varlat, kdy sledujeme rozdíly mezi translokací zděděnou od matky a od otce, je možno pozorovat i na následujícím histogramu (obrázek 7).

Obrázek 7 – histogram četnosti fenotypu váha varlat (testes, mg) v závislosti na genotypu. Poziční efekt1 = translokace od matky, poziční efekt2= translokace zděděná od otce.

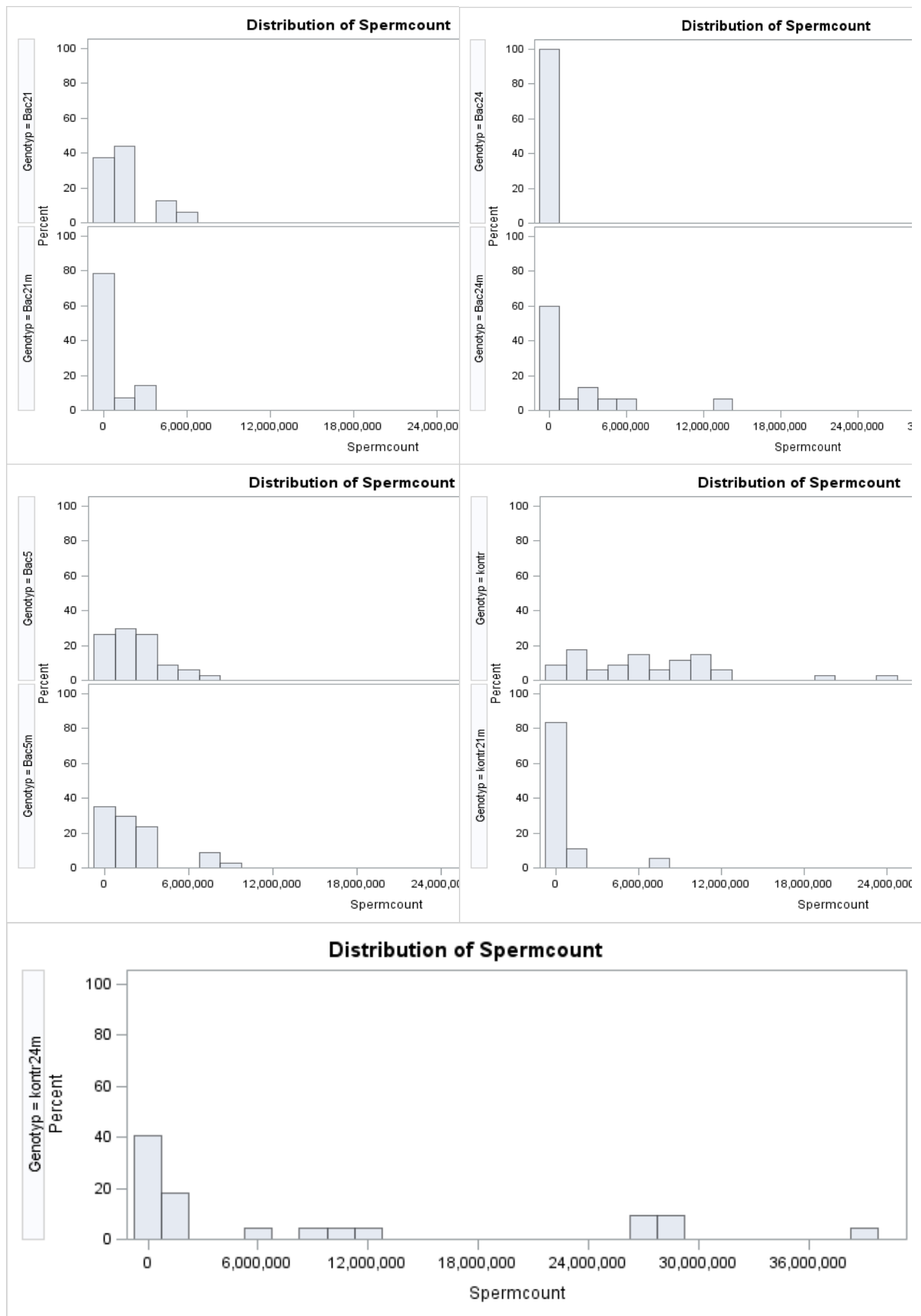


Rozdíl průměrů byl statisticky významný (0,05;Ttest).

5.2 Počet spermií

Hybridní sterilita samců velmi dobře koreluje nejen s váhou testes, ale i s počtem spermií (FOREJT & IVÁNYI, 1974; FOREJT *et al.*, 1991), proto byl u usmrčených zvířat počítán absolutní počet spermií v 1 ml. Z podobných pokusů vyplývá, že samci, kteří mají absolutní počet spermií v 1 ml menší než 500 tisíc, jsou zcela sterilní. Ti co mají počet spermií větší než 10 milionů naopak zcela fertilní a ostatní vykazují plynulý přechod.

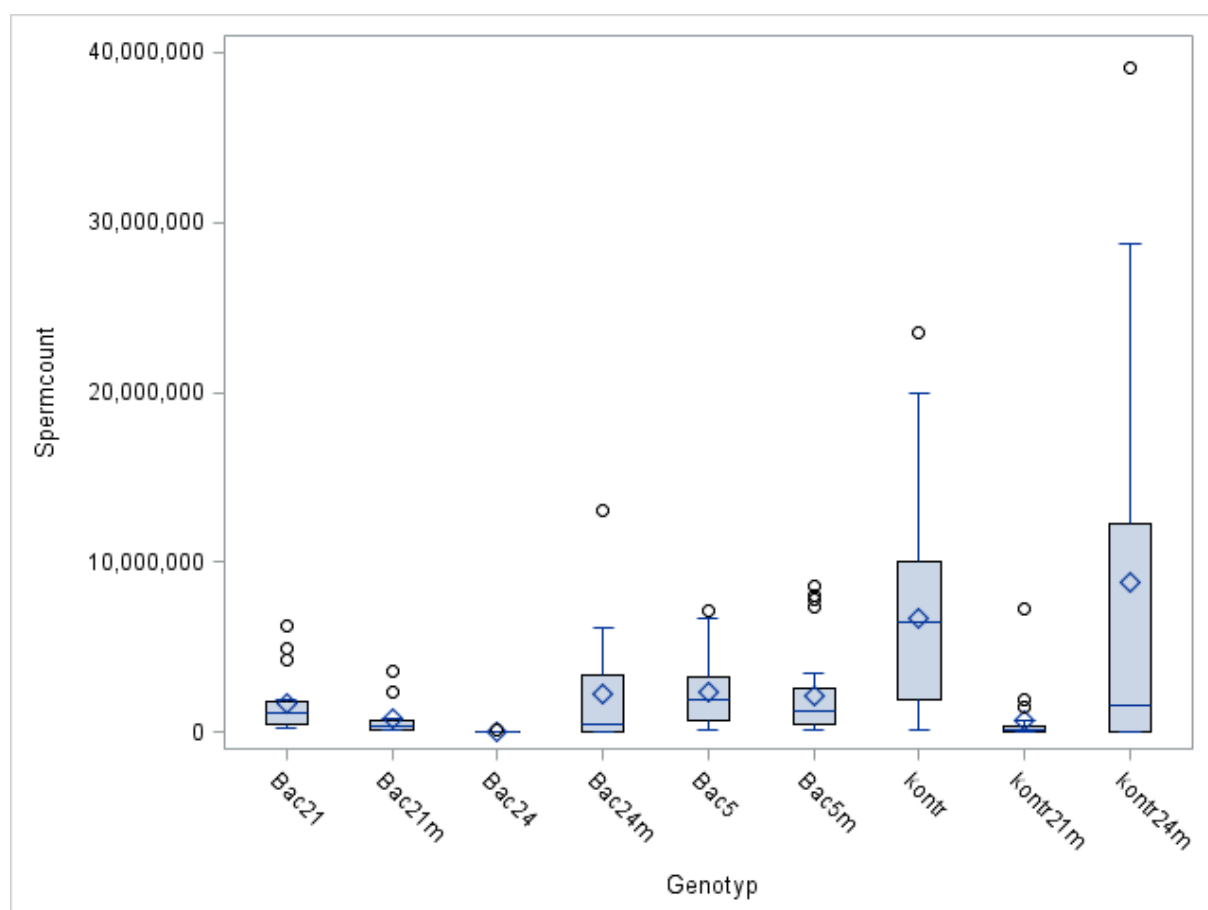
Na následujícím obrázku 8 můžeme vidět histogramy četnosti znaku počet spermií (v 1ml) v závislosti na genotypu.



