

UNIVERZITA KARLOVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Doktorský studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Mgr. Petr Flachs

Analýza vlivu genové dávky myšního speciačního genu *Prdm9* na fertilitu hybridů

Analysis of dosage effect of speciation gene *Prdm9* on fertility of mouse hybrids

DISERTAČNÍ PRÁCE

školitel: Ing. Zdeněk Trachtulec, Ph.D.

PRAHA 2017

Čestné prohlášení

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

V Praze dne

Poděkování

Můj dík patří především mému školiteli Ing. Zdeňku Trachtulcovi, Ph.D. za vedení mé práce a nekonečnou trpělivost, již od vstupu do laboratorní praxe na bakalářské úrovni. Děkuji také mé rodině za podporu během mých pregraduálních i postgraduálních studií.

Tato práce byla vypracovávána na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., za finanční podpory grantů GAČR 305/10/1931 a 14-20728S, MŠMT NPU II LQ1604, ERDF a MŠMT CZ.1.05/1.1.00/02.0109 (projekt BIOCEV).

Abstrakt (cz)

Fenomén hybridní sterility představuje jeden z evolučních mechanismů umožňující speciaci, tedy vznik nových druhů. Zatím bylo popsáno jen málo speciálních genů a *Prdm9* (PR-domain 9) je první a zatím jediný identifikovaný u savců. Hraje totiž roli ve sterilitě hybridů vznikajících křížením poddruhů myši domácí. Ohledně vlivu *Prdm9* na plodnost semifertilních hybridních samců bylo ale dosud publikováno jen omezené množství poznatků, přitom v přírodě jsou takoví samci daleko četnější než samci zcela sterilní. Pomocí panelu genetických nástrojů a baterií fenotypizačních testů dokazuje tato disertace ústřední roli *Prdm9* v hybridní sterilitě na mnoha typech mezi-poddrhových kříženců s různě postiženou plodností a věkovým omezením. Přidáváním ale i ubíráním genové dávky *Prdm9* se fenotyp snížené plodnosti vylepší. Také zvýšení genové dávky *Prdm9* alely, která v jedné kopii zapříčiňuje sterilitu, zlepšuje parametry fertility F1 hybridů. PRDM9 protein hraje roli i v určování míst meiotické rekombinace. Práce poukazuje na princip interakce soutěže alel v určování rekombinančně preferovaných genomických lokusů - hotspotů, a tím možné způsoby propojení obou rolí *Prdm9*. Tato disertace shrnuje sestavu tří logicky propojených publikací, které mají ambici být významnými díly skládačky poznání mechanismu speciace. Výsledky této práce mají také dopad na budoucí studie snížené plodnosti na laboratorních modelech hybridní sterility i pro analýzy divokých myších populací a měly by být vzaty do úvahy při jejich plánování.

Abstract (eng)

The phenomenon of hybrid sterility represents one of the evolutionary mechanisms that enables speciation. Only a few speciation genes have been uncovered. The only one found in mammals is *Prdm9* (PR-domain 9). Data in the literature on the involvement of *Prdm9* in decreased fertility of various semifertile hybrid males of house mouse subspecies were scarce before the results of this thesis were completed, despite that such males are much more frequent in nature than the fully sterile ones. Utilizing a panel of genetic tools and a battery of phenotyping tests, this thesis shows a central role of *Prdm9* in fecundity of hybrids, including many fertility disorders and age dependency. Both increasing and reducing the *Prdm9* gene dosage significantly elevated fertility parameters. Surprisingly, even the allele that in one copy causes full hybrid sterility increased F1 hybrid fertility when present in multiple copies. The PRDM9 protein also plays a role in identifying the sites of meiotic recombination. This study also points out the principles of allelic competition in determination of the sites of preferred recombination (hotspots), which suggests a possible link between both previously described *Prdm9* roles. This thesis summarizes a set of three logically interconnected publications with the ambition to become the key piece of puzzle illustrating the mechanism of speciation. The presented results should have an impact on studies dealing with decreased fertility of the mouse laboratory strains as well as on analysis of the wild mouse populations. Thus, they should be taken into an account when designing such experiments.

Obsah

Abstrakt (cz).....	3
Abstract (eng).....	4
Obsah	5
1 Úvod.....	8
2 Cíle práce	10
3 Současný stav problematiky	11
3.1 Speciace a reprodukční bariéry	11
3.2 Hybridní sterilita a její zákonitosti	12
3.3 Genetika reprodukční izolace.....	12
3.4 První živočišné geny hybridní sterility – <i>Drosophila</i>	13
3.5 Myš jako modelový organismus	14
3.6 Meióza, průběh popis	14
3.6.1 Základní fáze meiózy	15
3.6.2 Párování chromosomů, určování míst dvouřetězcových zlomů DNA v meióze	16
3.6.3 Meiotická rekombinace.....	18
3.6.4 Párování a transkripční umlčování chromosomů X a Y	20
3.7 Model hybridní sterility dvou poddruhů myši domácí.....	21
3.7.1 Mapování <i>Hst1/Prdm9</i>	21
3.8 Gen <i>Prdm9</i>	23
3.8.1 <i>Prdm9</i> v roli regulátora rekombinace u myši a lidí	24
3.8.2 PRDM9 a nukleosomy rekombinačních hotspotů	25

3.8.3	Rychlá evoluce genu <i>Prdm9</i>	25
4	Materiál a metody	27
4.1	Myši.....	27
4.2	Genotypování	28
4.2.1	Izolace DNA	28
4.2.2	PCR – amplifikace markerů a vyhodnocení produktů.....	28
4.3	Expresní analýza a kvantitativní PCR.....	30
4.4	Zjišťování plodnosti samců	30
4.5	Analýza meiotického průběhu.....	32
4.6	Statistické zpracování dat.....	35
5	Výsledky	36
5.1	Překonání hybridní sterility závisí na dávce, ale ne na alele genu <i>Prdm9</i>	36
5.2	Vliv <i>Prdm9</i> na spermatogenezi reciprokých F1(B6 x PWD) hybridů	38
5.3	Chromosomy X a 17 se účastní semisterility F1(PWK x B6) hybridů	41
5.3.1	Potomci křížení PWK samičky s B6 samcem jsou semisterilní	41
5.3.2	Vliv chromosomů 17 a X na plodnost F1(PWK x B6) hybridů	42
5.4	Genová dávka a původ alely <i>Prdm9</i> ovlivňuje také semisterilitu hybridů	42
5.5	Imunocytochemická a expresní analýza meiotického průběhu.....	46
5.5.1	Souhrnné parametry fertility jsou v souladu s úrovní meiotického bloku	46
5.5.2	Úroveň částečné meiotické zástavy závisí na věku F1(PWK x B6) hybridů	48
5.5.3	Nekompatibility alely <i>Prdm9^{B6}</i> v hybridních samcích nejsou způsobeny rozdílnou úrovní transkripce <i>Prdm9</i>	50

5.6	Částečná haploinsuficience <i>Prdm9</i> u vnitrodruhových kříženců.....	51
5.6.1	Vliv genové dávky na dostupnost PRDM9 katalytické aktivity u fertlních vnitrodruhových křížení.....	52
5.6.2	Počet DSB zůstává podobný i po snížení dávky <i>Prdm9</i>	53
6	Diskuse.....	54
6.1	Univerzální vliv <i>Prdm9</i> na fertilitu hybridních samců.....	58
6.1.1	Kontrast mezi fenotypem vyjmutí jedné kopie <i>Prdm9</i> u fertlních myší a (semi)sterilních hybridů.....	60
6.2	Soutěž homo- a heterodimerů proteinu PRDM9 o vazebná místa může vysvětlit závislost rozložení hotspotů na alelické dávce <i>Prdm9</i>	61
6.3	Počet DSB a správné párování chromosomů.....	63
6.3.1	Odklon rekombinačních dějů od funkčních oblastí genomu.....	64
6.3.2	Regulátor rekombinačních hotspotů <i>Prdm9</i> a hybridní sterilita.....	64
7	Závěr.....	68
7.1	Naplnění stanovených cílů práce.....	69
8	Seznam použité literatury.....	71

1 Úvod

Gen *Prdm9* (PR-domain containing 9) také označován jako *Meisetz* (Meiotic gene with SET domain and Zinc fingers) je prvním identifikovaným savčím speciálním genem. Speciace neboli vznik nových druhů z jednoho či více rodičovských druhů, je jeden z klíčových evolučních procesů, vedoucí k ohromné rozmanitosti forem organismů na naší planetě. Od okamžiku, kdy si lidé všimli tohoto pestrého množství tvarů, velikostí, barev a všech dalších vlastností živých tvorů v přírodě, začali se ptát, jak mohla tato rozmanitost vzniknout. Dnes máme k dispozici teorie, modely, ale i moderní experimentální metody, pomocí kterých by bylo možno tuto základní otázku evoluční biologie zodpovědět. Přestože tento proces vzniku a změn i stávajících druhů pokračuje, počítá se v měřítkách deseti, statisíců i miliónů let. Konkrétnější mechanismy a důkazy evolučních teorií jsou popsány především u nižších, či méně složitějších organismů třeba: rostliny (Bombliés 2010; Rieseberg and Blackman 2010), bezobratlí (Phadnis and Orr 2009), kde například díky kratší generační době a tím mnohem rychlejšímu vývoji je snadnější zachytit dva druhy procházející speciací. Díky nižšímu počtu jejich vlastností - fenotypů - je také snadnější nalézt ty fenotypy, které stály na začátku vzniku dvou nových forem a tak mechanismus tohoto evolučního rozdělení popsat a zjistit jeho příčiny a zákonitosti. Společně se složitostí organismu, ovšem klesá možnost odhalit rozdílnosti nebo faktory, které byly prvotními příčinami vzniku nových druhů. Dnes můžeme vidět spíše následky těchto rozdílů, které způsobily například adaptace na jiné prostředí, jiná strategie shánění potravy, přežití a rozmnožování. Přesto lze najít i u složitějších organismů, především živočichů a dokonce i savců poddruhy, které jsou již jasně definované, ale přesto se jejich vznik datuje do relativně nedávné minulosti, což dává šanci rozlišit právě ty momenty nebo vlastnosti, které způsobily jejich oddělení na dva nové poddruhy.

Proces speciace u pohlavně se rozmnožujících organismů závisí především na těch evolučních fenotypech, které brání výměně genetického materiálu mezi populacemi. K úplnému porozumění genetického základu speciace je potřeba najít primární reprodukční bariéry, identifikovat evoluční procesy, které tyto bariéry vytvářely a popsat konkrétní mutace izolující fenotypy obou populací. Nicméně konkrétní mechanismy speciace a tedy základní otázky o vzniku druhové rozmanitosti na naší planetě jsou pro většinu druhů stále neznámé.

Jednou z cest reprodukční izolace, které mohou vyústit až ve vznik nových druhů, je hybridní sterilita. Je definována jako situace, kdy křížením dvou odlišných, ale plně plodných rodičovských forem vznikají sterilní potomci. *Prdm9* je první gen obratlovce způsobující hybridní sterilitu charakterizovaný na molekulární úrovni (Mihola et al. 2009). Některé teoretické evoluční modely jako je Bateson-Dobzhansky-Mullerův model speciace, navrhují vysvětlení, že reprodukční izolace obvykle vzniká díky epistatickým interakcím odlišných genů (Bateson 1909; Dobzhansky 1937; Muller 1942). Popsáním funkce genu *Prdm9* by bylo možné prozkoumat přesněji mechanismus hybridní sterility a tímto detailněji nahlédnout do procesu speciace, tak zásadního nejen pro evoluční biologii.

2 Cíle práce

Tato práce si klade v konečném důsledku za cíl přispět k lepšímu poznání a popsání fenoménu hybridní sterility jako jednoho z klíčových procesů speciace, tedy vzniku nových druhů. Díky savčímu modelu hybridní sterility na geneticky dobře charakterizovaných inbredních kmenech máme nástroj, který umožňuje popsat konkrétní genetické vztahy a procesy mechanismu hybridní sterility. V této práci jsem shrnul úsilí a výsledky, které přineslo využití tohoto modelu především ve vztahu k dávkce genu *Prdm9*, jakožto klíčového genu sterility. Konkrétně se práce snaží zmapovat a popsat role a důležitosti počtu kopií a alel genu *Prdm9* v modelech hybridní sterility za pomoci jeho transgenů a mutací. Následky změny genové dávky *Prdm9* byly sledovány nejen u plně sterilních samčích hybridů, ale také u semisterilních hybridů, hybridů s časově omezenou plodností (poruchou reprodukčního věku) či vnitrodruhových kontrol, a to jak klasickými tak molekulárními a cytologickými metodami fenotypování fertility. V bodech:

1. Objasnit vliv kombinací různých alel *Prdm9* a jejich genové dávky na sterilitu hybridních samců.
2. Popsat účinek kombinací alel a jejich různého množství na jiné modely částečně neplodných hybridních samců.
3. Porovnat změny plodnosti hybridních samců způsobené různými alelickými kombinacemi s meiotickým průběhem.
4. Zmapovat dopady genetických a molekulárních interakcí *Prdm9* v meióze hybridních samců a genetice samčí hybridní sterility.

