



**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE**

---



**VYUŽITÍ IMUNOFLUORESCENCE A  
FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE PRO  
STUDIUM MEIOTICKÝCH A MITOTICKÝCH  
CHROMOZOMŮ U RODINY *CETARTIODACTYLA***

Disertační práce

**Jan Fröhlich**

Vedoucí práce: prof. MVDr. Jiří Rubeš CSc.

Brno 2016

## Bibliografický záznam

- Autor:** Mgr. Jan Fröhlich  
Přírodovědecké fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie
- Název práce:** Využití imunofluorescence a fluorescenční *in situ* hybridizace pro studium meiotických a mitotických chromozomů u rodiny *Cetartiodactyla*
- Studijní program:** Biologie
- Studijní obor:** Obecná a molekulární genetik
- Vedoucí práce:** prof. MVDr. Jiří Rubeš CSc.  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno  
Oddělení genetiky a reprodukce
- Akademický rok:** 2016/2017
- Počet stran:** 171
- Klíčová slova:** meióza, synaptonemální komplex, rekombinace, imunofluorescence, SCP3, MLH1, FISH, cytometrie

## Bibliographic Entry

- Author:** Mgr. Jan Fröhlich  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology
- Title of Dissertation:** The use of immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization in studies of meiotic and mitotic chromosomes in the *Cetartiodactyla* family
- Degree Program:** Biology
- Field of Study:** General and Molecular Genetics
- Supervisor:** Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.  
Veterinary Research Institute, Brno  
Department of Genetics and Reproduction
- Academic year:** 2016/2017
- Number of Pages:** 171
- Keywords:** meiosis, synaptonemal complex, recombination, immunofluorescence, SCP3, MLH1, FISH, cytometry

## Abstrakt

Řád *Cetartiodactyla* je v současnosti jedna z největších skupin savců na zemi, která zahrnuje 10 čeledí suchozemských a 12 čeledí vodních savců. Charakteristickým znakem všech dnešních sudokopytníků je osa končetin procházející mezi 3. a 4. prstem. Řád *Cetartiodactyla* je z cytogenetického hlediska heterogenní skupinou organismů, ve které se vyskytují čeledi s pomalou karyotypovou evolucí (*Cetacea* a *Hippopotamidae*) a čeledi (např. *Bovidae*), jejichž zástupci mají značně odlišné karyotypy ( $2n = 30 - 60$ ). Pro upřesnění evolučních vztahů přispívá velkou měrou komparativní genomika založená na analýze chromozomů, mapování genů a DNA sekvenování. Jednou ze základních a hojně využívaných metod je ZOO-FISH, jejímž principem je mezidruhov $\acute{a}$  cross-hybridizace specifických sond určitého druhu na chromozomy jiného druhu. Na základě znalostí evolučních chromozomových přestaveb můžeme sledovat speciaci druhů.

Jedním z cílů práce byla komparativní cytogenetika u vybraných savců z řádu *Cetartiodactyla*. K tomuto účelu byly použity celochromozomové a BAC FISH sondy, které byly připravovány z DNA prasete a krávy. Chromozomální DNA byla získávána průtokovou cytometrií chromozomů nebo laserovou mikrodisekcí. Metodou ZOO-FISH byl u hrošíka liberijského poprvé stanoven komparativní karyotyp, který je téměř shodný s karyotypem hrocha. Určena byla také bližší struktura chromozomu X hrošíka, jež je velice podobná struktuře chromozomu X žirafy.

V rámci čeledi *Bovidae* existuje značná variabilita v diploidním počtu chromozomů ( $2n = 30 - 60$ ), nicméně počet autozomálních ramen zůstává téměř nezměněn a genomy jednotlivých druhů jsou vysoce homologní. Předpokládá se, že ancestrální karyotyp, konzervovaný v genomu krávy nebo kozy, měl celkem 58 akrocentrických autozomů, akrocentrický X a malý submetacentrický chromozom Y. Veliká variabilita v počtu chromozomů a karyotypová různorodost v čeledi *Bovidae* je velice výhodným prvkem při studiu meiotického dělení a rekombinační interference.

Dalším cílem této práce bylo porovnávání frekvence a distribuce rekombinací mezi různými druhy z čeledi *Bovidae*. Bylo sledováno, zda vlivem centrických fúzí a procesem domestikace dochází ke změnám rekombinace u zkoumaných druhů. S využitím imunofluorescenční detekce meiotických proteinů (MLH1, SCP3) a FISH jsme sledovali v pachytenních spermatocytech frekvenci a distribuci crossing-overů na meiotických chromozomech. Vyšetřeno bylo celkem 112 jedinců 28 různých druhů z čeledi *Bovidae*.

U všech vyšetřovaných zvířat byla nalezena významná individuální i mezidruhová variabilita v délce synaptonemálních komplexů a v počtu rekombinací na buňku. Zároveň byl prokázán úbytek počtu a změna distribuce rekombinací na metacentrických chromozomech ovce oproti jejich orthologům u krávy a kozy. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny metacentrickým stavem chromozomů a centromerickou interferencí působící přes centromeru.

## Abstract

The order *Cetartiodactyla* is currently one of the largest groups of mammals on Earth that includes 10 families of terrestrial and 12 families of aquatic mammals. The main hallmark of all today's ungulates is the limb axis passing between the third and fourth finger. The order *Cetartiodactyla* is a cytogenetically heterogeneous group of organisms, comprising families with slow karyotype evolution (*Cetacea* and *Hippopotamidae*) and families (e.g. *Bovidae*) whose representatives have distinct karyotypes ( $2n = 30$  to  $60$ ). Comparative genomics, based on the analysis of chromosomes, gene mapping and DNA sequencing, greatly contributes to the clarification of evolutionary relationships between animals. One of the basic and abundantly used methods is ZOO-FISH, which is based on cross-hybridization of specific probes from one species on chromosomes of another species. Based on the knowledge of evolutionary chromosomal rearrangements, the process of organism speciation can be traced.

One of the aims of this study were comparative cytogenetics of selected mammals from the order *Cetartiodactyla*. For this purpose, whole chromosome and BAC FISH probes, prepared from pig and cow DNA, were used. Chromosomal DNA was obtained by flow cytometry of chromosomes or by laser microdissection. Using ZOO-FISH, comparative karyotype between pygmy hippo and common hippo was established for the first time. These karyotypes are almost identical. Detailed structure of the pygmy hippo X chromosome was defined and is very similar to the structure of the giraffe X chromosome. Within the family *Bovidae*, there is a considerable variability in the diploid number of chromosomes ( $2n = 30$  to  $60$ ), but the number of autosomal arms remains almost constant and genomes of various species are highly homologous. It is believed that the ancestral karyotype, preserved in the genome of cows and goats, had a total of 58 acrocentric autosomes, an acrocentric X and a small submetacentric Y chromosome. The great variability in chromosome number and karyotype diversity in *Bovidae* is a very convenient feature for the study of meiotic division and recombination interference.

Another aim of this study was the comparison of recombination frequencies and their distribution between different species of *Bovidae*. We investigated if centric fusions and the process of domestication cause changes in recombination rates in the researched species. With the use of immunofluorescence detection of meiotic proteins (MLH1, SCP3) and subsequent FISH, we analysed the frequency and distribution of crossing-overs on

meiotic chromosomes in pachytene spermatocytes. A total of 112 individuals from 28 different *Bovidae* species were examined. In all investigated animals, significant individual and interspecies variability was found in the length of synaptonemal complexes and the number of recombination events per cell. A decrease in the number and a change in the distribution of crossing-overs on sheep metacentric chromosomes was demonstrated compared to their orthologues in cows and goats. These differences are probably caused by the metacentric state of chromosomes and by centromeric interference acting over the centromere.

Předkládaná práce byla vypracována na Oddělení genetiky a reprodukce Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. v Brně za podpory Grantové agentury České republiky (projekt P502/11/0719), grantu Ministerstva zemědělství RO 0516 a Evropského fondu regionálního rozvoje – Středoevropský technologický institut Brno CEITEC (ED1.1.00/02.0068).

## **Poděkování**

Rád bych na tomto místě poděkoval mému vedoucímu disertační práce prof. MVDr. Jiřímu Rubešovi, CSc. za odborné vedení a možnost získat cenné praktické zkušenosti z oblasti cytogenetiky. Poděkování patří také všem členům (jak stávajícím, tak i bývalým) kolektivu Oddělení genetiky a reprodukce Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za vytvoření příjemných pracovních podmínek, za cenné rady a připomínky zvláště pak Mgr. Miluši Vozdové, PhD., RNDr. Svatavě Kubíčkové, Mgr. Halině Černošské a Heleně Muškové.

V neposlední řadě chci na tomto místě velmi poděkovat celé své rodině za podporu při psaní této práce.





# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Meióza</b> .....	<b>12</b>
1.1.1. První meiotické dělení.....	14
1.1.1.1. Profáze prvního meiotického dělení .....	14
1.1.1.2. Metafáze I.....	16
1.1.1.3. Anafáze I.....	16
1.1.1.4. Telofáze I.....	17
1.1.2. Druhé meiotické dělení .....	17
<b>1.2. Synaptonemální komplex a synapse chromozomů</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3. Homologní rekombinace</b> .....	<b>21</b>
1.3.1. Proteiny homologní rekombinace .....	22
1.3.2. Rekombinační variabilita .....	26
1.3.3. Interference .....	29
<b>1.4. Fluorescenční in situ hybridizace</b> .....	<b>32</b>
1.4.1. Neradioaktivní fluorescenční in situ hybridizace .....	34
1.4.2. Typy hybridizačních sond .....	35
1.4.3. ZOO-FISH .....	36
<b>1.5. Metody izolace specifické chromozomální DNA</b> .....	<b>37</b>
1.5.1. Laserová záchytová mikrodisekce.....	37
1.5.2. Flow cytogenetika - Sortování chromozomů pomocí průtokové cytometrie.....	39
<b>1.6. Cetartiodactyla</b> .....	<b>42</b>
1.6.1. Čeleď turovití ( <i>Bovidae</i> ) .....	45
1.6.2. Pohlavní chromozomy u čeledi <i>Bovidae</i> .....	46
1.6.3. Čeleď <i>Hippopotamidae</i> .....	48
<b>2. Materiál a Metody</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1. Vzorky</b> .....	<b>50</b>
<b>2.2. Příprava imunofluorescenčních preparátů testikulární tkáně</b> .....	<b>51</b>
<b>2.3. Příprava FISH sond</b> .....	<b>52</b>
2.3.1. Příprava malovacích sond pomocí DOP-PCR.....	52
2.3.2. Příprava BAC sond .....	52
<b>2.4. Fluorescenční in situ hybridizace</b> .....	<b>53</b>
<b>2.5. Analýza preparátů</b> .....	<b>53</b>
<b>2.6. Statistická analýza</b> .....	<b>54</b>
<b>2.7. Mikrodisekce mitotických chromozomů</b> .....	<b>54</b>
<b>2.8. Průtoková cytometrie mitotických chromozomů</b> .....	<b>54</b>
<b>3. Cíle práce</b> .....	<b>56</b>
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>57</b>

4.1.	<i>Rekombinace a její variance u čeledi Bovidae.....</i>	57
4.2.	<i>DSB a RAD51 .....</i>	59
4.3.	<i>Rekombinační a centromerická interference.....</i>	60
4.4.	<i>Rekombinace na pohlavních chromozomech a sex-autozomální translokace .....</i>	62
4.5.	<i>Průtoková cytometrie chromozomů a komparativní cytogenetika .....</i>	67
5.	<b>Diskuze .....</b>	<b>71</b>
5.1.	<i>Rekombinace a její variance u čeledi Bovidae.....</i>	71
5.2.	<i>DSB/RAD51 a jejich konverze v CO u Bovidae.....</i>	73
5.3.	<i>Rekombinační a centromerická interference.....</i>	74
5.4.	<i>Rekombinace na pohlavních chromozomech a sex-autozomální translokace .....</i>	76
5.5.	<i>Průtoková cytometrie a FISH v komparativní cytogenetice.....</i>	78
6.	<b>Závěr.....</b>	<b>81</b>
7.	<b>Literatura.....</b>	<b>83</b>
8.	<b>Přílohy .....</b>	<b>99</b>
9.	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>100</b>

# 1. Úvod

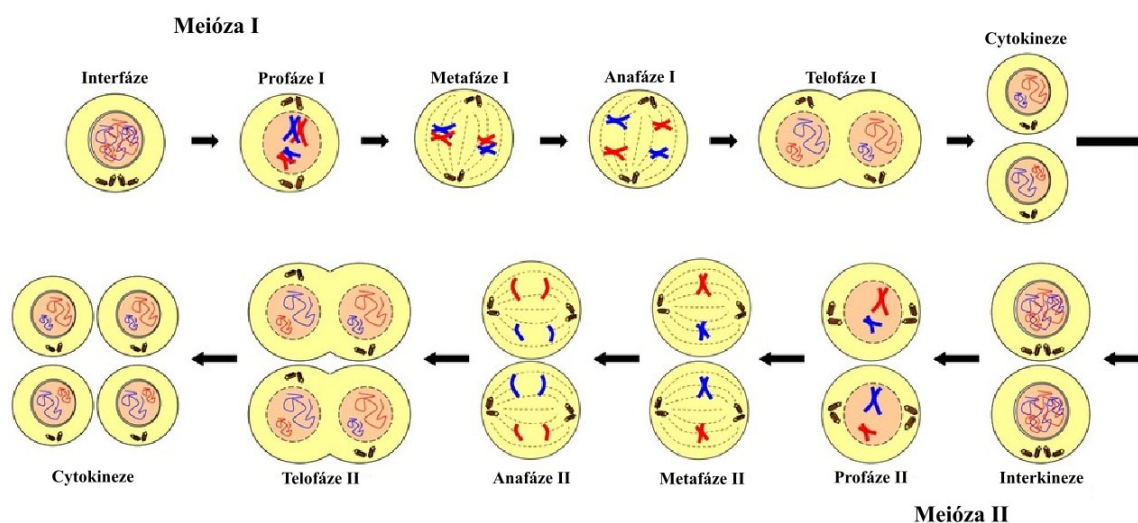
## 1.1. Meióza

Meióza nebo také redukční dělení je základním procesem pohlavního rozmnožování, během kterého vznikají buňky s haploidním (redukovaným) počtem chromozomů ( $2n \rightarrow n$ ) (Obrázek 1). Meióza je velice starým a evolučně dobře konzervovaným procesem (vznikl asi před 1,2 mld. let), avšak vyznačuje se řadou odlišností a modifikací mezi jednotlivými druhy a pohlavími. Bez procesu meiózy a potažmo redukce počtu chromozomů by docházelo při splynutí rodičovských gamet během oplození k nárůstu (zdvojnásobení) chromozomových sad v buňce s každou novou generací, což by bylo neúnosné pro organismus (Snustad a Simmons, 2008). V průběhu fertilizace tak dochází během splynutí haploidních samčích a samičích gamet k obnovení normálního diploidního stavu. Tento proces probíhá téměř u všech pohlavně se rozmnožujících organismů (Bernstein a kol., 2011; Lodé, 2011). Poruchy v procesu meiózy vedou často k aneuploidiím u embryí, které jsou pak častou příčinou potratů a geneticky podmíněných vrozených vývojových vad (Hassold a Hunt, 2001).

Sexuální reprodukce (potažmo rekombinace) je z evolučního hlediska velice významným procesem. Vede ke zvýšení genetické rozmanitosti, napomáhá přežívání stávajících druhů a zároveň umožňuje jejich evoluci a vytváření druhů nových (Butlin, 2005). Zvýšení genetické variability je dosaženo nejen pomocí náhodné segregace otcovských (paternalních) nebo mateřských (maternálních) chromozomů do pohlavních buněk (vytváření nových chromozomových kombinací), ale i prostřednictvím homologní chromozomové rekombinace (crossing-overu) (Snustad a Simmons, 2008; Vacek, 2006).

Meiotické dělení se obecně skládá ze dvou po sobě následujících dělení. Během prvního meiotického dělení (tzv. heterotypické nebo též redukční) vznikají dvě dceřiné, haploidní buňky, do kterých segreguje polovina celých homologních chromozomů, nikoliv jen chromatidy jako je tomu u mitózy. U druhého meiotického dělení (tzv. homeotypické neboli ekvační) již nedochází k replikaci jaderné DNA a do dceřiných buněk směřují jen jednotlivé chromatidy (Obrázek 1). U samčí meiózy vznikají celkově 4 stejně velké, haploidní buňky s polovičním počtem chromozomů, zatímco v případě samic vzniká jen jediná velká, oplození schopná buňka s redukovaným počtem chromozomů (oocyt) a 2-3 znatelně menší pólová tělíška.

**Obrázek 1:** Schematický model průběhu meiózy (převzato a upraveno z <https://www.thinglink.com/scene/498564561385816065>; 11. 5. 2016).



Základní procesy meiózy jsou shodné pro obě pohlaví, ale meióza samic má několik odlišností od té samčí. Jedná se především o odlišné načasování jednotlivých fází meiózy. U samic začíná meióza probíhat již prenatalně okolo 2 měsíce po početí, kdy dochází k mitotickému pomnožování kmenových buněk oogonií. Oogonia pak prochází proměnou v primární oocyty, které ihned vstupují do profáze prvního meiotického dělení, avšak meióza se zastavuje před ukončením profáze I (v diplotene - tzv. diktyotenní stadium). Dokončení prvního meiotického dělení se odehrává až v průběhu pohlavního dospívání (respektive při ovulaci), jejímž výsledkem je pak oocyt II. řádu a pólóvé tělísko (Vacek, 2006). Meióza oocytu II. se během ovulace zastaví v metafázi druhého meiotického dělení a cyklus je dokončen až během oplodnění vajíčka spermií.

Naproti tomu, u samčího pohlaví u savců probíhá meióza až postnatálně. Meióza započíná obvykle v pubertě a je ukončena obvykle až smrtí jedince. Spermie se vyvíjejí z diploidních spermatogonií nacházející se v semenotvorných kanálcích varlete. Spermatogonie se dělí mitoticky, tím jednak dochází k doplnění populace kmenových spermatogonií, ale taktéž v přítomnosti podpůrných buněk (např. Sertolihových buněk) se spermatogonie mění na spermatocyty I. řádu. Tyto buňky pak vstupují do meiózy a během prvního meiotického dělení vznikají 2 haploidní buňky – spermatocyty II. řádu (s redukovaným počtem dvou-chromatidových chromozomů) (Holstein a kol., 2003; Kittnar, 2011; Vacek, 2006). Spermatocyty II. řádu pak podstupují druhé meiotické dělení za vzniku čtyř stejně velkých, haploidních spermatid, které si již dále nedělí, ale procesem

spermiogeneze se přeměňují (maturují) na zralé spermie (Morelli a Cohen, 2005). U člověka se odhaduje, že celý proces tvorby životaschopných spermií trvá okolo 74-120 dnů (Heller a Clermont, 1964; Amann, 2008)

### **1.1.1. První meiotické dělení**

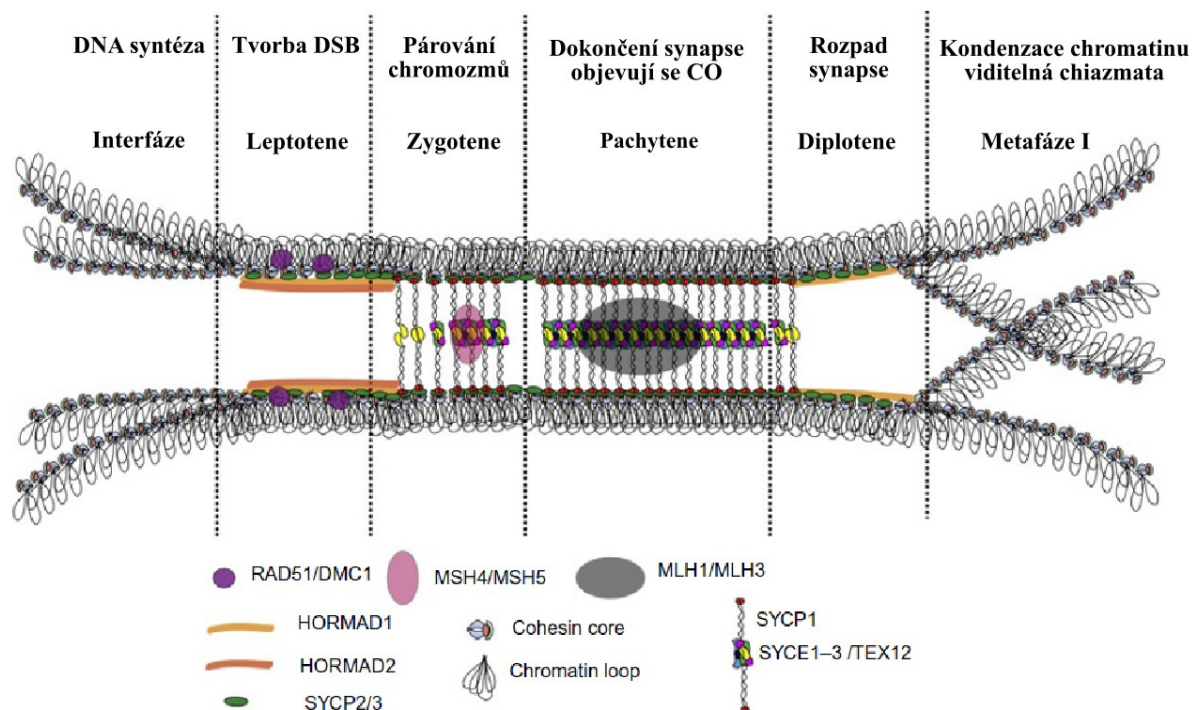
Před zahájením prvního meiotického dělení dochází k replikaci chromozomální DNA (zdvojuje se její obsah) podobně jako tomu je u mitózy. Jednou z hlavních odlišností meiózy od mitózy spočívá především v profázi prvního meiotického dělení, která je velmi dlouhá a můžeme ji rozdělit do čtyř stádií zvaných leptotene, zygotene, pachytene a diplotene. Dalším rozdílem mezi meiózou a mitózou spočívá v odlišnosti anafázního rozestupu chromozomů, kdy u mitózy dochází k rozchodu jednotlivých chromatid chromozomů k protilehlým pólům buňky, zatímco u meiózy jsou prostřednictvím mikrotubulů dělicího vřetenka taženy celé chromozomy k opačným stranám buňky.

#### ***1.1.1.1. Profáze prvního meiotického dělení***

Profáze I prvního meiotického dělení se odehrává v jádře se zachovalou jadernou membránou a jadérkem. Tato fáze je časově nejnáročnější fází celého meiotického dělení, jelikož může zahrnovat až 90 % celé meiózy a může trvat od několika hodin až po několik dní. V této fázi cyklu probíhají nejdůležitější a charakteristické procesy meiózy – párování, synapse a rekombinace homologních chromozomů (Jordan, 2006). Profáze I se dělí na několik stádií a to na základě morfologie chromatinu a párování homologních chromozomů během synapse (Obrázek 2).

Během **Leptotene** dochází ke kondenzaci a dehydrataci duplikované chromozomální DNA, která se v místech telomer začíná upínat k jadernému obalu (tzv. fáze kytice; bouquet stage) (Scherthan, 2007). Chromozomy se díky kondenzaci chromatinu stávají viditelnými jako velice dlouhá a tenká (nitkovitá) vlákna s centrální osou bílkovinné povahy (Snustad a Simmons, 2008). V této fázi cyklu jsou indukovány dvouřetězcové zlomy (DSB – Double Strand Breaks) prostřednictvím restriční enzymu Spo11 (Baudat a kol., 2000). Takto vzniklé zlomy jsou rozpoznávány multiproteinovými komplexy proteinů RAD51/DMC1, které se na DSB navazují spolu s dalšími proteiny rekombinační reparační DNA. Vytvoření dvouřetězcových zlomů je důležité pro nalezení homologních chromozomů a utváření synaptonemálního komplexu mezi nimi (Romanienko a Camerini-Otero, 2000).

**Obrázek 2:** Schematický model ukazující iniciaci synapse homologních chromozomů (Scherthan a kol., 1996) (upraveno).



Leptotenní stádium plynule přechází za pokračující spiralizace a kondenzace chromatinu ve stádium **Zygotene**. V této fázi cyklu se homologní/sesterské chromozomy začínají spolu párovat po celé své délce (tzv. konjugace/synapse), přičemž synapse je zprostředkována proteiny centrálních (CE) a laterálních (LE) elementů synaptonemálního komplexu (proteiny SCP1 a SCP3), které slouží k udržení správné orientace a vzdálenosti mezi vlákny DNA homologních chromozomů (Heyting, 1996; Vacek, 2006). Spárované homologní chromozomy se nyní nazývají bivalenty a tvoří je 4 chromatidy (tetrády). Během meiózy u samic se v oocytech mezi sebou homologně párují oba chromozomy X po celé své délce za vytvoření jediného bivalentu, stejně jako je tomu v případě autozomálních chromozomů. Naproti tomu, u samců ve spermatocytech dochází k opožděnému a jen částečnému párování mezi chromozomy X a Y, kde samotná synapse je krátká a soustředěna jen na malou oblast pohlavních chromozomů zvanou pseudoautozomální (PAR) (Kauppi a kol., 2012).

V **Pachytene** je plně dokončena kondenzace a synapse autozomálních chromozomů. Dochází k vytvoření překřížení vláken DNA nesesterských chromatid v místech rekombinační nodulů/uzlíků (Snustad a Simmons, 2008). Následuje vzájemná výměna úseků DNA (rekombinace/crossing-over) a opětovná rekonstrukce vláken DNA

prostřednictvím reparačních proteinů (např. MLH1). Po ustanovení rekombinace mezi homologními chromozomy dochází k rychlému zániku synapse a chromozomy zůstávají propojeny v místech svých konců a v místech CO. Propojené chromozomy jsou poté odsunuty stranou do blízkosti jaderné membrány (Handel, 2004; Vacek, 2006).

Během **Diplotene** je rekombinace plně dokončena a synaptonemální komplexy se začínají pomalu oddělovat a rozpadat. Tento rozpad synapse mezi homologními chromozomy probíhá ve směru od centromer k periferiím, avšak bivalenty zůstávají nadále spolu spojeny v místech rekombinačních nodulů (v chiasmatech). Na konci diplotenního stádia dochází k tzv. terminalizaci, tj. je posunu chiasmat z původního místa rekombinace směrem k telomerám chromozomů. Při tomto jevu bivalenty nabývají charakteristického prstencovitého tvaru.

S terminalizací chiasmat ke koncům chromozomů nastupuje konečná fáze prvního meiotického dělení, **Diakineze**. V diakinezi dochází k urychlené kondenzaci hmoty chromatinu a chromozomy uvolňují své spojení s jadernou membránou, která se již v této fázi rozpadá (Petronczki a kol., 2003; Vacek, 2006).

#### ***1.1.1.2. Metafáze I***

**Metafáze** prvního meiotického dělení se vyznačuje seřazením chromozomů do ekvatoriální roviny a vytvořením metafázní ploténky. Metafázního seřazení chromozomu je dosaženo pomocí kontrakcí mikrotubulů dělicího vřeténka (centriolu), ze kterého se vybíhající mikrotubuly napojují na kinetochory centromer homologních chromozomů. Z každého pólu buňky vybíhají mikrotubuly vždy jen k jedné chromatidě homologního chromozomu, což vede k oddělení celých homologních chromozomů na rozdíl od sesterských chromatid v případě mitózy. Orientace centromer (kinetochor) vůči dělicímu vřeténku je náhodná, proto pravděpodobnost, že otcovské nebo mateřské chromozomy přejdou do jedné nebo druhé buňky je stejná (Freeman a Hamilton, 2005).

#### ***1.1.1.3. Anafáze I***

Během **Anafáze I** dochází k uvolňování chiasmat, avšak nedochází k úplnému oddělení chromatid. K opačným pólům buňky vždy migrují celé chromozomy. Ke každému pólu pak putuje kompletní sada chromozomů a to s haplotypem původním (tj. mateřským/otcovským) nebo nově rekombinovaným.



#### **1.1.1.4. Telofáze I**

V **Telofázi I** dochází ke zpětné dekondenzaci chromozomů, rozpadá se dělicí vřeténko a utváří se jaderná membrána. Celý proces prvního meiotického dělení je zakončen **Cytokinezí**, při které dochází k vytvoření dvou buněk dceřiných. Jádra takto vzniklých buněk se vyznačují haploidní sadou chromozomů se dvěma zachovanými chromatidami.

### **1.1.2. Druhé meiotické dělení**

Druhé meiotické dělení se označuje jako homeotypické, je krátké a má téměř shodné fáze s mitózou (profáze, metafáze, anafáze a telofáze). Nicméně, je zde odlišnost v absenci syntetické fáze buněčného cyklu (nedochází k duplikaci DNA), jelikož buňky mají haploidní počet dvouchromatidových chromozomů. Chromatidy chromozomů jsou stále propojeny v místech kinetochorů a zaujímají tak tvar připomínající písmeno X. Během druhého meiotického cyklu dochází ke kondenzaci chromatinu, vzniká dělicí vřeténko, chromozomy se seřadí v ekvatorialní rovině a na kinetochory se napojují mikrotubuly dělicího vřeténka. V anafázi II se sesterské chromatidy od sebe oddělí a každá z nich je tažena k opačnému pólu buňky. Nakonec se v telofázi II znovu vytvoří jaderná membrána a chromozomy jsou opět dekondenzovány (Snustad a Simmons, 2008; Zickler a Kleckner, 1999). Výsledkem druhého meiotického dělení jsou 4 dceřiné buňky (v případě samčí meiózy) s haploidním počtem jednochromatidových chromozomů (Vacek, 2006).

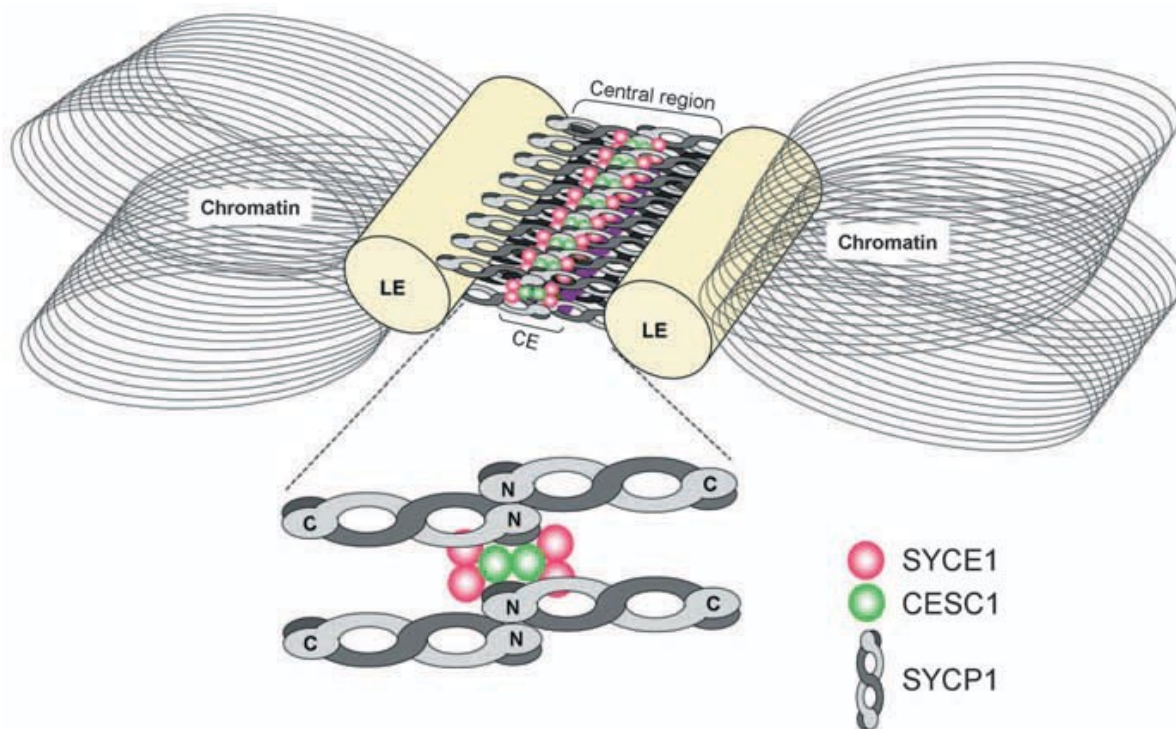
## **1.2. Synaptonemální komplex a synapse chromozomů**

Synapse chromozomů je klíčovou podmínkou pro úspěšný průběh meiotického dělení a jen správně spárované chromozomy podléhají rekombinaci, která napomáhá jejich rovnoměrnému rozdělení do dceřiných buněk.

Synaptonemální komplex (Obrázek 3) je žebříčkovitá/zipovitá proteinová struktura, která propojuje homologní chromozomy během meiózy u většiny pohlavně se rozmnožujících organismů. Během leptotene v profázi I dochází k vytváření proteinových struktur zvané axiální elementy (AE - Axial Elements, ve fázi zygotene nazývané laterální elementy - LE) podél chromatinu homologních chromozomů za vzniku jediné dlouhé proteinové osy. V průběhu zygotene a pachytene dochází ke vzájemnému párování a spojování LE homologních chromozomů prostřednictvím transverzálních elementů (TE).

Dochází tak k formování centrálního proteinového elementu (CE) ve středu vznikajícího komplexu. LE v pachytene tvoří jakési proteinové „lešení“ podél celé délky homologních chromozomů, které jsou následně spolu příčně propojeny transverzálními elementy. Většina DNA chromozomu (včetně histonů a dalších proteinů), je lokalizována po stranách synaptonemálního komplexu ve formě smyček (Rockmill a kol., 1995; Yuan a kol., 2000). Velikost DNA smyček je velmi variabilní se značnými rozdíly mezi různými druhy organismů (např. 0,5  $\mu\text{m}$  u kvasinek *S. cerevisiae* nebo 14  $\mu\text{m}$  u sarančat *Chorthippus longicornis*) (Moens a Pearlman, 1988).