Obrázek 8: histogramy četnosti znaku počet spermií (v 1ml) =spermcount, v závislosti na genotypu

Z grafů je na první pohled zřejmé, že hodnoty nemají normální rozdělení, což bylo i potvrzeno statistickým testem. Logaritmickou transformací se normálního rozdělení nedosáhlo, nebyl tedy splněn předpoklad pro metodu ANOVA, kterým je nutnost normálního rozdělení dat a muselo se i zde přikročit k neparametrickému testování.

Obrázek 9 – krabicový graf (boxplot) pro porovnání počtu spermií (ml^{-1}) u jednotlivých skupin



Pro potvrzení rozdílů bylo opět využito neparametrické období analýzy rozptylu Wilcoxonovo skóre (Kruskal – Wallisův test)

Kruskal-Wallis Test

Chi-Square 70.7613

DF 8

Pr > Chi-Square <.0001

Jeho hodnota potvrdila statisticky průkazné rozdíly mezi skupinami, které jsou zobrazeny v tabulce5:

Tabulka 5: statistická průkaznost rozdílů hodnot počtu spermií v 1ml, u jednotlivých genotypů, na hladinách významnosti *= 0,05 **=0,01***=0,001

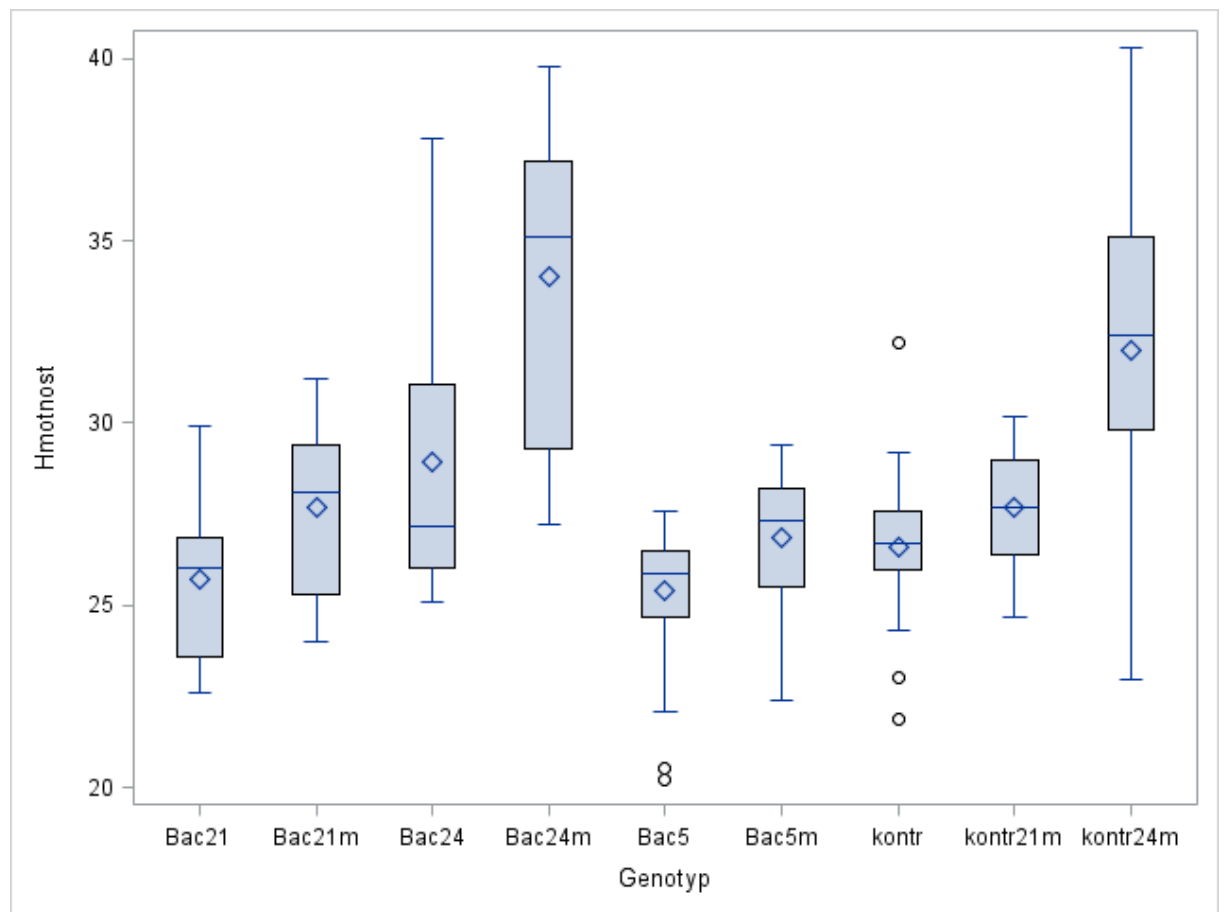
	bac24	bac24m	bac21	bac21m	bac5	bac5m	kontrl	kontrl21 m	kontrl24 m
bac24							**		***
bac24m									**
bac21							**		**
bac21m							**		**
bac5							*		***
bac5m							**		***
kontrl	**		**	**	*	**		**	
kontrl21 m							**		***
kontrl24 m	***	**	**	**	***	***		***	

Statisticky průkazné rozdíly byly nalezeny hlavně mezi genotypy s BACy a kontrolními soubory. Celkově jsou ale myši spíše sterilní, až semisterilní. Nejvýraznější efekt je ve skupině Bac24, kdy u žádného jedince počet spermií nepřekročil 100tis. U ostatních skupin se objevují vzdálená pozorování, tj, někteří jedinci mají semisterilní nebo dokonce plně fertlní fenotyp. Rozptyl je největší u kontrol (které nenesou BAC). Můžeme pozorovat rozpad skupiny do tří fenotypů (sterilní, semisterilní a fertlní), které jsou nezávislé na výskytu a typu BAC a to u obou směrů křížení. Rozdíl mezi počtem spermií u translokace zděděné od matky a od otce nebyl statisticky průkazný.

5.3 Váha těla a relativní váha testes

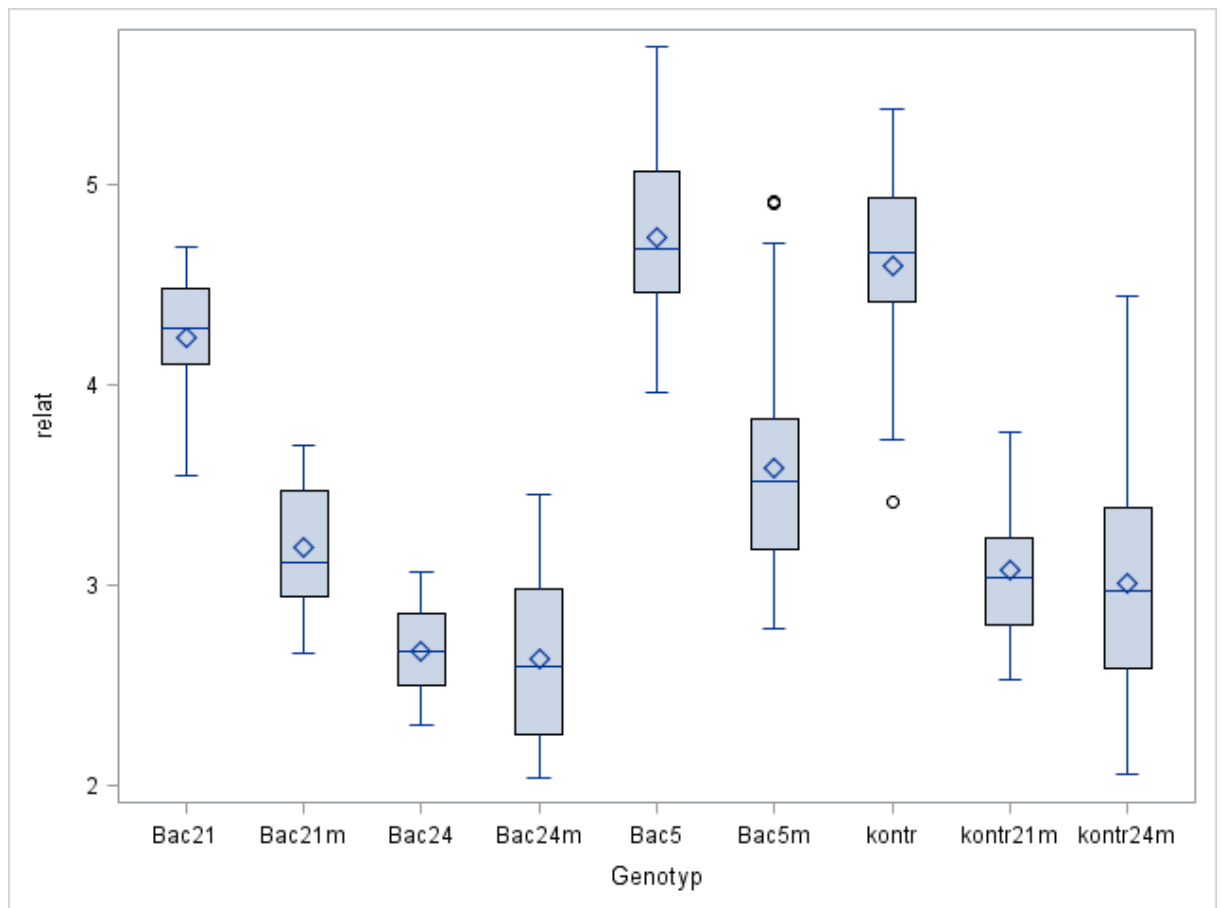
Hmotnost těla je silně korelován s váhou testes, proto byli všichni jedinci vždy také zváženi. (základní charakteristiky viz boxplot na obrázku 10) Následně bylo zjištěno, že v hmotnosti těla u jednotlivých skupin nejsou statisticky významné. Opticky vyšší hodnoty u skupin Bac24m a kontrl24m jsou způsobeny nejspíše tím, že tyto myši byly fenotypovány