3 Současný stav problematiky

3.1 Speciace a reprodukční bariéry

Proces, který dal vzniknout ohromné rozmanitosti různých forem organismů na naší planetě, se nazývá speciace. Tento výraz označuje děj, při kterém vznikají nové druhy ať už například individuálním vývojem a postupnými změnami jednoho druhu v průběhu střídání jeho generací a/nebo rozdělením jednoho druhu na dvě nebo více různých dceřiných forem. Tyto formy působením selekce divergují a dají tak vzniknout novým samostatným druhům. První poznatky a snahy o popsání tohoto klíčového evolučního procesu sahají už do druhé poloviny 19. století, do dob Darwina, Wallace a dalších tehdejších biologů.

Z hlediska pochopení procesu speciace bylo v prvních fázích studia tohoto fenoménu nutné si definovat pojem druh. Zásadní charakteristikou druhu je, že všichni jeho příslušníci se mohou mezi sebou být jen potencionálně křížit a dát vzniknout plodným potomkům, kteří jsou schopni stejným způsobem pokračovat v rozmnožování (Mayr 1963). Ve snaze najít nejzákladnější rozdíl mezi dvěma druhy, který je zároveň definuje, převládl koncept reprodukční izolace, která znemožňuje křížení mezi příslušníky obou druhů mezi sebou, nebo zabraňuje plození životaschopných a plodných potomků (hybridů). Tato reprodukční bariéra zabraňuje vzájemné výměně genetické informace a populace různých druhů jsou tak od sebe jasně odděleny (Dobzhansky 1937). Reprodukčně izolační mechanismy byly popsány jako prezygotické, například jiné způsoby páření, a postzygotické, kde hraje roli neživotaschopnost hybridů či jejich nižší plodnost nebo úplná sterilita. Současně byl také navržen Dobzhansky-Mullerův model speciace, který vyzdvihuje roli epistatických interakcí při vzniku reprodukčně izolačních mechanismů (Dobzhansky 1937; Muller 1942).

S příchodem nových genetických metod byla pozornost zaměřena na popsání genetických základů reprodukční izolace. Díky hojně využívanému klíčovému genetickému modelu mušky *Drosophila melanogaster* byly poprvé nastíněny počty genů zodpovědných za reprodukční bariéry a jejich přibližné mapování na chromosomech (Coyne and Charlesworth 1989; Coyne 1992). Nyní jsme ve fázi snahy identifikovat konkrétní geny a například specifickou funkci jejich proteinových produktů. Toto umožňují nové modely používané pro

výzkum reprodukčních bariér a také nově vyvinuté spektrum molekulárně biologických technik a znalost sekvence genomů zkoumaných organismů (Orr and Presgraves 2000).

3.2 Hybridní sterilita a její zákonitosti

Hybridní sterilita je definována jako situace, kdy křížením dvou plodných rodičovských forem vznikají sterilní potomci. Hybridní sterilita může fungovat jako mechanismus vzniku druhů a v časných fázích speciace, tak tvořit jednu z reprodukčních bariér mezi nově vznikajícími druhy. Mezi těmito druhy totiž zabraňuje toku genetických informací a tak udržuje specifické vlastnosti jejich genomů. Přestože hybridní sterilita je poměrně dlouho známý a intenzivně zkoumaný fenomén (Haldane 1922), nebyl donedávna u žádných obratlovců plně objasněn jediný mechanismus jejího působení (Forejt 1985; Forejt 1996).

Výzkum genetických mechanismů hybridní sterility je zatížen dvěma hlavními faktory. Předně poziční klonování genů hybridní sterility, které by umožnilo identifikovat geny důležité pro tento proces, je založeno na genetické analýze křížení jedinců, což je zjevně komplikováno samotnou sterilitou těchto jedinců. Dalším faktorem, se kterým je nutno počítat při studiu genetiky hybridní sterility je, že tento proces je na rozdíl od jiných znaků určován mnoha geny, mezi kterými jsou komplexní epistatické interakce (Sawamura et al. 2004). Tyto interakce mohou také často být tzv. konspecifické, což znamená, že se jejich účinek projeví jedině po společném přenesení genů jednoho druhu na genetické pozadí jiného druhu (Palopoli and Wu 1994).

3.3 Genetika reprodukční izolace

Dobzhansky-Mullerův (D-M) model speciace popisuje hybridní sterilitu a další typy reprodukčních bariér jako důsledek narušených epistatických interakcí genových lokusů mezi oddělujícími se druhy (Bateson 1909; Dobzhansky 1937; Muller 1942). Základní prvky tohoto jednoduchého modelu se dají popsat, když si představíme dvě populace s různými zafixovanými genotypy dvou interagujících lokusů $AAbb$ a $aaBB$, kde $aabb$ je genotyp společného předka obou populací. Hybridy těchto dvou populací budou mít genotyp $AaBb$, který může způsobit problém, protože interakce alel A a B neprošla společně přírodním výběrem. Toto je zatím všeobecně přijímaný obecný model (Coyne 2004) a několik studií

popisuje geny spadající do modelu D-M nekompatibilit (Wittbrodt et al. 1989; Ting et al. 1998; Barbash et al. 2003; Presgraves 2003; Brideau et al. 2006; Harrison and Burton 2006).

Významný aspekt genetiky speciace je, že v časných stádiích reprodukční izolace se problém nejčastěji vyskytuje u heterogametického pohlaví (Haldane 1922). Podle Haldanova pravidla (Laurie 1997; Orr et al. 1997) hrají při vzniku druhů velmi důležitou roli pohlavní chromosomy. V mnoha taxonomických jednotkách představují heterogametické pohlaví XY samci a X chromosom má významný efekt na reprodukční izolaci (Dobzhansky 1937; Orr 1987; Coyne and Orr 1989; Tucker et al. 1992; Dod et al. 1993; Besansky et al. 2003; Masly and Presgraves 2007). Vysvětlení důvodu, proč se hybridní sterilita týká především samců, nabízí „Mullerova teorie dominance“ (Muller 1942; Orr 1987; Coyne and Orr 1989). Díky svému hemizygotnímu stavu se u heterogametického pohlaví může fenotypově projevit alela nehledě na svou dominanci. U homogametických hybridů pak mutantní recesivní alelu kompenzuje její dominantní forma. Týká se to především recesivních X-vázaných D-M nekompatibilit, které se ve své jediné kopii projeví na hemizygotním hybridním genetickém pozadí (Muller 1942; Turelli and Orr 1995; Turelli and Orr 2000). Haldanovo pravidlo bylo od dob jeho stanovení pozorováno a tím potvrzeno na mnoha živočišných druzích a to jak s heterogametickým samčím i samičím pohlavím (shrnuto v (Schilthuizen et al. 2011)). Přestože většina mezidruhových křížení vykazuje znaky Haldanova pravidla, byly popsány i výjimky, například tzv. maternální efekt některých genů u rodu *Drosophila* (Sawamura 1996; Ferree and Barbash 2009).

K rychlé evoluci hybridní samčí sterility přispívá více faktorů než jen recesivní X-vázané nekompatibility (Muller 1942; Turelli and Orr 1995; Turelli and Orr 2000), např. rychlá evoluce genů samčí reprodukce a X chromosomu (Charlesworth et al. 1987; Wu and Davis 1993; Wu et al. 1996; Presgraves and Orr 1998).

3.4 První živočišné geny hybridní sterility – *Drosophila*

První úspěšné pokusy zmapovat mechanismus hybridní sterility u živočichů byly uskutečněny na modelu využívajícího rodu *Drosophila* (Coyne and Charlesworth 1989; Coyne 1992). Malá „ovocná muška“ drosophila je modelový organismus velmi vhodný pro genetické výzkumy včetně hybridní sterility, mimo jiné protože má velmi krátkou generační dobu, je známá její

genetická mapa včetně osekvenovaného genomu a je k dispozici více příbuzných druhů vhodných k pokusnému křížení. Nejvíce využité pro studium hybridní sterility a letality byly kříženci druhů *D. simulans* a *D. mauritiana* a také *D. simulans* a *D. melanogaster* (Shinohara et al. 1993; Sawamura 1996; Ting et al. 1998; Barbash et al. 2003; Sun et al. 2004; Brideau et al. 2006; Bayes and Malik 2009; Phadnis and Orr 2009; Tang and Presgraves 2009). Díky tomuto modelu byly doposud sekvenčně identifikovány geny hybridní sterility: *OdsH*, *JYAlpha*, a *Ovd* (Ting et al. 1998; Masly et al. 2006; Phadnis and Orr 2009).

3.5 Myš jako modelový organismus

Myš domácí je dobře prostudovaný modelový systém se značnými možnostmi genetického výzkumu (Dietrich et al. 1994; Mouse Genome Sequencing et al. 2002; Su et al. 2004; Shifman et al. 2006; Church et al. 2009). Rod *Mus* - myš domácí – zahrnuje v druhu *Mus musculus* (dále jen *M. m.*) tři poddruhy (*M. m. domesticus*, *M. m. musculus* a *M. m. castaneus*), které se oddělily od svého společného předka před 350 000 lety (She et al. 1990; Geraldès et al. 2011). Především pak poddruhy *domesticus* a *musculus* jsou velmi vhodné pro studium počátků reprodukční izolace. Tyto dva poddruhy tvoří v Evropě dobře popsanou úzkou hybridní zónu (Dod et al. 1993; Payseur et al. 2004; Macholan et al. 2007)), ve které se vyskytují samci se sníženou fertilitou (Albrechtová et al. 2012; Turner et al. 2012). Také laboratorní studie poukázaly na oddělení těchto poddruhů samčí hybridní sterilitou (Forejt and Ivanyi 1974; Forejt et al. 1991; Forejt 1996; Vyskocilová et al. 2005). Myš domácí proto představuje robustní systém pro objasnění genetických zákonitostí fenotypů, které stojí za reprodukční izolací v přírodě, a poskytuje možnost vhledu do evolučních procesů, které vedly k fixaci nekompatibilních hybridních mutací.

3.6 Meióza, průběh popis

Sterilita i poruchy fertility obecně, nejen ty způsobené hybridním křížením, jsou zjevné a dají se měřit např. množstvím spermií, schopností plodit potomky apod. Abychom ovšem identifikovali konkrétní molekulární příčiny poruch fertility, musíme sledovat vlastní proces tvorby pohlavních buněk, jehož důležitou část tvoří speciální typ buněčného dělení zvaný meióza. Proces meiotického dělení dobře vystihuje i slovo použité pro jeho název - meióza, z řeckého *mioun*, což znamená zmenšit (se), snížit (se). A opravdu jedná se na rozdíl od mitózy

o redukční buněčné dělení. V principu jde o speciálně vyvinutý proces sexuálně se rozmnožujících organismů, kdy po jednom cyklu DNA replikace dochází ke dvěma buněčným dělením (shrnutí (Bolcun-Filas and Schimenti 2012)). Vznikají tak haploidní spermie či vajíčka (gamety) a navíc v procesu zvaném genetická rekombinace dochází k částečné výměně DNA pocházející z otce a matky, a tím ke vzniku nových alelických kombinací v těchto gametách. Meióza velmi pravděpodobně vznikla adaptací mitózy (Wilkins and Holliday 2009) po vložení několika kritických a komplexních kroků. Jedná se především o párování a synapsi homologních chromosomů, genetickou rekombinaci mezi nesesterskými chromatidami, potlačení rozchodu sesterských chromatid při prvním meiotickém dělení a další postup do druhého dělení s vynecháním S-fáze (replikace DNA). Každý z těchto kroků je sám o sobě dost komplikovaný a může se zdát nepravděpodobné, že by se vyvinuly najednou, nebo že jeden bez druhého nedávají smysl (nepřinášejí „Darwinovskou“ výhodu), aby se objevili postupně (Maynard Smith 1978; Hamilton 1999). Pro tuto, z hlediska evoluční biologie velmi zajímavou, otázku ohledně původu meiózy ovšem existuje hypotéza, která poukazuje mimo jiné na výhody původních funkcí některého s uvedených kritických kroků a také na velmi podobné a evolučně mnohem starší mechanismy, které mohly být při vzniku meiózy alternativně využity a přizpůsobeny novým potřebám (Wilkins and Holliday 2009).