**Obrázek 3:** Schematický náčrt uspořádání proteinů a DNA v meiotickém synaptonemálním komplexu (Costa a kol., 2005). (LE – laterální element tvořen axiálními elementy; CE – centrální element tvořen transverzálními elementy)



První studie zabývající se strukturou SC pocházejí z padesátých let minulého století a byly prováděny pomocí elektronové mikroskopie. Tyto práce prokázaly, že struktura SC je shodná u všech sexuálně se rozmnožujících organismů (Moses, 1956). Identifikovány byly tři hlavní proteinové komponenty synaptonemálního komplexu (proteiny SCP1, SCP2 a SCP3).

SCP3 (Synaptonemal Complex Protein 3) je evolučně konzervovaným, relativně malým proteinem o velikosti okolo 30 kDa, který je složen ze 4 řetězců s centrální  $\alpha$ -helikální doménou (Meuwissen a kol., 1992; Syrjanen a kol., 2014).

Během časné fáze leptotene dochází v meiotickém jádře k vazbě komplexu proteinů SCP2 a SCP3 na chromatinová vlákna chromozomů, přičemž pro sestavení synaptonemálního komplexu jsou důležité telomerické repetice, od kterých synapse započiná. Samotný rozpad vazby mezi SCP3/SCP2 a chromatinem se odehrává až ve fázi diplotene, kdy dochází k rozpadu SC a sesterské chromatidy jsou drženy u sebe prostřednictvím crossing-overů (Yuan a kol., 2000). Mutace v genu pro protein SCP3 nebo ztráta jeho funkce je často spojená s kompletní zástavou tvorby spermií u samců savců. Dochází k abnormálnímu a nesprávnému párování bivalentů, což vede k apoptóze spermatocytů během fáze zygotene prvního meiotického dělení. U samic je kontrola jednotlivých fází meiózy benevolentnější, a proto narušení funkce SCP3 není často spojeno se zástavou tvorby gamet. Nicméně, produkované oocyty se vyznačují vysokým procentem aneuploidii, které mají ve velké míře za následek odumření embrya *in utero* (Yuan a kol., 2000; Bolor a kol., 2009; Fraune a kol., 2012).

SCP1 (Synaptonemal Complex Protein 1) je 111 kDa velkou molekulou, která je hlavní složkou transverzálních vláken spojující axiální elementy homologních chromozómů k sobě. Protein SCP1 se nachází výhradně jen v oblastech spárovaných homologních chromozómů (Meuwissen a kol., 1992; Offenbera a kol., 1998; Baarends a Grootegoed, 2003). V zygotene jednotlivé proteiny SCP1 dimerizují do paralelních homodimerů, které se prostřednictvím svých N-domén spojují a váží se na axiální elementy za vytvoření centrálního elementu (Obrázek 2) (Schmekel a kol., 1996). Následky absence SYCP1 v myších pohlavních buňkách není na rozdíl od SYCP2 a SYCP3 ovlivněná pohlavím. Deficience proteinu SCP1 vede u obou pohlaví myši k apoptóze většiny meiotických buněk již během fáze pachytene, což je následně spojeno s kompletní sterilitou jedinců. Myši samci jsou sterilní, ale fenotypově se vyvíjí normálně. V leptotene tvoří poškozené spermatocyty normální AE, avšak nevykazují náznak tvorby homologní synapse nebo vznik centrálního elementu (Vries a kol., 2005).

Funkční SC je nezbytný pro správný průběh rekombinace. Regulace párování, synapse a rekombinace homologních chromozómů jsou velmi úzce propojenými ději. Narušení správného párování homologních chromozómů a rekombinace vedou u savců

k poruchám během meiózy a mohou způsobovat sterilitu. Negativní vlivy jsou patrné jak v případě oogeneze tak i spermiogeneze. Zárodečné buňky jsou díky absenci homologní rekombinace mnohem náchylnější k výskytu aneuploidii, které často vedou k embryonální letalitě (Yuan a kol., 2000, 2002). U mužů s diagnostikovanou neobstrukční azoospermií (porucha tvorby spermií) jsou mnohdy odhaleny poruchy v homologním párování chromozomů během meiózy. Snížená tvorba CO pak vede k zastavení meiózy, apoptóze zárodečných pohlavních buněk a neplodnosti (Odorisio a kol., 1998; Sun a kol., 2005a)

Pro správný a zdárný průběh meiotické synapse jsou nezbytně důležité centromerické a telomerické oblasti chromozomů. U většiny druhů má každý premeiotický chromozom své příslušné teritorium v jádře buňky a téměř ve všech případech jsou chromozomy orientovány svými telomerami a centromerami k vnější straně chromozomálního teritoria. Jakmile jsou všechny chromozomální konce vhodně orientovány, dochází k uchycení nejprve centromer k jadernému obalu, později se na jadernou membránu napojují telomery. Od tohoto okamžiku pak začíná párování homologických chromozomů, které startuje právě v místech telomer a progreduje směrem k centromerickým oblastem (Scherthan a kol., 1996).

K synapsi na sub/metacentrických chromozomech dochází současně na obou jejich ramenech a probíhá konstantní rychlostí od obou konců (telomer) chromozomu. Díky progresi synapse od konců směrem k centromere je pak u metacentrických chromozomů výsledkem asynaptická bublina v centromerické oblasti, která podléhá synapsi jako poslední. U kratších submetacentrických chromozomů vzniká asynapse až za centromerou, nejčastěji však v pericentromerické oblasti delšího z chromozomálních ramen. Centromera tak neřídí sestavování synaptonemálního komplexu, ale pravděpodobně funguje jako možná bariéra synapse (Brown a kol., 2005). U celé řady organismů je nalézána korelace mezi iniciačními místy homologní synapse a rekombinacemi. Není ale zcela jasné, zda iniciace synapse spouští rekombinaci nebo počátek rekombinace spouští synapsi. Ukazuje se, že absence iniciačního místa v okolí centromery, které se často skládá z repetitivních sekvencí, potlačuje rekombinaci v těchto oblastech. Funkce tohoto mechanismu nejspíše spočívá v minimalizaci rizika nondisjunkce (Zickler a Kleckner, 1999; Hassold a Hunt, 2001; Henderson a Keeney, 2005; Rockmill a kol., 2006; Black a kol., 2010).

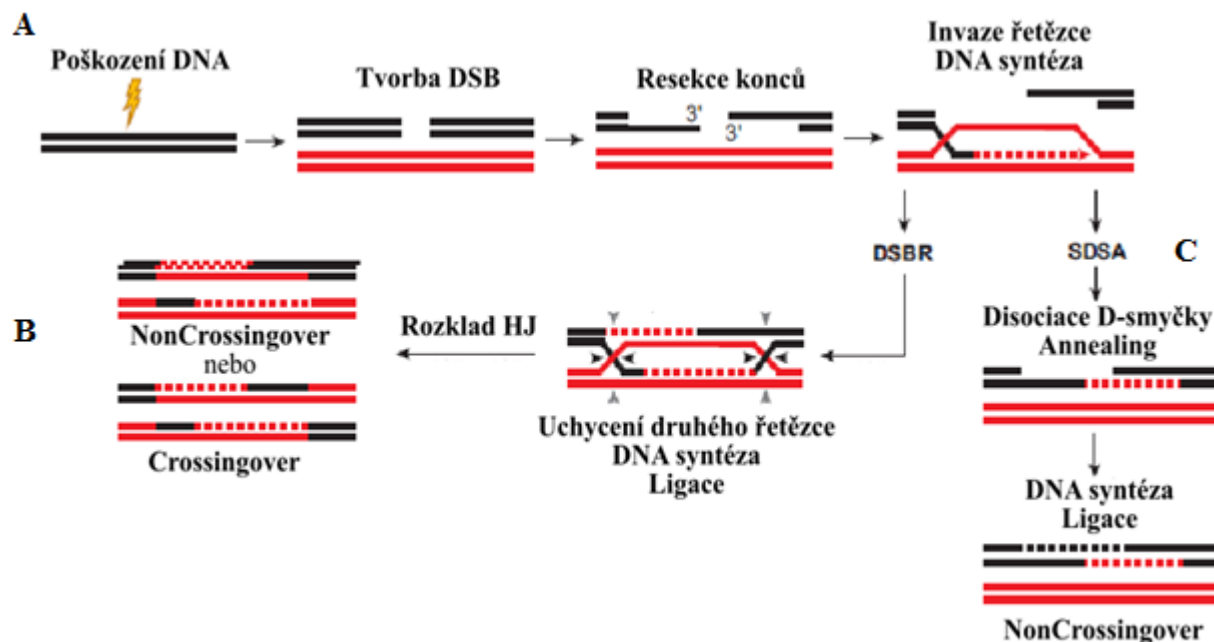
### 1.3. Homologní rekombinace

Meiotická rekombinace je procesem, během kterého dochází k výměně částí DNA mezi sesterskými chromozomy a vzniku nových kombinací alel (Heyer a Kohli, 1994). Rekombinace je nezbytnou podmínkou pro správné proběhnutí meiotického dělení a vytvoření balancovaných haploidních gamet (Hassold a kol., 2000). Výslednými produkty rekombinace jsou 2 základní typy produktů, crossing-over (CO) a genová konverze neboli noncrossover (NCO) (Youds a Boulton, 2011).

Pouze CO mohou zajišťovat fyzické spojení homologních chromozomů během meiózy, které je nezbytné pro jejich správnou segregaci do dceřiných buněk (Keeney, 2009a). NCO nemá žádný vliv na průběh segregace chromozomů a jeho funkce je prozatím neznámá. Spekuluje se o možné biologické funkci NCO, která napomáhá meiotickému homolognímu párování chromozomů (Smithies a Powers, 1986). Společnou vlastností CO a NCO je jejich společný vznik z DSB a jejich enzymatická reparace za vytvoření Hollidayova spoje (HJ – Holliday Junction) (Obrázek 4). Všechny rekombinační události zahrnují dva HJ a o tom, zda dojde k progresi v NCO nebo CO rozhoduje jejich vzájemná orientace (Bishop a Zickler, 2004; Filippo a kol., 2008).

Na počátku složitého rekombinačního procesu jsou indukovány DSB, jejichž 3' konce jsou upraveny pomocí restriktáz za vzniku 3' přesahů, které jsou rozeznávány proteiny opravy poškozené DNA (Obrázek 4A). Následně je zahájena invaze homologního vlákna DNA, vytvoří se D-smyčka a zahajuje se syntéza nového řetězce. V případě zapojení dvou DSB do rekombinačního procesu dojde k vytvoření dvojitého Hollidayova spoje s následnou syntézou mezer a ligací volných konců (Obrázek 4B). Rozdělení Hollidayova spojení probíhá prostřednictvím specializované endonukleázy a na základě orientace celého komplexu při jeho rozvolnění mohou být výsledným produktem jak CO tak i NCO. Při opravě DSB pomocí SDSA (Synthesis-dependent Strand Annealing) je po syntéze jednoho vlákna DNA D-smyčka rozložena a volný 3'konec je spojen s původním vláknem (Obrázek 4C). Posléze je syntetizováno komplementární vlákno a DNA ligáza spojí volné konce. Takto vzniklé molekuly DNA jsou nerekombinované, ale jejich sekvence není shodná s původní.

**Obrázek 4.** Schéma meiotické rekombinace a Hollidayova spoje (Filippo a kol., 2008) (upraveno). (A) Opravy DSB prostřednictvím homologní rekombinace mohou probíhat pomocí (B) Double-Strand Break Repair (DSBR) nebo (C) Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA).



### 1.3.1. Proteiny homologní rekombinace

Proces homologní rekombinace vyžaduje společnou součinnost mnoha odlišných proteinů (Cohen a kol., 2006), přičemž řada z nich má svou funkci v procesech reparace DNA. Celá řada těchto klíčových proteinů je evolučně konzervována a jejich homology můžeme nalézt už u jednoduchých bakteriálních organismů (savčí MLH1 je homologní k MutL z *E. Coli*) (Masson a West, 2001).

Intenzivní studie procesu rekombinace na kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*), jakožto jednoduchém eukaryotickém organismu množícím se pohlavně, ukázaly, že mechanismus iniciace rekombinace je evolučně konzervovaným dějem a existuje úzký vztah mezi procesem formování SC a homologní rekombinací (Fraune a kol., 2012).

Rekombinace je u všech eukaryotických organismů iniciována dvouřetězcovými zlomy (DSB), které narušují cukr-fosfátové vazby v DNA. Jedním z hlavních proteinů účastnících se tvorby DSB je vysoce evolučně konzervovaná nukleáza Spo11, příbuzná topoizomerázám II skupiny. Na začátku profáze I se tento enzym aktivuje a štěpí dsDNA na jejím 5' konci za současného vytvoření volného 3' konce.

Ačkoliv je funkce Spo11 klíčová v iniciaci procesu rekombinace a vzniku synaptonemálního komplexu, tvorba DSB a synapse mezi homologními chromozomy jsou na sobě nezávislémi ději (Barzel a Kupiec, 2008). Tato skutečnost byla prokázána jak u *C. elegans*, kde deficiencie ve Spo11 nemá vliv na vznik synaptonemálního komplexu a párování sesterských chromozomů (Dernburg a kol., 1998), tak i u *D. melanogaster*, u které absence proteinu mei-W68 (homolog Spo11) nemá taktéž žádný vliv na utváření synapse (McKim a Hayashi-Hagihara, 1998). Iniciace rekombinace pomocí DSB je proces, kde je „mapa“ DSB každé buňky unikátní a lokalizace CO, případně NCO, se mezi jedinci může významně lišit.

Mechanismus formování a kontroly distribuce DSB není příliš znám, ale značná část vytvořených zlomů je soustředěna nenáhodně napříč genomem, což dává vzniknout tzv. rekombinačním „hot-spot“ oblastem (Keeney, 2009a, 2009b). Studie prováděné pomocí techniky „single sperm typing“ u člověka a myši odhalily oblasti o velikosti 1-2 KB, ve kterých je pravděpodobnost rekombinace pětinasobně vyšší než u jakékoliv jiné náhodné oblasti v genomu. Tyto regiony se opakují zhruba každých 50-100 Kb a jejich celkový počet v genomu je odhadován až na padesát tisíc (Buard a de Massy, 2007; de Massy, 2003; Kauppi a kol., 2004; Myers a kol., 2005). Avšak i přes možná preferenční místa vzniku DSB, mapa skutečně vzniklých zlomů je unikátní pro každou buňku (stovky zlomů) a lokalizace výsledných rekombinačních míst je značně variabilní mezi jedinci téhož druhu (Keeney a kol., 1997; Koehler a kol., 1996).

Vzniklé DSB jsou rozeznávány komplexy proteinů RAD51 a DMC1. Proteiny RAD51 a DMC1 jsou rekombinázy, které interagují s jednořetězcovou DNA za vytvoření vláknitých filament (presynaptická filamenta) a iniciují homologní párování a výměnu chromatid sesterských chromozomů (Filippo a kol., 2008; Sauvageau a kol., 2005). Narušení enzymatických funkcí těchto proteinů vede k narušení schopnosti párování sesterských chromozomů a sestavování SC (Rockmill a kol., 1995; Song a Sung, 2000; Bogdanov, 2003). Exprese proteinů RAD51 a DMC1 probíhá současně ve stejné fázi meiotického cyklu a největší počet komplexů RAD51/DMC1 lze imunofluorescenčně pozorovat především v leptotene a zygotene (Moens a kol., 2007). V pokročilejších fázích meiózy dochází k postupnému uvolňování těchto proteinů ze synaptonemálních komplexů a jsou nahrazovány proteinem MLH1. Během pozdní fáze pachytene a diplotene již nejsou komplexy RAD51/DMC1 detekovatelné.

Protein RAD51 je savčím homologem k proteinu RecA u *E. Coli* a RAD51 u kvasinek. U obou těchto organismů má tento protein klíčové postavení v procesech rekombinace a reparace DNA. Jedná se o vysoce sekvenčně konzervovaný protein napříč všemi eukaryotickými organismy. Sekvenční a aminokyselinová homologie RAD51 vyšších eukaryotních organismů s kvasinkami je větší než 80 % a v případě srovnání s orthology u *E. coli* dosahuje až 50 % (Baumann a West, 1998). Velká část našich dosavadních znalostí o chování a funkci tohoto proteinu pochází z biochemických a genetických studií kvasinek (Filippo a kol., 2008). Kvasinkoví mutanti v proteinu RAD51 jsou vysoce citliví na látky poškozující DNA a vykazují defekty v mitotické a meiotické rekombinaci (Aboussekhra a kol., 1992; Basile a kol., 1992; Shinohara a kol., 1993). Buňky kvasinek jsou sice mitoticky životaschopné, ale během meiózy jsou u nich pozorovány poruchy homologního párování, značná akumulace DSB, opoždění synapse a významný pokles viability během sporulace (Shinohara a kol., 1992; Rockmill a kol., 1995).

Ukazuje se, že u obratlovců (stejně i jako u ostatních organismů) je RAD51 nezbytný pro buněčnou proliferaci, reparaci poškozené DNA a meiózu. Jeho vyšší míra exprese byla detekována v rychle množících se buňkách varlat, vaječníků, brzlíku a sleziny myši, kuřat a lidí (Morita a kol., 1993). Vysoká abundance RAD51 v lymfatických orgánech poukazuje na významné zapojení tohoto proteinu do procesu VDJ somatické rekombinace během přeskupování subgenů pro T a B buněčné receptory (Shinohara a kol., 1993).

Narušení funkce genu RAD51 vede u obratlovců k mitotické letalitě buněk, která je pravděpodobně způsobena narušením funkcí reparace poškozené DNA během syntetické fáze buněčného cyklu (Symington, 2002). Samotné buňky jsou bez funkčního genu RAD51 velice citlivé na účinky ionizujícího záření ( $\gamma$ -záření) a látky poškozující DNA, jež vede k zastavení buněčného cyklu a ke smrti buněk (Tsuzuki a kol., 1996). Mutantní myši s jedinou mutantní alelou RAD51 jsou bez jakýchkoliv fenotypových abnormalit a jsou normálně fertillní, i přes skutečnost, že hladina tohoto proteinu je jen poloviční oproti „wild“ type myšim. Jedinci s nefunkčním RAD51 se nerodí, umírají již během embryonálního vývoje ve stádiích moruly/blastocysty (Tsuzuki a kol., 1996).

DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA 1) byl poprvé studován a izolován u *S. Cerevisiae* během experimentů zaměřujících se na meiotické geny aktivní v profázi prvního meiotického dělení (Bishop a kol., 1992). Už jen samotná homologie DMC1 s bakteriálním RecA proteinem, naznačuje zapojení DMC1 proteinu do procesů rekombinačních oprav.



Samotný protein RecA u bakterií zprostředkovává vazbu homologních molekul DNA k sobě a následně katalyzuje reparaci poškozené DNA (Roca a kol., 1990). Kvasinkoví a myší mutanti tohoto genu vykazují zástavu meiózy v zárodečných buňkách během pozdní profáze I. s defektně složeným SC (formování SC je zahájeno, ale neskládá se po celé délce homologních chromozomů) (Bishop a kol., 1992; Pittman a kol., 1998). Protein DMC1 zároveň napomáhá během pokročilejších fází meiózy s nasměrováním proteinu RAD51 k výměně nesesterských chromatid nežli sesterských, popřípadě zabraňuje (zatím neznámým mechanismem) rekombinaci mezi sesterskými chromatidami (Tarsounas a kol., 1999; Masson a West, 2001).

MLH1 (mutL homolog 1) je důležitým a evolučně vysoce konzervovaným proteinem zapojeným v procesu „mismatch“ oprav poškozené DNA. Gen pro tento protein je velice často nacházen v mutovaném stavu u hereditárního nepolypozního karcinomu tlustého střeva (HNPCC, Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer) (Bronner a kol., 1994). MLH1 protein je jedním ze sedmi DNA „mismatch“ proteinů (např. MSH2, MSH3, PMS1), které se ve vzájemně navazujících krocích podílejí na incizní opravě špatně zařazených nukleotidů do DNA řetězce (vzniklých například během replikace DNA nebo působením agens poškozující DNA). Neschopnost opravy špatně zařazených bází ve vláknech DNA vede často k mikrosatelitové nestabilitě (MSI - Microsatellite Instability) a ke zvýšeným hodnotám spontánních mutací v genomu organismu (Li, 2008; Schmidt a Pearson, 2016).

Kromě důležité funkce v opravách poškozené/špatně spárované DNA, je protein MLH1 (a jeho další homology) zapojen v procesech meiotické rekombinace. Tato funkce byla poprvé popsána u myší s deficiencí MLH1 proteinu (Baker a kol., 1996). U myších samců s absencí funkčního MLH1 docházelo k formování synaptonemálního komplexu, ale během profáze I ve fázi pachytene docházelo k zástavě tvorby rekombinačních nodulů (crossing-overů) a buňky podléhaly apoptóze. Výsledkem pak byli sterilní samci se zástavou vývoje spermatocytů a většina chromozomů v meiotických buňkách byla přítomna ve formě samostatných nespárovaných univalentů. U myších samic s defektním genem MLH1 je situace obdobná. Myší samice jsou taktéž postiženy zástavou rekombinace a narušením plodnosti, avšak fenotyp (resp. jeho průběh) je od samečků odlišný (Woods a kol., 1999). Myší samičky při vnější hormonální stimulaci ovulují standardní počet oocytů, které ale vykazují celou řadu abnormalit. Ty zahrnují neschopnost vydělit druhé pólóvé tělísko, sníženou schopnost fertilizace, špatnou progresi rýhování

oplozené buňky a zástavu rýhování a dalšího vývoje ve dvoubuněčném stádiu (Baker a kol., 1996; Edelman a kol., 1996).

Studie na myších a kvasinkových modelech prokázaly, že v profázi prvního meiotického dělení dochází k akumulaci proteinů MLH1 a MLH3 na synaptonemálních komplexech meiotických chromozomů. Nejprve dochází k akumulaci MLH3 v pozdní zygotene/časné pachytene, zatímco MLH1 je naváděn na SC až během pachytene (prostřednictvím vazby s MLH3). Proteiny MLH3 a MLH1 spolu vytvářejí heterodimer vyznačující se endonukleázovou aktivitou, která vytváří další jednořetězcové zlomy v dvouřetězcové DNA (Ranjha a kol., 2014; Rogacheva a kol., 2014). Komplex MLH3/MLH1 se váže specificky prostřednictvím molekul SCP3 na Hollidayova spojení a svou enzymatickou aktivitou napomáhají jeho konverzi a progresi v crossing-over. Nicméně, MLH1/MLH3 jsou jen jedny z mnoha důležitých proteinů rekombinačních komplexů přítomných v rekombinačních nodulech, které interagují s SCP3 a účastní se konverze Hollidayova spojení v crossing-over (Cohen a kol., 2006; Lynn a kol., 2004).

### **1.3.2. Rekombinační variabilita**

Důležitost rekombinace podtrhuje skutečnost, že je zásadní pro správné seřazení a segregaci chromozomů během meiózy. Tento fakt byl prokázán u celé řady organismů, kde narušení počtu a polohy rekombinačních míst na chromozomech je především u samčího pohlaví asociováno se zvýšeným rizikem neobstrukční azoospermie (Hassold a Hunt, 2001; Hawley a Theurkauf, 1993; Rockmill a kol., 1995; Sun a kol., 2004a). U převážné většiny zkoumaných druhů organismů jsou jen velmi vzácně nalézány meiotické chromozomy s absencí CO. To vede k úvahám o teorii „obligátních“ crossing-overů, která tvrdí, že na každém homologním chromozomovém páru (nebo SC) by měl být přítomen během meiózy alespoň jeden CO. Tato jedna rekombinační událost je biologicky nezbytná pro zajištění správného párování a soudržnosti homologních chromozomů v průběhu jejich meiotické segregace (Carlton a kol., 2006; Jones a Franklin, 2006).

Ve studii z roku 1986 byla prokázána silná korelace mezi celkovým počtem vytvořených rekombinací a haploidním počtem chromozomálních ramen (FNa/2 – Fundamental Number) (Dutrillaux, 1986). V následujících letech se potvrdilo, že počet rekombinačních událostí je přímo úměrný počtu chromozomálních ramen a pro správný průběh segregace chromozomů je důležitý alespoň jeden CO na rameno chromozomu,

nikoliv jediná rekombinace na celý chromozom (Villena a Sapienza, 2001). Avšak jen jediný CO nacházející se na každém chromozomálním rameni nemusí být dostatečnou zárukou správného průběhu segregace během meiózy. Ukazuje se, že je taktéž důležitá pozice CO na chromozomálním rameni. Například u lidí, pokud je CO příliš blízko u centromery nebo telomery, může docházet k non-disjunkci (Hassold a Hunt, 2001).

S využitím imunofluorescenčních metod detekce proteinů byla meiotická profáze studována již u celé řady organismů. Během profáze prvního meiotického dělení jsou indukovány DSB (leptotene), jejichž počet několikanásobně převyšuje počty finálních rekombinací. U samců myši bylo detekováno v genomu na počátku profáze okolo 250 až 300 DSB (Moens a kol., 2002), u mužů pak více než 350 DSB (Cohen a kol., 2006). Extrémem jsou pak někteří zástupci rostlinné říše, kde například u lilie dlouhokvěté (*Lilium longiflorum*) bylo napočítáno okolo 2000 DSB (Anderson a kol., 1997).

V pozdních fázích profáze I (pachytene) dochází k vytváření rekombinačních nodulů a je ustaven finální počet CO. Například u lidí byl průměrný počet CO ve spermatocytech stanoven na 49 (Barlow a Hultén, 1998; Hassold a kol., 2000; Sun a kol., 2005b, 2004b; Vallente a kol., 2006), zatímco u myši jsou hodnoty rekombinací hodně variabilní a průměrný počet CO na spermatocyt se udává v rozmezí od 21,78 do 34,46 (Dumont a Payseur, 2011). Zároveň se u divokých myši vyskytují lokální populace s různým počtem chromozomů (díky centrickým fúzím původně 40 akrocentrických chromozomů), které jsou výborným modelem pro studium vlivu centrických fúzí a potažmo centromerické interference (Anderson a kol., 1999; Bidau a kol., 2001; Dumas a Britton-Davidian, 2002; Froenicke a kol., 2002). Dalšími savci, u kterých byl stanoven počet rekombinací, je například kočka domácí se 42,5 CO na spermatocyt, prase s 32 CO nebo skot se 46,4 rekombinacemi (Borodin a kol., 2007; Vozdova a kol., 2013; Mary a kol., 2014; Frohlich a kol., 2015; Sebestova a kol., 2016).

Díky skutečnosti, že narušení správné funkce meiotické rekombinace vede ke zvýšení pravděpodobnosti meiotických nondisjunkcí a zástavy tvorby gamet, dalo by se očekávat, že počty a polohy crossing-overů by měly být striktně regulovány a kontrolovány. Především vnitrodruhová variabilita v počtu rekombinací u většiny savců tuto teorii popírá. Několik studií (např. u samců makaka a člověka) popisuje 15-25% individuální rozdíly mezi jedinci v počtu rekombinací (Hassold a kol., 2009; Lynn a kol., 2002). Navíc počty a polohy crossing-overů jsou velice variabilní a specifické i mezi jednotlivými pohlavími (Cheung a kol., 2007; Coop a kol., 2008; Kong a kol., 2010). U člověka (ale i u jiných savců) je u samčího pohlaví genetická mapa, založená na

mapování míst rekombinací, 1,6x delší než v případě samčího pohlaví a průměrné počty rekombinací jsou 49,01 u mužů a 70,3 u žen (Chowdhury a kol., 2009; Fledel-Alon a kol., 2009; Lynn a kol., 2004; Matise a kol., 2007).

Nabízí se tedy otázka, jaké faktory ovlivňují počet a distribuci CO. Variace v počtu rekombinací může pravděpodobně vznikat ve třech oddělených fázích během meiózy.

Zaprvé, variace může být způsobena na počátku rekombinačního řetězce, kdy dochází k vytváření dvouřetězcových zlomů v DNA. Za předpokladu, že určitá proporce z DSB je vždy v pozdějších fázích meiózy převedena na CO by znamenala u jedinců s vyšší četností iniciálních DSB také vyšší hodnoty CO. Současné studie u myši tuto domněnku vyvracejí, jelikož se zdá být patrné, že rekombinační homeostáza se snaží raději udržovat u myších samců minimální a zároveň konstantní počet CO nežli široké spektrum DSB. Tato skutečnost tedy poukazuje na nezávislost tvorby DSB a jejich následné progresy v rekombinační uzly (Cole a kol., 2012; Martini a kol., 2006). Avšak tyto studie na myších zkoumaly vliv různého počtu alel SPO11 na celkový počet DSB (potažmo CO) při zanedbání genetického pozadí jedinců, které může ovlivnit hladiny CO.

Druhý předpokládaný faktor ovlivňující variaci v počtu rekombinací může vzniknout během progresy rekombinačních intermediátů. Například různé alelické variace genu RNF212 (kódující protein s homologií k rekombinačně propagačním proteinům *S. Cerevisiae* a *C. Elegans*) jsou nejlépe charakterizovanými variantami genu u člověka, které se podílí na odlišných individuálních počtech rekombinací (Kong a kol., 2008). Nicméně podobné studie u myši, zaměřující se na deficienci genu RNF212, poukazují na nižší postavení tohoto genu v rekombinační kaskádě s funkcí stabilizace a spojování sesterských molekul DNA k sobě s jejich následnou progresí v CO (Reynolds a kol., 2013). Všechny tyto analýzy dokládají, že události, které následují po vytvoření DSB, skutečně ovlivňují finální počty rekombinačních míst u savců.

Třetím možným faktorem jsou děje odehrávající se v posledních fázích tvorby (resp. maturace) CO a jsou zprostředkovány různými hladinami proteinů MLH1 a MLH3, které jsou důležité pro rezoluci Hollidayových spojů (Baker a kol., 1996).

Nicméně, Baier a kol. ve své studii zaměřené na objasnění všech předpokládaných faktorů ovlivňující CO u inbredních linií myši (z důvodu odstranění vlivu různého genetického pozadí jedince), došli k závěru, že finální počty MLH1/CO nejsou ovlivněny množstvím iniciálních DSB, ani jinými faktory v kaskádě progresy DSB v CO (Baier a kol., 2014).

Několik dalších prací popisuje, že primárním determinantem počtu finálních CO je pravděpodobně modifikace chromatinu a jeho uspořádání v podobě smyček během homologního párování (Gruhn a kol., 2013; Smagulova a kol., 2011). Analýza chromatinových struktur u kvasinek prokázala, že rekombinační „hot-spot“ oblasti jsou lokalizovány preferenčně v místech s rozvolněným chromatinem, které jsou pak lépe přístupné pro enzymatický aparát tvorby a opravy DSB (Keeney, 2009b). Kratší smyčky vedou k prodlužování délky SC, která následně poskytuje více místa pro enzymatický aparát opravy DSB (Lynn a kol., 2002; Sun a kol., 2005a). Navíc byla odhalena pozitivní korelace mezi délkou SC a počtem vytvořených MLH1 u myši, lidí a koček, kde kratší chromozomy u různých organismů mají obvykle 1 CO/MLH1 na SC, zatímco delší chromozomy/SC jich mají více (Anderson a kol., 1999; Froenicke a kol., 2002; Lynn a kol., 2002; Sun a kol., 2004b; Borodin a kol., 2007).

### 1.3.3. Interference

Dle teorie obligátních crossing-overů by měl být přítomen na každém homologním chromozomovém páru (SC) alespoň jeden CO, který je biologicky nepostradatelný pro zajištění správného párování a bezchybného průběhu segregace chromozomů (Carlton a kol., 2006; Jones a Franklin, 2006). U většiny organismů je pozorován více než jeden CO na páru homologních chromozomů, avšak přítomnost crossing-overu na určitém místě na SC má za následek snižování pravděpodobnosti vzniku dalšího CO v těsném okolí. Tento jev nazýváme interferencí a poprvé byl popsán ve 20. letech 20. století u *Drosophila melanogaster* (Muller, 1916; Sturtevant, 1915).

První definice interference byla formulována jako odchylka od nezávislé rekombinace mezi dvěma regiony na témže chromozomu. Rekombinační interferenci dnes definujeme jako nenáhodnou distribuci CO na chromatidách meiotických chromozomů. Původně byly vlivy interference sledovány během genetických experimentů křížení organismů s viditelnými fenotypovými znaky s mendelistickou dědičností. Z odchylek mezi očekávanými a reálnými výsledky (fenotypovými znaky) hybridizačního pokusu byla nakonec vypočtena hodnota interference. V dnešní době je možné analyzovat meiotickou interferenci jednak s využitím PCR a STR markerů nebo pomocí imunofluorescenčních metod s využitím protilátek namířených proti proteinům zapojeným v rekombinačním procesu (MLH1) v preparátech testikulárních tkání (Broman a kol., 2002; Jones a Franklin, 2006; Keeney, 2009c).

Rozlišuje především dva hlavní typy rekombinační interference: interferenci pozitivní a negativní. Při negativní interferenci jsou místa s CO na meiotickém chromozomu více agregována u sebe, než by byly ve skutečnosti při jejich náhodném rozmístění. U pozitivní interference je tomu opačně a místa s CO jsou od sebe více vzdálená, než by se očekávalo při náhodném rozmístění. Meióza u většiny organismů vykazuje především pozitivní typ interference, jejíž mechanismus však není stále uspokojivě vysvětlen (Zhao a kol., 1995).

Předpokládá se, že interference je procesem kontrolovaným a udržovaným na genetické úrovni (Sym a Roeder, 1994). Zároveň se interference ukazuje jako důležitý faktor uplatňující se během meiózy, který reguluje počet míst s CO a jejich rovnoměrné rozprostření po chromozomech. Představuje tak biologický mechanismus, který zajišťuje, že i ty nejmenší chromozomy budou mít alespoň jediný CO nezbytný pro správné proběhnutí meiózy (Egel, 1995; Roeder, 1997). U mutantů kvasinek, kteří postrádají mechanismus interference, dochází mnohem častěji k meiotické nondisjunkci (Chua a Roeder, 1997; Sym a Roeder, 1994).