v pozdějším věku než zbytek souboru (průměrně v 13. týdnu věku). Nicméně ani tento rozdíl není statisticky významný.



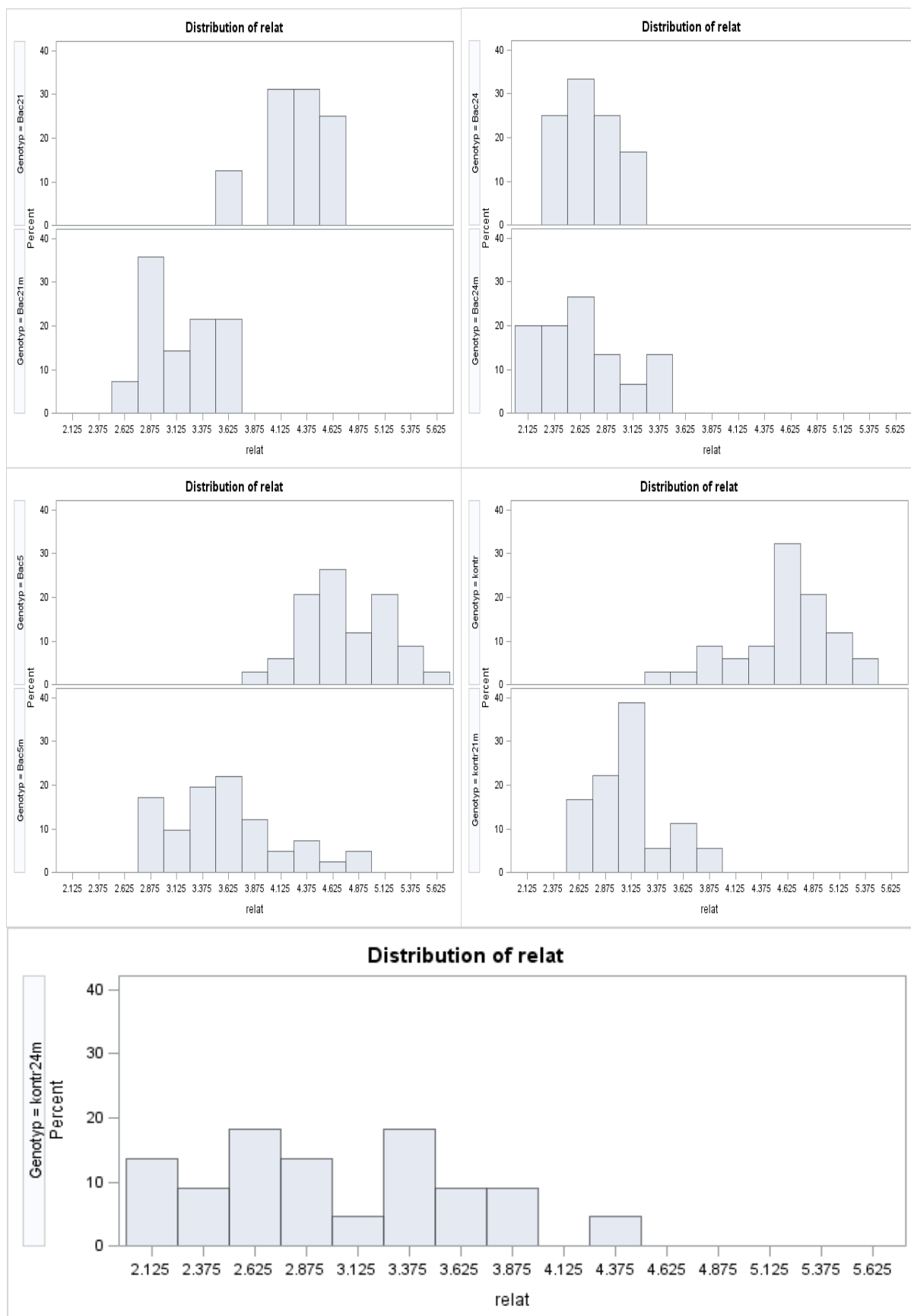
Obrázek 10. krabicový graf (boxplot) pro porovnání hmotnosti těla (g) u jednotlivých skupin

Ve snaze odfiltrovat část vlivu celkové váhy těla na hmotnost testes (které jsou spolu silně korelovány) byla stanovena relativní váha testes.



Obrázek11. krabicový graf (boxplot) pro porovnání relativní hmotnosti testes u jednotlivých skupin

Z boxplotu vyplývá, že skupiny jsou velmi variabilní. Pro lepší znázornění jednotlivých parametrů byly vytvořeny histogramy četností. (obrázek 12)



Obrázek 12: histogramy četnosti znaku relativní váhy testes (=relat), v závislosti na genotypu

Tato proměnná měla jako jediná normální rozdělení, bylo tak možné přistoupit ke klasické analýze rozptylů (ANOVA)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	120.1958434	15.0244804	71.09	<.0001
Error	197	41.6345759	0.2113430		
Corrected Total	205	161.8304192			

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Genotyp	8	120.1958434	15.0244804	71.09	<.0001