3.6.1 Základní fáze meiózy

Vstup do meiózy se týká specifické buněčné linie zárodečných pohlavních buněk neboli primordiálních germinálních buněk (angl. PGCs – primordial germ cells). Tyto buňky během vývoje zárodka putují do vvvýjejších se oblastí budoucích pohlavních žláz a na základě okolních tkáňových i vnitřních buněčných faktorů je u těchto buněk přesně regulován vstup do meiózy. U samic jsou PGCs směřovány do meiózy již během fetálního vývoje a naopak u samců je v budoucích varlatech zárodečným buňkám zabráněn vstup do meiózy a jako prospermatogonie se začnou vyvíjet na samčí pohlavní buňky až během postnatálního vývoje (Adams and McLaren 2002).

Meióza se skládá ze dvou základních na sebe navazujících buněčných dělení - meióza I a II, které se obě rozdělují ještě na profázi, metafázi, anafázi a telofázi. Zárodečné buňky vstupují do meiózy I replikací DNA, kdy se z nich stanou primární meiocyty (u samců primární spermatocyty). Následuje nejdelší a nejkritičtější fáze - profáze I (profáze meiózy I), během které párují homologní

chromosomy. U profáze I tedy rozlišujeme ještě další dílčí stádia meiocytů: leptotene, zygotene, pachytene a diplotene. Mezi homologními chromosomy dochází k rekombinaci, a tím také k jejich fyzickému spojení, které je nutné pro správný průběh jejich následného rozchodu do dceřiných buněk bez ohledu na jejich rodičovský původ. Tímto končí první fáze meiózy a sekundární meiocyty (sekundární spermatocyty u samců) podstoupí mnohem rychlejší meiózu II, která už je podobná mitóze somatických buněk jen s vynecháním replikace DNA. Dojde tak k rozchodu sesterských chromatid a z jedné diploidní zárodečné buňky se zdvojenými sadami chromosomů vzniknou čtyři dceřiné haploidní gamety (shrnutí v (Bolcun-Filas and Schimenti 2012)).

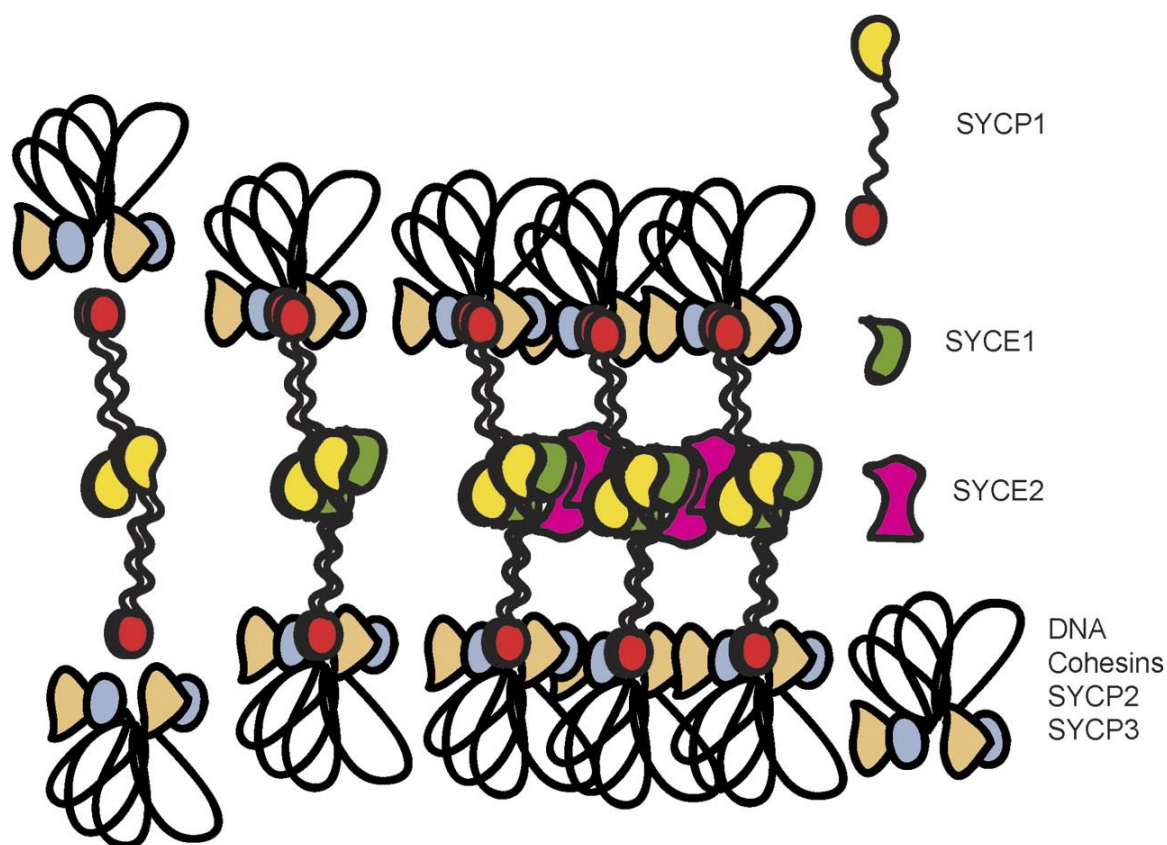
3.6.2 Párování chromosomů, určování míst dvouřetězcových zlomů DNA v meióze

Jeden z nejzásadnějších a přesně regulovaných procesů během meiózy je organizace DNA v chromatinu. To zahrnuje utvoření chromosomální osy (axiálního elementu) pro správné seřazení sesterských chromatid, a také skládání a odbourání synaptonemálního komplexu, což je jakési lešení umožňující synapsi homologních chromosomů, které je zachycené za kohesinové komplexy, jenž drží pohromadě sesterské chromatidy. Telomery v tomto procesu hrají také důležitou strukturní roli pro chromosomální a genomovou stabilitu. Během meiotické profáze I se telomery váží k jadernému obalu a v časných fázích (leptotene, zygotene) vykazují dynamické přeskupování do takzvané meiotické chromosomální kytice (angl./franc. bouquet), o které se předpokládá, že napomáhá správnému hledání a párování homologních chromosomů (Zickler and Kleckner 1998).

Organismy mají různé počty chromosomů a dá se předpokládat, že větší počet chromosomů v jádře bude znamenat komplikovanější nacházení homologního partnera. Ve většině organismů včetně myši tento proces zahrnuje a umožňuje i programové vytváření dvouřetězcových zlomů (angl. double-stranded breaks - DSBs) pomocí topoizomerasy SPO11 (angl. sporulation protein 11) (Keeney 2008). Pro opravy těchto endogenních dvouřetězcových zlomů je potřeba nalézt homologní sekvence a vytvořit spoje mezi homologními chromosomy. Chromosomální meiotické kytice mají zvýšit pravděpodobnost setkání homologních partnerů a také mohou možná sloužit jako mechanismus testování homologie mezi budoucími bivalenty (Scherthan et al. 1998; Bass et al. 2000).

Správně sestavený synaptonemální komplex je zipu podobná struktura, která je velmi proteinově bohatá. Skládá se ze tří hlavních částí a to ze dvou paralelních axiálních elementů (AE), které se v kontextu synaptonemálního komplexu nazývají laterální elementy (LE). Tyto AE/LE jsou na jedné straně souměrně přiřazeny ke kohesinovým komplexům spojujícím sesterské chromatidy a na druhé straně transverzálními vlákny (transverse filaments - TF) propojeny s centrálním elementem (CE) (obrázek 1). Prostorová struktura jako taková je vysoce konzervovaná od kvasinek až po člověka, nicméně jednoznačná univerzální homologie proteinové sekvence jednotlivých komponentů nebyla nalezena (Bogdanov et al. 2007). Zdá se tedy, že jde spíše o zachování a utváření podobné prostorové (3D) stavby. Fenotyp skládání synaptonemálního komplexu se dokonce může také lehce lišit mezi pohlavími vzhledem k odlišné míře efektivnosti a striktnosti meiotických kontrolních mechanismů, především v rámci AE/LE (Yang and Wang 2009; Fraune et al. 2012). Dva základní díly myšího AE/LE jsou proteiny synaptonemálního komplexu SYCP2 a SYCP3 (angl. Synaptonemal complex protein 2, 3). TF vlákna, která jsou hlavní složkou centrální struktury synaptonemálního komplexu, jsou tvořena proteinem SYCP1 (angl. Synaptonemal complex protein 1), který typicky vytváří paralelní homodimery interagující svými koncovými globulárními doménami a mezi nimi se nachází delší superhelikální doména (angl. coiled-coil). Dalšími součástmi CE jsou proteiny SYCE1 a SYCE2 (angl. synaptonemal complex central element 1, 2). Axiální elementy jsou zásadní v pre-synaptických fázích pro zhutnění/kondenzaci chromatinu a jako LE (v souvislosti se synaptonemální komplexem) poté tvoří dohromady s centrálním elementem proteinové lešení fyzicky spojující homologní chromosomy.

Obrázek 1.: Schéma skládání synaptonemálního komplexu.



Homodimery proteinu SYCP1 se svými C-konci váží k axiálnímu elementu (SYCP2 a 3) a svými N-konci tvoří asociace mezi sebou. Tyto N-koncové asociace jsou dále stabilizovány proteinem SYCE1. Tvoří se tak krátké spárované úseky, které jsou dále mezi sebou propojovány SYCE2, jak se prodlužuje a tvoří synaptonemální komplex podél celého chromosomu (převzato a upraveno z (Bolcun-Filas and Schimenti 2012)).

3.6.3 Meiotická rekombinace

Kromě vytváření nových alelických kombinací, je meiotická rekombinace důležitá také pro fyzické propojení chromosomů. Tato fyzická propojení se nazývají chiasmata a umožňují homologním párům chromosomů stabilně se orientovat k dělicím vřeténkům meiózy I velmi podobně jako orientují kohesiny sesterské chromatidy k mitotickým dělicím vřeténkům (Petronczki et al. 2003; Copsey et al. 2013). Chiasmata tedy umožňují správnou segregaci chromosomů během prvního meiotického dělení, aby tak byla zajištěna příslušná ploidita budoucích gamet, které vznikají jako konečný výsledek meiózy po druhém meiotickém dělení. Meiotický mechanismus opravy vnitřně indukovaných DSB pomocí homologní rekombinace

umožňuje vznik takovýchto interhomologních propojení - chiasmát. Pro úplnost není bez zajímavosti, že některé druhy organismů (*Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*) nepotřebují meiotickou rekombinaci pro homologní párování chromosomů a vytváření synaptonemálního komplexu (Bhalla and Dernburg 2008; Tsai and McKee 2011).

V celém genomu se vytvoří řádově stovky DSB a jen malá část (přibližně desetina) oprav (Cole et al, 2012) vyústí v takzvaný crossing-over (CO) – tedy překřížení, které dá následně vzniknout chiasmátům. Oprava každého DSB začíná v místě dvouřetězcového zlomu odbouráním části 5' konce, aby se vytvořil 3' přesahující konec, který na základě homologní symetrie napadne DNA vlákno ve svém dosahu. Následují tři možná vyústění takovéto situace podle typu intermediátů, neboli meziproductů, které vznikají při opravách DSB. Nejjednodušší cesta je dosyntetizování napadajícího 3' konce podle napadené homologní DNA. Následuje rozpad tohoto intermediátu, spojení konců DNA a vyplnění mezer. Tento model opravy DSB se nazývá SDSA (angl. synthesis-dependent strand annealing) a ustí jedině do takzvaných non-crossoverů (NCO), které mají za následek genovou konverzi (jednostranné přenesení části sekvence DNA) (Paques and Haber 1999). Druhá cesta je pospána modelem dvouřetězcové opravy zlomu DSBR (angl. double-stranded-break repair) (Szostak et al. 1983). Zahrnuje zapojení i druhého 3' přesahujícího konce z přerušeného řetězce DNA a vytvoření dvojitého Hollidayova křížení (Holliday 1964). Vlákna se dosyntetizují, spojí a podle toho, která vlákna se nakonec přeruší aby, se struktura zase rozvolnila, vzniká CO nebo NCO (genová konverze). Ve skutečnosti jsou dráhy vedoucí k CO či NCO enzymaticky odlišné a také předem určené (Hunter and Kleckner 2001; Borner et al. 2004).