Možným vysvětlením vzniku pozitivní interference je předpokládané lokální hromadění rekombinačních enzymů v místech již vytvořených rekombinačních nodulů, které následně vede v blízkém okolí k jejich nedostatku pro zahájení další rekombinace (Bogdanov, 2003). Další možnou teorií je tuhost šroubovice DNA, kdy pro vytvoření CO je nutné překřížení šroubovic DNA homologních chromozomů. Párování a překřížení volných DNA řetězců chromozomů může být inhibováno neschopností (resp. nepružností) DNA vláken se ohnout v blízkosti již vytvořeného CO. Naproti tomu, genové konverze (neproduktivní crossing-over) jsou mezi sebou distribuovány rovnoměrně bez známek působící interference (Hollingsworth a Brill, 2004; Mortimer a Fogel, 1974). Produktivní CO a NCO mohou mezi sebou interagovat a interferovat s okolními potencionálními rekombinačními místy (Foss a kol., 1993; Kitani, 1978).

Vliv interference na počet a distribuci CO je patrný jen v případech přítomnosti dvou a více rekombinačních míst na jediném SC. Nachází-li se na chromozomovém páru pouze jediný CO, je jeho výsledná poloha na SC téměř náhodná. Distribuce a umístění výsledných rekombinačních nodulů na spárovaných homologních chromozomech je dána především polohou iniciálních DSB a také efektem kontrolního mechanismu, který řídí, jaká místa zlomů budou úspěšně přeměněna na CO, a která budou jen reparována za vzniku NCO (Jones a Franklin, 2006).

U velké části organismů je rekombinace potlačována také v blízkosti centromer, avšak existují i druhy, které naopak mají CO přednostně umístěn v jejich blízkosti (Choo, 1998). U některých organismů bylo prokázáno (člověk, sarančata a rybenky), že centromera nepředstavuje bariéru pro interferenci na dvouramenných (sub/metacentrických) chromozomech. Pokud leží CO na jednom rameni chromozomu poblíž centromery, tak u druhého ramene téhož chromozomu bude rekombinační nodulus dále od centromery (Colombo a Jones, 1997; Hassold a kol., 2000; Laurie a Hultén, 1985; Voždova a kol., 2014; Youds a Boulton, 2011). Vzdálenost CO, mezi kterými se nachází centromera, je signifikantně delší, než mezi dvěma CO ležícími na stejném rameni chromozomu (Anderson a kol., 1999; Borodin a kol., 2007; Sun a kol., 2004b). Mechanismus centromerické interference je stále dost nejasný. Jednou z teorií, proč je rekombinace potlačována v okolí centromer se týká míry kondenzace a metylace pericentromerického heterochromatinu. Obecně, epigenetické modifikace chromatinu se ukázaly být velice důležitým činitelem působícím na míru rekombinace a potažmo i interference. DSB preferenčně vznikají v DNA s otevřenou strukturou, která je vysoce transkribovaná, zatímco metylace DNA má supresivní charakter na tvorbu CO (Smagulova a kol., 2011). Dalším faktorem vysvětlující centromerickou interferenci je pravděpodobně organizace meiotických chromozomů v jádře buňky a také způsob, jakým se homologní chromozomy mezi sebou párují. Během formování axiálních elementů dochází k uchycení telomer homologních chromozomů k obalu jádra (Scherthan a kol., 1996), kde se poté začnou mezi sebou vzájemně párovat. Výsledkem je ustanovení prvního CO v blízkosti konců chromozomů. Na základě teze o meiotické interferenci, že již umístěný CO na synaptonemálním komplexu interferuje s vytvořením dalších CO v jeho blízkém okolí, bude distálně umístěný CO interferovat s vytvořením dalších CO umístěných blíže k centromeře. U dvouramenných (sub/metacentrických) chromozomů tak probíhá synapse od obou jeho distálních konců a iniciální CO na koncích ramen omezují/interferují s tvorbou rekombinačních míst směrem k centromeře (Kleckner a kol., 2004).

Síla interference není konstantní a můžeme pozorovat její rozdíly mezi jednotlivými druhy a dokonce i mezi různými chromozomy v rámci jediného organismu (Broman a kol., 2002). Například u myši je interference silnější než u lidí i přes skutečnost, že oba genomy mají velice podobnou velikost (velikost savčích genomů je okolo 3 Gb) a jsou z velké části homologní (vice než 70 %) (Broman a kol., 2002; Broman a Weber, 2000).

Taktéž velikost a morfologie chromozomů (sub/metacentrický nebo akrocentrický chromozom) značně ovlivňuje míru interference a potažmo i výsledný počet a distribuci rekombinačních míst (Frohlich a kol., 2015). Delší chromozomy mají tendenci k vyšším počtům CO, zatímco menší chromozomy mají průměrně méně rekombinací a slabší interferenci při jejich vytváření (Hassold a kol., 2000; Jones a Franklin, 2006; Kauppi a kol., 2004; Segura a kol., 2013). Korelace mezi interferencí a délkou meiotických komplexů poukazuje na vztah mezi uspořádáním chromozomů během vytváření dvouřetězcových zlomů a reálným pozorováním CO v pachytene. Místa rekombinace v pachytene (označená prostřednictvím proteinu MLH1), vykazují mezi sebou mnohem silnější interferenci než je tomu v případě DSB. Tato skutečnost vede k závěru, že interference působí postupně během meiózy a to v různých stádiích vývoje rekombinačních míst od DSB ke crossing-overu (de Boer a kol., 2006; Jones a Franklin, 2006).

#### **1.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace**

Jednou ze základních a dnes stále velmi využívaných molekulárně-cytogenetických metod je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tato metoda vizualizuje specifické sekvence DNA v cytologických preparátech a umožňuje jejich skutečnou prostorovou lokalizaci (Obrázek 5). FISH je vhodná pro studium struktury a poruch chromozomů, stejně jako pro zjišťování vzájemných fylogenetických vztahů mezi různými organismy.

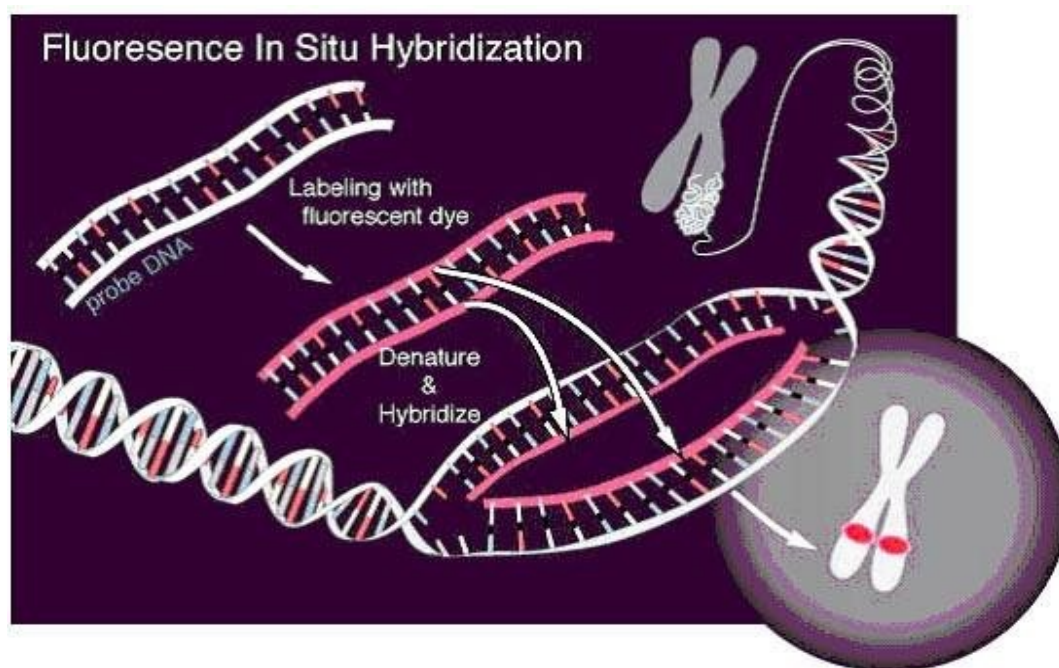
*In situ* hybridizace (ISH) byla poprvé použita v 70. letech 20. století na myších buňkách a umožňovala detekci specifických typů DNA sekvencí na chromozomech zkoumaného preparátu (Pardue a Gall, 1970). První sondy pro ISH využívaly radioaktivně značené hybridizační sondy, které měly velmi dobrou citlivost detekce. Vyhodnocování probíhalo autoradiograficky, kde na nahybridizované sklo byla nanášena tenká vrstva fotografické emulze s následnou expozicí po dobu 2-4 týdnů. Nicméně, samotné radioaktivní sondy byly velice nestabilní, produkovaly nebezpečné záření a jejich doba expozice byla extrémně dlouhá.

Ve druhé polovině osmdesátých let byla metoda ISH vylepšena zavedením fluorescenčně značených sond, čímž vznikla fluorescenční *in situ* hybridizace tak, jak ji známe dnes (Pinkel a kol., 1986). Tato nová, vylepšená metodika značení sond byla obrovským přínosem pro svět cytogenetiky. Došlo především k redukci práce s nebezpečným radioaktivním zářením a značnému urychlení samotného experimentu.



K dalšímu významnému rozvoji techniky FISH došlo v 90. letech, kdy byly nahrazeny metafázní chromozomy pozorováním interfázních jader buněk. Došlo tak k redukci potřeby kultivace a synchronizace vyšetřovaných buněk a nutnost dobře rozprostřených mitóz. Technologie FISH, především pak interfázní FISH, je díky své nízké časové náročnosti a schopnosti odhalovat balancované typy chromozomových aberací vysoce rozšířenou a v praxi dodnes používanou metodou. Zároveň se stala výchozím bodem pro další cytogenetické techniky jako je mnohobarevná FISH (M-FISH), spektrální karyotypování (SKY) a komparativní genomová hybridizace (CGH).

**Obrázek 5.** Princip detekce sekvence na chromozomu pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). (převzato z <http://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/centralni-dogma-molekukularni-biologie.html>, 10. 9. 2016)



Základním principem ISH je interakce mezi značenou DNA sondou a zkoumanou DNA ve formě metafázních či interfázních chromozomů fixovaných na podložním sklíčku. Při zvýšení teploty na 72-74°C dochází prostřednictvím denaturačního roztoku (nejčastěji obsahujícím formamid) k rozvolnění (denuraci) DNA na jednotlivá vlákna jak u sondy, tak u chromozomů fixovaného preparátu. Během ochlazení a inkubace při 37 °C se zkoumaná a značená DNA k sobě váží a utvářejí na základě komplementarity duplex, který je velice stabilní a odolný vůči odmytí. Působením záření o patřičné vlnové délce na preparát, dojde k vybuzení (excitaci) molekul fluorescenčních značek (fluorochromu).

Excitovaná molekula fluorochromu je ve svém vysokoenergetickém stavu nestabilní a během návratu na původní (bazální) energetickou hodnotu je vyzářena (emitována) energie ve formě fluorescence, kterou jsme schopni pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu opatřeného příslušnými fluorescenčními filtry. Samotná rozlišovací schopnost metody FISH se pohybuje okolo 0,001 až 0,5 Mb se schopností odlišit dvě sekvence, které jsou od sebe vzdáleny méně než 1 Mb (Palotie a kol., 1996).

#### **1.4.1. Neradioaktivní fluorescenční *in situ* hybridizace**

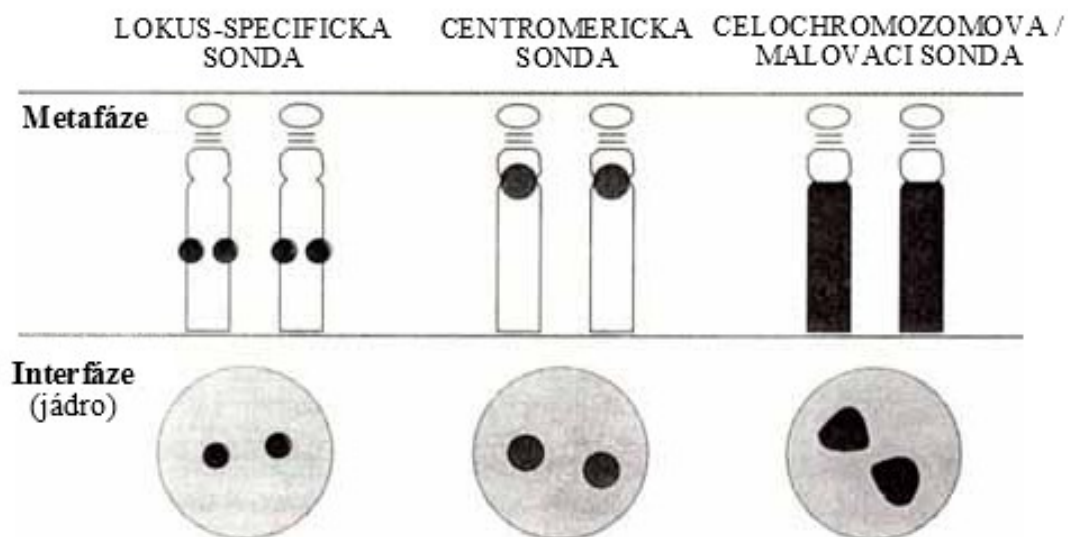
Sondy pro neradioaktivní fluorescenční *in situ* hybridizaci můžeme rozdělit dle typu modifikovaných bází do dvou skupin. V prvním případě se jedná o přímo fluorochromem značené sondy (díky modifikovaným nukleotidům konjugovaným např. s Orange-dUTP, Green-dUTP, FITC-dUTP), které jsou začleňovány do nově vznikajícího řetězce DNA během jeho PCR amplifikace. Druhým případem jsou sondy značené nepřímo prostřednictvím chemicky modifikovaných nukleotidů, které jsou obvykle konjugované s biotinem, digoxigeninem nebo jinými látkami, které samy neposkytují emisi fluorescenčního záření (Höltke a kol., 1995). Po hybridizaci preparátu s takto označenou sondou je třeba provést imunodetekci pomocí fluorochromem značených protilátek. V případě nepřímého značení sond je možná taktéž detekce chemicky modifikovaných sond prostřednictvím protilátek konjugovaných s enzymy. Nejčastěji se jedná o protilátky s navázanou alkalickou fosfatázou nebo peroxidázou. Finální detekce signálu z nepřímě značených sond pak probíhá ve fotografické emulzi kolorimetricky, fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně dle typu enzymu a jeho specifického substrátu. Výhodnost kolorimetrické detekce ISH spočívá ve stálosti signálu, který se nevysvěcuje a nevybledne. Nepřímá metoda značení ISH sond dovoluje několikanásobné zesílení (amplifikaci) hybridizačního signálu, což je velice přínosné k zviditelnění kratších sond. Citlivost této metody je vysoká, v publikovaných pracích je popisována detekce sond s délkou menší než 1 Kb (Heppell-Parton a kol., 1994; Lemieux a kol., 1992). Sondy s odlišnými fluorochromy (s různými emisními spektry) je možné využívat v jediné reakci v tzv. mnohobarevné FISH (m-FISH, multicolor FISH) (Nederlof a kol., 1990; Yurov a kol., 1996).

### 1.4.2. Typy hybridizačních sond

Sondy pro fluorescenční *in situ* hybridizaci lze dělit do několika skupin na základě různých parametrů jako je například velikost (celogenomové, celochromozomové, parciální a genové), typ výchozí DNA (BAC, kosmidová nebo chromozomální DNA) nebo podle jejich funkce (translokační sondy = splitové/fúzní; centromerické/telomerické).

Nejčastěji používanými jsou sondy specifické pro určitou oblast chromozomu nebo celý chromozom („malovací/paintové“), které mají velký význam při studiu strukturálních aberací chromozomů (Obrázek 6). Jediná paintová sonda se sestává z velkého souboru jednotlivých sond, které v konečném důsledku hybridizují většinou po celé délce jednoho konkrétního chromozomu.

**Obrázek 6.** Ukázky hybridizace několika odlišných typů FISH sond (převzato z [http://carolguze.com/text/442-4-chromosome\\_analysis.shtml](http://carolguze.com/text/442-4-chromosome_analysis.shtml), 29. 8. 2016, upraveno)



Výchozím materiálem pro tvorbu malovacích sond je hlavně celochromozomová DNA získána prostřednictvím mikrodisekce, průtokové cytometrie nebo je použita celochromozomová DNA izolovaná z buněčných knihoven specifických pro daný chromozom (Frönicke a kol., 1996; Goldammer a kol., 1996; Kubickova a kol., 2002; Langford a kol., 1993; Rettenberger a kol., 1995; Yerle a kol., 1993).

Malovací sondy, stejně jako repetitivní sondy, poskytují dobrý hybridizační signál a jsou používány pro identifikaci aneuploidii, detekci chromozomových přestaveb a užívají se také v komparativní evoluční cytogenetice. Jako sondu pro FISH lze použít taktéž

naznačenou celogenomovou DNA, která může být hybridizována na metafázní chromozomy. Takovýto typ experimentu je nazýván komparativní hybridizací (CGH) a je využíván k detekci chromozomálních aberací v celém genomu nebo pro identifikaci chromozomů určitého druhu v hybridech somatických buněk (Kallioniemi a kol., 1992).

Dalším typem jsou sondy odvozené z DNA BAC klonů (Bacterial Artificial Chromosome), což jsou konstrukty skládající se z libovolné DNA (genomová, chromozomální, atd.) a bakteriálního vektoru (nejčastěji F-plazmid *E. coli*), které jsou následně transformovány a klonovány (propagovány) v *E. coli* (Shizuya a kol., 1992; Shizuya a Kouros-Mehr, 2001). Velikost inzerovaných sekvencí (kapacita BAC vektoru) se pohybuje okolo 100–350 Kbp (Stone a kol., 1996). Malá velikosti BAC sond je vhodná pro lokalizaci nebo identifikaci přestaveb krátkých úseků chromozomů a to jak na mitotických chromozomech, tak i v interfázních jádrech buněk (i-FISH). BAC knihovny byly v minulosti často používány jako výchozí materiál pro sekvenování genomů, jak tomu bylo například v případě projektu sekvenace lidského genomu.

Nejčastěji se pro FISH používají sondy, které jsou připraveny z DNA studovaného druhu (tzv. homologní sondy). Sekvence sondy a DNA zkoumaného preparátu mají maximální možnou homologii a hybridizace je tedy vysoce specifická. Nejsou-li k dispozici homologní sondy pro konkrétní zkoumaný druh (nebo je to z nějakého důvodu výhodnější), dá se pro hybridizační reakci využít DNA sonda z jiného organismu (tzv. heterologní sondy). Úspěšnost hybridizace pak záleží na míře homologie mezi sekvencemi jednotlivých druhů (homologie alespoň 72 %), kde sekvence s vyšší homologií budou poskytovat lepší/intenzivnější signály (Kopečna a kol., 2014).

### 1.4.3. ZOO-FISH

ZOO-FISH nebo také „comparative painting” je metoda využívající mezidruhové cross-hybridizace specifických sond určitého druhu (celochromozomové nebo parciální sondy), které jsou hybridizovány na metafázní chromozomy odlišného živočišného druhu. První studie využívající ZOO-FISH byly publikovány v roce 1994. Během prvních let byly v experimentech hybridizovány lidské a myší celochromozomové (paintingové) sondy na chromozomy různých primátů, hlodavců, sudokopytníků a dokonce i na chromozomy velryby (Balmus a kol., 2007; Kulemzina a kol., 2009; Scherthan a kol., 1994). Mezidruhové srovnání chromozomů nám dovoluje určit konzervované homologní úseky chromozomů u různě příbuzných druhů. Proto je ZOO-FISH velice užitečný nástroj pro

stanovení evoluční divergence genomů a pro srovnávací mapování genů (Chowdhary a Raudsepp, 2001). Na základě znalostí chromosomových přestaveb vzniklých během evoluce můžeme získat informace o podobě výchozích ancestrálních karyotypů (Froenicke a kol., 2006).

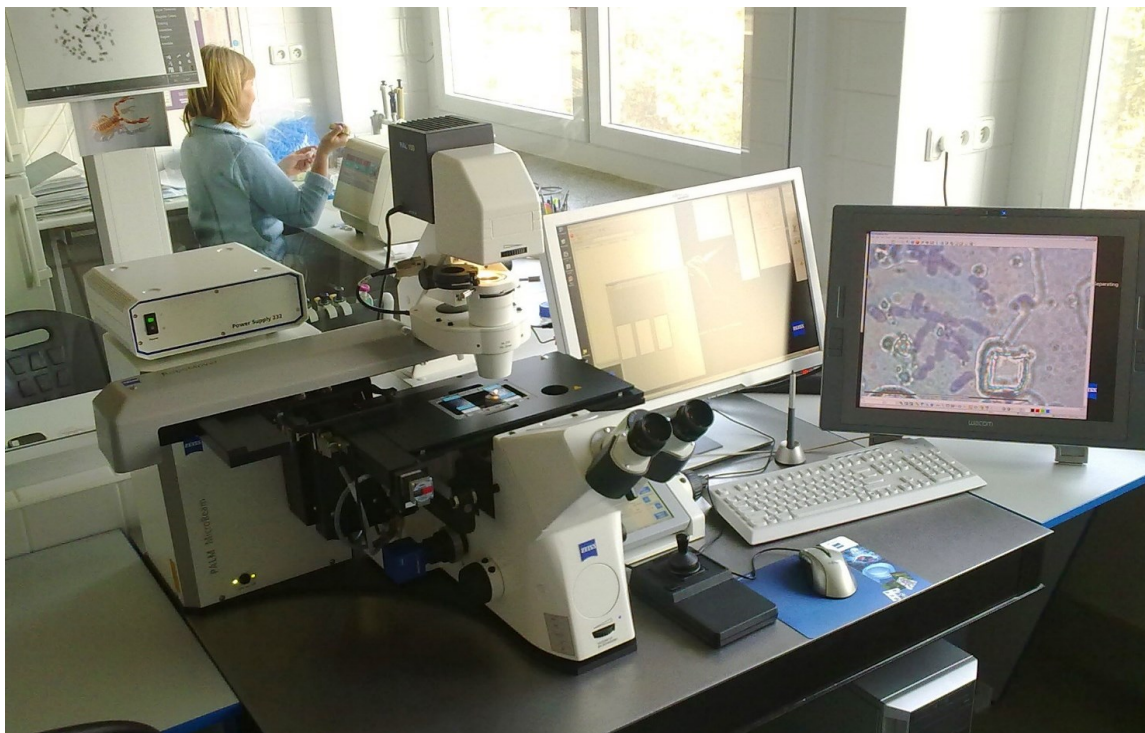
## **1.5. Metody izolace specifické chromozomální DNA**

### **1.5.1. Laserová záchyťová mikrodisekce**

Laserová záchyťová mikrodisekce (Laser Capture Microdissection, LCM) je rychlá bezkontaktní metoda izolace mikroskopických objektů prostřednictvím laserového paprsku. První odborné publikace s využitím laserové mikrodisekce se objevují v druhé polovině 90. let 20. stol (Emmert-Buck a kol., 1996). Laserová mikrodisekce je vhodnou technikou pro izolaci materiálu z rostlinných i živočišných preparátů, parafinových řezů, buněčných stěrů a tkáňových kultur. Cílovými objekty mohou být části tkání, samostatné buňky (pro single-cell analýzy) nebo jejich segmenty, jako jsou části membrán s povrchovými molekulami, buněčné organely a chromozomy (Chen a kol., 2002; Kubickova a kol., 2002; Liu a kol., 2010).

Základem LCM je inverzní mikroskop se zabudovaným světelným zdrojem (UV-A nebo infračervený laser) (Obrázek 7), který umožňuje zaostření laserového paprsku prostřednictvím objektivu s vysokou numerickou aperturou do ohniska menšího než 1  $\mu\text{m}$ . Vzorky jsou v případě laserové mikrodisekce využívající UV záření uchyceny na polyetylenovou fólii (nejčastěji PEN-polyethylen naftalát), která je umístěna na podložním skle. Pomocí laseru zaostřeného prostřednictvím objektivu do malého bodu je vyříznuta oblast zájmu (specifická část tkáně, jediná buňka, chromozom nebo jeho část), která je poté prostřednictvím laserového impulsu katapultována do víčka mikroskopu. Malá šířka řezu umožňuje mikrodisekci zvoleného materiálu na subbuněčné úrovni bez poškození okolní tkáně. Katapultáž mikrodisekované oblasti je prováděna mimo ohniskový bod laseru, přičemž plocha paprsku je rozšířena na požadovaný průměr vystřelovaného preparátu. Jelikož se doba samotného laserového impulsu při katapultaci pohybuje okolo 1 ns, u katapultovaného vzorku tak nedochází k významnému zahřívání a tepelnému znehodnocení preparátu.

**Obrázek 7.** Příklad laserové mikrodisekce (PALM Microlaser systém; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Munich, Germany).



Velkou výhodou metody laserové mikrodisekce je vizuální kontrola, při níž máme možnost získat homogenní vzorky z přesně definovaného a kontrolovaného prostředí. Zároveň můžeme získat cílový objekt (nebo jen jeho specifickou požadovanou část) bez kontaminace okolním prostředím a jinými strukturami preparátu.

Hlavní nevýhodou laserové mikrodisekce je především omezené množství materiálu, který jsme schopni získat. Pro tvorbu FISH sond pomocí LCM se do značící reakce dává obvykle 10-20 jednotlivých chromozomů (maximálně několik desítek). Navíc, sledované buňky či jiné struktury musí být viditelně odlišené od ostatních částí preparátu tak, aby nedošlo k chybě výběru a ke kontaminaci vzorku buňkami/chromozomy, které nejsou předmětem zájmu. Pro mikrodisekci chromozomů je nutné, aby operátor přístroje dokázal spolehlivě rozpoznat příslušné chromozomy u zkoumaného organismu, které jsou předmětem zájmu, přičemž odlišení jednotlivých chromozomů nemusí být vždy jednoduché. Záleží především na zkušenostech operátora přístroje, druhu organismu (celá řada organismů má těžce rozlišitelné chromozomy, např. pes má 78 malých akrocentrických chromozomů), a také na samotné kvalitě preparátu a jeho schopnosti barvení/značení.



### 1.5.2. Flow cytogenetika - Sortování chromozomů pomocí průtokové cytometrie

Karyotypování pomocí průtokové cytometrie bylo poprvé použito v polovině 70. let 20. stol. jako kombinace metodiky izolace chromozomů ze suspenzí a průtokové cytometrie (Gray a kol., 1975a; Wray a Stubblefield, 1970). První komerčně dostupné přístroje pro průtokovou cytometrii byly k dispozici jen několik málo let před vznikem průtokové cytogenetiky (Flow Cytogenetics), která se pak vyvíjela současně s technologickým vývojem průtokových cytometrů (Dilla a kol., 1969; Dittrich a Göhde, 1969) (Obrázek 8).

**Obrázek 8.** Příklad moderního průtokového cytometru Beckman Coulter MoFlo XDP; Brea, CA, USA) vybaveného samostatnými lasery (460 nm a 355 nm) pro dvourozměrnou analýzu chromozomů (převzato z <https://www.beckmancoulter.com>, 5. 6. 2015).

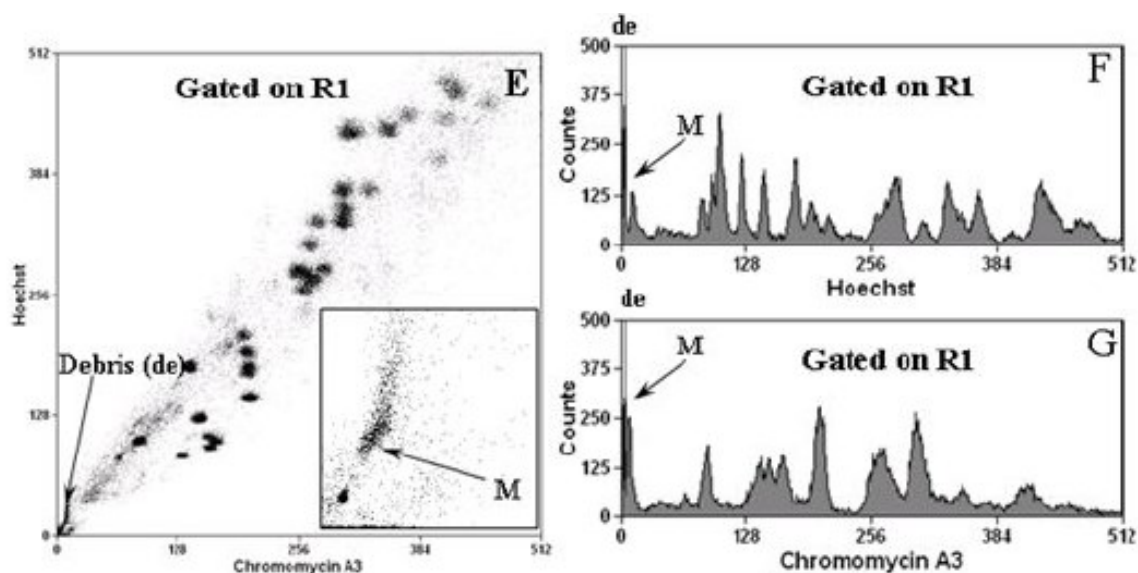


První experimenty průtokové cytogenetiky byly prováděny na chromozomových suspenzích připravených z buněk čínského křečka (Chinese hamster), které byly barveny pomocí interkalačního fluorochromu ethidium bromidu (EthBr) (Gray a kol., 1975a; Stubblefield a kol., 1975). Chromozomy byly analyzovány jednonábově (monovariátně) na průtokovém cytometru, přičemž fluorescence byla proporcčně závislá na velikosti

a obsahu DNA jednotlivých chromozomů. Flow karyogramy, jak se výsledným histogramům z měření fluorescence EthBr říkalo, umožňovaly nejen seřazení chromozomů podle velikosti, ale dovolovaly odhalit změny v počtu kopií a další chromozomové aberace (Gray a kol., 1975b). Velice rychle byla tato metodika adaptována pro studium chromozomů člověka, kde slibovala možnost rychlé, avšak velice přesné kvantitativní analýzy malých variací v DNA obsahu jednotlivých lidských chromozomů.

Kromě EthBr se v následujících letech začaly používat i další DNA interkalační fluorochromy jako jsou Hoechst 33258 (HO), Chromomycin A3 (CA3) nebo Propidium iodid (PI) (Carrano a kol., 1979). Využití nových typů fluorochromů vylepšilo rozlišení metodiky a umožnilo další, alternativní možnosti separace jednotlivých chromozomů mezi sebou (Jensen, 1977). Stále však, využití systému jediného fluorochromu nebylo dostačující pro rozlišení všech chromozomů karyotypu do samostatných čistých populací (viz. Obrázek 9F,G), což v počátcích karyotypování pomocí průtokové cytometrie snižovalo analytickou sílu této metodiky (Gray a kol., 1975a; Gray a kol., 1975b; Green a kol., 1984; Harris a kol., 1985; Stubblefield a kol., 1975).

**Obrázek 9.** Příklad monovariatního (F-Hoechst; G-Chromomycin A3) a bivariatního (E) flow karyotypu lidských chromozomů (Ng a kol., 2007) (upraveno).



Zavedení systému využívající dvou různých laserů umožnilo analyzovat dva různé fluorochromy současně, což vedlo ke skokovému zlepšení v rozlišovací schopnosti flow karyotypování (Dean a Pinkel, 1978; Ferguson-Smith a kol., 1998; Langlois a kol., 1980;



Langlois a Jensen, 1979). Bivariatní flow karyotypování (Obrázek 9E) je založeno na principu využití dvou fluorochromu o různých excitačních/emisních spektrech, které mají navíc odlišnou schopnost vazby na různé typy bází v DNA (Gray a kol., 1979; Langlois a kol., 1980; Langlois a Jensen, 1979; Latt a kol., 1980). Nejvíce využívanou kombinací fluorochromů pro flow karyotypování je Hoechst 33258 a Chromomycin A3. Hoechst je synteticky vyráběný fluorochrom s preferenční vazbou k AT bázím a jeho excitační/emisní spektrum se pohybuje okolo 360/461 nm (Latt a Wohlleb, 1975). Naproti tomu je Chromomycin A3 látkou organického původu s antibiotickou funkcí ze *Streptomyces griseus*. CA3 se preferenčně váže na GC báze a při excitaci světlem o vlnové délce 460 nm emituje fluorescenční záření s maximem kolem 570 nm (Ward a kol., 1965). Kombinace HO a CA3 umožňuje rozlišovat chromozomy nejen podle jejich velikosti (respektive celkového množství DNA), ale především prostřednictvím relativního zastoupení jednotlivých AT/GC bází v DNA chromozomu (viz. Obrázek 5). Vylepšení metody navýšilo počet jednotlivých specifických populací chromozomů, které jsme schopni rozlišit, například v genomu čínské křečka z 10 na 16 a u člověka z 12 populací na 20 (Gray a kol., 1979; Trask a kol., 1984).

Dvourozměrná analýza chromozomů pomocí průtokové cytometrie byla od svého vynalezení hojně používána v genetice člověka. Jednalo se především o kvantifikaci chromozomů, zkoumání chromozomové variability v populaci, detekce delecí, aneuploidií, translokací a jiných chromozomových aberací (Boschman a kol., 1993, 1992; Cooke a kol., 1989, 1988; Engh a kol., 1988; Gray a kol., 1979; Gribble a kol., 2009; Harris a kol., 1987; Young a kol., 1981). Karyotypování pomocí průtokové cytometrie bylo od svých počátků vždy pevně spjata se sortováním chromozomů, které sloužilo k obdržení čistých populací specifických chromozomů. Takto získané suspenze specifických chromozomů mají veliký význam pro celou řadu využití. Jedním z uplatnění je možnost výroby kvalitních paintových/malovacích FISH sond, které poskytují velice dobré fluorescenční signály (Blennow a kol., 1992; Carter, 1994; Gribble a kol., 2004; Howarth a kol., 2008). Kvalita takto připravených sond je dána především množstvím výchozího materiálu, jelikož pomocí cytometrie jsme schopni do značící reakce vložit stovky až tisíce chromozomů, zatímco v případě mikrodisekcí je to nanejvýše několik desítek. Avšak pomocí cytometrie nejsme schopni připravit parciální chromozomové FISH sondy (specifické pro q nebo p ramena určitého chromozomu), jelikož přístroj separuje vždy celé chromozomy. Dalším využitím sortovaných chromozomů je produkce chromozomálně specifických

DNA knihoven (Krumlauf a kol., 1982; Lalande a kol., 1984) a nebo získání specifické chromozomální DNA pro cílené sekvenace (Boschman a kol., 1993; Lebo a kol., 1986a, 1986b, 1983). Sekvenace DNA pocházející z individuálních chromozomů získaných pomocí průtokové cytometrie byla využita v počátečních fázích projektu sekvenace lidského genomu (Van Dilla a Deaven, 1990). Tvorba genomových knihoven a sekvenování DNA jsou metody, které jsou velice náročné na množství vstupní DNA a také na její čistotu. Tyto nároky velice dobře splňuje flow karyotypování a sortování chromozomů, pomocí kterého jsme schopni obdržet velká množství (stovky tisíc kopií) jednotlivých specifických chromozomů a vysoké čistotě (nad 90 %).