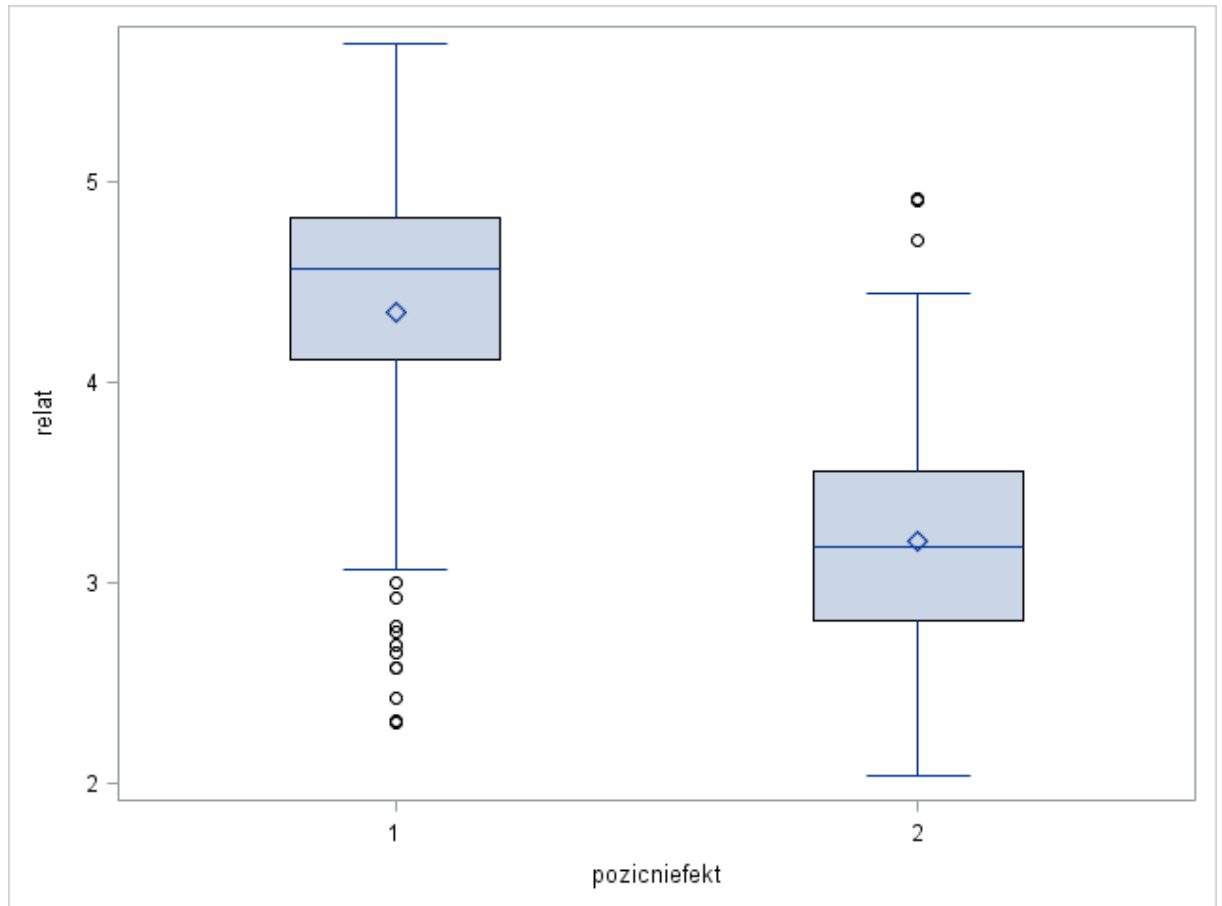
Z testu vyplynulo, že se skupiny dle genotypu výrazně odlišují, což bylo dále znázorněno v tabulce 6.

	bac24	bac24m	bac21	bac21m	bac5	bac5m	kontrl	kontrl21 m	kontrl24 m
bac24			***		***	**	***		
bac24m			***		***	*	***		
bac21	***	***		***	*	***		***	***
bac21m			***		***		***		
bac5	***	***	*	***		***		***	***
bac5m	**	**	***		***		***	**	**
kontrl	***	***		***		***		***	***
kontrl21 m			***		***	**	***		
kontrl24 m			***		***	**	***		

Tabulka 6: statistická průkaznost rozdílů hodnot relativní váhy testes, u jednotlivých genotypů, na hladinách významnosti *= 0,05 **=0,01***=0,001

Z grafů a tabulek vyplývá, že se jednotlivé genotypy od sebe signifikantně odlišují. Nejvíce patrné jsou rozdíly mezi reciprokými kříženci. Samci, kteří zdělili translokaci od otce, měli průměrně nižší váhu testes ve všech skupinách.

Poziční efekt pro hmotnost varlat, kdy sledujeme rozdíly mezi translokací zděděnou od matky a od otce, je možno pozorovat i na následujícím histogramu (obrázek 13).



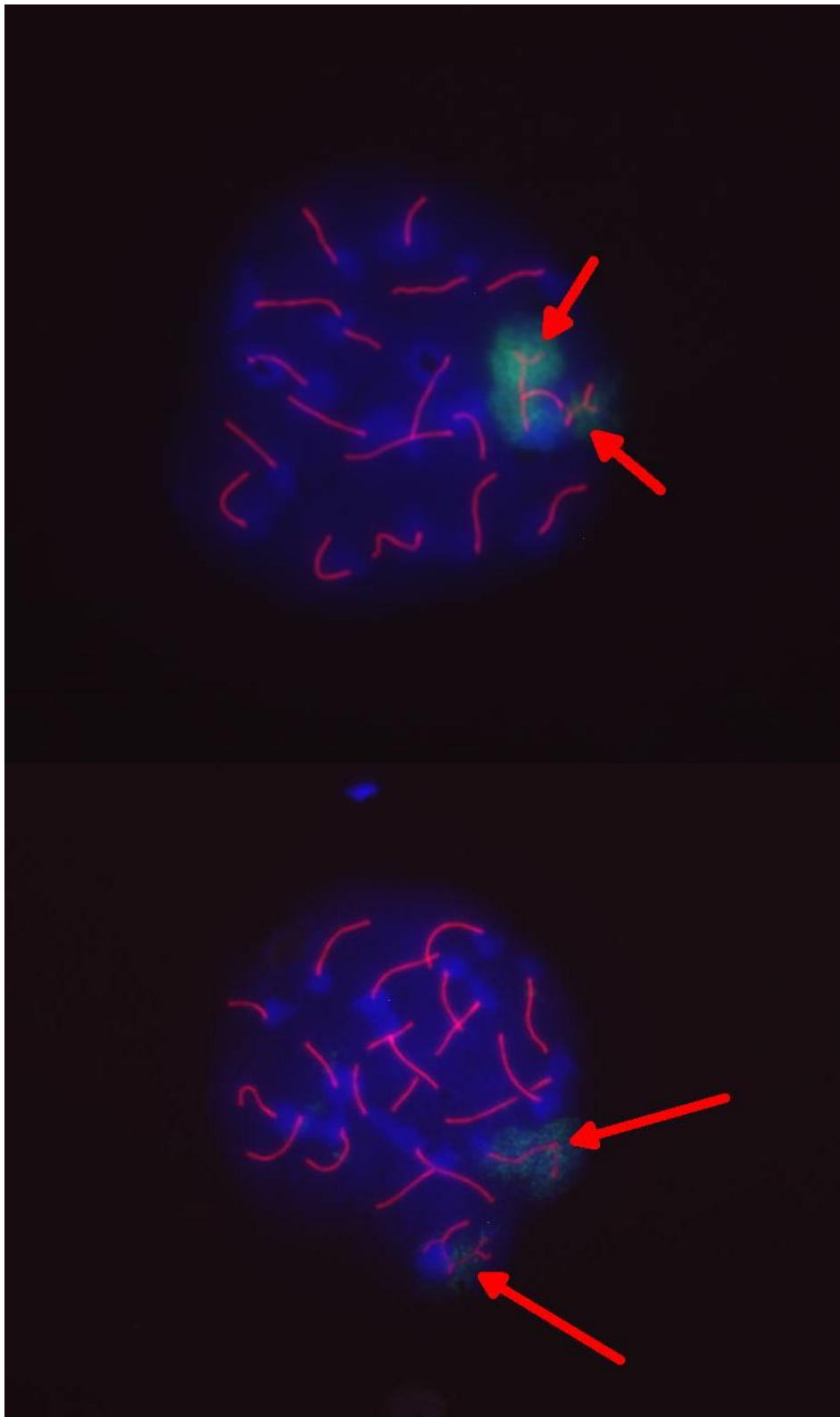
Obrázek 13: Poziční efekt1 = translokace od matky, poziční efekt2= translokace zděděná od otce pro relativní váhu testes.

Rozdíl byl také statisticky významný.

5.4 Imunofluorescence

U vybraných jedinců byla provedena pro potvrzení přítomnosti translokace imunofluorescenční analýza nátěrů spermatocytů s použitím protilátek proti proteinům synaptonemálního komplexu 3 (SCP3) a fosforylovanému histonu H2AX (anti- γ H2AX). Pro obarvení buněčných jader bylo použito barvivo DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). N

Jedinec na horním obrázku byl z kontrolního souboru, měl fertíl ní fenotyp (SC 11mil, váha testes 131 mg). Spermato cyt na spodním obrázku pochází od jedince s genotypem BAC24, který byl zcela sterilní (váha testes 80, SC 30tis v1ml)



Imunofluorescenční preparát: modře – buněčná jádra, červeně - synaptonemální komplexu (SCP3), zeleně - fosforylovanému histonu H2AX (anti- γ H2AX), ukazuje asynapse. 3ipkou jsou označeny místa XY pohlavního tělíska a translokační kvadrivalent B10 T43/+.

6 Diskuse

Hybridní sterilita je definována jako neplodnost postihující potomky dvou plně fertálních rodičovských forem. Je to jedna z prvních reprodukčních bariér, které se objevují mezi nově vznikajícími druhy a patří tedy k prvním krokům speciace. Tento fenomén byl intenzivně zkoumán u myši a to konkrétně u potomků – kříženců dvou myších poddruhů. Pomocí klonování a transgeních myších kmenů byl určen gen *Prdm9* jako jeden z hlavních genů způsobující neplodnost kříženců. Gen *Prdm9* je tak prvním známým genem hybridní sterility u obratlovců.