Ze struktury synaptonemálního komplexu je zřejmé, že sesterská chromatida je prostorově blíže a proto se předpokládá mechanismus, který zvýhodňuje rekombinaci nesesterských chromatid, nebo naopak znevýhodňuje „sesterskou“ rekombinaci. Tento mechanismus není dodnes zcela prozkoumán a nejdetailnější studie byly prováděny s kvasinkami (Plug et al. 1998). Během meiotické rekombinace dochází k vytváření časných a pozdních takzvaných rekombinačních nodulů a zapojení homologů bakteriální rekombinasy A (recA) RAD51 (Rat sarcoma - RAS associated with diabetes protein 51) a DMC1 (DNA meiotic recombinase 1). RAD51 a DMC1 se váží na jednovláknovou DNA 3' přesahujícího řetězce, čímž aktivují a zároveň regulují hledání homologního templátu pro opravu zlomu na sesterské, či nesesterské chromatidě. RAD51 a DMC1 rekombinasy byly na základě homologie recA domény

identifikovány i u savců (Morita et al. 1993; Shinohara et al. 1993; Habu et al. 1996; Matsuda et al. 1996) a u myši byla prokázána významná role proteinů AE při regulaci sesterských rekombinací (Li et al. 2011).

Jak dochází k synapsi homologních chromosomů RAD51 a DMC1 jsou nahrazovány kaskádou proteinů opravného mechanismu jednonukleotidových mutací DNA – tzv. DNA MMR (angl. mismatch repair proteins). Postupně lze na zrajících rekombinačních nodulech nalézt proteiny MSH4 a MSH5 (proteiny rodiny MutS), kterým je přisuzována role stabilizátorů rekombinačních intermediátů. Tyto proteiny jsou dále vystřídány MLH1 a MLH3 (MutL proteinová rodina), které svou endonukleasovou aktivitou přispívají k vyřešení (či rozuzlení) složitých intermediálních DNA struktur (Plug et al. 1998; Rogacheva et al. 2014). Uvedené proteiny se tak dají hojně používat jako spolehlivé cytologické markery zrajících rekombinačních nodulů.

3.6.4 Párování a transkripční umlčování chromosomů X a Y

Pohlavně se rozmnožující organismy musí pro úspěšný průběh meiózy u heterogametického pohlaví překonávat ještě další komplikaci s párováním nehomologních pohlavních chromosomů. V případě samce myši se jedná o X a Y chromosom, mezi kterými je sekvenční homologie zúžena do krátkého (asi 700 kbp) úseku nazývaného pseudoautosomální oblast (angl. PAR - pseudoautosomal region). Je zřejmé, že správné párování na základě homologního vyhledávání X a Y chromosomu bude o něco složitější, protože je soustředěno jen do této pseudoautosomální oblasti. Dále je známo, že v PAR úseku se děje rekombinace ve 100% meiotických buněk a je to nutná podmínka ke správnému průběhu meiózy (Perry et al. 2001; Neale and Keeney 2006). Správné párování a vytvoření chiasmat, tedy fyzického spojení bivalentů pomocí crossing-overu (CO) je zásadní pro přesný rozchod pohlavních chromosomů během meiotického dělení a protože je délka PAR v porovnání s autosomy mnohem menší dochází také k další vlně vytváření DSB (Kauppi et al. 2011). Tyto přidané dvouřetězcové zlomy mají ještě více usnadnit hledání homologních partnerů a také mají za následek lokální aktivaci dráhy odpovídající na poškozenou DNA, neboli DDR (angl. DNA damage response), což v konečném důsledku vede k vytvoření speciální chromatinové struktury nazývané pohlavní tělísko (angl. sex body). Tuto strukturu tvoří u zdravé buňky jen částečně synapsované (v rámci PAR) pohlavní chromosomy X a Y během pachytenního a diplotenního stádia spermatocytů

v první meiotické profázi. Pohlavní tělísko je speciální heterochromatinová struktura izolující pohlavní chromosomy, které podléhají procesu meiotické inaktivace - MSCI (angl. meiotic sex chromosomes inactivation) (Turner 2007; Heard and Turner 2011).

Tvorba pohlavního tělíska a proces MSCI je pro zdárný průběh meiózy zásadní, protože škodlivé účinky exprese pohlavně vázaných genů na meiózu byly jasně prokázány (Wu and Xu 2003; Kelly and Aramayo 2007). MSCI je doprovázena rozsáhlými přestavbami chromatinu pohlavních chromosomů, což je umožněno histonovými modifikacemi, z nichž nejdůležitější je nahrazení histonu H2A jeho variantou H2AX a následnou fosforylací (na serinu 139) za vzniku γ H2AX (Mahadevaiah et al. 2001). Fosforylace histonu H2AX na γ H2AX přichází v první vlně na chromatin autosomů v reakci na vytváření DSB v leptotenních spermatocytech a v další vlně v pachytenních spermatocytech už jen na nespárovaný chromatin (v normální buňce na X a Y chromosomech). Tuto fosforylací zajišťuje ATR (angl. Ataxia telangiectasia and Rad3 related) kinasa z rodiny PI3-podobných kinas (Turner et al. 2004; Bellani et al. 2005). Následně γ H2AX váže v místech zlomů proteiny dráhy opravující DNA jako například MDC1 (angl. mediator of DNA damage checkpoint 1) (Stucki et al. 2005).

3.7 Model hybridní sterility dvou poddruhů myši domácí

U myši byl poprvé fenomén hybridní sterility popsán během experimentů zabývajících se polymorfismy *H2* histokompatibilních systémů (Ivanyi et al. 1969), kdy se během křížení divokých myši poddruhu *musculus* s některými laboratorními kmeny jako například C57BL/10SnPh (B10) rodili sterilní hybridní samci. Naopak křížením odchycených myši s jinými klasickými kmeny (např. C3H) vznikali plodní samci. Posléze byl tento rozdíl ve fenotypech asociován pomocí genetického mapování s lokusem 10 cM proximálně od *H2* systému na chromosomu 17 nazvaným *Hst1* (Forejt and Ivanyi 1974).

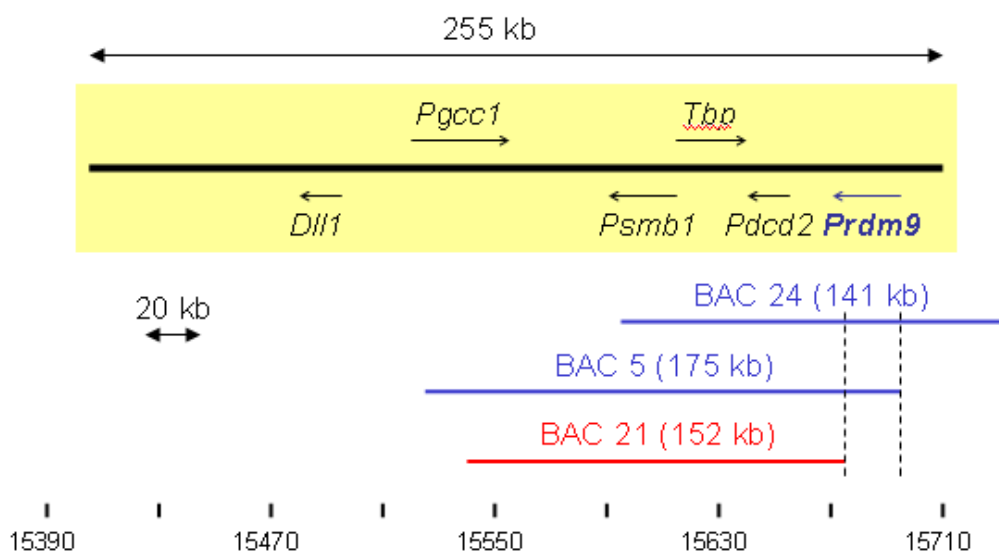
3.7.1 Mapování *Hst1/Prdm9*

Identifikace *Hst1* (angl. Hybrid sterility gene 1), který byl nejdříve přibližně geneticky mapován do proximální části chromosomu 17, probíhala postupně, společně s tím, jak začaly být dostupné nové a přesnější metody mapování genů. V první fázi bylo provedeno několik kroků genetického mapování, které bylo založeno na použití kříženců (B10 x C3H) s divokými myšmi nebo z divokých myši odvozenými inbredními kmeny poddruhu *M. m. musculus*

(PWD). *Hst1* byl geneticky lokalizován přesněji na chromosomu 17 (Forejt 1985; Forejt et al. 1991; Gregorova et al. 1996). Dalším krokem k pozičnímu klonování *Hst1* bylo jeho fyzické mapování pomocí oligonukleotidových primerů, specifických DNA sond a kvasinkových umělých chromosomů – YAC (angl. Yeast artificial chromosome), což zúžilo kandidátní oblast na délku 2 Mb (Trachtulec et al. 1994).

Kombinace výsledků fyzického a genetického mapování umožnila ještě větší zpřesnění *Hst1* oblasti a pomocí expresních a sekvenčních analýz se nakonec dospělo k asi 255 kbp dlouhému genomovému úseku, který obsahoval šest kandidátních, protein kódujících genů (obrázek 2) (Trachtulec et al. 2005). Pro takto zúžený seznam kandidátních genů byl navrhnout funkční experiment záchrany hybridní sterility pomocí transgeneze a to přímo na genetickém pozadí sterilních samců. Hybridi F1(PWD x B6) nesou kombinaci sterilní a divoké alely *Hst1* (*Hst1^s* x *Hstw*) a hypotéza byla, že přidáním několika kopií „F1-fertilní“ (*Hst1^f*) alely, by se měl u těchto samců změnit fenotyp sterility. Pro tento postup byly použity BAC transgeny (angl. Bacterial artificial chromosome) obsahující překrývající se úseky *Hst1* oblasti genomu kmene C3H, který nakřížením na PWD dával vzniknout plodným F1 hybridům a který tudíž nesl alelu *Hst1^f*. Byly získány celkem tři C3H BAC transgenní kmeny BAC 5, 21 a 24, kteří byly na vnitrodruhovém genetickém pozadí plodní a stejně tak plodily i fertilní potomky s rodičovským kmenem B6. Po nakřížení BAC transgenních samců s PWD samicemi plodili samci ze dvou linií (BAC 5 a 24) fertilní F1 samčí potomky a jen samci obsahující BAC 21 plodili hybridní samce, kteří nevykazovali žádné zlepšení plodnosti. Vylučovací metodou překrývajících se oblastí BAC transgenů byl pak určen jediný gen, který splňoval podmínku, aby byl zahrnut v obou transgenech BAC 5 a 24 a zároveň chyběl v BAC 21 (viz obrázek 2) (Mihola et al. 2009).

Obrázek 2: Úsek *Hst1* a překrývající se BAC transgeny.



Ve žlutém poli je schéma genomové oblasti s kandidátními geny. Barevné horizontální čáry vyznačují pokrytí *Hst1* úseku jednotlivými BAC transgeny: modré BAC 5 a BAC 24 zachraňující fertilitu a červený BAC 21 nezachraňující fertilitu F1 hybridních samců. Vertikální čárkované úsečky poukazují na gen kritické oblasti – *Prdm9*.

3.8 Gen *Prdm9*

Gen *Prdm9* kóduje jeden z proteinů rodiny nesoucí PR doménu - PRDM. Je známo 16 členů rodiny PRDM proteinů u hlodavců (myš a potkan), kura domácího a žáby drápatky (*Xenopus*). Dále byly doposud identifikovány dva až tři PRDM proteiny u háďátka (*Caenorhabditis elegans*) a mušky (*Drosophila*) (Fumasoni et al. 2007; Sun et al. 2008). Lidských proteinů PRDM rodiny je 17 a účastní se několika vývojových procesů včetně buněčné diferenciace (Hohenauer and Moore 2012). Z komparativních genomických studií vyplývá, že *Prdm* geny pocházejí již z dob počátků vývoje samotné živočišné říše (Vervoort et al. 2016) a navíc byl vznik některých členů *Prdm* genové rodiny asociován s objevením se nových genetických znaků (Khalturin et al. 2009; Foret et al. 2010).

PRDM proteiny se charakteristicky skládají z N-terminální PR domény (PRDI-BF1 a RIZ1 homologní), po které následuje několik opakování domén zinkových prstů nesoucích DNA

vazebnou aktivitu. Zinkový prst (zinc finger) je název domény s typickou sekvencí obsahující motif His₂Cys₂. Každý tento motif váže jeden zinečnatý iont; zinkové prsty tak slouží k udržování terciární a kvartérní struktury bílkovin nesoucích DNA vazebnou aktivitu (Maret and Li 2009). U některých proteinů rodiny PRDM byla prokázána metylační aktivita histonů (PRDM2, 3, 8, 9 a 16) a někteří zprostředkovávají navázání jiných enzymů modifikujících histony (Hayashi et al. 2005; Eom et al. 2009; Hohenauer and Moore 2012; Pinheiro et al. 2012).