I přes značné úsilí a pokroky v protokolech pro přípravu chromozomových suspenzí a ve vývoji průtokových cytometrů, je stále nemožné rozpoznat a získat/sortovat individuálně všechny chromozomy na bivariatních flow karyogramech u celé řady organismů (např. člověka) (Engh a kol., 1988; Ferguson-Smith a kol., 1998; Ng a Carter, 2006, 2010). Existují snahy upravit rozlišovací schopnost a diskriminovat chromozomy podle nových, jiných znaků. Jedním z těchto pokusů je zavádění FISH v suspenzích, při kterých se hybridizují známé úseky DNA na DNA chromozomu v suspenzích s cílem označit konkrétní chromozomy pro jejich specifické sortování (Dudin a kol., 1987; Ma a kol., 2005; Macas a kol., 1995). Jedním z mála doposud známých případů užití této techniky je provedení FISH v suspenzi s využitím oligonukleotidů, respektive polyamidů, které rozpoznávají specifické repetitivní motivy chromozomů, na které se váží a vytvářejí tak chromozomálně specifické „vzory“, jež napomáhají jejich dalšímu a podrobnějšímu rozdělení (Gygi a kol., 2002).

## 1.6. Cetartiodactyla

Jednu z největších skupin savců tvoří v současnosti zástupci řádu *Cetartiodactyla*. Podle novodobé taxonomie vznikl tento řád spojením skupin *Cetacea* (kytovci) a *Artiodactyla* (sudokopytníci) do jednoho taxonu na základě molekulárních a morfologických studií, které potvrzují, že obě skupiny živočichů mají stejný ancestrální původ (Ferguson-Smith a Trifonov, 2007; Kulemzina a kol., 2009). Odhaduje se, že společný předek kytovců a sudokopytníků žil na zemi asi před 59-80 miliony let (Bininda-Emonds a kol., 2007; Murphy a kol., 2007). Charakteristickými znaky všech dnešních sudokopytníků je osa přední a zadní končetiny, která prochází mezi 3. a 4. prstem a speciálně adaptovaná hlezenní kost (double-pulley astragalus) v končetinách. Tyto dva

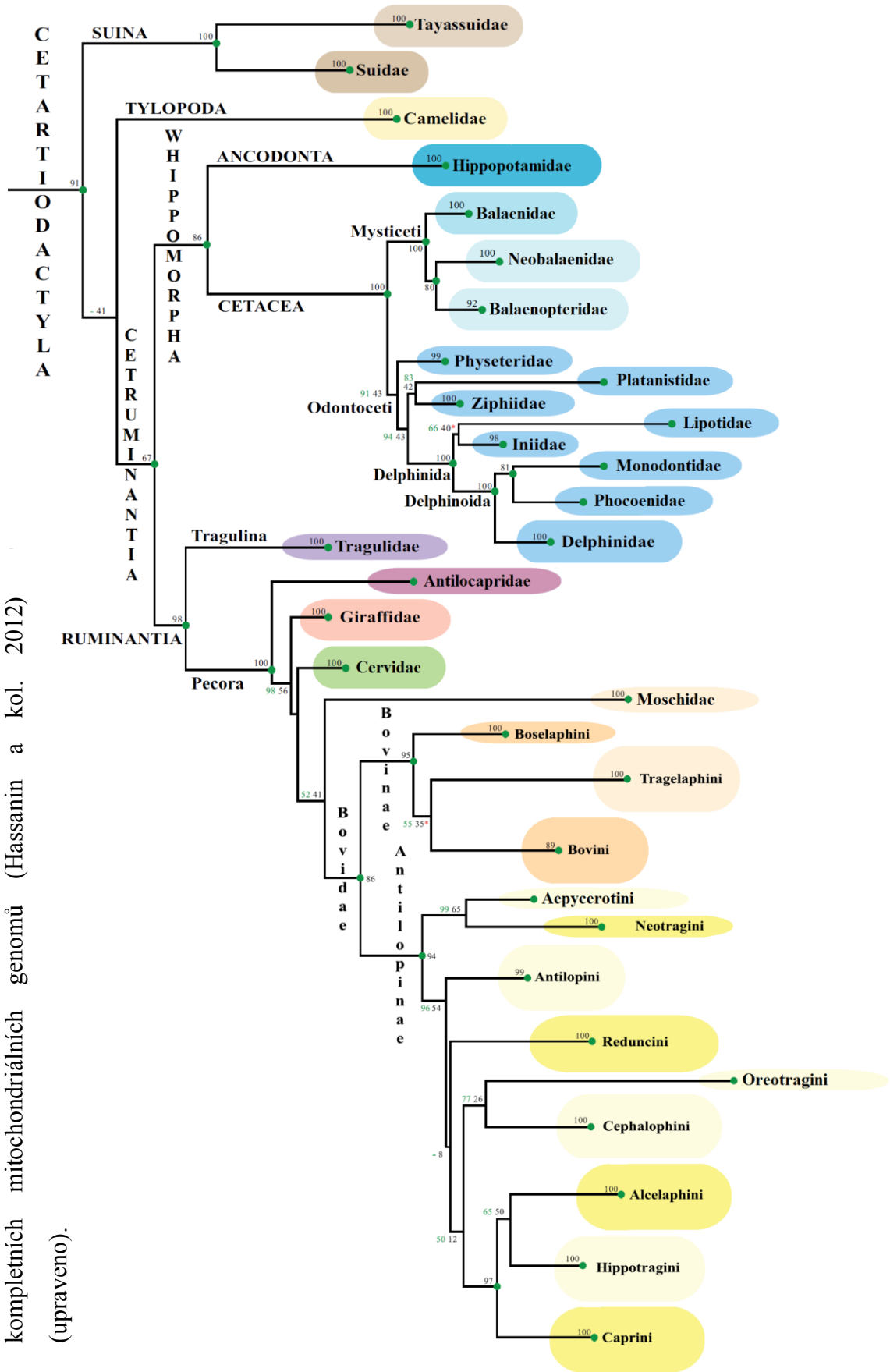
znaky byly identifikovány také u fosilních eocenních velryb, což naznačuje, že tyto klíčové znaky se vyskytovaly už u jejich suchozemských předků (Hassanin a kol., 2012).

Zatímco sudokopytníci (např., prasata, velbloudi, tuři, antilopy, jeleni a žirafy) ovládli souš po celém světě včetně Austrálie, kytovci (delfíni, velryby a kapustňáci) se stavbou těla přizpůsobili životu ve vodních ekosystémech. V současné době zahrnujeme mezi sudokopytníky 10 čeledí suchozemských savců a 12 čeledí ze skupiny *Cetacea* (Obrázek 10) (Groves a Grubb, 2011).

K upřesnění evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy savců přispívá v současné době velkou měrou komparativní genomika založená na analýze chromozomů, mapování genů a DNA sekvenování. Ukázalo se, že pro všechny *Cetartiodactyla* s výjimkou velbloudovitých (*Camelidae* - velbloudi, lamy a vikuně) je charakteristická fúze dvou chromozomů HSA8;9 (struktura chromozomů jednotlivých druhů je většinou srovnávána s lidským karyotypem, *Homo sapiens*, HSA) (Kulemzina a kol., 2009). Tato zjištění poukazují na skutečnost, že velbloudovití se odštěpili od společného předka ještě dříve než kytovci. Četné molekulární studie tento předpoklad potvrzují (Bininda-Emonds a kol., 2007; Murphy a kol., 2007; Price a kol., 2005).

Komparativní studium karyotypů zástupců *Cetartiodactyla* umožnilo vědcům sestrojít pravděpodobný karyotyp předka dnešních sudokopytníků, který se skládal pravděpodobně z 25-26 párů autozomálních chromozomů,  $2n = 52 - 54$ . Podle dosavadních cytogenetických studií jsou živočichové ze skupiny *Cetacea* chromozomálně velmi uniformním a konzervativním taxonem s velice pomalou karyotypovou evolucí. Nejvíce konzervativní karyotyp se zachoval u velryby kulohlavce černého (*Globicephala melas*) obývající vody Atlantického oceánu (Kulemzina a kol., 2009, 2016).

**Obrázek 10.** Fylogenetický strom sudokopytníků složený na základě  
kompletních mitochondriálních genomů (Hassanin a kol. 2012)  
(upraveno).



### 1.6.1. Čeleď turovítí (*Bovidae*)

Čeleď *Bovidae* z taxonomického hlediska řadíme do řádu sudokopytníků (*Artiodactyla*), podřád přežvýkavci (*Ruminantia*). Tato čeleď zahrnuje na 143 recentních (což je asi 55 % všech známých žijících sudokopytníků) a asi na 300 známých vyhynulých druhů (Wilson a Reeder, 2005).

Přirozeným prostředím této heterogenní skupiny organismů jsou především travnaté stepi, křovinaté a lesní porosty, ale taktéž polopouště s travnatým porostem v Africe, Eurasii a Severní Americe. Čeleď *Bovidae* zahrnuje řadu domestikovaných druhů, jako jsou například krávy, ovce nebo kozy, ale i živočišné druhy, které jsou v dnešní době ve volné přírodě téměř vyhubeny. Například adax nubijský (*Addax nasomaculatus*) se téměř nevyskytuje ve volné přírodě, avšak v zajetí je celkem běžný a dobře se rozmnožuje. Dalším pravděpodobně vyhynulým druhem ve volné přírodě je přimorožec šavlorohý (*Oryx dammah*), ale můžeme jej spatřit v mnoha zoologických zahradách a dokonce existují usilovné snahy o jeho navrácení do volné přírody.

Vzájemné fylogenetické vztahy mezi jednotlivými zástupci z čeledi *Bovidae* nejsou dnes stále plně objasněny. Dle nejnovějších výzkumů byly v rámci této čeledi taxonomicky vyčleněny dvě hlavní linie, a to podčeleď Tuři (*Bovinae*) a podčeleď Antilopy (*Antilopinae*) (Robinson a Ropiquet, 2011). Dle nejnovější taxonomie lze organismy z čeledi *Bovidae* dělit do 12 samostatných taxonomických jednotek (Groves a Grubb, 2011).

Pro upřesnění evolučních a fylogenetických vztahů mezi zástupci čeledi *Bovidae* přispívá v současnosti vyjma molekulárně-genetických metod hlavně technika ZOO-FISH založena na hybridizaci fluorescenčních sond určitého druhu na chromozomech příbuzného druhu.

Nejčastějším typem chromozomových přestaveb, které jsou významným činitelem karyotypové variability u čeledi *Bovidae* jsou Robertsonovské translokace (Rb, resp. centromerické fúze) (Gallagher a Womack, 1992). Tento typ chromozomové přestavby vzniká spojením dvou nehomologních chromozomů (nejčastěji akrocentrických) v oblasti centromer a výsledkem je pak sub/metacentrický chromozom. Právě výskyt velkého počtu akrocentrů v ancestrálním karyotypu turovítých byl nejspíše vhodným předpokladem pro vznik Robertsonovských fúzí u jednotlivých druhů této čeledi. Dle některých teorií jsou fúze dvou akrocentrických chromozomů primárním evolučním

mechanismem, který se uplatňoval u čeledi *Bovidae* (Buckland a Evans, 1978; Qumsiyeh, 1994).

Dalším, avšak méně častým typem chromozomových aberací, které se podílely na karyotypové evoluci turovitých a napomáhaly tak utváření jejich genomů jsou tandemové fúze (Rubes a kol. 2008b; Ropiquet a kol. 2010; Cernohorska a kol., 2011). Tandemové fúze vznikají spojením centromerické části jednoho chromozomu s telomerickou oblastí druhého chromozomu.

Oba typy chromozomových přestaveb mají u turovitých za následek snižování diploidního počtu chromozomů v genomech a vedou k velkému kolísání počtu chromozomů napříč celou čeledí. V rámci této skupiny zvířat můžeme nalézt živočichy s 60 páry chromozomů (např. tur domácí; *Bos taurus*), ale i organismy s polovičním počtem chromozomů, tj. 30 páry například u antilopy jelení (*Antilope cervicapra*) (Hsu a Benirschke, 2013). Předpokládá se, že původní ancestrální karyotyp bovidů měl 58 akrocentrických autozomálních chromozomů a dva pohlavní chromozomy ( $2n = 60$ ). Takovéto ancestrální uspořádání chromozomů můžeme dnes nalézt u krávy ( $2n = 30$ ) nebo u kozy domácí (*Capra hircus*;  $2n = 60$ ). Přítomnost četných fúzovaných chromozomů a jejich homologních nefúzovaných variant v genomech různých zástupců z čeledi *Bovidae*, dělá tuto skupinu živočichů velmi zajímavou pro studium meiotické rekombinace a především pak rekombinační centromerické interference. Zároveň díky řadě domestikovaných organismů z této čeledi je možné zkoumat vliv lidského působení během procesu domestikace a šlechtění na meiotickou homologní rekombinaci.

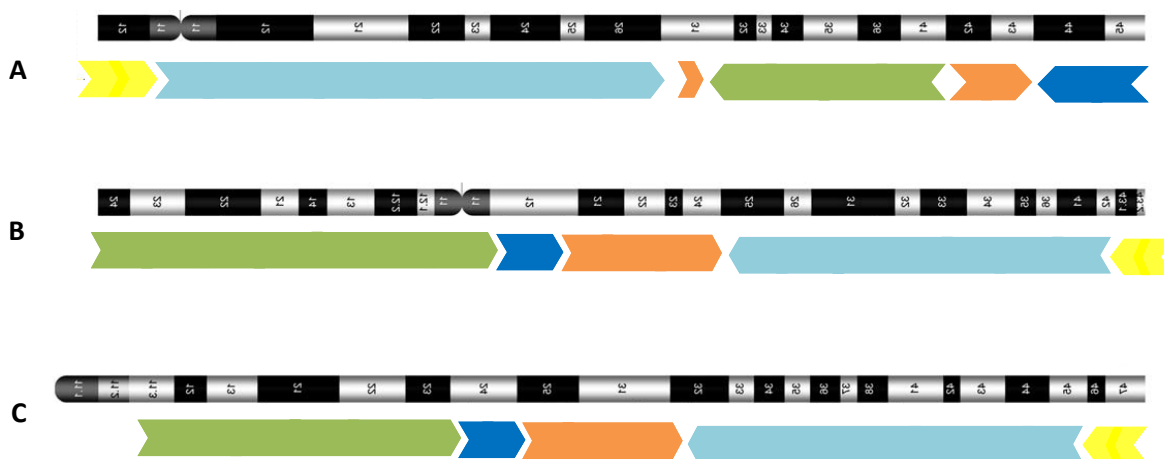
### 1.6.2. Pohlavní chromozomy u čeledi *Bovidae*

Na rozdíl od autozomů, které jsou u většiny turovitých vysoce homologní, docházelo u pohlavních chromozomů zástupců čeledi *Bovidae* k mnohem komplexnějším chromozomálním přestavbám, což poukazuje na jejich oddělenou a nezávislou evoluci. Variabilita bovinního chromozomu X je způsobena především přestavbami (transpozicemi) několika chromozomových bloků, expanzí repetitivních sekvencí a repozicemi centromery (Centromere Shift) (Robinson a kol., 1998; Rubes a kol., 2008b). Chromozomální přestavby X chromozomů nebyly u přežvýkavců doposud podrobněji studovány s výjimkou domestikovaných druhů čeledi *Bovidae* a několika volně žijících druhů. Odhaleny byly celkem tři různé prototypy chromozomu X, které se během karyotypové

evoluce vyvinuly (Obrázek 11) (Chaves a kol., 2004; Iannuzzi a kol., 2009; Nguyen a kol., 2008).

Za ancestrální chromozom X se považuje akrocentrický prototyp „suni“ nebo také „Capra“, který se vyskytuje u ovce domácí (*Ovis aries*, OAR) a dalších zástupců *Caprini*. Dalším typem akrocentrického X je tzv. typ „eland“ nebo taktéž *Bubalus*, který můžeme nalézt v genomu buvola domácího (*Bubalus bubalis*, BBU) a ostatních zástupců *Tragelaphini* a některých kopytníků z *Bovini*. Posledním typem je submetacentrický chromozom X „Bos“ vyskytující se u rodů *Bos* a *Bison* ze skupiny *Bovini* (Nguyen a kol., 2008). Během evoluce došlo u některých taxonů (jako jsou *Antilopini*, *Boselaphini* a *Tragelaphini*) k fúzím pohlavních chromozomů s autozomy, které však nemají žádný negativní vliv na fitness a plodnost daného druhu (Rubes a kol., 2008a; Cernohorska a kol., 2015). Naproti tomu u člověka jsou translokace pohlavních chromozomů s autozomy spojovány často s neplodností a neschopností tvorby gamet. Nicméně u některých druhů savců se zdá, že fúze autozom-gonozom jsou během meiotického buněčného dělení akceptovány/tolerovány (Dobigny a kol., 2004).

**Obrázek 11.** Typy chromozomu X u čeledi *Bovidae*. (A) akrocentrický typ „suni“, (B) submetacentrický „bos“, (C) akrocentrický „eland“ (Perucatti a kol., 2012) (upraveno).



Pro zjišťování a upřesnění struktury a organizace homologních segmentů chromozomu X u různých druhů byla od druhé poloviny 90. let využívána technika FISH. První studie využívaly mapování pomocí BAC a bovinních malovacích sond specifických pro jednotlivá ramena chromozomu (Arm-specific Probes).

V roce 2000, Iannuzzi a kol. rozdělili chromozom X u turovitých, na základě 24 kozích BAC sond, do pěti homologních segmentů, které svědčily o četných

chromozomových přestavbách, expanzích repetitivních motivů a repozicích centromery během jejich karyotypové evoluce. Tyto výsledky pak byly v pozdějších letech potvrzeny a upřesněny (Perucatti a kol., 2012).

Velikost a morfologie chromozomu Y jsou velice proměnlivé u jednotlivých zástupců čeledi *Bovidae*. Jelikož chromozom Y obsahuje jen několik málo funkčních genů a je mu znemožněna homologní rekombinace (mimo oblasti PAR), je jeho velikost do značné míry ovlivňována především akumulací (popřípadě ztrátami) repetitivních sekvencí (Cabelova a kol., 2012; Kopecna a kol., 2012, 2014). Chromozom Y se vyskytuje u převážné většiny turovitých ve formě akrocentru, méně často pak jako sub/metacentrický chromozom. Na rozdíl od chromozomu X jsou fúze Y s autozomem velmi vzácnou událostí, nicméně se vyskytuje několik zástupců u této čeledi, kteří mají tento typ aberací evolučně fixován v genomu. U člověka je incidence těchto přestaveb v populaci asi 1:2000 živě narozených jedinců, a často bývá spojena se zástavou meiózy a sterilitou postižených jedinců. U prasat byla taktéž identifikována translokace chromozomu Y s gonozomem (konkrétně t(Y;1)), která způsobovala neplodnost kanců (Barasc a kol., 2012). Je proto s podivem, že v karyotypech některých kopytníků se sex-autozomální translokace (Autosom/X, Autosom/Y) během evoluce fixovaly a jsou bez velkých reprodukčních bariér přenášeny do dalších generací.

### 1.6.3. Čeleď *Hippopotamidae*

Čeleď *Hippopotamidae* zahrnuje dva recentně žijící zástupce zařazené do dvou rodů: hroch obojživelný (*Hippopotamus amphibius*; HAM) a hrošík liberijský (*Choeropsis liberiensis*, CLI). Hroch obojživelný (dále jen hroch) je velký sudokopytník dobře adaptovaný k životu na souši i ve vodním prostředí. Hmotnostně se jedná o nejtěžší druh sudokopytníka a třetího nejtěžšího suchozemského živočicha, který se v současnosti vyskytuje na Zemi. Žije na území subsaharské Afriky od Etiopie, Senegal a Čadského jezera až po jihoafrický Natal. Asi před 5-10 tisíci lety hroši žili i na Sahaře, jejíž klima bylo tehdy mnohem vlhčí a příznivější pro život, než je tomu v současné době. Hrošík liberijský je malým druhem hrocha, který se vyskytuje v afrických pobřežních nížinách Guinejského zálivu (Groves a Grubb, 2011). Tento živočich sdílí mnoho charakteristických znaků, především adaptaci na semiakvatický způsob života, se svým příbuzným druhem, hrochem obojživelným (Hsu a Benirschke, 2013).



Fylogeneticky byli hroši pokládáni ještě donedávna za příbuzné prasat (*Suidae*), ale podle současných výzkumů má však skupina *Hippopotamidae* mnohem bližší příbuzenské vztahy k dnešním kytovcům (*Cetacea*). Tyto dvě skupiny živočichů se od sebe oddělily pravděpodobně v období třetihor před 55 miliony lety (Hassanin a kol., 2012)

Cytogenetické studie založené na klasickém barvení chromozomů Giemsovým barvivem jsou dostupné pro oba zástupce čeledi *Hippopotamidae* (Hsu a Benirschke, 1977). Autoři uvádějí, že hrošík i hroch mají stejný počet chromozomů ( $2n = 36$ ), a kromě rozdílu v délce chromozomů Y jsou oba karyotypy totožné. Standardní karyotyp založený na G-pruhování chromozomů byl doposud publikován jen u hrocha obojživelného (Hsu a Benirschke, 2013; Kulemzina a kol., 2009).

Komparativní studie využívající lidské a velbloudí paintingové sondy na chromozomech hrocha obojživelného ukázala, že karyotyp hrocha podstoupil během své evoluce celou řadou chromozomových změn a od ancestrálního karyotypu sudokopytníků (CAK – Cetartiodactyl Ancestral Karyotype,  $2n = 52$ ) se odlišuje osmi fízemi, 15 fúzemi a pěti inverzemi. Žádná srovnatelná studie nebyla doposud publikována pro genom hrošíka. Naproti tomu, obdobná komparativní studie na chromozomech kulohlavce černého (*Globicephala melas*,  $2n = 44$ ) ukázala, že tento živočich z čeledi *Cetacea* (kytovci) má nejkonzervovanější ancestrální karyotyp ze všech sudokopytníků, kteří byli doposud zkoumaní (Kulemzina a kol., 2009). Karyotyp kulohlavce se liší od ancestrálního karyotypu sudokopytníků jednou fízí, čtyřmi fúzemi a dvěma inverzemi. I přes příbuznost hrochů s kytovci, nebyly nalezeny žádné charakteristické chromozomové přestavby, které by tyto dvě skupiny živočichů spojovaly (Kulemzina a kol., 2009).

## 2. Materiál a Metody

### 2.1. Vzorky

Pro přípravu skel s metafázními chromozomy pro laserovou mikrodisekci a FISH analýzy byly výchozím materiálem vzorky plné krve divokých zástupců *Cetartiodactyla*, které pocházely převážně ze ZOO ve Dvoře Králové. Vzorky plné krve domestikovaných zástupců čeledi *Bovidae* pocházely od jedinců porážených na jatkách pro masnou produkci. Plná krev byla kultivována, sklizena a fixována podle standardních protokolů, jež byly popsány dříve (Cernohorska a kol., 2011). Skla s metafázními chromozomy byla následně připravována dle zavedených protokolů (Cernohorska a kol., 2012). Pro stanovení karyotypu hrošíka liberijského byla použita metoda GTG-pruhování dle klasického postupu trypsin/Giemsa (Seabright, 1971).

Pro analýzy meiotických chromozomů byla vstupním materiálem testikulární tkáň, která se odebírala *post mortem*. Vzorky pocházející od divokých zástupců čeledi *Bovidae* byly odebírány v ZOO ve Dvoře Králové nad Labem, zatímco testikulární tkáň domestikovaných druhů pocházela od jedinců porážených na jatkách pro masnou produkci. Testikulární tkáň byla vždy dopravována na ledu (4°C) do laboratoře, kde byla tkáň následně rozmělněna na menší části a zamrazena při -80°C (zásobní/pracovní vzorky) nebo archivována v tekutém dusíku (-196°C).

Pro přípravu chromozomových suspenzí pro průtokovou cytometrii byly použity tkáňové kultury, které byly ustaveny v naší laboratoři. Vzorky tkáně (nejlépe kůže, či jiná vazivová tkáň) byly odebírány jednak *post mortem*, popřípadě byly kousky ušní tkáně odebírány během značkování zvíře. Malý kousek tkáně (ušní chrupavka, vazivová tkáň) byl následně v naší laboratoři rozřezán na menší části a přenesen do kultivační nádoby na 2 až 3 hodiny, během kterých došlo k přilnutí tkáně ke dnu kultivační nádoby. Posléze bylo přidáno kultivační medium složené z DMEM, 15 % BSA a 1,5 % ATB a kultivace probíhala v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře při 37°C 1-2 týdny.

## 2.2. Příprava imunofluorescenčních preparátů testikulární tkáně

Stěžejní technikou pro zkoumání frekvence a distribuce rekombinací na meiotických chromozomech u čeledi *Bovidae* byla metoda imunofluorescenční lokalizace proteinů synaptonemálního komplexu (SCP3, SCP1) a proteinů účastnících se tvorby a maturace rekombinačních nodulů (RAD51, MLH1). Pro rozlišení jednotlivých meiotických chromozomů byla použita fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), viz dále.

Pro zhotovení imunofluorescenčních preparátů byl vždy odebrán ze zásobních kryo-zkumavek malý kousek testikulární tkáně (cca 15 mm<sup>3</sup>), který byl vložen do PBS (Phosphate Buffered Saline) a rozmělněn mechanicky v buněčnou suspenzi. Po sedimentaci větších kusů nerozmělněné tkáně byla suspence přepipetována do nové zkumavky a centrifugována 5 min při 400g. Získaný pelet byl rozsuspendován v malém množství PBS (200-300 µl). Na podložním skle pak bylo smícháno 10 µl buněčné suspence s 10 µl roztoku dest. vody a 0,05 % Tritonu-X, které byly rozetřeny po ploše skla (jako je tomu u krevních nátěrů). Skla s nanesenou suspenzí se inkubovala 15 min ve vlhké komůrce a 10 min při laboratorní vlhkosti. V dalším kroku byla skla převrstvena 80 µl roztoku dest. vody a 0,015 % Igepalu a ponechány ve vlhku 5 minut. Po převrstvení 120 µl 1% PFA na 10 min byly preparáty opláchnuty v dest. vodě a 2x 3 min v 0,1% TNT (Tris/NaCl buffer + 1 % Tween). Na takto připravené meiotické roztěry jsou nanášeny primární protilátky (50 µl ředěné protilátky/sklo). Veškeré protilátky byly ředěny v roztoku 0,55 % BSA/0,1 % Tween/PBS.

V případě detekce proteinů MLH1/RAD51, SCP3 a centromerických proteinů byly nejprve nanесeny protilátky rabbit polyclonal anti-MLH1 nebo rabbit polyclonal anti-RAD51 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA ) (ředění 1:50) a lidská anti-centromere (Antibodies Inc. Davis, CA, USA ) (ředěna 1:100) a inkubovány přes noc při 37°C. Po inkubaci byla skla opláchnuta 2x 3 min v TNT a sekundární protilátky (v ředění 1:100) byly aplikovány (donkey anti-rabbit-FITC, Santa Cruz Biotechnology a donkey anti-human-AMCA, Jackson Immunoresearch, USA) a ponechány 1h ve vlhku při 37°C. Preparáty byly následně odmyty 2x3 min v TNT a primární protilátka rabbit polyclonal anti-SCP3 (Abcam, Cambridge, UK ) (ředění 1:100) byla nanесena a inkubována přes noc ve vlhku při 37°C. Po odmytí probíhala sekundární detekce (1h při 37°C) protilátkou donkey anti-rabbit-Texas Red (ředění 1:100 ) (Santa Cruz

Biotechnology, USA). Po finálním odmytí se skla zamontovala do čistého Vectashield Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

V případě detekce SCP3, SCP1 a centromerických proteinů byly postup a časy jednotlivých kroků obdobné jako u detekce SCP3/MLH1/Centromery (detekce probíhala opět ve dvou separátních detekcích). Nejprve byly aplikovány primární protilátky rabbit polyclonal anti-SCP1 (Santa Cruz Biotechnology, USA ) (1:100) a lidská anti-centromere (Antibodies Inc. Davis, CA, USA ) (1:100). Následovala sekundární detekce s donkey anti-rabbit-FITC (Santa Cruz Biotechnology) a donkey anti-human-AMCA (Jackson Immunoresearch, USA). Ve druhém kole primární detekce byla použita protilátka rabbit polyclonal anti-SCP3 (Abcam, Cambridge, UK), která byla posléze detekována sekundární protilátkou donkey anti-rabbit-Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, USA) a zamontována do Vectashield média.

## **2.3. Příprava FISH sond**

### **2.3.1. Příprava malovacích sond pomocí DOP-PCR**

Pro konstrukci malovacích chromozomových FISH sond bylo použito 10-20 chromozomálních kopií obdržných pomocí laserové mikrodisekce (PALM Microlaser systém; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Munich, Germany) nebo 500-1000 specifických chromozomálních kopií izolovaných průtokovou cytometrií (Becman Coulter MoFlo XDP; Brea, CA, USA). Chromozomální DNA pak byla amplifikována pomocí metody DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed Polymerase Chain Reaction) s využitím primeru CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG (Telenius a kol., 1992). Samotné fluorescenční značení sond probíhalo v druhé PCR reakci s modifikovanými nukleotidy Green-dUTP nebo Orange-dUTP (Abbott, IL, USA) (Kubickova a kol., 2002).

### **2.3.2. Příprava BAC sond**

BAC klony z bovinní knihovny CHORI-CH240 byly zakoupeny v Children's Hospital Oakland Research Institute, BACPAC Resources, USA. Klony byly z knihovny vybírány na základě informací z NCBI podle Bos\_taurus\_UMD\_3.1.1 Primary Assembly. BAC DNA byla izolována z bakteriálních klonů a naznačena biotin-16-dUTP nebo digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) za použití komerčního kitu BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Pokud to bylo

možné, dva až tři BAC klony byly vybrány z jednoho regionu a použity dohromady jako jediná sonda. Důvodem bylo zvýšení kvality hybridizace a poskytnutí lepších fluorescenčních signálů při hybridizaci u evolučně vzdálenějších organismů.

## 2.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Vyhodnocená skla po imunofluorescenci určená pro FISH analýzu, se omyla v TNT na 5 min s následnou dehydratací v ethanolové řadě (70%, 85%, 96%). Osušená skla pak byla zafixována v 1% PFA na 5 min, odmyta 2x 2 min v 2xSSC a znovu dehydratována. Skla s metafázními chromozomy a zafixována skla s meiotickými komplexy určenými pro FISH analýzu byla denaturována v 70% formamidu/2xSSC při 72°C na 2 min, dehydratována v ledové ethanolové řadě (-18°C, 70%, 85%, 96%) a ponechána uschnout při laboratorní teplotě.

Na připravená zdenaturovaná skla pak bylo nanášeno 10μl hybridizační směsi. Do 10 μl hybridizační směsi, která obsahovala 6 μl MM (50% formamid), 1 μl EC (30% Ethylen Carbonate, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), 0,5 μl DNA z lososích spermií (Salmon Sperm DNA; 0,7 μg/μl ) (Sigma-Aldrich), 1,5 μl bovinní kompetitorová DNA (*Bovine* hybloc DNA; 10 μg/μl; Applied Genetics Laboratories, FL, USA) byl přidán 1 μl DNA sondy (nebo 2x 0,75 μl v případě použití 2 sond v jedné hybridizaci). Denaturace sondy probíhala 10 min při 75°C s prehybridizací při 37°C na 40 min v termocykleru. Po hybridizaci sondy přes noc při 37°C byla skla odmyta v 0,4xSSC při 72°C 2 min a zamontována do Vectashield Mounting Media (meiotické preparáty jen s čistým médiem, mitotické preparáty Vectashield + 0,24 μl/ml DAPI).

V případě hybridizace BAC sond denaturace probíhala při 72°C 5 min se stejně dlouhou inkubací na ledu. Po nanesení na sklo a hybridizaci (24-48h) byla skla odmývána v 0,7xSSC při 72°C 2 min a zamontována do Vectashield + 0,24 μl/ml DAPI.

## 2.5. Analýza preparátů

Preparáty byly analyzovány za použití fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60, který byl vybaven příslušnými fluorescenčními filtry. Pro nahrávání dobře rozprostřených meiotických chromozomů nebo FISH na metafázních chromozomech byla použita CoolCube CCD Camera (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

Pro vyhodnocení počtu MLH1 a RAD51 na buňku, měření délky synaptonemálních komplexů, určení pozic MLH1 na chromozomu, identifikaci chromozomů pomocí FISH a měření velikosti DNA smyček byl využit ISIS3 software (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

## **2.6. Statistická analýza**

Pro statistickou analýzu byly využity především Mann-Whitney test a Spearmanův korelační koeficient softwaru SPSS statistics (verze 22 pro Windows ) (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Při vyhodnocení statistické významnosti zjištěných rozdílů byla zvolena hladina významnosti  $>0,05$ .

## **2.7. Mikrodisekce mitotických chromozomů**

Vstupním materiálem pro laserovou záchyťovou mikrodisekci mitotických chromozomů jsou v naší laboratoři využívány především fixované suspenze (metanol:octová kyselina;3:1) kultivované plné krve, jejichž příprava byla popsána dříve (Cernohorska a kol., 2011). Suspenze obsahující fixované mitotické buňky jsou kapány na podložní skla opatřená polyethylenovou membránou a pro rozpoznání jednotlivých chromozomů je prováděno klasické G-pruhování (G-banding) (Seabright, 1971). Pomocí laserového paprsku je „vyříznuto“ alespoň 10-20 individuálních chromozomů pro tvorbu fluorescenčních FISH sond.