V další fázi nás zajímala otázka, zda tento gen ovlivňuje i sterilitu samců způsobenou jinými příčinami. U myši se vyskytuje chromozomová translokace (T43H), která u heterozygotních samců způsobuje neplodnost. Mým úkolem bylo tedy zjistit možný vliv genu *Prdm9* na sterilitu způsobenou touto translokací.

Byli proto vybrány T43 - homozygotní samice a samci, kteří nesli různý počet kopií genu *Prdm9*. Jejich samčí potomci pak byli rozděleni do skupin a použiti pro další zkoumání.

Prvním krokem pro analýzu vlivu nadpočetných kopií genu *PRDM9* na chromozomální sterilitu bylo založení křížení. Byly vytvořeny chovné páry v dostatečném množství, tak aby počet samčích potomků v jednotlivých skupinách dosáhl aspoň 30 kusů. Samice kmene B10, obsahující ve svém genomu translokaci T(16;17)43H v homozygotní sestavě byly kříženy s několika samci z kmenu B6 nesoucí transgeny BAC 5, BAC21 a BAC24. Samci BAC21 a BAC24 byli heterozygoti, samci BAC5 homozygoti. BAC 5 a 24 obsahují na rozdíl od BACu 21 gen hybridní sterility *Prdm9*. Navíc, jak bylo publikováno (Mihola *et al*, 2009), transgen BAC 24 se integroval v šesti kopiích na rozdíl od BACů 5 a 21, které jsou integrovány pouze ve dvou kopiích. V druhém kole pokusů bylo pářeno 6 samců B10.T43/T43 (homozygoté) - se samicemi BAC21, BAC24 (heterozygoté) a BAC5 (homozygotní).

Sterilita samců velmi dobře koreluje s některými fenotypovými znaky, proto byla u usmrcených zvířat měřena váha testes a počet spermií (= absolutní počet spermií v 1 ml roztoku PBS) pomocí počítání spermií v Bürkerově komůrce. Tyto kvantitativní znaky se samozřejmě mění s věkem, proto pro získání relevantních informací bylo třeba myši usmrtit a pitvat ve stejném věku, jako cílový věk bylo zvoleno 70 dní.

Sterilita se morfologicky projeví snížením hmotnosti varlat. Závislost mezi hmotností varlat a sterilitou myších samců byla zjištěna již dříve porovnáním počtu potomků zplozených samci za měsíc a hmotností varlat jednotlivých samců. Hybridní samci, kteří mají varlata lehčí než 75 mg nemají spermie v nadvarletech a neplodí potomky. U zcela fertálních samců přesahuje hmotnost varlat 120 mg. Samci, kteří měli varlata v rozmezí 75 - 120 mg, vykazovali plynulý přechod fenotypu od úplné sterility až po normální fertilitu.

Z podobných pokusů vyplývá, že samci, kteří mají absolutní počet spermií v 1 ml menší než 500 tisíc, jsou zcela sterilní. Ti co mají počet spermií větší než 10 milionů naopak zcela fertální a ostatní vykazují plynulý přechod.

V druhém kole pokusů bylo pářeno 6 samců B10.T43/T43 (homozygoté) - se samicemi BAC21, BAC24 (heterozygoté) a BAC5 (homozygotní). Narození potomci byli ve věku průměrně 12 týdnů usmrceni, u samců byl určen fenotyp a genotyp. Myši z druhého reciprokého křížení jsou ve výsledcích označovány jako Bac21m, Bac24m a Bac5m. Jako kontroly sloužili transgen-negativní sourozenci z příslušných křížení. U prvního křížení (translokace zděděná od matky) nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v žádném z parametrů mezi skupinou kontrol pocházející z křížení Bac21xT43 a skupinou Bac24xT43. Byli tedy pro zjednodušení zahrnuti do jedné skupiny označované kontr. U reciprokého křížení (translokace od otce) se ale tyto skupiny sourozenců bez Bac statisticky lišily v mnoha parametrech, nelze je tedy posuzovat společně (označení kontr24m, kontr21m).

Celkově bylo zhodnoceno 206 samčích potomků z těchto křížení. U všech byl určen genotyp a změřena váha těla, váha testes a počet spermií. Souhrnné statistiky je možné vidět

Na počátku jsme měli následující hypotézy: Gen Prdm9 by mohl zvrátit hybridní sterilitu navozenou chromozomální translokací T43, protože umožňuje synapsi neúplně homologních chromozomů (Forejt, osobní sdělení). Pak by více kopií genu Prdm9 znamenalo větší fertilitu (BAC 24x BAC 5), vliv Bac 21 by nebyl patrný.

Tento předpoklad se ale nepotvrdil. U myši s genotypem BAC24 došlo naopak k nejvýraznější redukci ukazatelů fertility. Genotyp Bac 5 odpovídá kontrolnímu souboru, u genotypu Bac 21 došlo také ke snížení parametrů fertility.

Translokace T43 získaná od matky a od otce má na fenotyp potomstva rozdílný vliv. Tento poziční efekt může být vysvětlen epigenetickými rozdíly, jako je genový imprinting, variegace, nebo vliv mitochondriálního genomu.

U reciprokého křížení je soubor velmi nesourodý, od kompletně sterilních myší až po normálně plodné ve všech skupinách včetně kontrol. Na fertilitu tak bude mít vliv nějaký jiný, dosud námi neuvažovaný faktor. Samotný gen *Prdm9* nejspíš nemá na takto navozenou sterilitu vliv, více pravděpodobný je vliv samotného BAC, který se inkorporuje do genomu náhodně. To by vysvětlovalo i větší vliv BAC24 (šest kopií) oproti BAC5 (dvě kopie). Další možností je vliv jiného genu z Bacu (Tento úsek obsahuje ještě šest genů *Dll1*, *Pgcc1*, *Psmbl1*, *Tbp*, *Pdcd2*)

Na imunofluorescenčních preparátech byla ověřena přítomnost translokace T43 u potomstva. Jiné abnormality nebyly pozorovány.

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

7 Závěr

Hybridní sterilita je definována jako neplodnost postihující potomky dvou plně fertálních rodičovských forem. Je to jedna z prvních reprodukčních bariér, které se objevují mezi nově vznikajícími druhy a patří tedy k prvním krokům speciace. Tento fenomén byl intenzivně zkoumán u myši a to konkrétně u potomků – kříženců dvou myších poddruhů. Pomocí klonování a transgeních myších kmenů byl určen gen *Prdm9* jako jeden z hlavních genů způsobující neplodnost kříženců. Gen *Prdm9* je tak prvním známým genem hybridní sterility u obratlovců.

Cílem diplomové práce bylo využitím transgeních myši ověřit vliv nadpočetných kopií genu *Prdm9* na chromozomální sterilitu indukovanou chromozomální translokací T43H. Bylo zjištěno, že samotný gen *Prdm9* na pozorovanou změnu nemá vliv, ale byl potvrzen významný poziční efekt u translokace T43H. Translokace zděděná od otce způsobuje zhoršení parametrů fertility oproti té pocházející od matky.

Bylo pozorováno několik zajímavých jevů, které by bylo vhodné dále prostudovat. Všechny pozorované fenotypické znaky mohou být ovlivněny interakcemi vícero genů, genetického pozadí v místě integrace a negenetickými i vnějšími faktory, což vyžaduje další podrobnější analýzy a zvýšení počtu sledovaných zvířat. Tato předběžná analýza nám tedy spíše napověděla, na které fenotypy se máme v budoucnu podrobněji zaměřit.

8 Seznam použité literatury

Albrechtova J, Albrecht, T, Baird SJE, Macholan M, Rudolfson G, Munclinger P, Tucker PK, & Pialek J (2012) Sperm-related phenotypes implicated in both maintenance and breakdown of a natural species barrier in the house mouse. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 279(1748):4803–4810.

Allers T & Lichten M (2001) Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106(1):47–57.

Arnheim N, Calabrese P, & Tiemann-Boege I (2007) Mammalian meiotic recombination hot spots. *Annual Review of Genetics* 41:369–399.

Auton A, *et al.* (2012) A Fine-Scale Chimpanzee Genetic Map from Population Sequencing. *Science* 336(6078):193–198.

Auton A, *et al.* (2013) Genetic Recombination Is Targeted towards Gene Promoter Regions in Dogs. *Plos Genetics* 9(12): e1003984.