PRDM9 je, kromě jeho PRDM7 paralogu u lidí, jediný člen rodiny PRDM proteinů kódující také KRAB doménu (Krüppel-associated box). KRAB doména je často spojována s transkripčními represory (Birtle and Ponting 2006). PR/SET doména PRDM9 katalyzuje mimojiné trimetylaci lysinu 4 na histonu 3 (H3K4me3) (Hayashi et al. 2005). Tato histonová modifikace je ovšem typicky přítomná na počátečních místech aktivní transkripce (Barski et al. 2007). Podle nejnovějších poznatků je KRAB doména PRDM9 proteinu nezbytná pro meiotickou profázi I a gametogenezi (Imai et al. 2017). Alela *Prdm9*, která produkuje protein s poškozenou KRAB doménou, způsobuje vážné defekty ve vývoji gonád u homozygotních myší (Imai et al. 2017). V uvedené studii jsou i naznačeny interakce KRAB domény s proteiny mašinerie opravující DSB. Celkem vzato PRDM9 nemusí hrát roli v transkripční regulaci, ale zdá se, že je spíše klíčovým faktorem v určování pozic meiotické rekombinace u myší a lidí (Baudat et al. 2010; Myers et al. 2010; Parvanov et al. 2010).

3.8.1 *Prdm9* v roli regulátora rekombinace u myší a lidí

Domény zinkových prstů, které PRDM9 obsahuje, určují specifickou vazbu na DNA oocytů a spermatocytů v místech, kde může metylační aktivita tohoto proteinu zvýšit koncentraci histonových značek vytvořených PR/SET doménou proteinu PRDM9. Nedávno byla *in vitro* i *in vivo* potvrzena schopnost PRDM9 katalyzovat trimetylaci lysinu K4 a K36 na histonu H3 - H3K4me3 a H3K36me3. Obě tyto značky se ve meiocytech hojně vyskytují, ale v kombinaci na tom samém histonu se objevují pouze v místech rekombinačních hotspotů a v PAR pohlavních chromosomů (Powers et al. 2016). Rekombinanční hotspoty jsou místa na chromosomech, kde se s vyšší pravděpodobností odehrávají meiotické crossing-overy a konverze, které tak neurčuje pouze náhoda. Bylo dokázáno, že v leptotenním stádiu myších spermatocytů, které předchází meiotickým rekombinančním opravám DSB, je chromatin v

rekombinančních hotspotech označen právě trimetylovaným H3K4me3 a H3K36me3 (Buard et al. 2009; Powers et al. 2016). V PAR pohlavních chromosomech je určování DBS specifické a probíhá jinými mechanismy než ve zbytku genomu, na autosomech (Kauppi et al. 2011). Použitím dvou myších kmenů lišících se v transaktivaci rekombinančních hotspotů bylo možno geneticky zmapovat geny, které tyto rekombinanční hotspoty určují. Toto mapování ukázalo na proximální oblast chromosomu 17 s kandidátním genem *Prdm9* (Grey et al. 2009; Baudat et al. 2010; Parvanov et al. 2010). Studie také potvrdily *in silico* a *in vitro* vazbu lidského PRDM9 proteinu na konsenzuální sekvenci rekombinančních hotspotů u lidí (Baudat et al. 2010; Myers et al. 2010).

3.8.2 PRDM9 a nukleosomy rekombinačních hotspotů

Jeden z aspektů možného mechanismu působení PRDM9 při aktivování kandidátních sekvencí pro následné navázání endogenní topoizomerasy a vytvoření dvouřetězcového zlomu je pomocí remodelace chromatinu na různých úrovních. Podle recentní studie (Baker et al. 2014) PRDM9 vytvoří značku H3K4me3 na nukleosomech obklopujících vazebný motiv a způsobí přeskupení nukleosomálních histonových jader za vytvoření sekvence DNA bez navázaných nukleosomů (tzn. nucleosome-depleted regions – NDRs). Délka těchto PRDM9 indukovaných sekvencí byla okolo 120 párů bazí, což je téměř dvojnásobný rozdíl oproti obvyklé strukturní organizaci chromatinu ve zbytku genomu, protože DNA sekvence mezi nukleosomy nazývané linkery bývají v průměru 66 (+/-30) párů bazí dlouhé (Valouev et al. 2011). Autoři studie (Baker et al. 2014) uvedli zajímavou souvislost s již dříve popsány proteiny, které také disponují DNA-vazebnou sekvencí zinkových prstů (ZnF) na C-konci a u kterých bylo dokázáno, že při své specifické vazbě na DNA tvoří analogické a dokonce obdobně dlouhé NDRs. Například vysoce konzervovaný represorový protein CTCF s 11 ZnF repeticemi, vážící se na NDR o délce ~130 bp, nebo další represor v lidských buněčných liniích známý jako NRSF s NDR dlouhým 93 bp (Valouev et al. 2011).

3.8.3 Rychlá evoluce genu *Prdm9*

Počet ZnF domén na C-terminálním konci proteinu PRDM9 se velice rychle vyvíjí. Navíc kodony pro aminokyseliny předpovězené jako zásadní pro specifitu vazby PRDM9 na DNA vykazují známky pozitivní selekce (Oliver et al. 2009; Thomas et al. 2009; Berg et al. 2010). C-konce PRDM9 se liší i mezi-(pod)druhovými a vnitro-(pod)druhovými alelami s rozdílnými

důsledky pro hybridní sterilitu (Mihola et al. 2009) a jsou funkčním rozdílem způsobujícím hybridní sterilitu (Davies et al. 2016).

U jiného modelu sterility, který byl zkoumán na hybridech drosofil, byla také prokázána rychlá evoluce a pozitivní selekce speciálního genu. Jedná se o homeodoménu genu *OdsH* (*OdysseusH* – *Odysseus* homeobox factor), která rovněž zajišťuje vazbu na DNA (Bayes and Malik 2009; Oliver et al. 2009). V tomto případě se zdá, že vývoj genu *OdsH* reflektuje rychlou evoluci satelitní DNA v rámci centromerického heterochromatinu, na který se produkt tohoto genu váže.

V případě genu *Prdm9* se jeví jako vhodnější vysvětlení, proč je tento gen pod pozitivní selekcí, pomíjivý charakter rekombinančních hotspotů (Coop and Myers 2007). Tyto studie popisují vnitřní sebedestruktivní atribut rekombinančních hotspotů. Hotspoty přitahují enzymatickou mašinérii vytvářející endogenní dvouřetězcové zlomy, která se sekvenčně specificky váže právě do PRDM9-nukleotidových motivů. Tyto zlomy jsou přirozeným procesem (nutným pro fertilitu), zahajujícím reciprokou meiotickou výměnu DNA homologních chromosomů, která je ve své podstatě opravou těchto zlomů. Mechanismus rekombinace opravuje dvouřetězcové zlomy pomocí genové konverze nebo crossing-overu. V obou případech se zlom doplní podle druhé nesesterské chromatidy, která nemusí mít PRDM9-vazebnou sekvenci. Tak může sekvence hotspotu zaniknout a dá se dokonce vyvodit, že čím jsou rekombinanční hotspoty silnější, tím více určují samy sebe k zániku (Coop and Myers 2007).

Tato pozorování tedy spíše poukazují na hypotézu, že mezi-(pod)druhová meiotická nekompatibilita v našem modelu hybridní sterility by mohla být následkem rychlé evoluce C-konce PRDM9, která se snaží přizpůsobit neustálému zanikání rekombinančních hotspotů v genomu (Forejt et al. 2012). Pozitivní selekce by totiž přispívala k rychlejšímu vzniku nových alel genu *Prdm9* u dočasně izolovaných populací a tak k hromadění potenciálních D-M nekompatibilit.

4 Materiál a metody

4.1 Myši

Inbrední laboratorní kmeny C57BL/6J (dále jen B6) a C3H/HeN pocházely z The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Myši kmeny PWD/Ph a PWK/Ph (Prague Wild D a K) byly odvozeny z divokých myši poddruhu *M. m. musculus* (Gregorova and Forejt 2000) v Ústavu molekulární genetiky (ÚMG, Akademie věd České Republiky), kde jsou od té doby udržovány více než 70 generacemi inbredního křížení. Konsomické kmeny C57BL/6J-ChrX^{PWD} a C57BL/6J-Chr17^{PWD} byly také připraveny na ÚMG AV ČR a již dříve popsány (Nadeau et al. 2000; Gregorova et al. 2008).

Transgenní kmeny použité v této práci byly následující. Kmeny nesoucí BAC 5, 21 a 24 byly vytvořeny z konstruktů z DNA kmene C3H/HeJ použitím genomické knihovny CHORI-34BAC (Zeng et al. 2001). Vyselektované BAC konstrukty byly transfekovány do F1(129/S4SvJae x C57BL/6) embryonálních buněk. Příslušné embryonální linie byly mikroinjekovány do C57BL/6 blastocyst náhradních matek pro získání chimerických myši. Na základě polymorfních markerů CH07 (viz níže: Primery pro *Prdm9*^{C3H}) byly identifikovány transgeny a použitím stejných markerů byli vytvářeni mezi-poddruhová kříženci i převedeny celé BAC kmeny deseti generacemi zpětného křížení na C57BL/6 genetické pozadí. BAC transgen obsahující C57BL/6 neboli B6 alelu *Prdm9* byl vytvořen mikroinjekováním cirkulární DNA BACu s označením RP23-159N6 do zygot samčích prvojader na C57BL/6 genetickém pozadí. Myši nesoucí delecii s označením *Sod2*^{df14J} na chromosomu 17 byly vytvořeny pomocí embryonálních kmenových buněk (Bergstrom et al. 2003). Nefunkční (KO, knock-out) alela s označením *Prdm9*^{tm1Ymat} byla genereována na 129P2/OlaHsd embryonálních kmenových buňkách nahrazením prvních pěti exonů *LacZ* operonem a zpočátku udržována na smíšeném 129P2/OlaHsd a C57BL/6 genetickém pozadí.

Všechny myši byly ustájeny v SPF (Specific Pathogen-Free) chovech na Ústavu molekulární genetiky v Praze. S myšmi bylo zacházeno v souladu se zákony České Republiky na ochranu zvířat proti týrání (č.264/1992 Sb).

4.2 Genotypování

4.2.1 Izolace DNA

Izolace genomové DNA alkalickou extrakcí byla provedena z části odstřiženého ocásku (asi 2 mm), která byla vložena do 600 μ l 50 mM NaOH. Následovala inkubace 90 min při 95°C. Vzorek byl poté neutralizován 50 μ l 1M Tris (pH 8) a lehce promíchán pár převrácením zkumavky. Po šestiminutovém stočení na stolní centrifuze maximálními otáčkami bylo možné DNA přímo použít na genotypizaci, případně podle potřeby naředit 2 - 5x ultračistou vodou (Millipore Corp.).

Pro **izolaci vysokomolekulární genomové DNA fenol-chloroformovou metodou** byla použita dostupná tkáň (slezina, ocásek), která byla rozstříhána (případně po zmrazení rozdrčena na malé kousky). Kousky tkáně se vložily do 0,7 ml lyzačního roztoku na přípravu DNA (100 mM TrisCl pH 8,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 200 mM NaCl; 0,2% SDS). Po přidání 10 μ l proteinasy K o koncentraci 10 mg/ml byl vzorek inkubován na rotační míchačce při 50-55°C přes celou noc. Druhý den následovala centrifugace při 10 000 otáčekách/min (rpm), 10 min a k 0,7 ml lyzátu bylo přidáno stejné množství fenol:chloroform:isoamylalkoholové směsi (25:24:1). Vzorek byl dále protřepáván po dobu 5 min při pokojové teplotě, až se fáze spojily a znovu centrifugován 10 minut při otáčkách 10 000 rpm. Horní fáze byla přenesena do čisté zkumavky a bylo přidáno stejné množství chloroform:isoamylalkoholu (v poměru 24 : 1). Zkumavka byla důkladně promíchána a centrifugována 10 minut při otáčkách 10 000 rpm. Z horní vodné fáze byla pak DNA vysrážena 0,5 ml 100% isopropanolu a opláchnuta v 75% ethanolu. Usušená peleta DNA byla nakonec rozpouštěna při 4°C přes noc ve 100 μ l 1 x TE pufru (10 mM TrisCl pH 8,5; 1 mM EDTA pH 8,0). Změření na spektrofotometru (Nanodrop ND-1000) byla stanovena výsledná koncentrace vyizolované DNA a čistota určena pomocí poměru absorpance A_{260}/A_{280} . DNA byla nakonec naředěna ultračistou vodou (Millipore Corp.) na požadovanou koncentraci pro příslušné použití.

4.2.2 PCR – amplifikace markerů a vyhodnocení produktů

Obecně probíhala základní genotypizační reakce celkem ve 20 μ l reakční směsi, která obsahovala: vodu, DNA templát, 1x PCR pufr, 1,65 mM MgCl₂, 175 μ M každého dNTP, 200 nM obou primerů a 0,3 U *Taq* polymerasy. Ke genotypizaci nám sloužily primery amplifikující

délkově polymorfní mikrosatelitové úseky (tabulka 1). Amplikony byly elektroforeticky rozděleny na (EtBr) agarosovém gelu.