## **2.8. Průtoková cytometrie mitotických chromozomů**

Výchozím materiálem pro přípravu chromozomových suspenzí pro průtokovou cytometrii byly především buněčné linie (tkáňové kultury), které jsou výhodnější vstupním materiálem než vzorky kultivované plné krve. U vzorků plné krve nastávají problémy s nehomogenitou růstu vzorků od různých jedinců, nedostatečné jsou výtěžky mitóz (mitotický index pod 50 %) a také přítomnost červených krvinek a hemoglobinu vytváří pozadí na flow karyogramech. Naproti tomu, buněčná linie roste téměř homogenně na všech inokulovaných plotnách a vhodně zvolenou dobou kultivace buněk s mitotickými jedy (kolcemid, kolchicin) jsme schopni obdržet až 90 % buněk v mitotické fázi cyklu. Zároveň odpadá problém s červenými krvinkami nebo jinými balastními buňkami.

Námi připravené tkáňové kultury (adherentní buňky) byly po ustavení z primární tkáně organismu zamrazeny v alikvotech dostatečných pro kultivaci v nádobách o 75 cm<sup>2</sup>. Kultivace probíhala v médiu DMEM s přidavkem 15 % BSA a 1,5 % ATB v 5% CO<sub>2</sub> při 37°C. Pro izolaci chromozomů byla tkáňové kultura ponechána narůst do celkové konfluence mezi 75-90 % plochy kultivační nádoby s následovným přidáním kolcemidu. Kolcemid (10 µl/ml; 40-120 µl na 20 ml kultivačního média) byl přidáván k různým buněčným kulturám na různě dlouhou dobu (3-12h). Důvodem je nestejná rychlost růstu kultivovaných buněk různých buněčných kultur přičemž optimalizací doby kultivace s kolcemidem lze dosáhnout lepších hodnot mitotického indexu. Pomaleji rostoucí buňky vyžadují větší koncentraci kolcemidu a další čas potřebný pro dosažení mitotické fáze buněčného cyklu. Po přidání kolcemidu k adherentním buňkám (především fibroblasty mající hvězdicovitý/vřetenovitý tvar) byly buňky v mitóze zřetelně rozeznatelné od ostatních díky kulatému tvaru a částečné ztrátě adheze. Zastavené buňky pak byly přidáním roztoku trypsinu (Trypsin/EDTA 0,25%/0,02% v PBS ) (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) sklizeny do zkumavky a centrifugovány 5 min na 300g. Po odsátí média byl pelet opatrně rozsuspendován v předeřátém (37°C) hypotonickém roztoku (75 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 mM Spermine a 05 mM spermidine, pH = 8,0) a ponechán v termostatu při 37°C. Po 15-20 minutové inkubaci v hypotonickém roztoku byly buňky stočeny (5 min, 300 g), supernatant byl odsán a nahrazen 0,8-1,5 ml (dle velikosti peletu) ledového (4°C) polyaminového izolačního pufru (2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 15 mM Tris-HCl, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% (vol/vol) 2-45 mercaptoethanol, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM spermine a 0,5 mM spermidine). Po inkubaci buněk 10 min na ledu následovalo uvolnění mitotických chromozomů z buněk do okolního roztoku prudkým vortexováním po dobu 25 vteřin nebo trojnásobným protlačením přes tenkou injekční jehlu (22G). Po krátkém stočení v centrifuze (1 min;200g) byl supernatant odebrán a přefiltrován přes 20 µm filtr do čisté zkumavky. Takto připravená chromozomová suspence byla značena po dobu alespoň 2 hodin Chromomycinem A3 a Hoechst 33258 o výsledné koncentraci 40 µg/ml, respektive 2 µg/ml. Hodinu před samotným měřením byl přidán citrát sodný a sulfit sodný, které zlepšují morfologii a trvanlivost chromozomů.

Sorting chromozomů a jejich analýza probíhala na průtokovém cytometru Becton Coulter MoFlo XDP (Brea, CA, USA) vybaveného pro tento účel lasery o vlnových délkách 460 nm (Chromomycin A3) a 355 nm (Hoechst 33258) a příslušnými emisními filtry (575 nm pro Chromomycin A3 a 460 nm pro Hoechst 33258).

### 3. Cíle práce

1. Stanovení četností a distribuce rekombinací u zástupců z čeledi *Bovidae* se zaměřením na vybrané domestikované druhy
2. Zvládnutí technologie separace mitotických chromozomů pomocí průtokové cytometrie a využití získaných chromozomů pro tvorbu FISH sond
3. Komparativní cytogenetika u vybraných organismů z řádu sudokopytníků (*Cetartiodactyla*) pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace



## 4. Výsledky

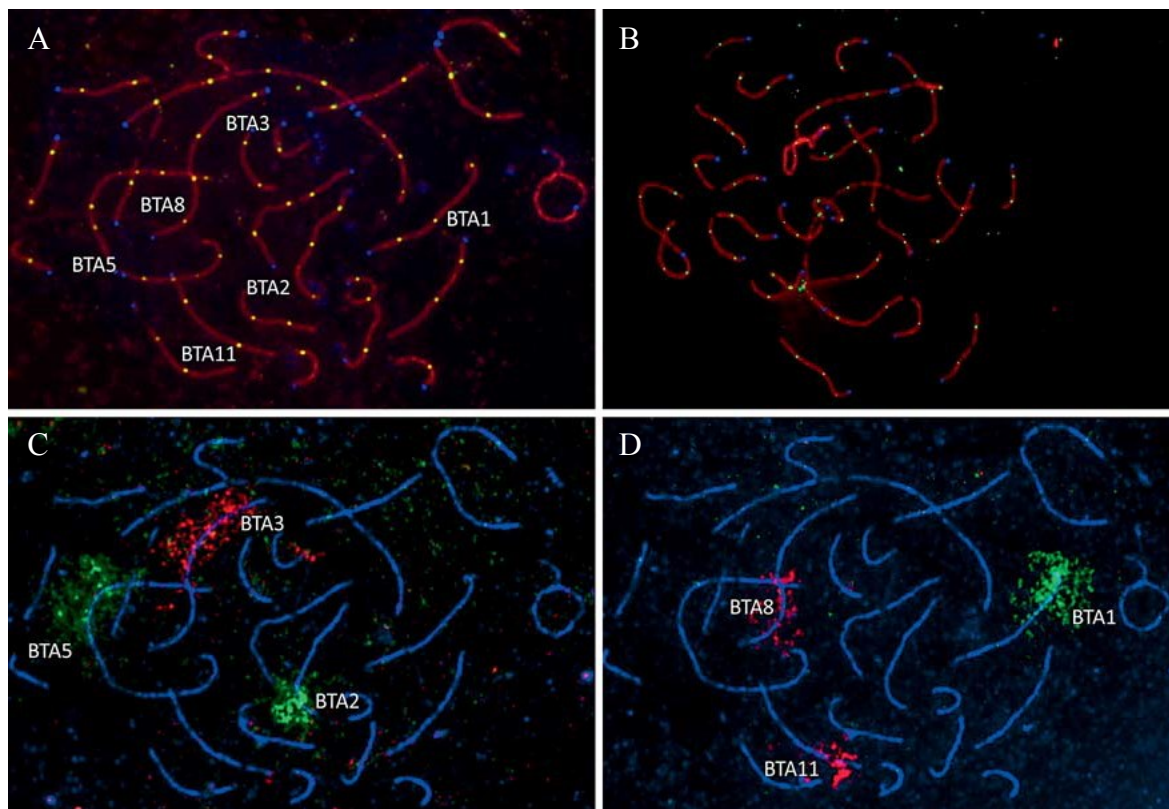
### 4.1. Rekombinace a její variance u čeledi *Bovidae*

S využitím imunofluorescenčního značení meiotických rekombinačních proteinů (MLH1) a proteinů synaptonemálního komplexu (SCP1/SCP3) bylo v naší laboratoři vyšetřeno 112 jedinců 28 různých druhů z čeledi *Bovidae*. Imunofluorescenčně bylo vyšetřováno alespoň 100 dobře rozprostřených meiotických buněk (spermatocytů) ve fázi pachytene u jednoho zvířete (celkově bylo vyšetřeno 12185 spermatocytů). U všech zkoumaných organismů byly měřeny počty rekombinací (CO/MLH1) na jeden spermatocyt (jak na autozomech, tak na pohlavních chromozomech) a z obdržených hodnot rekombinací byly u jednotlivých druhů vypočteny délky příslušných genetických map. Měřena byla taktéž celková délka autozomálních SC (protein SCP3/SCP1) a to alespoň v 15-20 buňkách od každého jedince příslušného druhu (veškeré výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1). Příklad imunofluorescenční detekce meiotických proteinů SCP3 a MLH1 je znázorněn na Obrázku 12 A-B.

Z obdržených výsledků měření počtu CO vyplývá, že byla splněna teze týkající se počtů rekombinací v meiotických buňkách, kdy na každém rameni autozomu by měl být přítomen alespoň jeden CO. Základní haploidní počet autozomálních ramen ( $FNa/2$ ) se u čeledi *Bovidae* pohybuje v rozmezí 23 (dik dik, *Madoqua kirkii*) až 29 (většina druhů, např. skot) a průměrný počet crossing-overů u měřených organismů (Tabulka 1) často násobně převyšoval počet autozomálních ramen a pohyboval se v rozmezí od  $34,39 \pm 3,2$  MLH1 u dik dika do  $62,83 \pm 3,8$  u ovce (*Ovis aries*,  $FNa/2 = 29$ ). Jedinou výjimkou byla sitatunga (*Tragelaphus spekii*) u které byl naměřen počet rekombinací nižší než je počet autozomálních ramen ( $FNa/2 = 28$ ) a to pouze  $26,13 \pm 1,2$ .

U naměřených hodnot rekombinací byla zaznamenána velice významná individuální i mezidruhovú variabilita (Mann-Whitney test,  $P < 0,001$ ) jejíž velikost je shrnuta v koeficientu variance (CV), který byl vypočten pro všechny druhy a pohyboval se v rozmezí od 7,46% u *B. p. indicus* až po 18,38 % u *T. imberbis* (44,43–62,95 MHL1) (Tabulka 1). Tyto hodnoty vnitrodruhové (individuální) variance v počtu rekombinačních míst ve spermatocytech jsou v konkordanci s hodnotami, které byly již dříve publikovány u myši a člověka a pohybovaly se okolo 15 % (Lynn a kol., 2002).

**Obrázek 12.** Pachytenní spermatocyty býka (*B. taurus*) (A) a ovce (*O. aries*) (B) imunofluorescenčně značené protilátkami proti proteinům SCP3 (červeně), MLH1 (žlutě) a centromeře (modře). Imunoznačený pachytenní spermatocyt (A) po FISH s malovacími sondami specifickými k chromozomům BTA2, 3 a 5 (C) a BTA1, 8 a 11 (D).



Průměrná celková délka autozomálních SC na buňku u všech zkoumaných druhů je uvedena v Tabulce 1. Podobně jako tomu bylo i u rekombinace, i v případě celkových délek SC byla nalezena signifikantní individuální i mezidruhová variabilita (Mann-Whitney test,  $P < 0,001$ ). Rozmezí hodnot délek SC bylo poměrně široké, nejkratší SC měla antilopa losí ( $213,83 \pm 20,9 \mu\text{m}$ ) a nejdelší koza kamerunská ( $321,42 \pm 11,8 \mu\text{m}$ ). Z naměřených hodnot celkové délky synaptonemálních komplexů a počtu rekombinací ve spermatocytech byly vypočteny rekombinační hustoty pro jednotlivé druhy (počet rekombinací byl vydělen délkou autozomálních SC v konkrétním spermatocytu (viz Tabulka 1). Nejvyšší zaznamenané hodnoty rekombinační hustoty byly pozorovány u ovce ( $0,244 \pm 0,021 \text{ MLH1}/\mu\text{m}$ ), zatímco nejmenší hustoty byly pozorovány u sitatungy ( $0,099 \pm 0,027 \text{ MLH1}/\mu\text{m}$ ) (Tabulka 1).

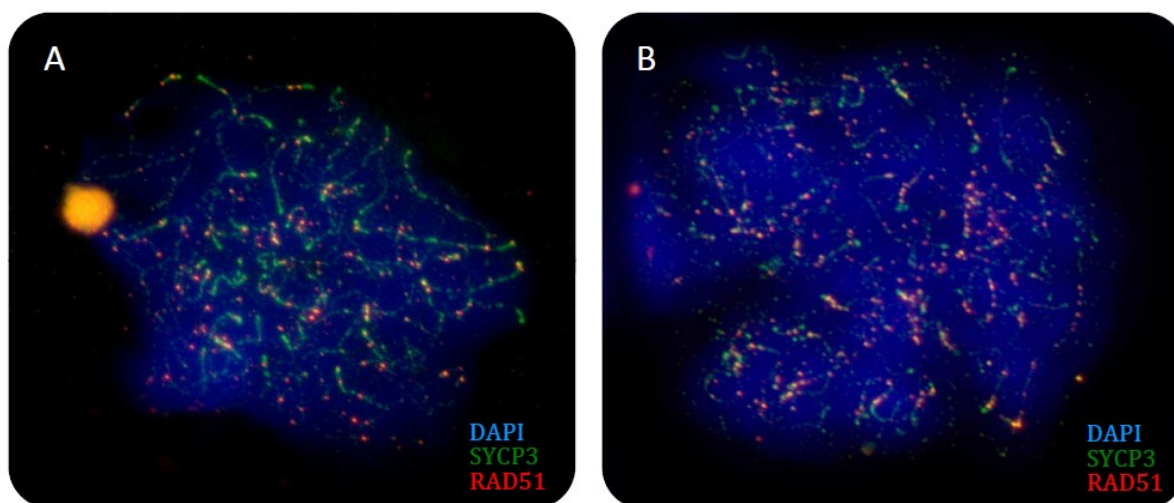
Na základě všech obdržených výsledků byla odhalena statisticky významná korelace (Spearmanův korelační koeficient,  $r = 0,67$ ;  $p < 0,01$ ) mezi počtem rekombinací a celkovou délkou autozomálních synaptonemálních komplexů. Zároveň byla zjištěna pozitivní

korelace mezi počtem autozomálních ramen (FNa) a počtem rekombinací (Spearmanův korelační koeficient,  $r = 0,576$ ;  $p < 0,01$ ).

## 4.2. DSB a RAD51

Dalším parametrem měřeným v meiotických buňkách testikulární tkáně byl počet iniciálních dvouřetězcových zlomů (DSB) v časných fázích profáze I. Indukované DSB jsou v DNA rozpoznávány řadou proteinů, mezi nimi například RAD51, který se váže a akumuluje se na jednořetězcové DNA (single strand DNA - ssDNA). Jeho imunodetekcí můžeme odhadnout počet vytvořených DSB míst v profázi I (Bishop, 1994) (Obrázek 13). Přítomnost proteinu RAD51 byla detekována od časně leptotene až do fáze pachytene a jak bylo očekáváno, nejvyšší abundance RAD51 byla detekována v leptotene, kdy jsou utvářeny DSB a s postupnou progresí meiotického cyklu do fáze pachytene počet RAD51 míst klesá.

**Obrázek 13.** Příklad imunofluorescenční detekce proteinu RAD51 (červeně) SCP3 (zeleně) a centromery (modře) v pachytenních spermatocytech. **(A)** býka (*B. taurus*) a buvolce běločelého (*D. p. phillipsi*) **(B)**.



Pro zjištění možné variability v počtu RAD51/DSB míst, která by mohla být způsobena rozdílnou kompozicí genomu (respektive počtem chromozomů), byly pro měření počtu DSB vybrány preferenčně druhy z čeledi *Bovidae* s nízkým diploidním počtem chromozomů (*G. leptoceros*, *T. spekkii*, *T. strepsiceros*, *T. oryx*, *N. d. ruficollis*, *M. kirkii*) a s vysokým počtem chromozomů (*B. taurus*, *S. c. caffer*, *S. c. nanus*,

*A. melampus*, *C. t. taurinus*, *A. marsupialis*, *C. hircus*, *O. aries*, *A. nasomaculatus*, *H. niger*, *O. dammah*, *O. gazela* a *K. l. kafuensis*) (Ruiz-Herrera a kol., 2016). Hodnoty naměřené u jednotlivých druhů byly značně variabilní, rozsah od 50,43±3,31 u *T. strepsiceros* do 148,3±3,16 u kozy (*C. hircus*).

Jako kontrola specifity/funkčnosti imunodetekce proteinu RAD51 v našich experimentech byl tento protein detekován na myších spermatocytech, u nichž naměřená hodnota byla 210,94 RAD51 míst na buňku (průměr v 65 analyzovaných meiotických buňkách) a spadá tak do intervalu hodnot popisovaných v literatuře (200-300 míst na buňku) (Cole a kol., 2012). Nalezena byla korelace mezi počtem utvářených DSB/RAD51 míst a výsledným počtem rekombinačních míst u zkoumaných druhů (Spearmanův korelační koeficient = 0,163,  $p \leq 0,001$ ). Měl-li organismus větší počet iniciálních DSB, měl také vyšší hodnoty rekombinací na spermatocyt a naopak. Srovnáním počtu utvářených RAD51 míst a výsledných MLH1 míst jsme byli schopni vypočítat míru konverze/progrese dvouřetězcových zlomů (Tabulka 1).

### 4.3. Rekombinační a centromerická interference

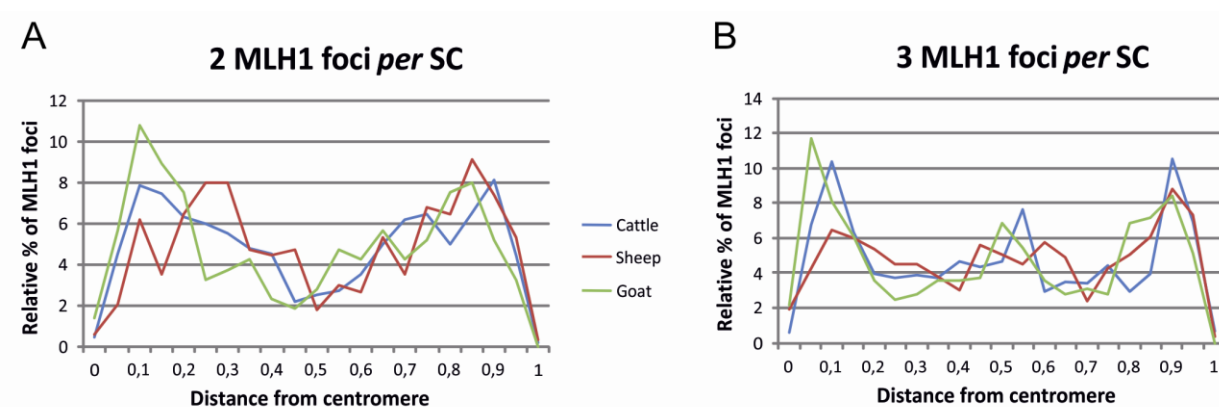
Kombinací FISH a imunofluorescenčního značení meiotických proteinů byly sledovány rozdíly v hodnotách rekombinace na vybraných individuálních chromozomech (orthology BTA1, 2, 3, 5, 8 a 11) mezi druhy s ancestrálním bovinním karyotypem (skot, koza) a organismy s Robertsonovskými fúzemi (ovce). Hustota rekombinace na metacentrických chromozomech u ovce (orthology BTA1;3, BTA2;8, BTA5;11) byla signifikantně vyšší než u korespondujících akrocentrických chromozomů skotu a kozy. Nicméně, relativní počty rekombinací přítomné na metacentrech ovce (vypočteny jako % z celkového počtu rekombinací v buňce) byly signifikantně nižší, než tomu bylo v případě orthologních akrocentrických chromozomů v genomech skotu a kozy (26,1 vs. 27,6 respektive 28,23 %;  $p < 0,001$ ). Příklad imunofluorescenční detekce meiotických proteinů SCP3 a MLH1 s následnou FISH analýzou vybraných chromozomů je znázorněn na Obrázku 12 A-D.

Distribuce rekombinačních míst na SC byla u zkoumaných druhů (skot, ovce a koza) měřena jako relativní vzdálenost místa rekombinace od centromery na příslušném SC (vyjádřeno jako % délky SC). Bylo zjištěno, že distribuce CO je nenáhodná s nenáhodnými vzdálenostmi mezi jednotlivými CO na jednom rameni chromozomu. V případě jednoho MLH1 místa na daném SC bylo toto rekombinační místo umístěno ve

středu ramene (medián umístění u skotu 55,2 % a ovce 52,5 %). V případě přítomnosti dvou MLH1 na jednom SC, jsou tato místa preferenčně lokalizována na opačných stranách ramene chromozomu.

Pro identifikaci vlivu centromery a potažmo centrických fúzi na rekombinační hodnoty, bylo provedeno srovnání mezi ovčími metacentrickými chromozomy a příslušnými bovinními (a kozími) orthologními akrocentrickými chromozomy. Nalezeny byly signifikantní ( $p < 0,001$ ) rozdíly v distribucích CO mezi těmito zkoumanými druhy. Největší rozdíl byl zaznamenán v případě výskytu 3 MLH1 míst na rameni meiotického chromozomu ( $p < 0,001$ ) (Obrázek 14)

**Obrázek 14.** Distribuce (A) dvou a (B) tří MLH1 míst na SC korespondujících ke chromozomům BTA1, 2, 3, 5, 8, a 11 u býka, ovce a kozy. MLH1 na rameno SC.



Největší disparita v distribuci CO (v případě 3MLH1/rameno metacentrického SC) byla pozorována u umístění prvního/proximálního (blíže centromery) a druhého rekombinačního místa na SC ( $p < 0,001$ , respektive  $p = 0,003$ ), ale žádný statistický rozdíl nebyl prokázán v umístění třetího/distálního (blíže telomeře) MLH1 místa ( $p > 0,05$ ). Obdobně tomu bylo u dvou rekombinačních událostí na SC, kde signifikantní rozdíl byl zaznamenán jen u prvního CO (blíže centromery,  $p < 0,001$ ), ale ne u druhého (distálního) CO.

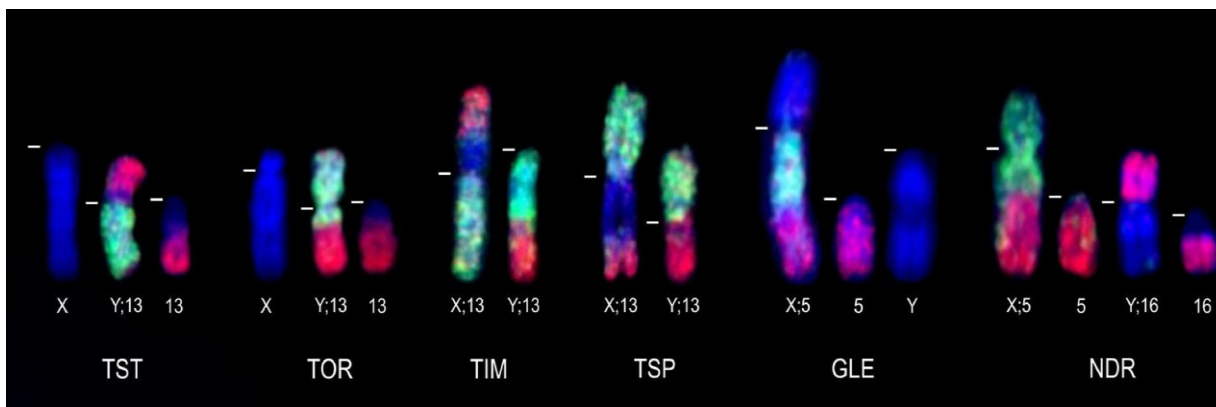
#### 4.4. Rekombinace na pohlavních chromozomech a sex-autozomální translokace

Na rozdíl od autozomů, rekombinace na pohlavních chromozomech, které jsou u většiny placentálních savců heteromorfní, je omezena na malou homologní oblast na koncích pohlavních chromozomů zvanou pseudoautozomální oblast (PAR - Pseudoautosomal Region). Nespárované oblasti na pohlavních chromozomech podléhají během meiózy procesu umlčování nespárovaného chromatinu (MSUC - Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin, MSCI - Meiotic Sex Chromosome Inactivation), který napomáhá buňce v progresi do dalších fází cyklu a zabraňuje zastavení meiózy a apoptóze buňky (Cloutier a Turner, 2010; Turner, 2007).

Počty rekombinací nacházející se na pohlavních chromozomech u zkoumaných druhů jsou uvedeny v Tabulce 1, přičemž počty MLH1 míst na PAR vykazovaly signifikantní individuální i mezidruhovou variabilitu (Mann-Whitney test,  $p < 0,001$ ) mezi všemi zkoumanými organismy. Nejmenší počty rekombinací na chromozomech XY byly napočítány u přimorožce jihoafrického (*Oryx gazela*) (8,7 %) a naopak nejvíce CO na PAR měl pakůň bělobradý (61,7 %). Zároveň, nikdy nebyla pozorována více jak jedna rekombinační událost na pseudoautozomálním regionu.

Opakovaný výskyt sex-autozomálních translokací během savčí evoluce naznačuje přítomnost mechanismu, který umožňuje přesnou kontrolu meiotické synapse, rekombinace a umlčování chromatinu pohlavních chromozomů. Čeleď *Bovidae* je jednou ze skupin organismů, u kterých je relativně častý výskyt evolučně fixovaných sex-autozomálních translokací, jež však nemají žádný viditelný vliv na fertilitu svých nositelů, jako je tomu u jiných druhů (Cotton a kol., 2014; Homolka a kol., 2007; Kim a Kim, 2012). Chování sex-autozomálních fúzních chromozomů během meiózy bylo sledováno u *T. strepsiceros* (Y;13) (TST), *T. oryx* (Y;13) (TOR), *T. spekii* (X;13, Y;13) (TSP), *T. imberbis* (X;13, Y;13) (TIM), *Gazella leptoceros* (X;5) (GLE) a *Nanger dama ruficollis* (X;5, Y;16) (NDR), kteří jsou nositeli odlišných sex-autozomálních translokací (Obrázek 14) (Vozdova a kol., 2016). S využitím imunofluorescenčního značení proteinů SCP3/SCP1,  $\gamma$ H2AX a FISH jsme blíže zkoumali dynamiku umlčování nespárovaného sex chromatinu a odlišné modifikace chromatinu mezi autozomální a gonozomální částí pohlavních chromozomů během meiózy.

**Obrázek 14.** FISH na metafázních chromozomech (DAPI, modře) *T. strepsiceros* (TST), *T. oryx* (TOR), *T. imberbis* (TIM), *T. speki* (TSP), *G. Leptoceros* (GLE) a *N. dama ruficollis* (NDR) s celochromozomovými sondami specifickými pro BTAX, BTAY (zeleně) a BTA5, BTA13 a BTA16 (červeně). Čísla 5, 13 a 16 na obrázku indikují orthology BTA5, BTA13 a BTA16.

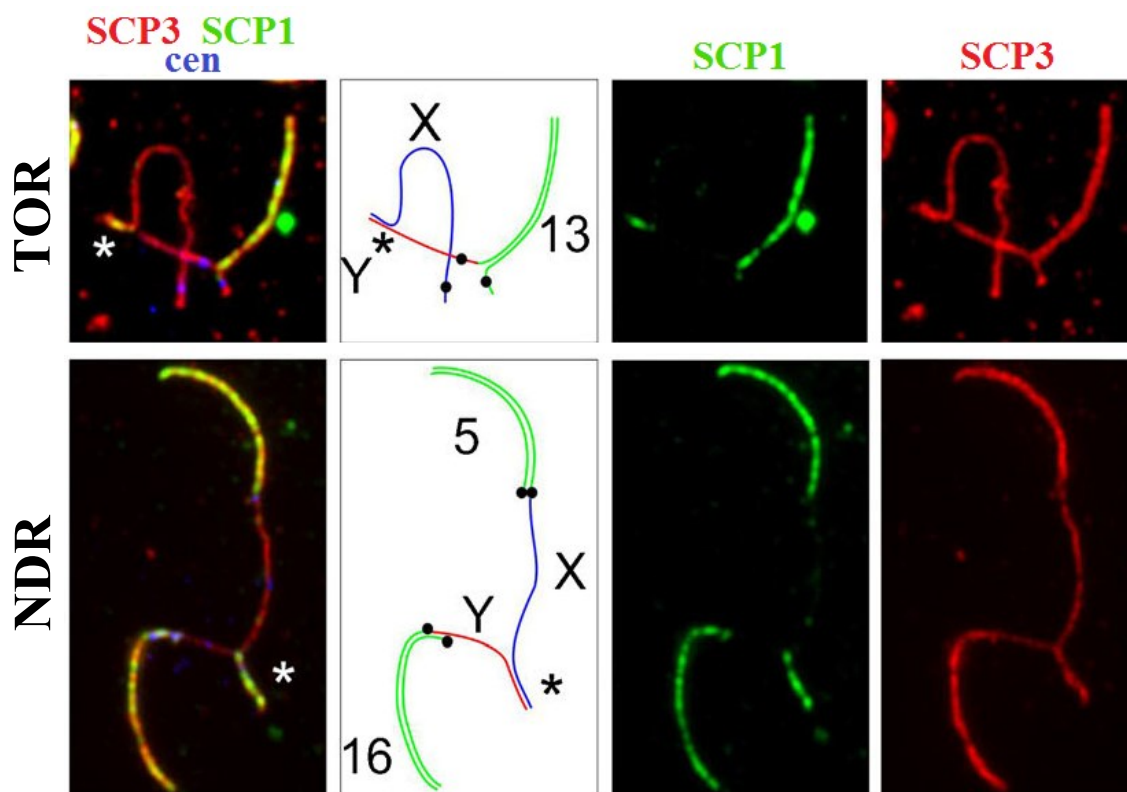


Pomocí protilátek SCP1/SCP3 byla nejprve analyzována synapse pohlavních chromozomů v 920 pachytenních buňkách (288 u TST, 251 T. oryx, 53 TSP, 135, TIM, 50 GLE a 143 buněk u NDR) a pozorovány byly charakteristické meiotické konfigurace pohlavních chromozomů, jako jsou bivalenty (u TSP a TIM), trivalenty (u TST, TOR a GLE) a kvadrivalent (NDR) (Obrázek 15).

Přítomnost rekombinačních míst na PAR byla zkoumána pomocí anti-MLH1 protilátky celkem u 1691 pachytenních buněk (313 buněk v případě TOR, 322 u TST, 341 u TSP, 316 u TIM, 115 u GLE, 212 u NDR a 107 u BTA). U fúzovaných sex-autozomálních chromozomů byl pozorován alespoň jeden CO na autozomální části chromozomu ve všech zkoumaných spermatocytech, zatímco hodnoty rekombinací v PAR se pohybovaly od 18 % (TIM) do 46 % (TOR).



**Obrázek 15.** Imunofluorescenční lokalizace proteinu SCP3 (červeně), SCP1 (zeleně), centromera (modře) a schematický náčrt synapse pohlavních chromozomů u *T. oryx* (TOR; trivalent) a *N. dama ruficollis* (NDR; kvadrivalent) ukazující synapsi autozomálních a pseudoautozomálních oblastí. PAR označena \*.

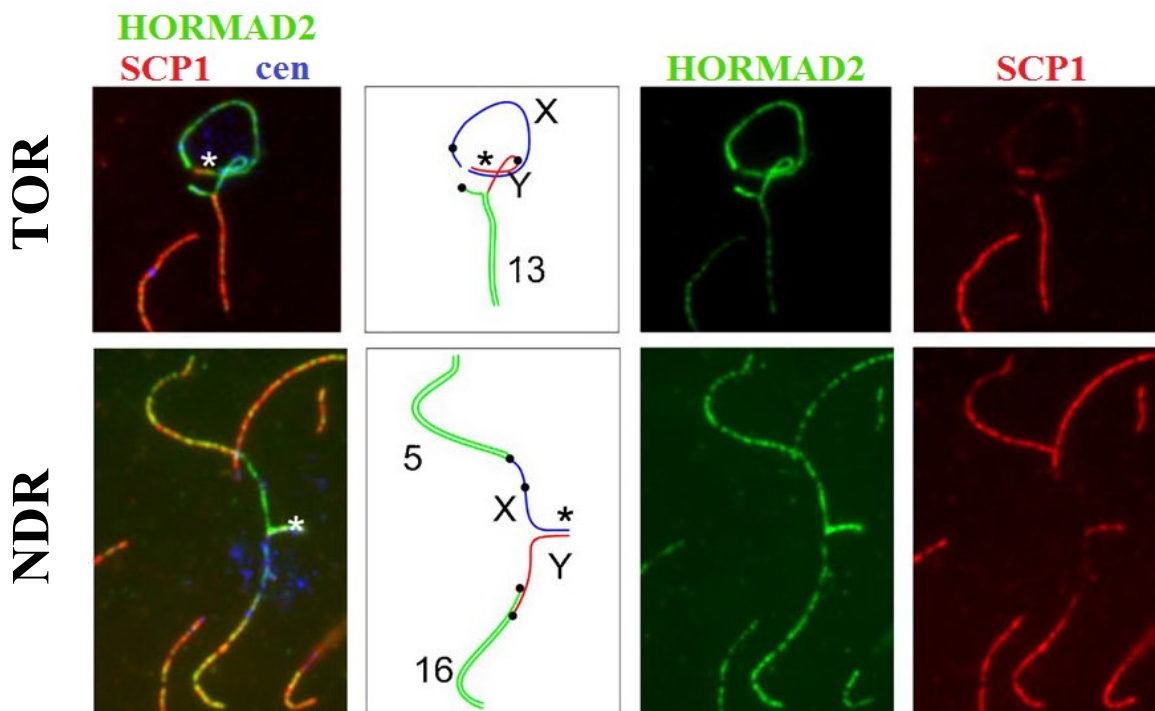


Během formování pohlavního tělíska v profázi prvního meiotického dělení je charakteristická transkripční inaktivace a akumulace heterochromatin-specifických proteinů (Turner, 2007), jako je například *HORMAD2*, který slouží jako senzorický protein nespárovaného chromatinu (Kogo a kol., 2012; Turner, 2015). Tento protein napomáhá náboru/navádění ATR kináz, které pak fosforylují histony H2AX na  $\gamma$ H2AX. Histon  $\gamma$ H2AX je tak indikátor transkripčně umlčeného chromatinu (Fernandez-Capetillo a kol., 2003; Handel, 2004; Mahadevaiah a kol., 2001). V našich imunofluorescenčních experimentech byla pozorována přítomnost proteinu *HORMAD2* na nespárovaných částech pohlavních chromozomů u zástupců skupiny *Tragelaphini*, stejně jako na části pericentromerické oblasti volného/akrocentrického orthologu *BTA13* u TOR a *TST* (Obrázek 16). U *Antilopini* byla pozorována přítomnost *HORMAD2* jak na PAR, tak v místě fúze chromozomů X;5. U všech zkoumaných druhů se sex-autozomálními translokacemi byla sledována intenzivní fluorescence protilátek proti fosforylovanému histonu H2AX na gonozomálních částech fúzovaných pohlavních chromozomů, což



odpovídá normálnímu průběhu meiotického umlčování nespárovaného chromatinu. Bez ohledu na komplexnost sex-autozomálních fúzí, signál  $\gamma$ H2AX byl vždy omezen jen na gonozomální část fúzního chromozomu a nebyl pozorován na části autozomální.