Axelsson E, Webster MT, Ratnakumar A, Ponting CP, Lindblad-Toh K, & Consortium L (2012) Death of PRDM9 coincides with stabilization of the recombination landscape in the dog genome. *Genome Research* 22(1):51–63.

Baker CL, Walker M, Kajita S, Petkov PM, & Paigen K (2014) PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Research* 24(5):724–732.

Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, & de Massy B (2010) PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science* 327(5967):836–840.

Bateson W (1909). Heredity and variation in modern lights. In: Steward AC, editor. Darwin and modern science. *Cambridge University Press*: 85–101.

Berg IL, Neumann R, Lam K-WG, Sarbajna S, Odenthal-Hesse L, May CA, & Jeffreys AJ (2010) PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nature Genetics* 42(10):859–863.

Bhattacharyya T, Gregorova S, Mihola O, Anger M, Sebestova J, Denny P, Simecek P, & Forejt J (2013) Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(6):E468–E477.

Bhattacharyya T, Reifova R, Gregorova S, Simecek P, Gergelits V, Mistrik M, Martincova I, Pialek J, & Forejt J (2014) X chromosome control of meiotic chromosome synapsis in mouse inter-subspecific hybrids. *PLoS genetics* 10(2):e1004088.

Billings T, Parvanov ED, Baker CL, Walker M, Paigen K, & Petkov PM (2013) DNA binding specificities of the long zinc-finger recombination protein PRDM9. *Genome Biology* 14(4):R35.

Birtle Z & Ponting CP (2006) Meisetz and the birth of the KRAB motif. *Bioinformatics* 22(23):2841–2845.

Borde V & de Massy B (2013) Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis: setting up communication between DNA and the chromosome structure. *Current Opinion in Genetics & Development* 23(2):147–155.

Borel C, Cheung F, Stewart H, Koolen DA, Phillips C, Thomas NS, Jacobs PA, Eliez S, & Sharp AJ (2012) Evaluation of PRDM9 variation as a risk factor for recurrent genomic disorders and chromosomal non-disjunction. *Human Genetics* 131(9):1519–1524.

Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, & O'Bryan MK (2010) Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Human Reproduction Update* 16(2):205–224.

Boulton A, Myers RS, & Redfield RJ (1997) The hotspot conversion paradox and the evolution of meiotic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15):8058–8063.

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(7400):642–645. 86 *sekundární citace

Broman KW & Sen S (2009) Guide to QTL Mapping with R/qtl. *Springer, New York.*

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(17):2616–2624.

Buard J, Rivals E, de Segonzac DD, Garres C, Caminade P, de Massy B, & Boursot P (2014) Diversity of Prdm9 Zinc Finger Array in Wild Mice Unravels New Facets of the Evolutionary Turnover of this Coding Minisatellite. *Plos One* 9(1):e85021.

Cole F, Baudat F, Grey C, Keeney S, de Massy B, & Jasin M (2014) Mouse tetrad analysis provides insights into recombination mechanisms and hotspot evolutionary dynamics. *Nature Genetics* 46(10):1072–1080.

Cox A, *et al.* (2009) A New Standard Genetic Map for the Laboratory Mouse. *Genetics* 182(4):1335-1344.

Crichton JH, Playfoot CJ, & Adams IR (2014) The Role of Chromatin Modifications in Progression through Mouse Meiotic Prophase. *Journal of Genetics and Genomics* 41(3):97–106.

Darvasi A & Soller M (1995) Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic-mapping. *Genetics* 141(3):1199–1207.

Dobzhansky T (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.

Dumont BL & Payseur BA (2011) Genetic Analysis of Genome-Scale Recombination Rate Evolution in House Mice. *Plos Genetics* 7(6):e1002116.

Dzur-Gejdosova M, Simecek P, Gregorova S, Bhattacharyya T, & Forejt J (2012) Dissecting the genetic architecture of F1 hybrid sterility in house mice. *Evolution* 66(11):3321–3335.

Eram MS, *et al.* (2014) Trimethylation of Histone H3 Lysine 36 by Human Methyltransferase PRDM9 Protein. *Journal of Biological Chemistry* 289(17):12177–12188.

Escalier D (2006) Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Human Reproduction Update* 12(4):449–461.

Flachs P (2009) Příprava tří myších kongenních kmenů a jejich fenotypizace, diplomová práce

Flachs P, Bhattacharyya T, Mihola O, Pialek J, Forejt J, & Trachtulec Z (2014) Prdm9 Incompatibility Controls Oligospermia and Delayed Fertility but No Selfish Transmission in Mouse Intersubspecific Hybrids. *Plos One* 9(4):e95806.

Flachs P, *et al.* (2012) Interallelic and Intergenic Incompatibilities of the Prdm9 (Hst1) Gene in Mouse Hybrid Sterility. *Plos Genetics* 8(11):e1003044.

Forejt J & Ivanyi P (1974) Genetic studies on male-sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus-musculus* L.). *Genetical Research* 24(2):189–206.

Forejt J, Pialek J, & Trachtulec Z (2012) Hybrid male sterility genes in the mouse subspecific crosses. In: Baird SJE, Macholan M, Munclinger P, Pialek J, editors. Evolution of the House Mouse: *Cambridge University Press*. 482–503.

Forejt J, Vincek V, Klein J, Lehrach H, & Loudovamickova M (1991) Genetic-mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mammalian Genome* 1(2):84–91.

Gregorova S, Divina,P, Storchova R, Trachtulec Z, Fotopulosova V, Svenson KL, Donahue LR, Paigen B, & Forejt J. (2008) Mouse consomic strains: Exploiting genetic divergence between *Mus m musculus* and *Mus m domesticus* subspecies. *Genome Research* 18(3):509–515.

Gregorova S & Forejt J (2000) PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m-musculus* subspecies - a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biologica* 46(1):31–41.

Gregorova S, *et al.* (1996) Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse Chromosome 17 including the hybrid sterility 1 gene. *Mammalian Genome* 7(2):107–113.

Grey C, Barthes P, Chauveau-Le Fric G, Langa F, Baudat F, & de Massy B. (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(2):327–339. 8

Guichoux E, *et al.* (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11(4):591–611.

Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12(2):101–109.

Handel MA & Schimenti JC (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* 11(2):124–136.

Hayashi K, Yoshida K, & Matsui Y (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438(7066):374–378.

Heil CSS & Noor MAF (2012) Zinc Finger Binding Motifs Do Not Explain Recombination Rate Variation within or between Species of *Drosophila*. *Plos One* 7(9):e45055.

Hess RA & de Franca LR (2008) Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* 636:1–15.

Hillers KJ (2004) Crossover interference. *Current Biology* 14(24):R1036–R1037.

Hinch AG, Altemose N, Noor N, Donnelly P, & Myers SR (2014) Recombination in the Human Pseudoautosomal Region PAR1. *Plos Genetics* 10(7):e1004503.

Homolka (2012) Meiotic Sex Chromosome Inactivation in Mouse Spermatogenesis, dissertation thesis

Hussin J, *et al.* (2013) Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. *Genome Research* 23(3):419–430.

Choo Y & Klug A (1994) Selection of DNA-binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(23):11168–11172.

Irie S, Tsujimura A, Miyagawa Y, Ueda T, Matsuoka Y, Matsui Y, Okuyama A, Nishimune Y, & Tanaka H (2009) Single-Nucleotide Polymorphisms of the PRDM9 (MEISETZ) Gene in Patients With Nonobstructive Azoospermia. *Journal of Andrology* 30(4):426–431.

Jeffreys AJ, Cotton VE, Neumann R, & Lam K-WG (2013) Recombination regulator PRDM9 influences the instability of its own coding sequence in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(2):600–605.

Johnson KR, Zheng QY, & Noben-Trauth K (2006) Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice. *Brain Research* 1091:79–88.

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(5):957–965.

Koh-Stenta X, *et al.* (2014) Characterization of the histone methyltransferase PRDM9 using biochemical, biophysical and chemical biology techniques. *Biochemical Journal* 461:323–334.

Kono H, Tamura M, Osada N, Suzuki H, Abe K, Moriwaki K, Ohta K, & Shiroishi T (2014) Prdm9 Polymorphism Unveils Mouse Evolutionary Tracks. *DNA Research* 21(3):315–326.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, & Stevens GA (2012) National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *Plos Medicine* 9(12): e1001356.

Masly JP, Jones CD, Noor MAF, Locke J, & Orr HA (2006) Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science* 313(5792):1448–1450.