Tabulka 1: Použité primery s udanou polohou na chromosomu

Chr17		ChrX	
Název	Pozice [Mb]	Název	Pozice [Mb]
D17Mit164	3	DXMit166	49
D17M13	13	DXMit92	58
D17Zt642	15	DXMit194	67
D17Ch07	15,6	DXMit44	77
D17Zt334	16		
D17M21	21		
D17Mit33	35		
D17Mit123	94		

(Gregorova et al. 2008; Flachs et al. 2012)

Dále byly použity speciálně navržené primery pro genotypizaci *Prdm9* alel:

Primery pro *Prdm9^{tm1Ymat}* knock-out (5' → 3'):

ATTTCCCTGTATCTTCTTCAGGACT

AGGAATCTTCCTTCCTTGCTGTCG

CGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTT

- $T_a = 54^\circ\text{C}$; délkový polymorfismus: *Prdm9^{tm1Ymat}* > *Prdm9^{wt}* (450 bp, 319 bp)

Primery pro *Prdm9^{C3H}* (5' → 3'):

TTGCTATAAAAGGACTGTTTGAT

ACACAAAGACAGAAGAAGAGGA

- $T_a = 52^\circ\text{C}$; délkový polymorfismus: *Prdm9^{B6}*>*Prdm9^{C3H}* (144 bp)

Primery pro *Prdm9^{B6}* (BAC RP23-159N6 transgen) (5' → 3'):

AGGAGCTGACTGGGTTGAA

CCCTATGAAGATCCTCTCCCTA

- $T_a = 53^\circ\text{C}$; (123 bp)

4.3 Expresní analýza a kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR byla prováděna s použitím real-time PCR systému (LightCycler, Roche). Primery byly navrhovány tak, aby neamplifikovaly druhotné struktury a mapovaly mimo polymorfní oblasti mezi kmeny B6, C3H a PWD. Jejich sekvence a podmínky jsou popsány v (Mihola et al. 2009). Celková RNA (total RNA) byla izolována pomocí Trizolu (Invitrogen) ze 14 denních myší. Následně byla použita MuMLV reverzní transkriptasa (Invitrogen) pro RT reakci (reverzní transkripce). Do každé reakce obsahující FastStart DNA MasterSYBR Green I kit bylo přidáno množství DNA odpovídající 50 ng RNA a směs byla spuštěna v systému LightCycler. Jako kontroly sloužily RT reakce bez reverzní transkriptasy. Testovány byly nejméně dva vzorky DNA od různých myší stejného genotypu a vždy v nejméně dvou technických replikátech.

4.4 Zjišťování plodnosti samců

Pitva

K vyšetření plodnosti samců bylo hodnoceno více parametrů z 9 – 12 týdenních samců. Základní fenotypy jako hmotnost těla (BW – body weight) a varlat (TW – testes weight) byly odečítány vždy při pitvách samců a sloužily tak jako první kontrola a orientace v jejich potencionální plodnosti.

Počet spermií

Klíčové hodnoty počtu spermií (SC – sperm count) byly ve většině případů stanoveny z obou kompletních nadvarlat (epididymis) jejich vypitváním, extrakcí spermií a počítáním pod

světelným mikroskopem v Bürkerově počítací komůrce. Spermie z nadvarlat byly eluovány v 0,5 ml fyziologického roztoku PBS rozstříháním na malé kousíčky. Zkumavka se vzorkem rozstříhaných epididymis byla ručně silně protřepána pro důkladné vylití spermií a nechána při pokojové teplotě pět minut odstát, aby se usadily větší zbytky tkáně. Vzorek spermií byl opatrně odebrán z horní části roztoku a naředěn podle odhadovaného počtu spermií, tak aby v Bürkerově počítací komůrce bylo ideálně do pěti spermií na čtverec. Do Bürkerovy počítací komůrky bylo nanášeno 10 μ l vzorku a spermie počítány pod 400-násobným zvětšením ve světelném mikroskopu. Absolutní počet spermií samce v obou epididymis byl stanoven výpočtem rovnicí: počet buněk v 25 čtvcích \times 10 000 \times zředění \times výchozí objem PBS (tzn. 0,5 ml).

Morfologie spermií

Zbytek roztoku PBS po určení počtu spermií byl použit pro zjištění morfologie fixovaných spermií barvením 9 : 1 s 1% eosinem. Barvení eosinem probíhalo smícháním roztoku eluovaných spermií s eosinem v nové zkumavce při +4°C po dobu nejméně 45 minut. V případě samců s velice malým celkovým počtem spermií (tisíce až statisíce) byl roztok před inkubací s eosinem zahuštěn jemnou centrifugací (asi 3 000 rpm po dobu 2-3 minut). Poté bylo nakapáno 15 μ l roztoku nabarvených spermií na připravené podložní sklíčko. Spermie byly rozprostřeny pomocí tahu jiného podložního sklíčka a vysušením na vzduchu fixovány. Použitím 400-násobného zvětšení na světelném mikroskopu bylo spočítáno nejméně 100 buněk spermií a ty byly rozděleny do kategorií podle tvaru hlavičky, háčku, bičíku apod. (Otubanjo and Mosuro 2007).

Počet potomků

Fenotyp potvrzující plodnost samců je jejich reálná schopnost plodit potomstvo. Tato hodnota byla stanovena připuštěním vyšetřovaných dospělých samců po dva až čtyři měsíce s kontrolními plodnými samicemi. Mláďata byla odstraňována co nejdříve po porodu. Z počtu mláďat narozených během doby připuštění se vypočítal průměrný počet potomků, který daný samec zplodil s jednou samicí za jeden měsíc (OFM – offspring per female per month).

4.5 Analýza meiotického průběhu

Pro detailnější popis průběhu spermatogeneze a identifikaci konkrétních bodů meiotické zástavy byl optimalizován protokol pro přípravu a pozorování imunocytochemických preparátů testikulárních buňek.

Příprava testikulárních preparátů

Pro přípravu těchto testikulárních preparátů se z vypitvaných varlat zhotovila čistá jednobuněčná suspenze. Bylo použito EKRB medium, což je obohacené KRB medium (angl. Krebs-Ringer bicarbonate) a obsahuje: 120,1mM NaCl, 4,8mM KCl, 25,2mM NaHCO₃, 1,2mM NaH₂PO₄, 1,2mM MgSO₄, 1,3mM CaCl₂, 0,5mM pyruvát sodný, 11mM glukosu, esenciální a neesenciální aminokyseliny (Gibco) a směs penicilin-streptomycin (Gibco). Příprava suspenze spočívala nejprve v rozvolnění semenotvorných kanálků inkubací varlat zbavených tuniky v 10 ml EKRB média obsahujícího výslednou koncentraci 500μg/ml kolagenasy (Sigma-Aldrich, kat. č. C7657-1G) a 5 μg/ml DNAsy I (Affymetrix, kat. č. 14340 10 MG) při 32°C po dobu 25 minut a za mírného třepání (120 otáček/min). Po inkubaci se kanálky zbavily okolní tkáně a rozvolnily, což bylo dosaženo jejich jemným protahováním ustříhnutou 1 ml špičkou pipety. Rozvolněné kanálky byly přečištěny od zbytků tkáně a ostatních somatických buněk zachycením kanálků na 40 μm buněčném filtru (nylon 40 μm Cell Strainer). Kanálky byly opět resuspendovány v EKRB s opětovným přidáním enzymů kolagenasy a DNAsy I do uvedené koncentrace a znovu inkubovány ve 32°C po stejnou dobu. Touto druhou inkubací a následným důkladnějším protahováním neustříženou špičkou bylo dosaženo rozpadnutí kanálků a vylučování testikulárních buňek do média. Opětovným použitím buněčného filtru byly zachyceny tentokrát zbytky rozpadlých kanálků a ostatní nečistoty. Filtrát obsahující jednobuněčnou suspenzi spermatogenních buňek byl ještě dvakrát přečištěn centrifugací 12 respektive 15 minut při 1 000 rpm, kdy byl vždy supernatant odstraněn a peleta jemně resuspendována. Po druhé centrifugaci byla peleta rozpuštěna podle její velikosti ve 150 až 350 μl EKRB, aby výsledná koncentrace buňek před nakapáním na předčištěné sklo byla přibližně 2 až 3 milióny buněk na ml. Pro nakapání na podložní sklo nejprve asi 10 μl jednobuněčné suspenze (tj. 20 000 až 30 000 buněk) přidáno do 100 μl hypotonického vodného roztoku obsahujícího 0,1M sacharosu a 0,2x koncentrované inhibitory proteas (Roche). Takto připravená suspenze byla v množství 30μl na sklo nakapána ustříženou

špičkou z výšky asi 10 cm na podložní skla. Na každé jednotlivé podložní sklo bylo asi 30 minut předem naneseo 65 µl fixačního činidla (1% paraformaldehyd – PFA, 0,15% Triton X100, 0,2x inhibitory proteas v 50mM boritanu sodném, pH=9,2). Tato skla byla uchována ve vlhkém prostředí v +4°C po dobu tří hodin. Poslední fáze přípravy preparátu před imunobarvením spočívala v opláchnutí skel čistou demineralizovanou vodou, následným částečným vysušením na vzduchu (asi 10-15 minut) a uchováním v +4°C v PBS pufru. Tento protokol byl s menšími modifikacemi převzat z (Anderson et al. 1999).

Imunobarvení

Pro blokování preparátů a ředění protilátek bylo použito 0,5x koncentrovaného MAH pufru (1,5% BSA, 5% kozí sérum, 0,05% Triton X100 a 0,2x inhibitory proteas v PBS).

Použité primární protilátky: Synaptonemální komplex 1 (králičí polyklonální anti-SYCP1, Abcam ab15087); synaptonemální komplex 3 (myší monoklonální anti-SYCP3, Santa Cruz sc-74569); Ser139-fosforylovaná varianta histonu H2A.X (myší monoklonální anti- γ H2AX, Millipore 05-636)

Použité sekundární protilátky: Alexa Fluor 488 (kozí anti-králičí IgG, A-11034); Alexa Fluor 568 (kozí anti-myší IgG, A-11031); Alexa Fluor 647 (kozí anti-myší IgG, A-21236).

Sklíčka s testikulárními preparáty bylo možno po dobu přibližně pár týdnů skladovat v PBS pufru a teplotě +4°C bez zjevné změny kvality fixovaných jader a reaktivity epitopů se specifickými protilátkami. Před samotnou aplikací primárních protilátek bylo vždy provedeno blokování 0,5MAH pufrům po dobu nejméně 60 minut. Tato preinkubace samotným pufrům byla použita vždy před nanesením protilátek pro vyvážení případných nespecifických interakcí. Všechny aplikace protilátek včetně blokování byly prováděny ve vlhkém prostředí, pod krycím sklíčkem a teplotě +4°C s použitím 90 µl pufru na jedno podložní sklo s preparátem.

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek s optimalizovaným ředěním a dobou inkubace

Primární protilátky			Sekundární protilátky		
Název	Ředění	Inkubace	Název	Ředění	Inkubace
králičí- α -SYCP1	1:400	O/N	kozí- α -rIgG 488	1:500	1hod

myší-α-SYCP3	1:50	O/N	kozí- α -mIgG 568	1:500	1hod
myší-α-γH2AX	1:5 000	2hod	kozí- α -mIgG 647	1:500	1hod
králičí-α-RAD51	1:300	O/N			
králičí -α-DMC1	1:300	O/N			

O/N = přes noc (overnight); α = anti; **rIgG** = králičí (rabbit) Immunoglobulin G; **mIgG** = myší (mouse) IgG

Postup barvení:

1. Příslušný počet skladovaných skel s fixovanými buňkami byl opláchnut v 1xPBS pufru.
2. Na každé sklo bylo poté nanášeno 90 μ l 0,5MAH pufru a tato kapka pak byla opatrně (aby se nevytvořily bublinky) překryta krycím sklíčkem tak, že pufr pokrýval celou plochu preparátu. Skla byla inkubována ve vlhké komůrce a v temnu při +4°C.
3. Následovala aplikace předem naředěných primárních protilátek. Jednotlivé protilátky v žádané kombinaci se najednou naředily podle příslušného poměru v 0,5MAH pufru v množství 100 μ l x počet skel. Inkubovalo se pod krycím sklíčkem do druhého dne ve vlhké komůrce, temnu a maximálně +4°C.
4. Druhý den byla skla nejdříve zběžně opláchnuta PBS puftrem a poté provedeno důkladné omytí v PBS 3x10minut v temnu a chladu.
5. Po omytí následovalo nanášení sekundárních protilátek s navázaným příslušným fluorochromem. Opět 90 μ l 0,5MAH pufru s příslušně naředěnými protilátkami na každé sklo. Inkubace pod krycím sklíčkem jednu hodinu ve vlhké komůrce, temnu a maximálně +4°C.
6. Oplach 3x10 minut v PBS (viz krok 4).
7. (volitelné) V případě žádané kombinace protilátek získaných ze stejného zvířete, v tomto případě myší SYCP3 a γ H2AX, nelze aplikovat obě protilátky najednou z důvodu zkřížených reakcí (crossreactivity). Ale po důkladné optimalizaci bylo možné opakovat kroky 3 - 6. s příslušnou kombinací primární a sekundární protilátky (γ H2AX

a α -mIgG 647). Tento postup musel splňovat dvě důležité podmínky: A sice aby se předpokládané signály (značené buněčné struktury) obou protilátek nepřekrývaly a navíc aby použitá α - γ H2AX protilátka měla velmi silnou a vysoce specifickou reaktivitu.