**Obrázek 16.** Imunofluorescenční lokalizace proteinu SCP1 (červeně), HORMAD2 (zeleně), centromera (modře) a schematický náčrt pohlavních chromozomů u *T. oryx* (TOR) a *N. dama ruficollis* (NDR). PAR označena \*.



**Tabulka 1.** Souhrnný seznam všech vyšetřovaných druhů v naší laboratoři ukazující základní charakteristiky zvířat, počty CO, délky SC, rekombinační hustoty, počty DSB a konverzní poměry DSB/MLHI (jen u vybraných druhů).

Species	Tribe	N	Počet buněk	2n	aFN	Počet MLHI na buňku ± SD	CV	Celková délka ± SC (µm ± SD)	Hustota (MLHI/µm ± SD)	Počet MLHI na XY (% ± SD)	Mean RAD1 foci/cell	Ratio COs/DSBs
<b>Subfamily Bovinae</b>												
Tur domácí	<i>Bos taurus</i>	9	960	60	58	47.5 ± 4.69	9.87%	246.71 ± 8.2	0.192 ± 0.01	35.42 ± 13.9	124.09 ± 3.55	0.38
Zebu	<i>Bos p. indicus</i>	1	103	60	58	44.5 ± 3.31	7.43%	272.35 ± 33.9	0.164 ± 0.02	27.18 ± 0.0	n.a. ± n.a.	n.a.
Buvol kaferský	<i>Syncerus c. caffer</i>	1	107	54	58	44.2 ± 3.32	7.51%	226.4 ± 18.3	0.195 ± 0.00	28.97 ± 0.0	100.82 ± 3.6	0.44
Buvol pralesní	<i>Syncerus c. nanus</i>	1	115	52	58	39.3 ± 4.11	10.45%	220.48 ± 19.3	0.178 ± 0.01	42.61 ± 0.0	50.62 ± 3.62	0.78
Antilopa losí	<i>Taurotragus oryx</i>	12	1236	31	56	37.1 ± 4.02	10.84%	213.83 ± 20.9	0.173 ± 0.02	49.49 ± 10.9	78.57 ± 4.04	0.47
Kudu malý	<i>Tragelaphus imberbis</i>	5	551	38	56	53.3 ± 9.8	18.38%	248.62 ± 12.5	0.214 ± 0.02	27.8 ± 13.9	n.a. ± n.a.	n.a.
Sitatunga	<i>Tragelaphus speki</i>	5	579	30	56	26.12 ± 2.94	11.26%	264.99 ± 17	0.099 ± 0.01	25.64 ± 7.7	55.15 ± 3.21	0.47
Kudu velký	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	4	432	31	56	35.58 ± 3.25	9.13%	218.07 ± 13	0.164 ± 0.00	30.15 ± 4.6	50.43 ± 3.31	0.71
<b>Subfamily Antilopinae</b>												
Imapala	<i>Aepyceros melampus</i>	2	238	60	58	49.62 ± 3.99	8.04%	278.93 ± 9.7	0.178 ± 0.00	47.83 ± 8.0	82.16 ± 3.56	0.6
Pakůň běloocasý	<i>Connochaetes gnou</i>	6	654	58	58	43.22 ± 4.99	11.55%	230.19 ± 20.5	0.189 ± 0.01	44.38 ± 5.8	n.a. ± n.a.	n.a.
Pakůň modrý	<i>Connochaetes t. taurinus</i>	5	521	58	58	46.8 ± 4.92	10.51%	255.85 ± 1.3	0.184 ± 0.02	40.27 ± 7.6	106.12 ± 3.62	0.44
Pakůň běločelý	<i>Connochaetes t. albojubatus</i>	1	120	58	58	37.27 ± 4.57	12.26%	252.63 ± 19.8	0.148 ± 0.00	61.7 ± 0.0	n.a. ± n.a.	n.a.
Buvolec běločelý	<i>Damalisca p. philipsi</i>	3	326	38	58	40.62 ± 4.43	10.91%	232.76 ± 14.6	0.173 ± 0.01	34.89 ± 10.9	n.a. ± n.a.	n.a.
Antilopa skákavá	<i>Antidorcas marsupialis</i>	2	227	56	58	44.48 ± 3.61	8.12%	273.62 ± 15.2	0.164 ± 0.00	15.24 ± 11.2	102.85 ± 3.58	0.43
Gazela písková	<i>Gazela leptoceros</i>	1	115	32	56	34.97 ± 3	8.58%	269.99 ± 26.6	0.130 ± 0.00	40 ± 0.0	61.33 ± 3.22	0.57
Dik dik	<i>Madoqua kirkii</i>	1	117	46	46	34.39 ± 3.19	9.28%	231.31 ± 29	0.149 ± 0.00	28.21 ± 0.0	129.2 ± 3.08	0.27
Gazela dama	<i>Nanger d. nuficollis</i>	2	212	38	54	35.49 ± 2.97	8.37%	251.24 ± 5.6	0.141 ± 0.01	30.11 ± 2.9	61.64 ± 2.91	0.58
Paovec hřivnatá	<i>Ammotragus lervia</i>	1	107	58	58	57.95 ± 5.03	8.68%	295.5 ± 24.5	0.193 ± 0.00	20.56 ± 0.0	n.a. ± n.a.	n.a.
Koza kamenunská	<i>Capra hircus</i>	8	886	60	58	60.49 ± 5.21	8.61%	328.38 ± 23.49	0.184 ± 0.02	24.84 ± 6.6	148.3 ± 3.16	0.41
Oveč domácí	<i>Ovis aries</i>	11	1297	54	58	62.90 ± 6.04	10.00%	262.96 ± 21.51	0.224 ± 0.02	40.93 ± 13.5	117.98 ± 3.41	0.53
Adax nubijský	<i>Addax nasomaculatus</i>	5	536	58	58	48.25 ± 6.1	12.64%	274.77 ± 23.2	0.176 ± 0.01	28.46 ± 14.5	132.23 ± 3.14	0.36
Antilopa koňská	<i>Hippotragus equinus</i>	5	576	60	58	48.11 ± 3.75	7.79%	252.69 ± 13	0.146 ± 0.01	24.33 ± 5.7	n.a. ± n.a.	n.a.
Antilopa vraná	<i>Hippotragus niger</i>	5	543	60	58	51.46 ± 6.59	12.81%	294.26 ± 28.2	0.176 ± 0.01	37.85 ± 18.9	69.81 ± 3.41	0.74
Přimorožec šavlorohý	<i>Oryx dammah</i>	3	348	56	58	50.57 ± 5.15	10.18%	279.4 ± 15.8	0.182 ± 0.01	28.4 ± 8.3	62.82 ± 3.72	0.8
Přimorožec arabský	<i>Oryx leucoryx</i>	1	103	58	58	44.9 ± 6.27	13.96%	291.14 ± 28	0.154 ± 0.00	22.33 ± 0.0	n.a. ± n.a.	n.a.
Přimorožec jihuafričský	<i>Oryx gazela</i>	1	103	58	58	42.64 ± 4.22	9.90%	299.17 ± 30.2	0.143 ± 0.00	8.7 ± 0.0	75.88 ± 3.49	0.56
Vodňka lečve-červená	<i>Kobus leche kaffiensis</i>	7	746	48	58	45.83 ± 5.89	12.85%	292.45 ± 21.7	0.156 ± 0.01	36.78 ± 9.2	66.71 ± 4.38	0.69
Vodňka abok	<i>Kobus megaceros</i>	6	641	52	58	53.23 ± 7.22	13.56%	287.13 ± 19.2	0.185 ± 0.02	50.91 ± 4.7	n.a. ± n.a.	n.a.

## 4.5. Průtoková cytometrie chromozomů a komparativní cytogenetika

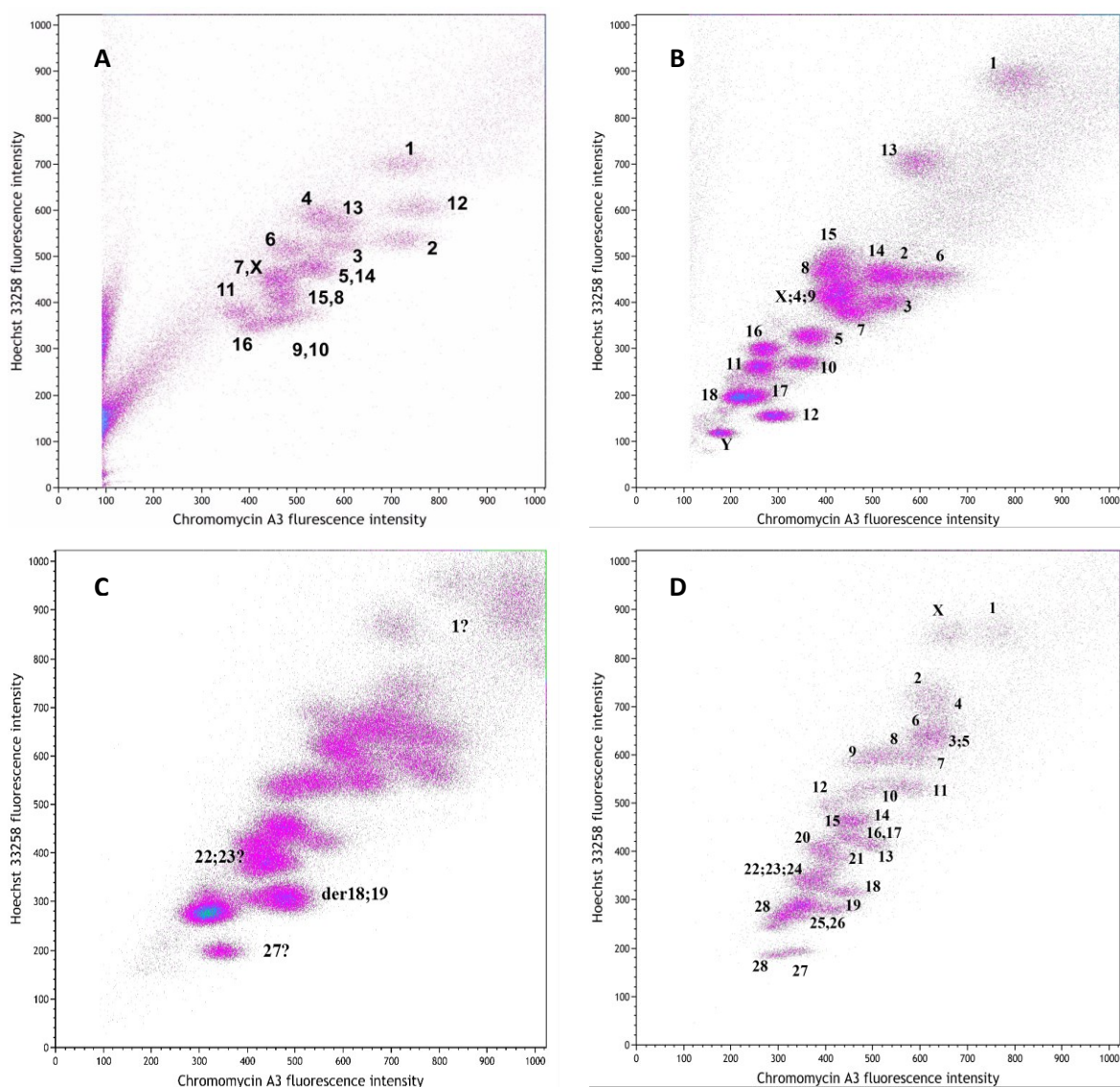
Průtoková cytometrie umožňuje rychlé kvantitativní karyotypování a vyhledávání chromozomových/genomových aberací u celé řady živočišných druhů. Na rozdíl od mikrodisekčních metod, průtoková cytometrie dovoluje získat vysoká množství individuálních chromozomů o vysoké čistotě, které jsou vhodné k vytváření genomových knihoven nebo kvalitních FISH sond.

Pomocí průtokové cytometrie byly v našich laboratořích získány flow karyogramy mnoha druhů savců, mezi nimi například člověka (*Homo sapiens*, HSA,  $2n = 46$ ), prasete (*Sus scrofa*, SSC,  $2n = 38$ ), lišky (*Vulpes vulpes*, VVU,  $2n = 38$ ) nebo krávy (*Bos taurus*, BTA,  $2n = 60$ ). U flow karyogramů lidí, lišek a prasat (Obrázek 17A, B) se nám podařilo rozeznat většinu individuálních chromozomálních populací ( $> 85\%$ ) a jejich sortováním jsme získali kvalitní FISH sondy. Naproti tomu, chromozomy ve flow karyogramu krávy (Obrázek 17D) jsou organizovány do větších skupin a jen několik málo individuálních chromozomů bylo možno izolovat bez kontaminace jinou chromozomální DNA.

Srovnáním dvou flow karyogramů krávy (jeden z normální zdravé tkáně a druhý z nádorové) byly odhaleny četné chromozomální změny (Obrázek 17C, D), přičemž některé z nich byly blíže charakterizovány pomocí FISH (DNA z derivovaných chromozomů byla naznačena DOP-PCR a hybridizována na metafázní chromozomy).

Námi připravené FISH sondy, jejichž DNA byla získána pomocí sortování chromozomů, byly využity v komparativních evolučních studiích, například u hrošíka liberijského (*Choeropsis liberiensis*, CLI). Pro posouzení základních chromozomálních homologií mezi hrošíkem, hrochem obojživelným a prasetem byly preferenčně použity prasečí malovací sondy získané pomocí cytometrie, pouze několik FISH sond bylo připraveno z DNA získané laserovou mikrodisekcí. Jednalo se o chromozomy, které nemohly být získány pomocí cytometru díky své vysoké podobnosti s jinými chromozomy v karyotypu nebo se jednalo jen o specifické sub-chromozomální části (sondy specifické pro jednotlivá ramena chromozomu-SSC1p, SSC1q). Celkem 18 použitých prasečích malovacích sond odhalilo 45 konzervovaných homologních segmentů v genomu hrošíka liberijského. Každá ze čtyř sond (SSC11, SSC12, SSC17, SSC18) hybridizovala samostatně na jediný chromozom hrošíka (Frohlich a kol., 2016).

**Obrázek 17.** Ukázka bivariatních flow karyogramů **(A)** lišky (*Vulpes Vulpes*, n=19) a **(B)** prasete (*Sus Scrofa*, n = 19). Popsané individuální chromozomy byly přiřazeny a potvrzeny pomocí FISH. Porovnání dvou flow karyogramů krávy, kde **(C)** je karyogram buněčné linie MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Epithelial Cells) a **(D)** standartní flow karyogram krávy (fibroblastová tkáňová kultura). V karyogramu linie MDBK jsou vyznačeny některé námi detekované chromozomální aberace.



CLI	SSC	BTA
1p	16/2/16	20/7/20
1q	4/6	3
2p	7/1	10/21
2q	1/10/14/1	8
3p	8	6
3q	10/4/10/9/16	29/16
4p	7	10/21
4q	10/9/18	13/4
5p	4	14
5q	14	26/28
6p	13	1
6q	1	9
7p	14	17
7q	15	2
8p	3	25
8q	9/2	29/15
9p	5	5
9q	3	11
10p	7	23
10q	6/1	24
11p	15/17	27
11q	13	1
12p	8	17
12q	13	22
13p	5	5
13q	17	13
14p	2	7
14q	16	20
15	11	12
16	6	18
17	12	19
X	X	X

**Tabulka 2.** Korespondence mezi konzervovanými homologními segmenty hrošíka (CLI), prasete (SSC) a krávy (BTA). Chromozomální segmenty jsou řazeny od centromery k telomeře.

Naproti tomu, fluorescenční signály individuálních sond připravených z prasečích chromozomů 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 13 a 14 poskytovaly signály na třech různých chromozomech hrošíka. Sonden specifické pro jednotlivá ramena největšího prasečího chromozomu (SSC1p a SSC1q) vykazovaly navzájem velmi odlišné hybridizační profily. Zatímco sonda SSC1p poskytovala jediný fluorescenční signál na p ramenu CLI6, sonda SSC1q hybridizovala na tři oddělené homologní bloky na CLI2. Čtyři chromozomy hrošíka vykazovaly hybridizační signály pocházející ze čtyř různých prasečích sond, které utvářely 4-6 konzervovaných segmentů na chromozomu. Všechny hybridizační výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2.

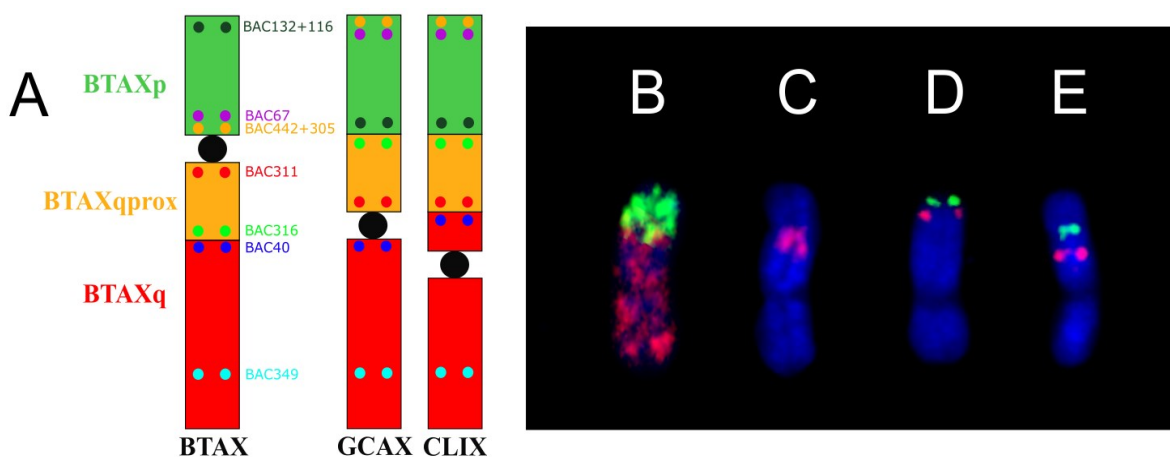
Z důvodu komplexních evolučních přestaveb mezi genomy hrošíka a prasete jsme se rozhodli použít několik vybraných bovinních sond pro upřesnění nalezených hybridizačních konfigurací. Většina těchto sond byla připravena pomocí laserové mikrodisekce (BTA1qd, BTA3, BTA7, BTA10, BTA11, BTA21, BTA24, BTA26, BTA27, BTA28 a BTA29), pouze BTA8, BTA13 a BTAX byly připraveny z DNA chromozomů sortovaných průtokovým cytometrem. Na rozdíl od sond připravených z prasečích chromozomů, každá z individuálních bovinních celochromozomových sond hybridizovala jen na 1-2 chromozomy hrošíka. Například sonda BTA8 poskytovala jediný fluorescenční signál na celém dlouhém rameni CLI2, zatímco na tuto stejnou oblast hybridizovaly tři prasečí sondy (SSC1, SSC10 a SSC14) a utvářely čtyři oddělené homologní segmenty (Tabulka 2).

Pro detailnější mapování přestaveb a určení pozic některých homologních segmentů byly použity BAC

sondy derivované z BTA1, BTA20 a BTA29. Hybridizace BAC sond odhalila, že homolog BTA1 se rozděluje na dva různé chromozomální ramena u dvou odlišných chromozomů hrošíka. Sondy BAC1qp a BAC1qd hybridizovaly na terminální část dlouhého ramene CLI11, zatímco BAC1qt poskytoval signál na proximální části krátkého ramene CLI6. BAC sondy derivované z bovinního chromozomu 20 (BTA20) hybridizovaly na stejném chromozomu hrošíka (CLI1p), avšak překvapivě, signály byly situovány na opačných stranách krátkého ramene CLI1 a obklopovaly tak hybridizační místo sondy BTA7 (kompletní seznam použitých BAC sond je uveden v Tabulce 1 ve Frohlich a kol., 2016 v přílohách této práce).

Sondy specifické pro chromozom X prasete a krávy poskytovaly fluorescenční signály po celé délce chromozomu X u hrošíka. Pro detailnější mapování X chromozomálních přestaveb jsme využili příslušné bovinní sondy, specifické pro jednotlivá ramena (BTAXp, BTAXq), a region specifickou sondu (BTAXqp). BTAXp hybridizovala na distální část CLIXq, zatímco zbývající část chromozomu byla obarvena BTAXq. Pro upřesnění orientace BTAXp a BTAXq ramen na CLIX jsme využili odpovídající BAC sondy, které byly pro evoluční srovnání hybridizovány na metafázní chromozomy žirafy a krávy (Obrázek18)

**Obrázek 18.** (A) Schematická ilustrace ukazující segmenty chromozomu X krávy a jejich orthologní protějšky u hrošíka (CLI) a žirafy (GCA). Malovací sondy specifické pro určitý region a BAC sondy jsou označeny různými barvami. Ukázky FISH na X chromozomu hrošíka s použitými sondami (B) BTAXp (zelená) a BTAXq (červená), (C) BTAXqp. Hybridizace BAC sond (D) BACXpp (zelená) a BACXpm (červená), (E) BACXqp (zelená) a BACXqm1 (červená) na CLIX.



## 5. Diskuze

### 5.1. Rekombinace a její variance u čeledi *Bovidae*

Sexuální reprodukce je z evolučního hlediska velice významným procesem, který vede ke zvýšení genetické rozmanitosti, napomáhá přežívání stávajících druhů a zároveň umožňuje jejich evoluci a vytváření druhů nových (Butlin, 2005). Jedním z nejvýznamnějších procesů, které se odehrávají během pohlavního rozmnožování u naprosté většiny organismů, je meiotická rekombinace. Tento proces zajišťuje během pohlavního rozmnožování fyzické spojení chromatid sesterských chromozomů, čímž napomáhá jejich správné segregaci do dceřiných gamet (Snustad a Simmons, 2008; Vacek, 2006). Důležitost rekombinace podtrhuje skutečnost, že narušení procesu rekombinace je asociováno se zvýšeným rizikem neobstrukční azoospermie a zástavě tvorby gamet u samců celé řady organismů (Hassold a Hunt, 2001; Hawley a Theurkauf, 1993; Rockmill a kol., 1995; Sun a kol., 2004a).

Distribuce a četnost výskytu rekombinačních míst je závislá a ovlivňována mnoha odlišnými faktory. Jedním z těchto faktorů je počet chromozomálních ramen ( $FNa/2$  - Fundamental Number), kde počet přítomných CO v buňce je úměrný počtu chromozomů (respektive počtu jejich ramen) v karyotypu (Dutrillaux, 1986). Z tohoto hlediska se čeleď *Bovidae* jeví jako výborný model pro komparativní studium vlivu počtu chromozomů na rekombinační hodnoty. Jednotliví zástupci čeledi *Bovidae* se vyznačují vysoce homologními karyotypy a i přes často odlišný počet chromozomů ( $2n = 30 - 60$ ) mají velice podobný haploidní počet autozomálních ramen ( $FNa/2 = 23 - 29$ ;  $FNa/2 = 29$  u většiny druhů). Variace v počtu chromozomů a podobnost v počtu chromozomálních ramen u bovidů je způsobena především četnými centrickými/tandemovými fúzemi (Robertsonovské translokace). Za předpokladu, že pro správný průběh meiotického dělení je potřeba alespoň jedna rekombinační událost na chromozomu/rameni chromozomu, dalo by se očekávat velice podobné hodnoty rekombinací u zástupců čeledi *Bovidae* (Kauppi a kol., 2004; Villena a Sapienza, 2001).

Užitím imunofluorescenční detekce meiotických proteinů jsme byli schopni zviditelnit hlavní proteinové součásti meiotického synaptonemálního komplexu (SCP3/SCP1) a místa rekombinačních událostí/CO (MLH1) v meiotických buňkách

testikulární tkáni. Z obdržených výsledků měření počtu CO vyplývá, že byla splněna teze týkající se počtů obligátních CO v meiotických buňkách. U všech zkoumaných druhů, s výjimkou sitatungy, byl pozorován větší počet rekombinací na spermatocyt než je jejich počet chromozomálních ramen ( $FNa/2$ ). Tento podobný trend byl taktéž zaznamenán u ostatních živočišných druhů, jako jsou například myši (Anderson a kol., 1999; Froenicke a kol., 2002), lidé (Lynn a kol., 2002; Sun a kol., 2006a, 2004b) nebo také kočky domácí (Borodin a kol., 2007). Ačkoliv byl průměrný počet rekombinací na spermatocyt u sitatungy nižší než je počet autozomálních ramen, alespoň jeden CO na chromozom byl vždy přítomen. Za předpokladu, že počet rekombinací je druhově specifický a CO jsou nezbytné pro správnou segregaci chromozomů, tak u sitatungy, stejně jako i u jiných živočišných druhů s nižším počtem celkových CO (například primáti), stačí pravděpodobně jen jediná rekombinační událost na celý chromozom. Tuto skutečnost podporuje nalezená korelace mezi diploidním počtem chromozomů ( $2n$ ) a počtem CO, která je sice slabší než je tomu v případě korelace mezi  $FNa/2$  a počtem CO, ale právě u druhů s nízkými frekvencemi CO je zřejmě tato jediná rekombinační událost na chromozom dostačující pro správnou segregaci homologních chromozomů (Garcia-Cruz a kol., 2011).

Jeden z dalších faktorů mající významný vliv na počet rekombinačních událostí je délka autozomálních SC (Lynn a kol., 2002). Napříč všemi druhy byla zaznamenána signifikantní ( $p < 0,001$ ) a silná korelace mezi fyzickou délkou autozomálních SC (v  $\mu\text{m}$ ) a počtem CO na spermatocyt. Obecně pak platí, že jsou-li autozomální synaptonemální komplexy delší, tím více CO se ve spermatocytu nachází. Obdobné korelace byly již publikovány u myši (Froenicke a kol., 2002), lidí (Lynn a kol., 2002; Sun a kol., 2004b) a u dalších placentálních savců (Segura a kol., 2013).

Dalším zkoumaným parametrem v našem souboru zvířat byla hustota rekombinace. Ta byla vypočítávána jako poměr celkového počtu rekombinací k celkové délce autozomálního SC v jednom příslušném spermatocytu (počet CO na jeden mikrometr délky SC) (viz Tabulka 1). Nejmenší zaznamenané hodnoty rekombinační hustoty byly pozorovány u sitatungy, zatímco nejvyšší byly pozorovány u ovce. Nízká hustota rekombinace u sitatungy je pravděpodobně způsobena tím, že délka jejich synaptonemálních komplexů je větší než např. u antilopy losí, která má shodný počet fúzních chromozomů, ale celkový počet CO ve spermatocytech je u sitatungy nejmenší ze všech zkoumaných druhů. Naopak, ovce má velmi podobnou celkovou délku



synaptonemálních komplexů jako sitatunga, avšak její průměrný počet CO na spermatocyt je ze všech zkoumaných druhů nejvyšší. Vypočítaná rekombinační hustota u ovce je jedna z nejvyšších doposud zaznamenaných hustot mezi organismy vůbec (Borodin a kol., 2007; Segura a kol., 2013)

## 5.2. DSB/RAD51 a jejich konverze v CO u *Bovidae*

V časných fázích profáze prvního meiotického dělení dochází ke specifickému (enzymatickému) vytváření dvouřetězcových zlomů (DSB) v DNA, které jsou základním předpokladem pro vznik rekombinační nodulů (CO) v pozdějších fázích profáze I. S využitím imunofluorescenčních metod detekce proteinů RAD51 jsme studovali časnou profázi I u vybraných druhů z čeledi *Bovidae* a z obdržených hodnot počtu iniciálních DSB a finálních počtu CO byly vypočteny poměry konverze DSB/CO. Obdržené hodnoty konverze velice kolísaly mezi zkoumanými druhy od 0,27 naměřených u dik dika (*M. Kirkii*) až po 0,8 u přimorožce šavlorohého (*O. dammah*). Průměrně tyto hodnoty naznačují vysokou míru reparace DSB za vzniku CO u bovidů (průměrný koeficient konverze je 54 %). Obdržené hodnoty konverze DSB/CO jsou mnohonásobně vyšší než hodnoty u myši domácí, u které konverzi do CO podléhalo jen asi 10 % ze všech vytvořených DSB (Cole a kol., 2012; Koehler a kol., 2002). U člověka (u mužů) se míra konverze DSB na CO pohybuje okolo 30 %, jelikož průměrný počet DSB se pohybuje okolo 152,1 na buňku, zatímco průměrný počet CO u lidí je 49,02 (Barlow a kol., 1997; Lynn a kol., 2002).

Příčiny takto vysoké variability v hodnotách konverzní DSB/MLH1 mezi jednotlivými druhy nejsou dnes stále zcela objasněny. V souboru našich dat byla objevena slabá, ale statisticky významná korelace, mezi počtem DSB a výsledným počtem MLH1 míst. To vede k hypotéze, že homeostáza v počtu CO nevyklučuje variabilitu v množství utvářených DSB, ale naopak, že iniciální počet DSB v časných fázích meiózy může nejspíše vyústit v ekvivalentní počet CO v příslušné buňce. Zároveň bylo objeveno, že druhy s nižším počtem chromozomů ( $2n = 20 - 38$ ; GLE, TSP, TST, TOR, NDR, MKI) mají průměrně menší počet rekombinací na spermatocyt, než zvířata s vyšším diploidním číslem ( $2n = 46 - 60$ ; OAR, ONA, HNI, ODA, OGA, KLK). Stejně tomu bylo i v případě

DSB, kdy zvířata s nízkým počtem chromozomů vykazovala menší počet iniciálních DSB v buňkách než ta s vyšším počtem chromozomů.

### 5.3. Rekombinační a centromerická interference

V naší studii zaměřené na vliv centrických fúzí na počty meiotických rekombinací, kterou jsme prováděli na hospodářsky významných druzích (skot, ovce, koza), jsme zjistili, že pozorované rekombinační hodnoty u kozy, paovce a ovce byly signifikantně vyšší, než hodnoty CO u skotu a ostatních již dříve vyšetřovaných/publikovaných druhů. Tato skutečnost naznačuje, že takto vysoké hodnoty rekombinací jsou typické pro *Caprini* a potvrzuje tak tezi, že příbuzné druhy mají velice podobné počty CO (Dumont a Payseur, 2011; Garcia-Cruz a kol., 2011). Navíc, z evolučního hlediska je mladším taxonům přisuzována vyšší průměrná četnost rekombinací, než taxonům evolučně starším (Segura a kol., 2013). *Caprini* jsou jednou z mladších fylogenetických skupin (*Caprini* se od ostatních bovidů oddělili před 20 mil. lety; koza a ovce divergovaly od sebe před 5 mil. lety), a proto se u této skupiny dá očekávat vyšší hodnoty rekombinací (Robinson a Ropiquet, 2011; Ropiquet a Hassanin, 2005).

Naměřené hodnoty rekombinační četnosti u ovce byly významně vyšší, než tomu bylo u býka a příbuzných druhů z *Caprini* (paovce hřivnatá a koza), a to navzdory stejnému fundamentálnímu počtu chromozomálních ramen ( $FNa/2 = 29$ ) a skutečnosti, že v jejím genomu se vyskytují 3 centrické fúze (orthology BTA1;3, BTA2;8, BTA5;11), které by měly naopak být zodpovědné za redukci rekombinací během meiózy.

Právě efekt centrických fúzí byl blíže sledován na chromozomech ovce, kozy a býka (na ortholozích chromozomů 1,2,3,5,8 a 11 skotu) a ukázalo se, že i přes vyšší hodnoty a hustoty rekombinace na fúzních chromozomech ovce jsou relativní hodnoty rekombinace (vypočítány jako procento rekombinací přítomných na příslušných chromozomech z celkového počtu rekombinací na buňku) signifikantně nižší než na odpovídajících chromozomech býka a kozy (26,1 vs. 27,6 a 28,23%, respektive;  $p < 0,001$ ). Rekombinační hodnoty na ovčích metacentrických chromozomech jsou redukovány i přes větší relativní/proporční délku jejich SC (30,27 % z celkové délky SC v buňce), než je tomu u orthologních SC býka a kozy (28,94 % a 27,88 %). Redukce počtu rekombinací není u ovce způsobena žádnou ztrátou chromozomální DNA během evolučního vzniku centrických fúzí, jak již bylo dříve popisováno u jiných bovidů

(Vozdova a kol., 2013), jelikož žádné signifikantní rozdíly v délce těchto orthologních chromozomů (ať již měřením mitotických chromozomů nebo srovnáním dostupných sekvencí v NCBI) nebyly nalezeny. Vezmeme-li v potaz nulové zkrácení genomu a naopak větší délku SC metacentrických chromozomů, relativní redukce v počtu chromozomů může být pravděpodobně způsobena metacentrickou morfologií příslušných ovčích chromozomů, stejně jako to bylo pozorováno u lidských a prasečích dvou-ramenných chromozomů (Lian a kol., 2008; Mary a kol., 2014).

Je uznávaným faktem, že meiotická rekombinace je umlčována v okolí centromer, avšak mechanismus tohoto procesu je doposud neznámý (Hassold a kol., 2000; Youds a Boulton, 2011). Centromerický supresivní efekt může být například vysvětlen vyšší mírou kondenzace a metylace pericentromerického chromatinu, jelikož správný epigenetický status chromatinu je důležitý pro tvorbu CO (Capilla a kol., 2014; Lynn a kol., 2002). Otevřená a nemetylovaná forma chromatinu je preferována pro tvorbu DSB a potažmo i pro vznik CO (Smagulova a kol., 2011).