*Matzuk MM & Lamb DJ (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Cell Biology* 4:S41–S49.

Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, & Forejt J (2009) A Mouse Speciation Gene Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase. *Science* 323(5912):373–375.

Miyamoto T, Koh E, Sakugawa N, Sato H, Hayashi H, Namiki M, & Sengoku K (2008) Two single nucleotide polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 25(11-12):553–557.

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(6):1017–1027.

Muller HJ (1942) Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biological Symposia. Jaques Cattell Press, Lancaster* 6:71–125.

Munoz-Fuentes V, Di Rienzo A, & Vila C (2011) Prdm9, a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots, Is Not Functional in Dogs and Their Wild Relatives, Wolves and Coyotes. *Plos One* 6(11):e25498.

Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, & Donnelly P (2005) A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science* 310(5746):321–324.

Myers S, Bowden R, Tumian A, Bontrop RE, Freeman C, MacFie TS, McVean G, & Donnelly P (2010) Drive Against Hotspot Motifs in Primates Implicates the PRDM9 Gene in Meiotic Recombination. *Science* 327(5967):876–879.

Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, & McVean G (2008) A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nature Genetics* 40(9):1124–1129.

Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, & Hayashi Y (2000) Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anatomical Record* 258(2):210–220.

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(3):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(3):507–516.

Oliver PL, Goodstadt L, Bayes JJ, Birtle Z, Roach KC, Phadnis N, Beatson SA, Lunter G, Malik HS, & Ponting CP (2009) Accelerated Evolution of the Prdm9 Speciation Gene across Diverse Metazoan Taxa. *Plos Genetics* 5(12):e1000753.

*Paigen K & Petkov P (2010) Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nature Reviews Genetics* 11(3):221–233.

Parvanov ED, Ng SHS, Petkov PM, & Paigen K (2009) Trans-Regulation of Mouse Meiotic Recombination Hotspots by Rcr1. *Plos Biology* 7(2):340–349.

Parvanov ED, Petkov PM, & Paigen K (2010) Prdm9 Controls Activation of Mammalian Recombination Hotspots. *Science* 327(5967):835–835.

*Petronczki M, Siomos MF, & Nasmyth K (2003) Un menage a quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112(4):423–440.

Phadnis N & Orr HA (2009) A Single Gene Causes Both Male Sterility and Segregation Distortion in Drosophila Hybrids. *Science* 323(5912):376–379.

- Pratto F, Brick K, Khil P, Smagulova F, Petukhova GV, & Camerini-Otero RD (2014) Recombination initiation maps of individual human genomes. *Science* 346(6211):1256442-1–1256442-9.
- Ptak SE, Hinds DA, Koehler K, Nickel B, Patil N, Ballinger DG, Przeworski M, Frazer KA, & Paabo S (2005) Fine-scale recombination patterns differ between chimpanzees and humans. *Nature Genetics* 37(4):429–434.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NCT, Schreiber SL, Mellor J, & Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905):407–411.
- Sato H, *et al.* (2006) Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *Journal of Human Genetics* 51(6):533–540.
- Schultz N, Hamra FK, & Garbers DL (2003) A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21):12201–12206.
- Segurel L, Leffler EM, & Przeworski M (2011) The Case of the Fickle Fingers: How the PRDM9 Zinc Finger Protein Specifies Meiotic Recombination Hotspots in Humans. *Plos Biology* 9(12):e1001211.
- Shi QH, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L, & Martin RH (2001) Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *American Journal of Medical Genetics* 99(1):34–38.
- Silver LM (1995) Mouse genetics: Concepts and applications. *Oxford University Press, Oxford*.
- Skakkebaek NE, *et al.* (2006) Is human fecundity declining? *International Journal of Andrology* 29(1):2–11.
- Smagulova F, Gregoretta IV, Brick K, Khil P, Camerini-Otero RD, & Petukhova GV (2011) Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature* 472(7343):375–378.
- Storchova R, Gregorova S, Buckiova D, Kyselova V, Divina P, & Forejt J (2004) Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mammalian Genome* 15(7):515–524.

Sun F, Fujiwara Y, Reinholdt L, Hu J, Saxl R, Baker C, Petkov P, Paigen K, & Handel M (2015) Nuclear localization of PRDM9 and its role in meiotic chromatin modifications and homologous synapsis. *Chromosoma*:1–19.

Thomas JH, Emerson RO, & Shendure J (2009) Extraordinary Molecular Evolution in the PRDM9 Fertility Gene. *Plos One* 4(12):e8505.

Ting CT, Tsaur SC, Wu ML, & Wu CI (1998) A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* 282(5393):1501–1504.

Trachtulec Z, Mihola O, Vlcek C, Himmelbauer H, Paces V, & Forejt J (2005) Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biological Journal of the Linnean Society* 84(3):637–641.

Trachtulec Z, Vincek V, Hamvas RMJ, Forejt J, Lehrach H, & Klein J (1994) Physical map of mouse chromosome 17 in the region relevant for positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene. *Genomics* 23(1):132–137.

Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, & Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29(1):52–54.

Turner LM, Schwahn DJ, & Harr B (2012) Reduced male fertility is common but highly variable in form and severity in a natural house mouse hybrid zone. *Evolution* 66(2):443–458.

Winckler W, *et al.* (2005) Comparison of fine-scale recombination rates in humans and chimpanzees. *Science* 308(5718):107–111.

Wu H, Mathioudakis N, Diagouraga B, Dong A, Dombrovski L, Baudat F, Cusack S, de Massy B, & Kadlec J (2013) Molecular Basis for the Regulation of the H3K4 Methyltransferase Activity of PRDM9. *Cell Reports* 5(1):13–2

Příloha 1

Tabulka se všemy pozorovanými fenotypovými znaky

Genotyp	poziciefekt	Testes	Spermcount	Hmotnost	relat
Bac21	1	99	1 900 000	22,9	4,32
Bac21	1	99	1 100 000	23,0	4,30
Bac21	1	106	500 000	25,8	4,11
Bac21	1	106	764 000	26,4	4,02
Bac21	1	106	1 500 000	22,9	4,63
Bac21	1	106	570 000	29,9	3,55
Bac21	1	106	400 000	22,6	4,69
Bac21	1	106	350 000	24,2	4,38
Bac21	1	106	1 300 000	25,6	4,14
Bac21	1	108	1800000	29,3	3,69
Bac21	1	109	330 000	26,6	4,10
Bac21	1	112	1 200 000	27,2	4,12
Bac21	1	112	260 000	26,3	4,26
Bac21	1	117	4 200 000	25,5	4,59
Bac21	1	117	4 900 000	27,1	4,32
Bac21	1	124	6 300 000	26,5	4,68
Bac24	1	66	90 000	25,6	2,58
Bac24	1	71	40 000	25,8	2,75
Bac24	1	71	35 000	26,4	2,69
Bac24	1	72	10 000	31,1	2,32
Bac24	1	76	3 000	28,7	2,65
Bac24	1	76	18 000	27,3	2,78
Bac24	1	77	0	26,3	2,93
Bac24	1	77	16 000	25,1	3,07
Bac24	1	80	30 000	31	2,58
Bac24	1	81	9 000	27	3,00
Bac24	1	85	2 000	35	2,43
Bac24	1	87	35 000	37,8	2,30
Bac5	1	95	310 000	23,5	4,04
Bac5	1	102	1 800 000	24,6	4,15
Bac5	1	104	560 000	20,5	5,07
Bac5	1	104	500 000	26,2	3,97
Bac5	1	106	570 000	22,9	4,63
Bac5	1	112	150 000	24,7	4,53
Bac5	1	112	1 300 000	25,1	4,46
Bac5	1	113	120 000	22,1	5,11