8. Následoval 2x rychlý oplach v demineralizované vodě a vysušení preparátů na vzduchu a pokojové teplotě (max 15 minut).
9. Nakonec bylo provedeno zamontování (uzavření) preparátu montovacím médiem obsahujícím také DAPI pro obecné barvení jader (DNA). Přibližně 15 - 20 μ l montovacího média (Mounting medium with DAPI, Vectashield) se nalilo na sklo a opatrně překrylo krycím sklíčkem.

Pozorování a vyhodnocení

Pozorování probíhalo na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse 400 při zvětšení 400 – 600x. Pořizování, zpracování i analýza obrazového materiálu bylo prováděno pomocí programu s ovládacím softwarem mikroskopu NIS-Elements BR (Nikon).

4.6 Statistické zpracování dat

Signifikance fenotypových hodnot hmotnosti těla a varlat (BW, TW) byla ověřována pomocí Welschova t-testu. Wilcoxonův test (Wilcoxon rank-sum test) byl použit na statistické zpracování dat počtu potomků a spermií (OFM, SC) i buněčné fenotypy meiotického průběhu.

5 Výsledky

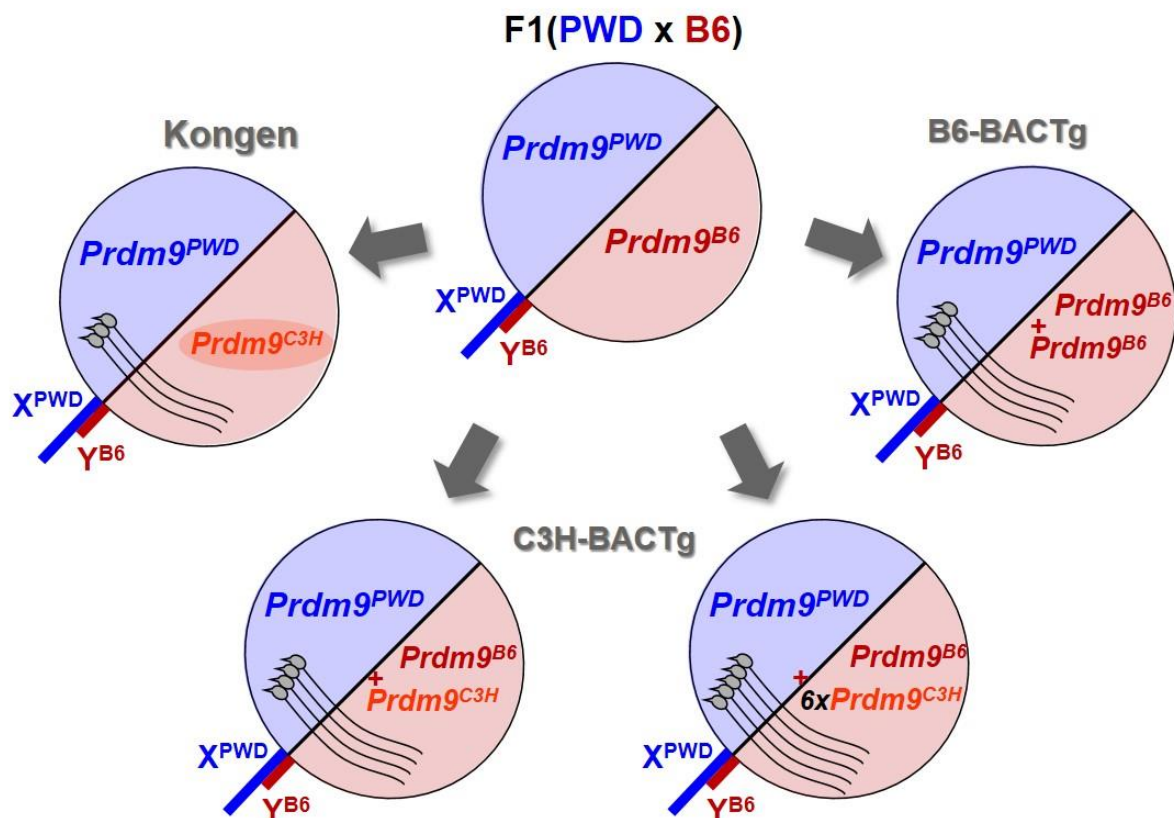
5.1 Překonání hybridní sterility závisí na dávce, ale ne na alele genu *Prdm9*

Již poziční klonování genu *Hst1* a jeho identifikace jako *Prdm9* (Mihola et al. 2009) naznačilo, že záchrana hybridní sterility samců F1(PWD x B6) pomocí přidání C3H fertillní alely není vždy stejně účinná. *Prdm9^{C3H}* alela byla přidávána na hybridní genetické pozadí pomocí BAC transgenů vložených do jednoho z inbredních rodičovských kmenů (obrázek 2). U dvou typů transgenů, BAC5 a BAC24, jsme pozorovali odlišný fenotyp záchrany sterility; průměrná váha testes a celkový počet spermií hybridů s BAC5 byli nižší než u hybridů obsahujících BAC24 (Mihola et al. 2009). Z důvodu variabilní účinnosti transgeneze se do rodičovského B6 genomu inkorporoval různý počet kopií BAC transgenů a díky expresním studiím jsme potvrdili, že počet vložených kopií transgenů (BAC5 dvě kopie a BAC24 šest kopií) pozitivně koreluje s expresí *Prdm9* stejně jako s mírou zlepšení fertility transgen-pozitivních hybridů (Mihola et al. 2009). Tento fenotyp se projevil pouze na hybridním mezi-(pod)druhovém genetickém pozadí, zatímco u rodičovského kmene nebylo možno pozorovat významný vliv této zvýšené genové dávky *Prdm9* na jejich plodnost.

Následně jsme zodpověděli otázku, jestli je právě popsán způsob nestejněměrného zvratu hybridní sterility zapříčiněn vkládáním *Prdm9^{C3H}* („F1-fertillní“, *Hst1^f*) alely, nebo se jedná o efekt zvýšení genové dávky genu *Prdm9* neohledě na typ alely. Využili jsme opět BAC transgeny, tentokrát se „F1-sterillní“ alelou *Prdm9^{B6}* (BAC transgen RP23-159N6, nadále nazýván B6BAC, (Grey et al. 2011)). Na výchozím B6 pozadí B6BAC transgen neměl podle očekávání patrný vliv na fertilitu a jeho efekt se projevil teprve po nakřížení s PWD samicí, aby tak vznikli F1(PWD x B6) hybridní samci, v tomto případě se dvěma kopiemi *Prdm9^{B6}* navíc k původním alelám B6 a PWD. Takovýmto samcům se opět zvýšily parametry fertility včetně schopnosti plodit potomstvo, a potvrdila se tak hypotéza, že záchrana fertility zvýšením genové dávky není omezena pouze na *Prdm9^{C3H}* alelu. Nabízela se další otázka, zdali by změna genové dávky působila na hybridní sterilitu také, pokud by se exprese *Prdm9* snížila. Pro tyto účely bylo možné použít dva typy nulových alel, které jsme měli k dispozici. Jednalo se o rozsáhlejší deleci chromosomu 17 obsahující také gen *Prdm9* (*Sod2^{df14J}*, (Bergstrom et al. 2003)) a knock-out připravený nahrazením prvních pěti exonů *Prdm9* LacZ konstruktem

(*Prdm9^{tm1Ymat}*) (Hayashi et al. 2005). Po nakřížení obou typů disfunkčních alel na B6 pozadí se samicí PWD vznikli opět hybridní samčí potomci se zvýšenou váhou testes, měřitelným počtem spermií i schopností plodit, kteří se tímto lišili od svých kontrolních sourozenců s jednou *Prdm9^{B6}* a jednou *Prdm9^{PWD}* alelou. Zvýšení parametrů plodnosti bylo zřejmé, i když nebylo stejně účinné jako u transgenů zachraňujících fertilitu (obrázek 3, tabulka 3). Zvrat fenotypu hybridní sterility F1(PWD x B6) hybridů je tudíž dosažitelný (alespoň do jisté míry) jak snížením, tak zvýšením genové dávky *Prdm9*.

Obrázek 3. Schématické znázornění zvratu sterility F1(PWD x B6) hybridů přidáním či záměnou *Prdm9* alel.



Kolečka představují genomy myších samců s pohlavními chromosomy X a Y jako úsečkami vyčnívajícími ven. Genetické pozadí je symbolizováno barvami, kde červená je pro B6, oranžová pro C3H (obě původu *M. m. domesticus*) a modrá pro PWD (původ *M. m. musculus*). Rozdělení kruhu označuje heterozygotní pozadí F1 hybridů. Úroveň fertility je znázorněna počtem spermií a nepřítomnost spermie znamená úplnou sterilitu.

Tabulka 3. Efekt dávky genu *Prdm9* na hybridní sterilitu.

Křížení (samička první)	<i>Prdm9</i>	n	TW	SC
PWD×B6-BACB6	PWD/B6	9	55	0,00 ^a
PWD×B6-BACB6	PWD/B6+2B6	3	167*	18* ^a
PWD×B6-KO	PWD/B6	10	59	0,00
PWD×B6-KO	PWD/-	12	82*	0,06*
PWD×(B6- <i>Prdm9</i> ^{C3H} ×KO)	PWD/-	10	94	0,10
PWD×(B6- <i>Prdm9</i> ^{C3H} ×KO)	PWD/C3H	8	140*	1,06*
PWD×B6- <i>Prdm9</i> ^{C3H}	PWD/C3H	8	109	0,2
PWD×(KO×BAC5)	PWD/-	13	85	0,07
PWD×(KO×BAC5)	PWD/-+2C3H	15	168*	1,6*
PWD×(KO×BAC24)	PWD/-	9	77	0,03
PWD×(KO×BAC24)	PWD/-+6C3H	5	235*	3,9*

B6-BACB6 = myš nesoucí *Prdm9*^{B6} (RP23-159N6) transgen v heterozygotním stavu; BAC5 = transgenní kmen se dvěma kopiemi *Prdm9*^{C3H}; BAC24 = transgenní kmen se šesti kopiemi *Prdm9*^{C3H}; KO, B6-KO = heterozygot nesoucí deletovanou – knock-out alelu *Prdm9*^{g^{my}mat}; *Prdm9* = genotyp *Prdm9* od (matka/otec); - = nulová alela; n = počet samců; TW = průměrná váha obou varlat v miligramech; SC = průměrný počet spermií v milionech v páru hlaviček nadvarlat (caput epididymis); a = hodnoty SC odpovídají počtu spermií z celého levého nadvarlete izolované jinou metodou; * = hodnoty jsou signifikantně rozdílné od hodnot kontrolních sourozenců.