Dalšími našimi důkazy, které podporují centromerickou interferenci, jsou rozdíly v uspořádání/distribuci CO podél osy SC metacentrických chromozomů ovce a příslušných orthologů býka a kozy. Největší rozdíl byl zaznamenán v případě výskytu 3 MLH1 signálů na jednom rameni příslušného SC a to především v pozici prvního/proximálního (bráno od centromery k telomeře) a druhého MLH1 signálu ( $p < 0,001$  a  $p = 0,003$ , respektive). Tato disparita může být způsobena procesem, jakým se sestavují meiotické SC. Nejprve se jednotlivé homologní chromozomy párují svými telomerickými konci a synapse následně progreduje směrem k centromerám (Barlow a Hultén, 1996; Brown a kol., 2005; Scherthan a kol., 1996). K ustavení prvního rekombinačního místa dochází proto v distálních/telomerických oblastech bez efektu interference. Naproti tomu, proximální MLH1 je z jedné strany ovlivňován centromerickou interferencí (především u metacentrických chromozomů), která zapříčiňuje jeho posunutí distálně, což již bylo popsáno u myši s Robertsonovskými fúzemi (Bidau a kol., 2001; Dumas a Britton-Davidian, 2002). Pozice druhého rekombinačního místa (v případě 3 MLH1 na jednom rameni SC) je z obou stran „stabilizována“ sousedními MLH1, avšak v případě relativně dlouhých ovčích SC může být pozice tohoto místa variabilnější a pod menším tlakem rekombinační interference.

## 5.4. Rekombinace na pohlavních chromozomech a sex-autozomální translokace

Obecně byla u všech našich zkoumaných druhů z čeledi *Bovidae* na pohlavních chromozomech v oblasti PAR sledována velká individuální i mezidruhová variabilita v počtu rekombinací (od 8,7 % spermatocytů vykazujících CO v PAR u přimorožce jihoafrického až k 61,7 % u pakoně bělobradého). Celkově byly frekvence buněk vykazujících CO v PAR relativně nízké. U ostatních skupin savců byly zaznamenány hodnoty rekombinace na PAR mnohem vyšší, například u člověka byl CO v PAR obvykle přítomen až u 73 % buněk, u mundžaka v 60,6 % a u prasat až v 61 % (Mary a kol., 2014; Sun a kol., 2006b; Yang a kol., 2011). Jedna z věcí, která může ovlivňovat a narušovat počet rekombinací na PAR je přítomnost sex-autozomálních translokací. U druhů, které mají tento typ fúzních chromozomů (TIM, TSP), byly rekombinace v pseudoautozomální oblasti méně časté (18 %, respektive 28 %). U těchto zvířat může být nedostatek MLH1 na PAR kompenzován prostřednictvím rekombinačních událostí na autozomální části fúzního chromozomu, podobně, jak to bylo popsáno u čeledi *Gerbillidae* (Ratomponirina a kol., 1986). Nízká frekvence rekombinací v PAR u ostatních druhů *Bovidae* (bez sex-autozomálních fúzí) může být vysvětlena odlišným načasováním a průběhem rekombinace v tomto regionu. Studie na myších ukázaly, že vzájemné párování a rekombinace X-Y v PAR probíhají až v pozdějších fázích profáze I a jsou pod jinou genetickou kontrolou. Za pozdější utváření DSB v PAR je zodpovědná odlišná izoforma proteinu Spo11 $\alpha$  (Kauppi a kol., 2012).

Čeď *Bovidae*, je z hlediska studia fúzí gonozom-autozom ideálním taxonem, jelikož se zde nachází celá řada druhů, kteří mají ve svém genomu tento typ chromozomových přestaveb evolučně zafixován. U všech námi vyšetřovaných druhů, které jsou nositeli sex-autozomálních fúzí, byly v meiotických buňkách pozorovány charakteristické meiotické konfigurace pohlavních chromozomů, jako jsou bivalenty (u TSP a TIM), trivalenty u (TST, TOR a GLE) a kvadrivalent (NDR). Terminální oblast gonozomální části fúzního chromozomu měla vždy zachovanou oblast PAR. Sex-autozomální přestavby jsou u druhů, kde nejsou charakteristickou součástí jejich karyotypu, často spojovány se závažnými (často až letálními) vývojovými vadami a poruchami plodnosti, a to i v případech balancovaných změn (Kim a Kim, 2012; Searle a kol., 1983). To je především způsobeno poruchami v epigenetických modifikacích, jako

jsou například inaktivace chromozomů X u samic nebo meiotické transkripční umlčování sex-chromatinu u samců. Epigenetický umlčovací proces v těchto výjimečných případech může zasahovat až do autozomální části fúzního komplexu a umlčovat tak důležité geny (Barasc a kol., 2012; Cotton a kol., 2014; Homolka a kol., 2007; Kalz-Füller a kol., 1999; Sharp a kol., 2002).

Je známo, že získ autozomálních genů pohlavními chromozomy za současného vytvoření „neo-pohlavních“ chromozomů se událo několikrát během evoluce živočichů (Bachtrog, 2006; Graves, 2006). Tato repozice genetického materiálu vyžaduje novou transkripční regulaci genů lokalizovaných na gonozomálních a autozomálních částech nově vytvořených „neo-X“ a „neo-Y“. Během meiózy podléhají nespárované chromozomální úseky meiotickému umlčování chromatinu, jinak jsou tyto nespárované oblasti/chromozomy rozpoznány meiotickým kontrolním mechanismem a dochází k apoptóze buňky (Turner a kol., 2005). MSCI je v tomto případě součástí MSUC, které je aktivováno asynapsí chromatinu, a vede k fosforylaci histonu H2AX na  $\gamma$ H2AX (prostřednictvím ATR kinázy) u nespárovaného chromatinu. Navádění samotných ATR kináz zprostředkovávají proteiny BRCA1 a HORMAD2 (Kogo a kol., 2012; Turner, 2007; Wojtasz a kol., 2012). Takto umlčený nespárovaný chromatin není rozpoznáván kontrolními mechanizmy meiotického buněčného cyklu a je umožněna další progresse do pozdějších fází cyklu.

U všech analyzovaných druhů se sex-autozomálními translokacemi byla pozorována výrazná imunofluorescence histonů  $\gamma$ H2AX pouze na gonozomální části fúzovaných chromozomů, což nasvědčuje normálnímu průběhu umlčování u pohlavních chromozomů. Zároveň byla sledována intenzivní imunofluorescence HORMAD2 proteinu u nespárovaných regionů „neo-X“ a „neo-Y“ chromozomů, stejně jako to bylo popsáno již dříve u myši (Kogo a kol., 2012; Wojtasz a kol., 2012). Přítomnost  $\gamma$ H2AX a HORMAD2 proteinů jen na nespárovaných úsecích gonozomální části fúzních chromozomů svědčí o regulačních/izolačních mechanismech, které omezují MSCI jen na příslušné nespárované úseky genomu a nedochází tak k progresi umlčování na autozomální část chromozomu. Předpokládá se, že bloky heterochromatinu, jež jsou vmezeřeny mezi autozomální a gonozomální část fúzních chromozomů, mohou sloužit jako bariéry bránící progresi MSCI na genově bohaté autozomální části chromozomů (Dobigny a kol., 2004; Ratomponirina a kol., 1986). Tuto teorii podporuje skutečnost, že všichni námi zkoumaní zástupci *Bovidae* se sex-autozomálními fúzemi mají své pohlavní chromozomy vzniklé

spojením centromerické části autozomu s jedním z konců pohlavního chromozomu. Tyto dvě části nově vzniklého fúzního chromozomu jsou navíc od sebe odděleny různě velkými bloky heterochromatinu (Cernohorska a kol., 2012; J Rubes a kol., 2008b). Přítomnost nespárovaných nehomologních gonozomálních oblastí a heterochromatinových bloků ve fúzních místech hraje s největší pravděpodobností důležitou roli v transkripční regulaci během samčí meiózy.

## 5.5. Průtoková cytometrie a FISH v komparativní cytogenetice

Průtoková cytometrie je metodou, která umožňuje rychlé a kvantitativní karyotypování a vyhledávání chromozomových/genomových aberací. Zároveň využitím sortování chromozomů pomocí cytometru jsme schopni získat velká množství individuálních chromozomů o vysoké čistotě, které jsou vhodné k vytváření genomových knihoven nebo kvalitních FISH sond.

Pomocí průtokové cytometrie byly v našich laboratořích vytvořeny FISH sondy, které byly následně využity v komparativních evolučních studiích u hrošíka liberijského (*Choeropsis liberiensis*, CLI). Čeleď *Hippopotamidae* zahrnuje dva rody, *Hippopotamus* a *Choeropsis*. Karyotyp hrošíka liberijského byl studován poprvé s využitím techniky malování chromozomů (Chromosome Painting). Porovnáním našich hybridizačních dat (použitím prasečích a bovinních malovacích sond) s již publikovanými daty hrocha obojživelného ukázalo na velice blízkou evoluční příbuznost těchto dvou rodů mezi sebou, jelikož oba druhy sdílejí stejný karyotyp.

Většina námi používaných FISH sond poskytovala dobré fluorescenční signály a umožňovaly detekovat i velmi malé homologní úseky. Mezi karyotypem prasete a hrošíka byly odhaleny rozsáhlé genomové přestavby, které však byly očekávány, jelikož se tyto dvě skupiny živočichů od sebe evolučně oddělily přibližně před 80-60 mil. lety (Hassanin a kol., 2012; Kulemzina a kol., 2009). Všechny malovací sondy z autozomů prasete (n=18) hybridizovaly celkem k 45 konzervovaným homologním segmentům na chromozomech hrošíka, zatímco všechny autozomální chromozomy krávy (n=29) mají homologii k celkem 39 různým chromozomálním segmentům. Zároveň, většina z individuálních chromozomů krávy má homologii jen k jednomu konkrétnímu chromozomu

hrošíka. Tyto poznatky pak svědčí o blízké (respektive bližší) evoluční příbuznosti a vysoké chromozomální synténii mezi čeledí *Bovidae* a *Hippopotamidae*.

Fúze orthologních chromozomů BTA26/BTA28 (CAK13 - Cetartiodactyl Ancestral Karyotype Chromosome 13) je jedinou karyotypovou synapomorfii, kterou hroši sdílejí s ostatními druhy ze skupiny *Cetartiodactyla* (výjimkou je čeleď *Bovidae*). Dalším chromozomálním rysem, který je společný pro čeledi *Hippopotamidae*, *Cetacea*, *Camelidae* a *Suidae* je přítomnost disociovaných orthologů BTA13 a BTA17. Nalezeny byly taktéž chromozomové změny, jež jsou specifické pouze pro skupinu *Hippopotamidae*. Jednalo se o případ hybridizace sond z malých chromozomů krávy (BTA20, BTA21 a BTA29) k chromozomům hrošíka, při kterých každá z použitých sond hybridizovala ke dvěma různým chromozomům. Tato skutečnost je velice ojedinělá, jelikož každý z těchto malých chromozomů utváří jen jediný homologní blok u všech zástupců *Cetruminantia* (dokonce i u velryb/*Cetacea*, sesterské skupiny *Hippopotamidae*) (Dementyeva a kol., 2010; Kulemzina a kol., 2009, 2011, 2014, 2016).

Použití FISH sond derivovaných z chromozomů skotu nám umožnilo odhalit nové informace o karyotypu hrošíka a určit specifické chromozomální homologie, které nemohly být vydedukovány z dříve publikovaných hybridizačních dat. Jednalo se například o přestavby orthologů BTA15/BTA29 nebo BTA7/BTA20 v genomu hrošíka. Překvapivě, tyto přestavby specifické jen pro hrochy, byly mnohem komplexnějšího rázu, než se předpokládalo, protože u velryb jsou tyto homologní bloky konzervovány ve formě CAK9 respektive CAK3. Z již dříve publikovaných prací je zřejmé, že tyto chromozomy obsahují evolučně konzervované „hot-spots“ oblasti, které jsou zodpovědné za dramatické a velice komplikované chromozomové přestavby během evoluce (Kulemzina a kol., 2011).

U skupiny *Cetartiodactyla* byla komparativní FISH s celochromozomovými malovacími sondami chromozomu X publikována již řadou autorů (Huang a kol., 2006; Kulemzina a kol., 2009; Lee a kol., 1998), avšak na rozdíl od autozomů, pohlavní chromozomy se odlišují mnohem komplexnějšími chromozomovými přestavbami zahrnující inverze, centromerické posuny a variaci ve velikosti heterochromatinu (Robinson a kol., 1998). Publikace, které popisují detailní strukturu a přestavby chromozomu X jsou vzácné a převážná většina z nich je zaměřena jen na domestikované druhy (Cernohorska a kol., 2013; Gallagher a kol., 1999; Perucatti a kol., 2012). V naší studii, hybridizační profily založené na užití sond BTAXp a BTAXq (sondy specifické pro jednotlivá ramena BTAX) na CLIX nenaznačovaly na přítomnost jakékoliv

chromozomové přestavby kromě repozice (posunu) centromery. Nicméně, hybridizace region specifických a BAC sond z krávy, užitých pro určení orientace p-ramene a q-ramene chromozomu X, odhalila, že CLIX se liší od BTAX nejenom repozicí své centromery, ale taktéž inverzemi postihující část homologní oblasti BTAXp a BTAXq (Obrázek 18). Porovnání námi získaných hybridizačních dat chromozomu X s již existujícími daty u čeledí *Giraffidae*, *Cervidae*, *Bovidae* a *Antilocapridae* poukázalo na vysokou podobnost CLIX s X chromozomem žirafy, přičemž oba chromozomy se od sebe liší jen pozicí centromery za současné konzervace všech ostatních přestaveb.



## 6. Závěr

Řád *Cetartiodactyla*, do kterého řadíme 10 čeledí suchozemských a 12 čeledí akvatických savců, je v současnosti jednou z největších skupin žijících savců na zemi. Z cytogenetického hlediska se jedná o velice heterogenní skupinu organismů a taxonomické rozdělení řádu sudokopytníků do jednotlivých čeledí a podčeledí je obtížné a je stále tématem mnoha diskuzí, stejně jako otázka týkající se jejich monofyletického původu. K upřesnění evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy savců přispívá v současné době velkou měrou komparativní genomika založená na analýze chromosomů pomocí ZOO-FISH.

Jedním z cílů této studie bylo praktické zvládnutí techniky izolace specifické chromozomální DNA pomocí průtokové cytometrie za účelem tvorby chromozomálně specifických FISH sond, které by byly následně použity pro komparativní cytogenetické studie u vybraných druhů sudokopytníků. Pomocí průtokové cytometrie byla získána chromozomální DNA téměř ze všech prasečích a některých bovinních chromosomů. Takto získané hybridizační sondy byly aplikovány na metafázní chromozomy hrošíka liberijského pro zjištění chromozomových homologií. Na základě výsledků byly porovnány karyotypy hrošíka a hrocha obojživelného, který je blízkým příbuzným druhem. Bylo zjištěno, že oba zástupci čeledi *Hippopotamidae* mají téměř shodný karyotyp a že struktura jejich chromozomu X je velice podobná chromozomu X žirafy.

Dalším cílem této disertační práce bylo porovnat frekvence a distribuce rekombinací za využití imunofluorescenčního značení meiotických proteinů a FISH u vybraných druhů z čeledi *Bovidae*. Pozorována byla pozitivní korelace mezi délkou synaptonemálních komplexů a počtem rekombinací, které se na nich nacházely. Čím delší byly SC ve spermatocyту, tím více rekombinačních míst se na nich nacházelo. Distribuce rekombinačních míst byla ovlivněna morfologií samotných chromosomů, přičemž akrocentrické chromozomy měly rekombinace lokalizované prokazatelně více do proximální (centromerické) části chromozomu než sub/metacentrické chromozomy. U všech zkoumaných druhů byla pozorována velmi vysoká mezidruhová a individuální variabilita v celkové délce SC a v počtu CO na buňku.

Meiotická interference byla zkoumána na vybraných druzích z čeledi turovitých s různou konfigurací karyotypu (metacentrické vs. akrocentrické chromozomy). Odhalena byla pozitivní korelace mezi rekombinační interferencí s počtem CO, které se na daném

chromozomu nacházely. Čím více bylo přítomných rekombinačních nodulů na rameni synaptonemálního komplexu, tím více byl mezi nimi znatelný vliv interference. Bylo zjištěno, že na fúzních sub/metacentrických chromozomech dochází k redukci rekombinace v porovnání s jejich akrocentrickými homology u příbuzných druhů a že centromera nepředstavuje bariéru pro působení interference u metacentrických chromozomů.

## 7. Literatura

- Aboussekhra, A., Chanet, R., Adjiri, A., Fabre, F. 1992. Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Mol Cell Biol* 12, 3224–3234.
- Amann, R.P. 2008. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: A need to revisit? *Int J Androl* 29, 469–487.
- Anderson, L.K., Offenberg, H.H., Verkuijlen, W.M.H.C., Heyting, C. 1997. RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6868–6873.
- Anderson, L.K., Reeves, A., Webb, L.M., Ashley, T. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151, 1569–1579.
- Baarends, W.M., Grootegoed, J.A. 2003. Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. *Cytogenet Genome Res* 103, 225–234.
- Bachtrog, D. 2006. A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr Opin Genet.Dev* 6, 578–585.
- Baier, B., Hunt, P., Broman, K.W., Hassold, T. 2014. Variation in genome-wide levels of meiotic recombination is established at the onset of prophase in mammalian males. *PLoS Genet* 10, e1004125.
- Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T., Liskay, R.M. 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* 13, 336–342.
- Balmus, G., Trifonov, V.A., Biltueva, L.S., O'Brien, P.C.M., Alkalaeva, E.S., Fu, B., Skidmore, J.A., Allen, T., Graphodatsky, A.S., Yang, F., Ferguson-Smith, M.A. 2007. Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla ancestral karyotype. *Chromosome Res* 15, 499–514.
- Barasc, H., Mary, N., Letron, R., Calgaro, A., Duzde, A.M., Bonnet, N., Lahbib-Mansais, Y., Yerle, M., Ducos, A., Pinton, A. 2012. Y-autosome translocation interferes with meiotic sex inactivation and expression of autosomal genes: a case study in the pig. *Sex Dev* 6, 143–150.
- Barlow, A.L., Benson, F.E., West, S.C., Hultén, M.A. 1997. Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J* 16, 5207–5215.
- Barlow, A.L., Hultén, M.A. 1998. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 6, 350–358.
- Barlow, A.L., Hultén, M.A. 1996. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4, 562–573.
- Barzel, A., Kupiec, M. 2008. Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat Rev Genet* 9, 27–37.
- Basile, G., Aker, M., Mortimer, R.K. 1992. Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombinational repair gene RAD51. *Mol Cell Biol* 12, 3235–3246.
- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J.P., Jasin, M., Keeney, S. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6, 989–998.
- Baumann, P., West, S.C. 1998. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* 23, 247–251.

- Bernstein, H., Bernstein, C., E., R. 2011. Meiosis as an evolutionary adaptation for DNA repair, in: Kruman, I. (Ed.), DNA Repair. InTech.
- Bidau, C.J., Giménez, M.D., Palmer, C.L., Searle, J.B. 2001. The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* 87, 305–313.
- Bininda-Emonds, O.R.P., Cardillo, M., Jones, K.E., MacPhee, R.D.E., Beck, R.M.D., Grenyer, R., Price, S.A., Vos, R.A., Gittleman, J.L., Purvis, A. 2007. The delayed rise of present-day mammals. *Nature* 446, 507–512.
- Bishop, D.K. 1994. RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* 79, 1081–1092.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., Kleckner, N. 1992. DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69, 439–456.
- Bishop, D.K., Zickler, D. 2004. Early decision: Meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell* 117, 9–15.
- Black, B.E., Jansen, L.E.T., Foltz, D.R., Cleveland, D.W. 2010. Centromere identity, function, and epigenetic propagation across cell divisions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75, 403–418.
- Blennow, E., Telenius, H., Larsson, C., de Vos, D., Bajalica, S., Ponder, B.A., Nordenskjöld, M. 1992. Complete characterization of a large marker chromosome by reverse and forward chromosome painting. *Hum Genet* 90, 371–374.
- Bogdanov, I.F. 2003. Variation and evolution of meiosis. *Genetika* 39, 453–73.
- Bolor, H., Mori, T., Nishiyama, S., Ito, Y., Hosoba, E., Inagaki, H., Kogo, H., Ohye, T., Tsutsumi, M., Kato, T., Tong, M., Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Kitaoka, E., Sawada, T., Nishiyama, Y., Udagawa, Y., Kurahashi, H. 2009. Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet* 84, 14–20.
- Borodin, P.M., Karamysheva, T.V., Rubtsov, N.B. 2007. Immunofluorescent analysis of meiotic recombination in the domestic cat. *Cell Tiss. Biol.* 1, 503–507.
- Boschman, G.A., Buys, C.H., van der Veen, A.Y., Rens, W., Osinga, J., Slater, R.M., Aten, J.A. 1993. Identification of a tumor marker chromosome by flow sorting, DNA amplification in vitro, and in situ hybridization of the amplified product. *Genes Chromosomes Cancer* 6, 10–16.
- Boschman, G.A., Rens, W., Manders, E.M., Slater, R.M., Versteeg, R., Aten, J.A. 1992. Detection of recurrent chromosome abnormalities in Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor cells using bivariate flow karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 375–384.
- Broman, K.W., Rowe, L.B., Churchill, G.A., Paigen, K. 2002. Crossover interference in the mouse. *Genetics* 160, 1123–1131.
- Broman, K.W., Weber, J.L. 2000. Characterization of human crossover interference. *Am J Hum Genet* 66, 1911–1926.
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., Tannergård, P., Bollag, R.J., Godwin, A.R., Ward, D.C., Nordenskjöld, M., Fishel, R., Kolodner, R., Liskay, R.M. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258–261.
- Brown, P.W., Judis, L., Chan, E.R., Schwartz, S., Seftel, A., Thomas, A., Hassold, T.J. 2005. Meiotic synapsis proceeds from a limited number of subtelomeric sites in the human male. *Am J Hum Genet* 77, 556–566.

- Buard, J., de Massy, B. 2007. Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots. *TIG* 23, 301–309.
- Buckland, R.A., Evans, H.J. 1978. Cytogenetic aspects of phylogeny in the *Bovidae*. *Cytogenet Genome Res* 21, 42–63.
- Butlin, R.K. 2005. Recombination and speciation. *Mol. Ecol.* 14, 2621–2635.
- Cabelova, K., Kubickova, S., Cernohorska, H., Rubes, J. 2012. Male-specific repeats in wild *Bovidae*. *J Appl Genetics* 53, 423–433.
- Capilla, L., Medarde, N., Alemany-Schmidt, A., Oliver-Bonet, M., Ventura, J., Ruiz-Herrera, A. 2014. Genetic recombination variation in wild Robertsonian mice: on the role of chromosomal fusions and Prdm9 allelic background. *Proc Biol Sci* 281.
- Carlton, P.M., Farruggio, A.P., Dernburg, A.F. 2006. A link between meiotic prophase progression and crossover control. *PLoS Genet* 2, e12.
- Carrano, A.V., Gray, J.W., Langlois, R.G., Burkhart-Schultz, K.J., Van Dilla, M.A. 1979. Measurement and purification of human chromosomes by flow cytometry and sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1382–1384.
- Carter, N.P. 1994. Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 18, 2–10.
- Cernohorska, H., Kubickova, S., Kopecna, O., Kulemzina, A.I., Perelman, P.L., Elder, F.F.B., Robinson, T.J., Graphodatsky, A.S., Rubes, J. 2013. Molecular cytogenetic insights to the phylogenetic affinities of the giraffe (*Giraffa camelopardalis*) and pronghorn (*Antilocapra americana*). *Chromosome Res* 21, 447–460.
- Cernohorska, H., Kubickova, S., Kopecna, O., Vozdova, M., Matthee, C.A., Robinson, T.J., Rubes, J. 2015. *Nanger*, *Eudorcas*, *Gazella*, and *Antilope* form a well-supported chromosomal clade within *Antilopini* (*Bovidae*, *Cetartiodactyla*). *Chromosoma* 124, 235–247.
- Cernohorska, H., Kubickova, S., Vahala, J., Robinson, T.J., Rubes, J. 2011. Cytotypes of Kirk's dik-dik (*Madoqua kirkii*, *Bovidae*) show multiple tandem fusions. *Cytogenet Genome Res* 132, 255–263.
- Cernohorska, H., Kubickova, S., Vahala, J., Rubes, J. 2012. Molecular insights into X;BTA5 chromosome rearrangements in the tribe *Antilopini* (*Bovidae*). *Cytogenet Genome Res* 136, 188–198.
- Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H. 2004. Comparative analysis (*Hippotragini* versus *Caprini*, *Bovidae*) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by in situ restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. *Genetica* 121, 315–325.
- Chen, J.Z., Gokden, N., Greene, G.F., Mukunyadzi, P., Kadlubar, F.F. 2002. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res* 62, 6470–6474.
- Cheung, V.G., Burdick, J.T., Hirschmann, D., Morley, M. 2007. Polymorphic variation in human meiotic recombination. *Am J Hum Genet* 80, 526–530.
- Choo, K.H.A. 1998. Why is the centromere so cold? *Genome Res* 8, 81–82.
- Chowdhary, B.P., Raudsepp, T. 2001. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci* 23, 37–55.
- Chowdhury, R., Bois, P.R.J., Feingold, E., Sherman, S.L., Cheung, V.G. 2009. Genetic analysis of variation in human meiotic recombination. *PLoS Genet* 5.
- Chua, P.R., Roeder, G.S. 1997. Tam1, a telomere-associated meiotic protein, functions in chromosome synapsis and crossover interference. *Genes Dev* 11, 1786–1800.

- Cloutier, J.M., Turner, J.M.A. 2010. Meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* 20, R962-963.
- Cohen, P.E., Pollack, S.E., Pollard, J.W. 2006. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27, 398–426.
- Cole, F., Kauppi, L., Lange, J., Roig, I., Wang, R., Keeney, S., Jasin, M. 2012. Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat Cell Biol* 14, 424–430.
- Colombo, P.C., Jones, G.H. 1997. Heredity - Abstract of article: Chiasma interference is blind to centromeres. *Heredity* 79, 214–227.
- Cooke, A., Gillard, E.F., Yates, J.R.W., Mitchell, M.J., Aitken, D.A., Weir, D.M., Affara, N.A., Ferguson-Smith, M.A. 1988. X Chromosome deletions detectable by flow cytometry in some patients with steroid sulphatase deficiency (X-linked ichthyosis). *Hum Genet* 79, 49–52.
- Cooke, A., Tolmie, J.L., Colgan, J.M., Greig, C.M., Connor, J.M. 1989. Detection of an unbalanced translocation (4;14) in a mildly retarded father and son by flow cytometry. *Hum Genet* 83, 83–87.
- Coop, G., Wen, X., Ober, C., Pritchard, J.K., Przeworski, M. 2008. High-resolution mapping of crossovers reveals extensive variation in fine-scale recombination patterns among humans. *Science* 319, 1395–1398.
- Costa, Y., Speed, R., Öllinger, R., Alsheimer, M., Semple, C.A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Höög, C., Benavente, R., Cooke, H.J. 2005. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 118, 2755–2762.
- Cotton, A.M., Chen, C.-Y., Lam, L.L., Wasserman, W.W., Kobor, M.S., Brown, C.J. 2014. Spread of X-chromosome inactivation into autosomal sequences: role for DNA elements, chromatin features and chromosomal domains. *Hum Mol Genet* 23, 1211–1223.
- de Boer, E., Stam, P., Dietrich, A.J.J., Pastink, A., Heyting, C. 2006. Two levels of interference in mouse meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9607–9612.
- de Massy, B. 2003. Distribution of meiotic recombination sites. *TIG* 19, 514–522.
- Dean, P.N., Pinkel, D. 1978. High resolution dual laser flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 26, 622–627.
- Dementyeva, P.V., Trifonov, V.A., Kulemzina, A.I., Graphodatsky, A.S. 2010. Reconstruction of the putative *Cervidae* ancestral karyotype by chromosome painting of Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) with dromedary probes. *Cytogenet Genome Res* 128, 228–235.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., Villeneuve, A.M. 1998. Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94, 387–398.
- Dilla, M.A.V., Truiullo, T.T., Mullaney, P.F., Coultex, J.R. 1969. Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163, 1213–1214.
- Dittrich, W., Göhde, W. 1969. Impulse fluorometry of single cells in suspension. *Z Naturforsch B* 24, 360–361.
- Dobigny, G., Ozouf-Costaz, C., Bonillo, C., Volobouev, V. 2004. Viability of X-autosome translocations in mammals: an epigenomic hypothesis from a rodent case-study. *Chromosoma* 113, 34–41.

- Dudin, G., Cremer, T., Schardin, M., Hausmann, M., Bier, F., Cremer, C. 1987. A method for nucleic acid hybridization to isolated chromosomes in suspension. *Hum Genet* 76, 290–292.
- Dumas, D., Britton-Davidian, J. 2002. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: Comparison of chiasma distribution patterns in standard and Robertsonian populations of the house mouse. *Genetics* 162, 1355–1366.
- Dumont, B.L., Payseur, B.A. 2011. Evolution of the genomic recombination rate in murid rodents. *Genetics* 187, 643–657.
- Dutrillaux, B. 1986. Role of chromosomes in evolution: a new interpretation. *Ann Genet* 29, 69–75.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., Pollard, J.W., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R. 1996. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85, 1125–1134.
- Egel, R. 1995. The synaptonemal complex and the distribution of meiotic recombination events. *Trends Genet* 11, 206–208.
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A. 1996. Laser Capture Microdissection. *Science* 274, 998–1001.
- Engh, G.V.D., Trask, B., Gray, J., Lansdorp, P. 1988. Improved resolution of flow cytometric measurements of Hoechst and Chromomycin-A3 stained human chromosomes after addition of citrate and sulfite. *Cytometry* 9, 266–270.
- Ferguson-Smith, M.A., Trifonov, V. 2007. Mammalian karyotype evolution. *Nat Rev Genet* 8, 950–962.
- Ferguson-Smith, M.A., Yang, F., O'Brien, P.C.M. 1998. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. *ILAR J* 39, 68–76.
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., Nussenzweig, A. 2003. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4, 497–508.
- Filippo, J.S., Sung, P., Klein, H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biophys.* 77, 229–257.
- Fledel-Alon, A., Wilson, D.J., Broman, K., Wen, X., Ober, C., Coop, G., Przeworski, M. 2009. Broad-scale recombination patterns underlying proper disjunction in humans. *PLoS Genet* 5.
- Foss, E., Lande, R., Stahl, F.W., Steinberg, C.M. 1993. Chiasma interference as a function of genetic distance. *Genetics* 133, 681–691.
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., Benavente, R. 2012. The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res* 2012 318, 1340–1346.
- Freeman, S., Hamilton, H. 2005. *Biological science*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Froenicke, L., Anderson, L.K., Wienberg, J., Ashley, T. 2002. Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am J Hum Genet* 71, 1353–1368.
- Froenicke, L., Caldés, M.G., Graphodatsky, A., Müller, S., Lyons, L.A., Robinson, T.J., Volleth, M., Yang, F., Wienberg, J. 2006. Are molecular cytogenetics and bioinformatics suggesting diverging models of ancestral mammalian genomes? *Genome Res* 16, 306–310.
- Frohlich, J., Kubickova, S., Cernohorska, H., Musilová, P., Muskova, H., Rubes, J. 2016. A comparative study of pygmy hippopotamus (*Choeropsis liberiensis*) karyotype by cross-

- species chromosome painting. *J Mamm Evol.* 10.1007/s10914-016-9358-5 (Accepted 4. 10. 2016)
- Frohlich, J., Vozdova, M., Kubickova, S., Cernohorska, H., Sebestova, H., Rubes, J. 2015. Variation of meiotic recombination rates and MLH1 foci distribution in spermatocytes of cattle, sheep and goats. *Cytogenet Genome Res* 146, 211–221.
- Frönicke, L., Chowdhary, B.P., Scherthan, H., Gustavsson, I. 1996. A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mamm Genome* 7, 285–290.
- Gallagher, D.S., Davis, S.K., De Donato, M., Burzlaff, J.D., Womack, J.E., Taylor, J.F., Kumamoto, A.T. 1999. A molecular cytogenetic analysis of the tribe *Bovini* (*Artiodactyla: Bovidae: Bovinae*) with an emphasis on sex chromosome morphology and NOR distribution. *Chromosome Res* 7, 481–492.
- Gallagher, D.S., Womack, J.E. 1992. Chromosome conservation in the *Bovidae*. *J Hered* 83, 287–298.
- Garcia-Cruz, R., Pacheco, S., Brieño, M.A., Steinberg, E.R., Mudry, M.D., Ruiz-Herrera, A., Garcia-Caldés, M. 2011. A comparative study of the recombination pattern in three species of *Platyrrhini* monkeys (primates). *Chromosoma* 120, 521–530.
- Goldammer, T., Weikard, R., Brunner, R.M., Schwerin, M. 1996. Generation of chromosome fragment specific bovine DNA sequences by microdissection and DOP-PCR. *Mamm Genome* 7, 291–296.
- Graves, J.A.M. 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124, 901–914.
- Gray, J.W., Carrano, A.V., Moore, D.H., Steinmetz, L.L., Minkler, J., Mayall, B.H., Mendelsohn, M.L., Dilla, M.A.V. 1975a. High-speed quantitative karyotyping by flow microfluorometry. *Clin Chem* 21, 1258–1262.
- Gray, J.W., Carrano, A.V., Steinmetz, L.L., Van Dilla, M.A., Moore, D.H., Mayall, B.H., Mendelsohn, M.L. 1975b. Chromosome measurement and sorting by flow systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1231–1234.
- Gray, J.W., Langlois, R.G., Carrano, A.V., Burkhart-Schulte, K., Dilla, M.A.V. 1979. High resolution chromosome analysis: one and two parameter flow cytometry. *Chromosoma* 73, 9–27.
- Green, D.K., Fantes, J.A., Buckton, K.E., Elder, J.K., Malloy, P., Carothers, A., Evans, H.J. 1984. Karyotyping and identification of human chromosome polymorphisms by single fluorochrome flow cytometry. *Hum Genet* 66, 143–146.
- Gribble, S., Ng, B.L., Prigmore, E., Burford, D.C., Carter, N.P. 2004. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res* 12, 143–151.
- Gribble, S.M., Ng, B.L., Prigmore, E., Fitzgerald, T., Carter, N.P. 2009. Array painting: a protocol for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *Nat Protoc* 4, 1722–1736.
- Groves, C., Grubb, P. 2011. *Ungulate Taxonomy*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Gruhn, J.R., Rubio, C., Broman, K.W., Hunt, P.A., Hassold, T. 2013. Cytological studies of human meiosis: Sex-specific differences in recombination originate at, or prior to, establishment of double-strand breaks. *PLoS One* 8.
- Gygi, M.P., Ferguson, M.D., Mefford, H.C., Lund, K.P., O’Day, C., Zhou, P., Friedman, C., van den Engh, G., Stolowitz, M.L., Trask, B.J. 2002. Use of fluorescent sequence-specific polyamides to discriminate human chromosomes by microscopy and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 30, 2790–2799.