Bac5	1	113	2 000 000	25,3	4,47
Bac5	1	115	208 000	26,0	4,42
Bac5	1	115	970 000	20,2	5,69
Bac5	1	115	3 200 000	26,4	4,36
Bac5	1	116	870 000	25,9	4,48
Bac5	1	116	490 000	27,2	4,26
Bac5	1	117	4 800 000	27,4	4,27
Bac5	1	118	1 400 000	25,5	4,63
Bac5	1	120	3 100 000	25,8	4,65
Bac5	1	122	690 000	24,8	4,92
Bac5	1	122	1 700 000	25,8	4,73
Bac5	1	123	970 000	26,7	4,61
Bac5	1	123	1 700 000	26,1	4,71
Bac5	1	125	3 100 000	27,1	4,61
Bac5	1	128	6 700 000	27,6	4,64
Bac5	1	129	3 380 000	25,8	5,00
Bac5	1	129	3 100 000	26,6	4,85
Bac5	1	130	2 900 000	24,6	5,28
Bac5	1	131	3 900 000	27,1	4,83
Bac5	1	132	2 140 000	26,0	5,08
Bac5	1	132	5 900 000	27,4	4,82
Bac5	1	133	3 300 000	26,4	5,04
Bac5	1	133	4 600 000	26,2	5,08
Bac5	1	134	7 100 000	25,1	5,34
Bac5	1	135	2 270 000	24,7	5,47
Bac5	1	135	3 100 000	26,5	5,09
kontr	1	92	156 000	26,9	3,42
kontr	1	100	1 390 000	26,4	3,79
kontr	1	105	2 900 000	26,5	3,96
kontr	1	111	1 740 000	26,4	4,20
kontr	1	118	11 700 000	24,9	4,74
kontr	1	120	10 000 000	26,2	4,58
kontr	1	120	6 700 000	32,2	3,73
kontr	1	121	1 860 000	27,3	4,43
kontr	1	122	4 300 000	27,6	4,42
kontr	1	125	9 400 000	26,8	4,66
kontr	1	126	830 000	26,7	4,72
kontr	1	127	5 900 000	25,0	5,08
kontr	1	130	6 400 000	28	4,64
kontr	1	131	11 800 000	26,4	4,96
kontr	1	136	11 200 000	27,2	5,00

kontr	1	136	9 300 000	28,3	4,81
kontr	1	141	9 000 000	27,8	5,07
kontr	1	142	10 700 000	26,4	5,38
kontr	1	144	10 700 000	29,2	4,93
kontr	1	100	625 000	21,9	4,57
kontr	1	107	360 000	27,4	3,91
kontr	1	110	1 300 000	23,0	4,78
kontr	1	113	8 800 000	26,6	4,25
kontr	1	115	2 500 000	24,7	4,66
kontr	1	121	7 100 000	28,4	4,26
kontr	1	123	900 000	26,8	4,59
kontr	1	123	4 500 000	24,8	4,96
kontr	1	124	3 800 000	26,0	4,77
kontr	1	125	23 500 000	25,3	4,94
kontr	1	126	20 000 000	26,7	4,72
kontr	1	127	5 400 000	27,9	4,55
kontr	1	127	6 500 000	28,0	4,54
kontr	1	128	8 100 000	24,3	5,27
kontr	1	139	10 200 000	27,1	5,13
Bac21m	2	76	310 000	28,5	2,67
Bac21m	2	78	87 000	26,9	2,90
Bac21m	2	82	220 000	25,1	3,27
Bac21m	2	82	104 000	27,7	2,96
Bac21m	2	82	730 000	27,1	3,03
Bac21m	2	83	680 000	29,4	2,82
Bac21m	2	85	120 000	28,7	2,96
Bac21m	2	87	850 000	24	3,63
Bac21m	2	88	100 000	25,3	3,48
Bac21m	2	91	690 000	24,6	3,70
Bac21m	2	92	400 000	31,2	2,95
Bac21m	2	95	200 000	29,6	3,21
Bac21m	2	101	3 600 000	29,3	3,45
Bac21m	2	108	2 400 000	29,9	3,61
Bac24m	2	60	0	28,7	2,09
Bac24m	2	64	0	29	2,21
Bac24m	2	89	1 500 000	31,5	2,83
Bac24m	2	72	3 400 000	29,3	2,46
Bac24m	2	124	3 200 000	36,8	3,37
Bac24m	2	98	600 000	37,7	2,60
Bac24m	2	81	0	39,8	2,04
Bac24m	2	100	220 000	38,3	2,61
Bac24m	2	92	450 000	36,6	2,51
Bac24m	2	76	0	33,4	2,28

Bac24m	2	115	4 600 000	33,3	3,45
Bac24m	2	82	0	36,3	2,26
Bac24m	2	110	6 200 000	35,1	3,13
Bac24m	2	111	13 000 000	37,2	2,98
Bac24m	2	73	0	27,2	2,68
Bac5m	2	100	2 600 000	26,7	3,75
Bac5m	2	78	160 000	27,6	2,83
Bac5m	2	97	3 300 000	28,5	3,40
Bac5m	2	124	7 400 000	26,3	4,71
Bac5m	2	96	920 000	28	3,43
Bac5m	2	97	2 300 000	28	3,46
Bac5m	2	82	380 000	26,8	3,06
Bac5m	2	96	990 000	27,3	3,52
Bac5m	2	84	330 000	24,8	3,39
Bac5m	2	123	3 500 000	29	4,24
Bac5m	2	122	8 600 000	28	4,36
Bac5m	2	65	470 000	22,4	2,90
Bac5m	2	127	8 000 000	28,8	4,41
Bac5m	2	79	300 000	28,3	2,79
Bac5m	2	83	140 000	27,6	3,01
Bac5m	2	95	1 600 000	29	3,28
Bac5m	2	91	300 000	25,5	3,57
Bac5m	2	83	500 000	26,2	3,17
Bac5m	2	96	1 700 000	25,8	3,72
Bac5m	2	104	1 600 000	29	3,59
Bac5m	2	112	2 000 000	28,2	3,97
Bac5m	2	96	820 000	29,4	3,27
Bac5m	2	90		23,4	3,85
Bac5m	2	92		26,4	3,48
Bac5m	2	92		24,9	3,69
Bac5m	2	100		27,6	3,62
Bac5m	2	78		27,6	2,83
Bac5m	2	79		28,1	2,81
Bac5m	2	80		27,4	2,92
Bac5m	2	109	2 400 000	25,2	4,33
Bac5m	2	84	80 000	26,4	3,18
Bac5m	2	99	380 000	27,3	3,63
Bac5m	2	100	590 000	28,4	3,52
Bac5m	2	81	710 000	29,1	2,78
Bac5m	2	101	3 400 000	26,4	3,83
Bac5m	2	99	2 600 000	28,7	3,45
Bac5m	2	113	2 700 000	23	4,91
Bac5m	2	101	2 000 000	25	4,04
Bac5m	2	122	7 800 000	24,8	4,92
Bac5m	2	94	830 000	25	3,76

Bac5m	2	95	800 000	24,8	3,83
kontr21m	2	73	52 000	28,9	2,53
kontr21m	2	73	52 000	26,3	2,78
kontr21m	2	74	78 000	26,4	2,80
kontr21m	2	78	120 000	28,9	2,70
kontr21m	2	80	50 000	29,4	2,72
kontr21m	2	80	280 000	25,1	3,19
kontr21m	2	81	35 000	27,8	2,91
kontr21m	2	84	360 000	27,6	3,04
kontr21m	2	84	30 000	29	2,90
kontr21m	2	85	1 500 000	26,9	3,16
kontr21m	2	87	35 000	26,3	3,31
kontr21m	2	87	700 000	27,1	3,21
kontr21m	2	87	313 000	28,6	3,04
kontr21m	2	91	12 000	30,2	3,01
kontr21m	2	93	220 000	24,7	3,77
kontr21m	2	94	100 000	26,7	3,52
kontr21m	2	95	7 300 000	29,3	3,24
kontr21m	2	105	1 900 000	29,6	3,55
kontr24m	2	79	15 000	25,5	3,10
kontr24m	2	80	66 000	28,3	2,83
kontr24m	2	90	70 000	27,4	3,28
kontr24m	2	63	20 000	23,0	2,75
kontr24m	2	80	580 000	29,8	2,68
kontr24m	2	81	1 200 000	31,3	2,59
kontr24m	2	80	0	36,4	2,20
kontr24m	2	120	12 300 000	35,7	3,36
kontr24m	2	82	1 530 000	35,1	2,34
kontr24m	2	117	10 100 000	32,9	3,56
kontr24m	2	108	9 400 000	36,1	2,99
kontr24m	2	125	26 500 000	32,2	3,88
kontr24m	2	74	0	32,7	2,26
kontr24m	2	115	26 300 000	33,9	3,39
kontr24m	2	82	100 000	36,5	2,25
kontr24m	2	124	39 100 000	32,6	3,80
kontr24m	2	83	1 600 000	40,3	2,06
kontr24m	2	115	28 100 000	33,9	3,39
kontr24m	2	91	2 000 000	30,7	2,96
kontr24m	2	80	0	30,1	2,66
kontr24m	2	132	28 800 000	29,7	4,44
kontr24m	2	107	5 400 000	30,1	3,55