- Handel, M.A. 2004. Handel, M.A. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res* 296, 57-63. *Exp cell res* 296, 57–63.
- Harris, P., Boyd, E., Ferguson-Smith, M.A. 1985. Optimising human chromosome separation for the production of chromosome-specific DNA libraries by flow sorting. *Hum Genet* 70, 59–65.
- Harris, P., Cooke, A., Boyd, E., Young, B.D., Ferguson-Smith, M.A. 1987. The potential of family flow karyotyping for the detection of chromosome abnormalities. *Hum Genet* 76, 129–133.
- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Jansen van Vuuren, B., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskou, V., Nguyen, T.T., Couloux, A. 2012. Pattern and timing of diversification of *Cetartiodactyla* (*Mammalia*, *Laurasiatheria*), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies* 335, 32–50.
- Hassold, T., Hansen, T., Hunt, P., VandeVoort, C. 2009. Cytological studies of recombination in rhesus males. *Cytogenet Genome Res* 124, 132–138.
- Hassold, T., Hunt, P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2, 280–291.
- Hassold, T., Sherman, S., Hunt, P. 2000. Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum Mol Genet* 9, 2409–19.
- Hawley, R.S., Theurkauf, W.E. 1993. Requiem for distributive segregation: achiasmate segregation in *Drosophila* females. *TIG* 9, 310–316.
- Heller, C.H., Clermont, Y. 1964. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog. Horm. Res.* 20, 545–575.
- Henderson, K.A., Keeney, S. 2005. Synaptonemal complex formation: where does it start? *Bioessays* 27, 995–998.
- Heppell-Parton, A.C., Albertson, D.G., Fishpool, R., Rabbitts, P.H. 1994. Multicolour fluorescence in situ hybridisation to order small, single-copy probes on metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet* 66, 42–47.
- Heyer, W.-D., Kohli, J. 1994. Homologous recombination. *Experientia* 50, 189–191.
- Heyting, C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 8, 389–396.
- Hollingsworth, N.M., Brill, S.J. 2004. The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* 18, 117–125.
- Holstein, A.-F., Schulze, W., Davidoff, M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 107.
- Höltke, H.J., Ankenbauer, W., Mühlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R., Walter, T. 1995. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids-an overview. *Cell Mol Biol* 41, 883–905.
- Homolka, D., Ivanek, R., Capkova, J., Jansa, P., Forejt, J. 2007. Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res* 17, 1431–1437.
- Howarth, K., Blood, K., Ng, B., Beavis, J., Chua, Y., Cooke, S., Raby, S., Ichimura, K., Collins, V., Carter, N., Edwards, P. 2008. Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene* 27, 3345–3359.
- Hsu, T.C., Benirschke, K. 2013. *An Atlas of Mammalian chromosomes*. Springer Science & Business Media.
- Hsu, T.C., Benirschke, K. 1977. Hippopotamus amphibius (Nile hippopotamus), in: *An Atlas of Mammalian Chromosomes*. Springer New York, pp. 225–228.

- Huang, L., Chi, J., Nie, W., Wang, J., Yang, F. 2006. Phylogenomics of several deer species revealed by comparative chromosome painting with Chinese muntjac paints. *Genetica* 127, 25–33.
- Iannuzzi, L., Di Meo, G.P., Perucatti, A., Incarnato, D., Schibler, L., Crihiu, E.P. 2000. Comparative FISH mapping of bovid X chromosomes reveals homologies and divergences between the subfamilies bovinæ and caprinæ. *Cytogenet Cell Genet* 89, 171–176.
- Iannuzzi, L., King, W.A., Di Bernardino, D. 2009. Chromosome evolution in domestic bovids as revealed by chromosome banding and FISH-mapping techniques. *Cytogenet. Genome Res* 126, 49–62.
- Jensen, R.H. 1977. Chromomycin A3 as a fluorescent probe for flow cytometry of human gynecologic samples. *J Histochem Cytochem* 25, 573–579.
- Jones, G.H., Franklin, F.C.H. 2006. Meiotic crossing-over: Obligation and interference. *Cell* 126, 246–248.
- Jordan, P. 2006. Initiation of homologous chromosome pairing during meiosis. *Biochem Soc Trans* 34, 545.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818–821.
- Kalz-Füller, B., Slegers, E., Schwantz, G., Schubert, R. 1999. Characterisation, phenotypic manifestations and X-inactivation pattern in 14 patients with X-autosome translocations. *Clin. Genet.* 55, 362–366.
- Kauppi, L., Jasin, M., Keeney, S. 2012. The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis. *Ann N Y Acad Sci* 1267, 18–23.
- Kauppi, L., Jeffreys, A.J., Keeney, S. 2004. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet* 5, 413–424.
- Keeney, S. (Ed.) 2009a. Parallel detection of crossovers and noncrossovers in mouse germ cells - Springer, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Keeney, S. (Ed.) 2009b. Modulating and targeting meiotic double-strand breaks in *saccharomyces cerevisiae* - Springer, *Methods in molecular Biology*. Humana Press.
- Keeney, S. (Ed.) 2009c. Cytological analysis of interference in mouse meiosis - Springer, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press.
- Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375–384.
- Kim, J., Kim, H. 2012. Recruitment and biological consequences of histone modification of H3K27me3 and H3K9me3. *ILAR J* 53, 232–239.
- Kitani, Y. 1978. Absence of interference in association with gene conversion in *Sordaria Fimicola* and presence of interference in association with ordinary recombination. *Genetics* 89, 467–497.
- Kittnar, O. 2011. Lékařská fyziologie. Grada Publishing a.s.
- Kleckner, N., Zickler, D., Jones, G.H., Dekker, J., Padmore, R., Henle, J., Hutchinson, J. 2004. A mechanical basis for chromosome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12592–12597.
- Koehler, K.E., Cherry, J.P., Lynn, A., Hunt, P.A., Hassold, T.J. 2002. Genetic control of mammalian meiotic recombination I. Variation in exchange frequencies among males from inbred mouse strains. *Genetics* 162, 297–306.
- Koehler, K.E., Hawley, R.S., Sherman, S., Hassold, T. 1996. Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5 Spec No, 1495–1504.

- Kogo, H., Tsutsumi, M., Inagaki, H., Ohye, T., Kiyonari, H., Kurahashi, H. 2012. *HORMAD2* is essential for synapsis surveillance during meiotic prophase via the recruitment of ATR activity. *Genes Cells* 17, 897–912.
- Kong, A., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Masson, G., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Walters, G.B., Jonasdottir, A., Gylfason, A., Kristinsson, K.T., Gudjonsson, S.A., Frigge, M.L., Helgason, A., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K. 2010. Fine-scale recombination rate differences between sexes, populations and individuals. *Nature* 467, 1099–1103.
- Kong, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Masson, G., Helgason, A., Gudbjartsson, D.F., Jonsdottir, G.M., Gudjonsson, S.A., Sverrisson, S., Thorlacius, T., Jonasdottir, A., Hardarson, G.A., Palsson, S.T., Frigge, M.L., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K. 2008. Sequence variants in the *RNF212* gene associate with genome-wide recombination rate. *Science* 319, 1398–1401.
- Kopecna, O., Kubickova, S., Cernohorska, H., Cabelova, K., Vahala, J., Martinkova, N., Rubes, J. 2014. Tribe-specific satellite DNA in non-domestic *Bovidae*. *Chromosome Res* 22, 277–291.
- Kopecna, O., Kubickova, S., Cernohorska, H., Cabelova, K., Vahala, J., Rubes, J. 2012. Isolation and comparison of tribe-specific centromeric repeats within *Bovidae*. *J Appl Genetics* 53, 193–202.
- Krumlauf, R., Jeanpierre, M., Young, B.D. 1982. Construction and characterization of genomic libraries from specific human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2971–2975.
- Kubickova, S., Cernohorska, H., Musilova, P., Rubes, J. 2002. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res* 10, 571–577.
- Kulemzina, A.I., Perelman, P.L., Grafodatskaya, D.A., Nguyen, T.T., Thompson, M., Roelke-Parker, M.E., Graphodatsky, A.S. 2014. Comparative chromosome painting of pronghorn (*Antilocapra americana*) and saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) karyotypes with human and dromedary camel probes. *BMC Genetics* 15, 68.
- Kulemzina, A.I., Proskuryakova, A.A., Beklemisheva, V.R., Lemskaya, N.A., Perelman, P.L., Graphodatsky, A.S. 2016. Comparative chromosome map and heterochromatin features of the Gray Whale karyotype (*Cetacea*). *Cytogenet Genome Res* 148,25-34
- Kulemzina, A.I., Trifonov, V.A., Perelman, P.L., Rubtsova, N.V., Volobuev, V., Ferguson-Smith, M.A., Stanyon, R., Yang, F., Graphodatsky, A.S. 2009. Cross-species chromosome painting in *Cetartiodactyla*: Reconstructing the karyotype evolution in key phylogenetic lineages. *Chromosome Res* 17, 419–436.
- Kulemzina, A.I., Yang, F., Trifonov, V.A., Ryder, O.A., Ferguson-Smith, M.A., Graphodatsky, A.S. 2011. Chromosome painting in *Tragulidae* facilitates the reconstruction of *Ruminantia* ancestral karyotype. *Chromosome Res* 19, 531–539.
- Lalande, M., Kunkel, L.M., Flint, A., Latt, S.A. 1984. Development and use of metaphase chromosome flow-sorting methodology to obtain recombinant phage libraries enriched for parts of the human X chromosome. *Cytometry* 5, 101–107.
- Langford, C.F., Miller, N.G.A., Tucker, E.M., Telenius, H., Thomsen, P.D. 1993. Preparation of chromosome-specific paints and complete assignment of chromosomes in the pig flow karyotype. *Anim Genet* 24, 261–267.
- Langlois, R.G., Carrano, A.V., Gray, J.W., Dilla, M.A.V. 1980. Cytochemical studies of metaphase chromosomes by flow cytometry. *Chromosoma* 77, 229–251.
- Langlois, R.G., Jensen, R.H. 1979. Interactions between pairs of DNA-specific fluorescent stains bound to mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 72–79.

- Latt, S.A., Sahar, E., Eisenhard, M.E., Juergens, L.A. 1980. Interactions between pairs of DNA-binding dyes: Results and implications for chromosome analysis. *Cytometry* 1, 2–12.
- Latt, S.A., Wohlleb, J.C. 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52, 297–316.
- Laurie, D.A., Hultén, M.A. 1985. Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49, 203–14.
- Lebo, R.V., Anderson, L.A., Lau, Y.F., Flandermeyer, R., Kan, Y.W. 1986a. Flow-sorting analysis of normal and abnormal human genomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 169–176.
- Lebo, R.V., Chakravarti, A., Buetow, K.H., Cheung, M.C., Cann, H., Cordell, B., Goodman, H. 1983. Recombination within and between the human insulin and beta-globin gene loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4808–4812.
- Lebo, R.V., Golbus, M.S., Cheung, M.C. 1986b. Detecting abnormal human chromosome constitutions by dual laser flow cytogenetics. *Am J Med Genet* 25, 519–529.
- Lee, C., Griffin, D.K., O'Brien, P.C., Yang, F., Lin, C.C., Ferguson-Smith, M.A. 1998. Defining the anatomy of the *Rangifer tarandus* sex chromosomes. *Chromosoma* 107, 61–69.
- Lemieux, N., Dutrillaux, B., Viegas-Péquignot, E. 1992. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59, 311–312.
- Li, G.-M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18, 85–98.
- Lian, J., Yin, Y., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Ko, E., Turek, P., Sun, F., Martin, R.H. 2008. Variation in crossover interference levels on individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* 17, 2583–2594.
- Liu, Y., Wu, J., Yan, G., Hou, R., Zhuang, D., Chen, L., Pang, Q., Zhu, J. 2010. Proteomic analysis of prolactinoma cells by immuno-laser capture microdissection combined with online two-dimensional nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry. *Proteome Sci* 8, 2.
- Lodé, T. 2011. Sex is not a solution for reproduction: the libertine bubble theory. *Bioessays* 33, 419–422.
- Lynn, A., Ashley, T., Hassold, T. 2004. Variation in human meiotic recombination. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 317–349.
- Lynn, A., Koehler, K.E., Judis, L., Chan, E.R., Cherry, J.P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P.A., Hassold, T.J. 2002. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296, 2222–2225.
- Ma, Y., Lee, J.-H., Li, L.C., Uchiyama, S., Ohmido, N., Fukui, K. 2005. Fluorescent labeling of plant chromosomes in suspension by FISH. *Genes Genet Sys* 80, 35–39.
- Macas, J., Dolezel, J., Gualberti, G., Pich, U., Schubert, I., Lucretti, S. 1995. Primer-induced labeling of pea and field bean chromosomes in situ and in suspension. *BioTechniques* 19, 402-404-408.
- Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., Burgoyne, P.S. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27, 271–276.
- Martini, E., Diaz, R.L., Hunter, N., Keeney, S. 2006. Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* 126, 285–295.
- Mary, N., Barasc, H., Ferchaud, S., Billon, Y., Meslier, F., Robelin, D., Calgaro, A., Loustau-Dudez, A.-M., Bonnet, N., Yerle, M., Acloque, H., Ducos, A., Pinton, A. 2014. Meiotic recombination analyses of individual chromosomes in male domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *PLoS One* 9.

- Masson, J.-Y., West, S.C. 2001. The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends Biochem Sci* 26, 131–136.
- Matise, T.C., Chen, F., Chen, W., De La Vega, F.M., Hansen, M., He, C., Hyland, F.C.L., Kennedy, G.C., Kong, X., Murray, S.S., Ziegler, J.S., Stewart, W.C.L., Buyske, S. 2007. A second-generation combined linkage–physical map of the human genome. *Genome Res* 17, 1783–1786.
- McKim, K.S., Hayashi-Hagihara, A. 1998. mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev* 12, 2932–2942.
- Meuwissen, R.L., Offenberger, H.H., Dietrich, A.J., Riesewijk, A., van Iersel, M., Heyting, C. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11, 5091–5100.
- Moens, P.B., Kolas, N.K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P.E., Spyropoulos, B. 2002. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115, 1611–1622.
- Moens, P.B., Marcon, E., Shore, J.S., Kochakpour, N., Spyropoulos, B. 2007. Initiation and resolution of interhomolog connections: crossover and non-crossover sites along mouse synaptonemal complexes. *J Cell Sci* 120, 1017–1027.
- Moens, P.B., Pearlman, R.E. 1988. Chromatin organization at meiosis. *Bioessays* 9, 151–153.
- Morelli, M.A., Cohen, P.E. 2005. Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130, 761–781.
- Morita, T., Yoshimura, Y., Yamamoto, A., Murata, K., Mori, M., Yamamoto, H., Matsushiro, A. 1993. A mouse homolog of the *Escherichia coli* recA and *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6577–6580.
- Mortimer, R.K., Fogel, S. 1974. Genetical interference and gene Cconversion, in: Grell, R.F. (Ed.), *Mechanisms in Recombination*. Springer US, 263–275.
- Moses, M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* 2, 215–218.
- Muller, H.J. 1916. The mechanism of crossing-over. *The American Naturalist*, New York.
- Murphy, W.J., Pringle, T.H., Crider, T.A., Springer, M.S., Miller, W. 2007. Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. *Genome Res* 17, 413–421.
- 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, 321–324.
- Nederlof, P.M., van der Flier, S., Wiegant, J., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ploem, J.S., van der Ploeg, M. 1990. Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 11, 126–131.
- Ng, B.L., Carter, N.P. 2010. Laser excitation power and the flow cytometric resolution of complex karyotypes. *Cytometry* 77, 585–588.
- Ng, B.L., Carter, N.P. 2006. Factors affecting flow karyotype resolution. *Cytometry* 69, 1028–1036.
- Ng, B.L., Yang, F., Carter, N.P. 2007. Flow analysis and sorting of microchromosomes (<3Mb). *Cytometry* 71, 410–413.
- Nguyen, T.T., Aniskin, V.M., Gerbault-Seureau, M., Planton, H., Renard, J.P., Nguyen, B.X., Hassanin, A., Volobouev, V.T. 2008. Phylogenetic position of the saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) inferred from cytogenetic analysis of eleven species of *Bovidae*. *Cytogenet Genome Res* 122, 41–54.

- Odorisio, T., Rodriguez, T.A., Evans, E.P., Clarke, A.R., Burgoyne, P.S. 1998. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nature Genetics* 18, 257–261.
- Offenberg, H.H., Schalk, J.A.C., Meuwissen, R.L.J., Aalderen, M. van, Kester, H.A., Dietrich, A.J.J., Heyting, C. 1998. SCP2: A major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucl Acids Res* 26, 2572–2579.
- Palotie, A., Heiskanen, M., Laan, M., Horelli-Kuitunen, N. 1996. High-resolution fluorescence in situ hybridization: a new approach in genome mapping. *Ann Med* 28, 101–106.
- Pardue, M.L., Gall, J.G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168, 1356–1358.
- Perucatti, A., Genuardo, V., Iannuzzi, A., Rebl, A., Bernardino, D.D., Goldammer, T., Iannuzzi, L. 2012. Advanced comparative cytogenetic analysis of X chromosomes in river buffalo, cattle, sheep, and human. *Chromosome Res* 20, 413–425.
- Petronczki, M., Siomos, M.F., Nasmyth, K. 2003. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423–440.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2934–2938.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., Schimenti, J.C. 1998. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Molecular Cell* 1, 697–705.
- Price, S.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Gittleman, J.L. 2005. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (*Cetartiodactyla*). *Biol Rev* 80, 445.
- Qumsiyeh, M.B. 1994. Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *J Hered* 85, 455–465.
- Ranjha, L., Anand, R., Cejka, P. 2014. The *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1-Mlh3 heterodimer is an endonuclease that preferentially binds to holliday junctions. *J Biol Chem* 289, 5674–5686.
- Ratomponirina, C., Viegas-Péquignot, E., Dutrillaux, B., Petter, F., Rumpler, Y. 1986. Synaptonemal complexes in *Gerbillidae*: probable role of intercalated heterochromatin in gonosome-autosome translocations. *Cytogenet Cell Genet* 43, 161–167.
- Rettenberger, G., Klett, C., Zechner, U., Kunz, J., Vogel, W., Hameister, H. 1995. Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics* 26, 372–378.
- Reynolds, A., Qiao, H., Yang, Y., Chen, J.K., Jackson, N., Biswas, K., Holloway, J.K., Baudat, F., de Massy, B., Wang, J., Höög, C., Cohen, P.E., Hunter, N. 2013. RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. *Nat Genet* 45, 269–278.
- Robinson, T.J., Harrison, W.R., Ponce de León, F.A., Davis, S.K., Elder, F.F. 1998. A molecular cytogenetic analysis of X chromosome repatterning in the *Bovidae*: transpositions, inversions, and phylogenetic inference. *Cytogenet Cell Genet* 80, 179–184.
- Robinson, T.J., Ropiquet, A. 2011. Examination of hemiplasy, homoplasy and phylogenetic discordance in chromosomal evolution of the *Bovidae*. *Syst Biol* 60(4), 439–50.
- Roca, A.I., Cox, M.M., Brenner, S.L. 1990. The RecA protein: structure and function. *Cri Rev Biochem Mol Biol* 25, 415–456.
- Rockmill, B., Sym, M., Scherthan, H., Roeder, G.S. 1995. Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes Dev* 9, 2684–2695.

- Rockmill, B., Voelkel-Meiman, K., Roeder, G.S. 2006. Centromere-proximal crossovers are associated with precocious separation of sister chromatids during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174, 1745–1754.
- Roeder, G.S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11, 2600–2621.
- Rogacheva, M.V., Manhart, C.M., Chen, C., Guarne, A., Surtees, J., Alani, E. 2014. Mlh1-Mlh3, a meiotic crossover and DNA mismatch repair factor, is a Msh2-Msh3-stimulated endonuclease. *J Biol Chem* 289, 5664–5673.
- Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D. 2000. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell* 6, 975–987.
- Ropiquet, A., Hassanin, A. 2005. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (*Mammalia*, *Bovidae*). *Mol Phylogenet Evol* 36, 154–168.
- Ropiquet, A., Hassanin, A., Pagacova, E., Gerbault-Seureau, M., Cernohorska, H., Kubickova, S., Bonillo, C., Rubes, J., Robinson, T.J., 2010. A paradox revealed: karyotype evolution in the four-horned antelope occurs by tandem fusion (*Mammalia*, *Bovidae*, *Tetracerus quadricornis*). *Chromosome Res.* 18, 277–286.
- Rubes, J., Kubickova, S., Pagacova, E., Cernohorska, H., Bernardino, D.D., Antoninova, M., Vahala, J., Robinson, T.J. 2008. Phylogenomic study of spiral-horned antelope by cross-species chromosome painting. *Chromosome Res* 16, 935–947.
- Rubes, J., Musilova, P., Mastromonaco, G.F. 2008. Cytogenetics of wild and captive bred non-domestic animals. *Cytogenet Genome Res* 120, 61–68.
- Ruiz-Herrera, A., Vozdova, M., Fernandez, J., Sebestova, H., Capilla, L., Frohlich, J., Henandez-Marsal, A., Sipek, J., Robinson, T.J., Rubes J. 2016. Recombination correlates with synaptonemal complex length and chromatin loop size in bovids – insights into mammalian meiotic chromosomal organization. *Chromosoma*. (under review: minor revisions, 10. 10. 2016)
- Sauvageau, S., Stasiak, A.Z., Banville, I., Ploquin, M., Stasiak, A., Masson, J.-Y. 2005. Fission yeast Rad51 and Dmc1, two efficient DNA recombinases forming helical nucleoprotein filaments. *Mol Cell Biol* 25, 4377–4387.
- Scherthan, H. 2007. Telomeres and meiosis in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 64, 117–124.
- Scherthan, H., Cremer, T., Arnason, U., Weier, H.U., Lima-de-Faria, A., Frönicke, L. 1994. Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* 6, 342–347.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Härle, M., Cremer, T. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134, 1109–1125.
- Schmekel, K., Meuwissen, R.L.J., Dietrich, A.J.J., Vink, A.C.G., van Marle, J., van Veen, H., Heyting, C. 1996. Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* 226, 20–30.
- Schmidt, M.H.M., Pearson, C.E. 2016. Disease-associated repeat instability and mismatch repair. *DNA Repair (Amst.)* 38, 117–126.
- Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971–972.
- Searle, A.G., Beechey, C.V., Evans, E.P., Kirk, M. 1983. Two new X-autosome translocations in the mouse. *Cytogenet. Cell Genet* 35, 279–292.
- Sebestova, H., Vozdova, M., Kubickova, S., Cernohorska, H., Kotrba, R., Rubes, J. 2016. Effect of species-specific differences in chromosome morphology on chromatin compaction and the frequency and distribution of RAD51 and MLH1 foci in two bovid species: cattle (*Bos taurus*) and the common eland (*Taurotragus oryx*). *Chromosoma* 125, 137–149.

- Segura, J., Ferretti, L., Ramos-Onsins, S., Capilla, L., Farré, M., Reis, F., Oliver-Bonet, M., Fernández-Bellón, H., Garcia, F., Garcia-Caldés, M., Robinson, T.J., Ruiz-Herrera, A. 2013. Evolution of recombination in eutherian mammals: insights into mechanisms that affect recombination rates and crossover interference. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 280.
- Sharp, A.J., Spotswood, H.T., Robinson, D.O., Turner, B.M., Jacobs, P.A. 2002. Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet* 11, 3145–3156.
- Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., Ogawa, T. 1993. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet* 4, 239–243.
- Shinohara, A., Ogawa, H., Ogawa, T. 1992. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457–470.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8794–8797.
- Shizuya, H., Kouros-Mehr, H. 2001. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med* 50, 26–30.
- Smagulova, F., Gregoretti, I.V., Brick, K., Khil, P., Camerini-Otero, R.D., Petukhova, G.V. 2011. Genome-wide analysis reveals novel molecular features of mouse recombination hotspots. *Nature* 472, 375–378.
- Smithies, O., Powers, P.A. 1986. Gene conversions and their relation to homologous chromosome pairing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 312, 291–302.
- Snustad, P.D., Simmons, M.J. 2008. *Principles of Genetics*, 5 edition. ed. Wiley, Hoboken, NJ.
- Song, B., Sung, P. 2000. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and Replication Protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* 275, 15895–15904.
- Stone, N.E., Fan, J.B., Willour, V., Pennacchio, L.A., Warrington, J.A., Hu, A., Chapelle, A. de la, Lehesjoki, A.E., Cox, D.R., Myers, R.M. 1996. Construction of a 750-kb bacterial clone contig and restriction map in the region of human chromosome 21 containing the progressive myoclonus epilepsy gene. *Genome Res* 6, 218–225.
- Stubblefield, E., Cram, S., Deaven, L. 1975. Flow microfluorometric analysis of isolated Chinese hamster chromosomes. *Exp Cell Res* 94, 464–468.
- Sturtevant, A.H. 1915. The behavior of the chromosomes as studied through linkage. *Z Vererbungslehre* 13, 234–287.
- Sun, F., Kozak, G., Scott, S., Trpkov, K., Ko, E., Mikhaail-Philips, M., Bestor, T.H., Moens, P., Martin, R.H. 2004a. Meiotic defects in a man with non-obstructive azoospermia: Case report. *Hum Reprod* 19, 1770–1773.
- Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Ko, E., Rademaker, A., Navarro, J., Benet, J., Martin, R.H. 2004b. Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74, 521–531.
- Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Trpkov, K., Ko, E., Rademaker, A., Martin, R.H. 2005a. Discontinuities and unsynapsed regions in meiotic chromosomes have a cis effect on meiotic recombination patterns in normal human males. *Hum Mol Genet* 14, 3013–3018.
- Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Turek, P., Ko, E., Rademaker, A., Martin, R.H. 2006a. Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* 15, 2376–2391.



- Sun, F., Oliver-Bonet, M., Liehr, T., Starke, H., Turek, P., Ko, E., Rademaker, A., Martin, R.H. 2006b. Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men. *Hum Reprod* 21, 2335–2339.
- Sun, F., Trpkov, K., Rademaker, A., Ko, E., Martin, R.H. 2005b. Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum Genet* 116, 172–178.
- Sym, M., Roeder, G.S. 1994. Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. *Cell* 79, 283–292.
- Symington, L.S. 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 630–670.
- Syrjanen, J.L., Pellegrini, L., Davies, O.R. 2014. A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife* 3.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R.E., Moens, P.B. 1999. Rad51 and Dmc1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* 147, 207–220.
- Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A.J., Tunnacliffe, A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13, 718–725.
- Trask, B., van den Engh, G., Gray, J., Vanderlaan, M., Turner, B. 1984. Immunofluorescent detection of histone 2B on metaphase chromosomes using flow cytometry. *Chromosoma* 90, 295–302.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., Morita T 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6236–6240.
- Turner, J.M.A. 2015. Meiotic Silencing in Mammals. *Annu Rev Genet* 49, 395–412.
- Turner, J.M.A. 2007. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823–1831.
- Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., Burgoyne, P.S. 2005. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37, 41–47.
- Vacek Z. 2006. Embryologie: Učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada Publishing a.s.
- Vallente, R.U., Cheng, E.Y., Hassold, T.J. 2006. The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions. *Chromosoma* 115, 241–249.
- Van Dilla, M.A., Deaven, L.L. 1990. Construction of gene libraries for each human chromosome. *Cytometry* 11, 208–218.
- Villena, F.P.-M. de, Sapienza, C. 2001. Recombination is proportional to the number of chromosome arms in mammals. *Incorporating Mouse Genome* 12, 318–322.
- Vozdova, M., Kubickova, S., Cernohorska, H., Frohlich, J., Rubes, J. 2016. Satellite DNA sequences in *Canidae* and their chromosome distribution in dog and red fox. *Cytogenet Genome Res.* (Accepted 3. 10. 2016)
- Vozdova, M., Ruiz-Herrera, A., Fernandez, J., Cernohorska, H., Frohlich, J., Sebestova, H., Kubickova, S., Rubes, J. 2016. Meiotic behaviour of evolutionary sex-autosome translocations in *Bovidae*. *Chromosome Res* 24(3), 325-38.
- Vozdova, M., Sebestova, H., Kubickova, S., Cernohorska, H., Awadova, T., Vahala, J., Rubes, J. 2014. Impact of Robertsonian translocation on meiosis and reproduction: an impala (*Aepyceros melampus*) model. *J Appl Genet* 55, 249–258.

- Vozdova, M., Sebestova, H., Kubickova, S., Cernohorska, H., Vahala, J., Rubes, J. 2013. A comparative study of meiotic recombination in cattle (*Bos taurus*) and three wildebeest species (*Connochaetes gnou*, *C. taurinus taurinus* and *C. t. albojubatus*). *Cytogenet Genome Res* 140, 36–45.
- Vries, F.A.T. de, Boer, E. de, Bosch, M. van den, Baarends, W.M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J.-G., Zeeland, A.A. van, Heyting, C., Pastink, A. 2005. Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19, 1376–1389.
- Ward, D.C., Reich, E., Goldberg, I.H. 1965. Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs. *Science* 149, 1259–1263.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M. 2005. *Mammal species of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wojtasz, L., Cloutier, J.M., Baumann, M., Daniel, K., Varga, J., Fu, J., Anastassiadis, K., Stewart, A.F., Reményi, A., Turner, J.M.A., Tóth, A. 2012. Meiotic DNA double-strand breaks and chromosome asynapsis in mice are monitored by distinct HORMAD2-independent and -dependent mechanisms. *Genes Dev* 26, 958–973.
- Woods, L.M., Hodges, C.A., Baart, E., Baker, S.M., Liskay, M., Hunt, P.A. 1999. Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female MLH1 mutant mice. *J Cell Biol* 145, 1395–1406.
- Wray, W., Stubblefield, E. 1970. A new method for the rapid isolation of chromosomes, mitotic apparatus, or nuclei from mammalian fibroblasts at near neutral pH. *Exp Cell Res* 59, 469–478.
- Yang, Q., Zhang, D., Leng, M., Yang, L., Zhong, L., Cooke, H.J., Shi, Q. 2011. Synapsis and meiotic recombination in male chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). *PLoS One* 6.
- Yerle, M., Schmitz, A., Milan, D., Chaput, B., Monteagudo, L., Vaiman, M., Frelat, G., Gellin, J. 1993. Accurate characterization of porcine bivariate flow karyotype by PCR and fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 16, 97–103.
- Youds, J.L., Boulton, S.J. 2011. The choice in meiosis - defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *J Cell Sci* 124, 501–13.
- Young, B.D., Ferguson-Smith, M.A., Sillar, R., Boyd, E. 1981. High-resolution analysis of human peripheral lymphocyte chromosomes by flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7727–7731.
- Yuan, L., Liu, J.-G., Hoja, M.-R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., Höög, C. 2002. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296, 1115–1118.
- Yuan, L., Liu, J.-G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., Höög, C. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell* 5, 73–83.
- Yurov, Y.B., Soloviev, I.V., Vorsanova, S.G., Marçais, B., Roizes, G., Lewis, R. 1996. High resolution multicolor fluorescence *in situ* hybridization using cyanine and fluorescein dyes: rapid chromosome identification by directly fluorescently labeled alphoid DNA probes. *Hum Genet* 97, 390–398.
- Zhao, H., Speed, T.P., McPeck, M.S. 1995. Statistical analysis of crossover interference using the chi-square model. *Genetics* 139, 1045–1056.
- Zickler, D., Kleckner, N. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33, 603–754.

## **8. Přílohy**

Přílohy jsou samostatnou součástí práce.

## 9. SEZNAM ZKRATEK

aCGH	array CGH
AE	axiální element synaptonemálního komplexu
BAC	umělý bakteriální chromozom
BTA	<i>Bos taurus</i>
CE	centrální element synaptonemálního komplexu
CGH	komparativní genomová hybridizace
CLI	<i>Choreopsis liberiensis</i>
CO	crossing-over (rekombinace)
DMC1	rekombináza vážící se na ssDNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOP-PCR	PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery
DSB	double-strand break, dvouřetězcový zlom
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
EtBr	ethidium bromid
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FNa	diploidní počet autozomálních ramen
FNa/2	haploidní počet autozomálních ramen (fundamental number)
HAM	<i>Hippopotamus amphibius</i>
HJ	Hollidayův spoj (Holliday junction)
HNPPC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
HSA	<i>Homo sapiens</i>
LE	laterální element synaptonemálního komplexu
m-FISH	mnohobarevná FISH
MLH1,2,3	savčí homology bakteriálního MutL proteinu
NCO	noncrossover
PAR	pseudoautozomální oblast pohlavních chromozomů
RAD51	rekombináza vážící se na ssDNA
Rb	Robertsonská translokace
SC	synaptonemální komplex
SCP1, 2, 3	proteiny synaptonemálního komplexu
Spo11	protein s DNA-štěpící aktivitou
SSC	<i>Sus scrofa</i>
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
TE	transverzální element synaptonemálního komplexu
MSI	Microsatellite Instability

SKY	spektrální karyotypování
i-FISH	interfázní FISH
ZOO-FISH	metoda využívající mezidruhové cross-hybridizace „comparative painting”
LCM	laserová záchytová mikrodisekce
HO	Hoechst 33258
CA3	Chromomycin A3
PBS	Phosphate Buffered Saline
MSUC	Meiotické umlčování nespárovaného chromatinu
MSCI	Meiotické umlčování pohlavních chromozomů