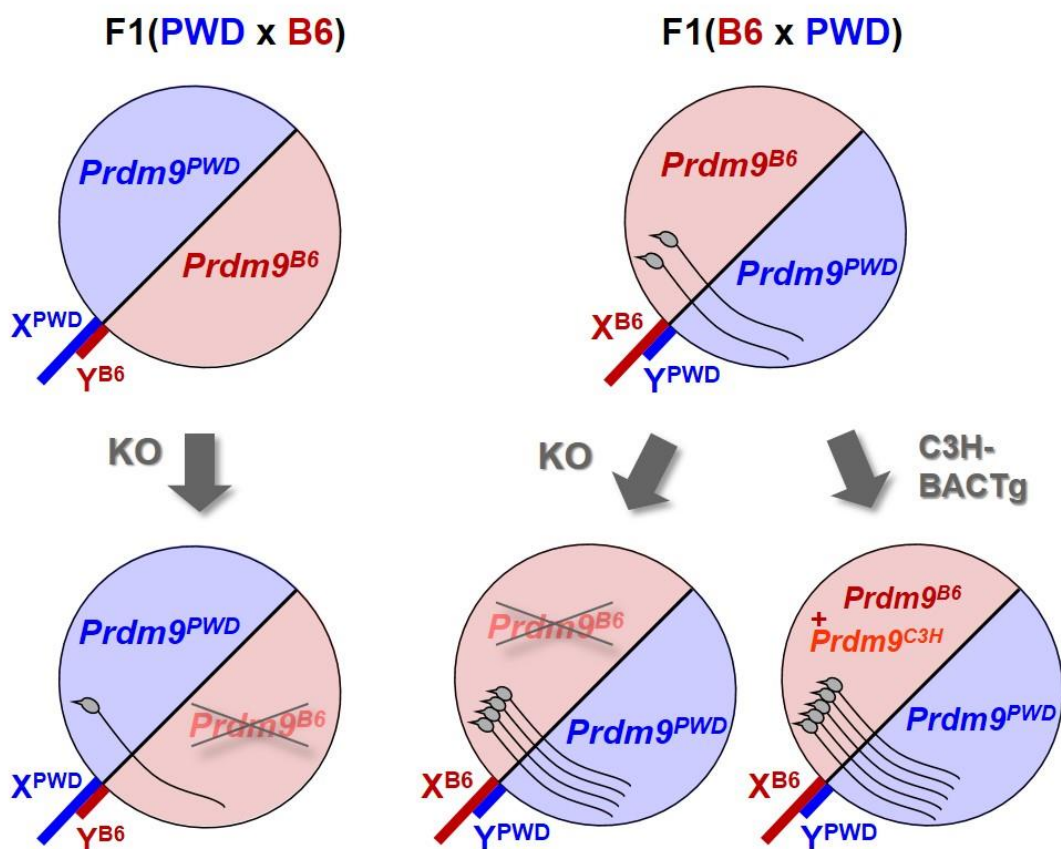
5.2 Vliv *Prdm9* na spermatogenezi reciprokých F1(B6 x PWD) hybridů

Role alel *Prdm9* genu byla dosud studována ve spermatogenezi sterilních F1(PWD x B6) hybridů. Naproti tomu úlohu tohoto genu v semisterilitě reciprokých F1(B6 x PWD), kteří vznikají zkřížením B6 samice a PWD samce, bylo potřeba ještě ověřit. Tito navzájem reciprocí hybridů s prohozenými rodiči se geneticky liší především kombinací pohlavních chromosomů a dále mitochondriálním genomem a genovým imprintingem. Fenotyp těchto navzájem reciprokých hybridů je zásadně rozdílný, protože hybridů, kde matka pocházela z kmene B6, jsou schopni plodit potomstvo, přestože jejich fertilita nedosahuje úrovně rodičovských kmenů ani v počtu potomků, váhy testes a množství spermií v epididymis (podrobněji v tabulce 4).

K prostudování této otázky jsme použili obdobný přístup a s PWD samcem jsme křížili B6 samice s mutovanými, přidanými či substituovanými alelami *Prdm9*. Srovnáním různých takto vzniklých kombinací alel *Prdm9* s kontrolními F1(B6 x PWD) sourozenci i mezi sebou jsme ukázali, že tento gen hraje roli v neúplné plodnosti i u tohoto typu F1 hybridů. Pokud jsme nahradili B6 alelu *Prdm9* genu za mutovanou alelu, vzniklá kombinace *Prdm9^{-P/WD}* měla za následek zvýšení fertility proti kontrolním samcům obsahujícím alely *Prdm9^{B6/P/WD}*, jednalo se tedy o snížení genové dávky. Navíc transgenezí zvýšená exprese genu signifikantně zvedla úroveň fertility i v tomto případě reciprokých hybridů, protože hybridní samci se sestavou alel *Prdm9^{B6/P/WD}* a několika kopiemi *Prdm9^{C3H}* obsažených v BAC5 navíc byli opět signifikantně plodnější. Tento výsledek jsme podpořili i kontrolními kříženími PWD samce s B6 samicemi s vloženým BAC21, který obsahoval pouze nefunkční část *Prdm9*. Parametry fertility u těchto samců nebyly lepší než u kontrolních semisterilních F1(B6 x PWD) (obrázek 4, tabulka 4).

Podobně jako u F1(PWD x B6) kříženců i zde jsme prozkoumali schopnost zlepšení fertility samotné alely *Prdm9^{C3H}*. Opět s využitím kongenních myší jsme získali F1(B6-*Prdm9^{C3H}* x PWD) hybridy s vyměněnou alelou *Prdm9^{B6}* a výsledná kombinace *Prdm9^{C3H/P/WD}* měla za následek signifikantně vyšší váhu testes, počet spermií i schopnost plodit více potomků (obrázek 4, tabulka 4).

Obrázek 4. Účinek změny a odstranění *Prdm9^{B6}* alely v obou směrech křížení F1 hybridů



Legenda viz obrázek 3.

Tabulka 4. Efekt dávky a různých alel genu *Prdm9* na plodnost reciprokých hybridů.

Křížení (samička první)	<i>Prdm9</i>	n	BW	TW	SC
B6-KO×PWD	B6/PWD	15	25	105	0,5
B6-KO×PWD	-/PWD	11	27	174*	4,1*
(B6×B6- <i>Prdm9^{C3H}</i>)×PWD	B6/PWD	7	24	97	0,3
(B6×B6- <i>Prdm9^{C3H}</i>)×PWD	C3H/PWD	5	25	171*	2,2*
BAC5/BAC5×PWD	B6+2C3H/PWD	7	25	181*	3,1*

B6.PWD-Chr17×PWD	PWD/PWD ^a	7	24	220*	4,2*
B6×B6	B6/B6	3	28	195*	3,2*
PWD×PWD	PWD/PWD	4	20	119 ^b	1,9*

B6-KO = heterozygot nesoucí deletovanou – knock-out alelu *Prdm9*; *Prdm9* = genotyp *Prdm9* od (matka/otec), - = nulová alela; n = počet samců; TW = průměrná váha obou varlat v miligramech; SC = průměrný počet spermií v milionech v páru hlaviček nadvarlat (caput epididymis), ^a = genotyp celého chromosomu 17, ^b = hodnoty TW jsou signifikantně rozdílné od zvířat v řadách 1 a 3; * = signifikantně vyšší než u zvířat v řadách 1 a 3.

5.3 Chromosomy X a 17 se účastní semisterility F1(PWK x B6) hybridů

5.3.1 Potomci křížení PWK samičky s B6 samcem jsou semisterilní

Nekompatibilita genu *Prdm9* a chromosomu X původu *M. m. musculus* byla prokázána pomocí kompletně sterilních samců F1(PWD x B6), kde silný fenotyp úplné zástavy spermatogeneze umožnil studovat genetiku hybridní sterility (Mihola et al. 2009; Flachs et al. 2014). Vliv interakce *Prdm9* a „musculoidního“ chromosomu X byl ošem studován na dalších mezi-podruhových F1(PWK x B6) hybridech. Kmen PWK byl vyvinut paralelně s PWD, ale z jiných zakladatelů, odchycených v lokalitě vzdálené několik desítek kilometrů od místa původu rodičů kmene PWD (Gregorova and Forejt 2000). Nakřížením samičky PWK se samcem B6 vznikali samci s významně nižší váhou testes než plně plodné rodičovské kmeny, nicméně vytvářející spermie a schopní plodit potomky. Počet jejich spermií byl signifikantně nižší než u kontrolních recipročných F1(B6 x PWK) hybridů či rodičovských kmenů, stejně jako váha testes a relativní počet potomků (Tabulka 5; $p_{TW}=0,001$, $p_{SC}=0,036$). Semifertilita těchto samců pak lépe modeluje situaci v přírodní hybridní zóně, kde je výskyt zcela sterilních samců velmi vzácný (Turner et al. 2012).

U F1(PWK x B6) hybridů byla také prokázána závislost fertility na věku samců. U běžných samců zplozených v rámci jednoho druhu se průměrný věk, kdy jsou schopni úspěšně počít potomky, pohybuje okolo devíti týdnů jejich stáří. Během kontrolního připouštění F1(PWK x B6) hybridních samců ve věku devíti týdnů se ukázalo, že z celkového počtu 13 samců devět zplodilo potomky, ovšem pět z nich toho bylo schopno až po dosažení věku 16 týdnů. F1(PWK x B6) samci tedy oproti kontrolám vykazují sníženou váhu testes a počet spermií v nadvarlatech (oligospermii), a navíc opožděnou schopnost plodit potomky.

5.3.2 Vliv chromosomů 17 a X na plodnost F1(PWK x B6) hybridů

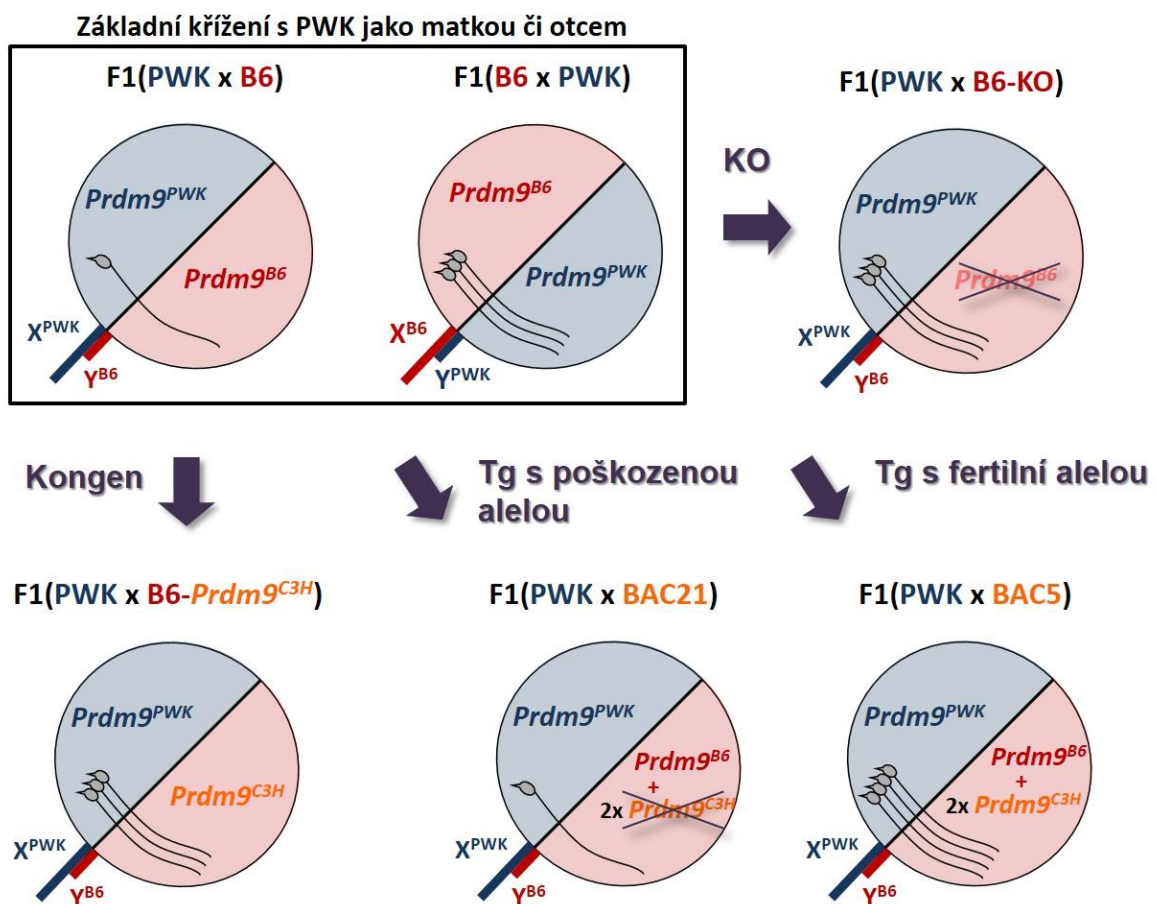
Z předchozích výsledků (Flachs et al. 2014) je patrné, že pro získání sterilního fenotypu u F1(PWD x B6) samců je třeba kombinace heterozygotní (PWD/B6) sestavy alel na proximální části 17. chromosomu a X chromosomu PWD (*M. m. musculus*) původu. Při použití PWK inbredního kmene se také vzájemně liší reciproci hybridů, kde při křížení B6 samice dostaneme hybridní samce vybavené chromosomem X^{B6} (*M. m. domesticus*). Takto vzniklí samci jsou plodnější než samčí potomci křížení PWK samice s B6 samci tedy obsahující chromosom X^{PWK} (*M. m. musculus*). Toto srovnání recipročních PWK hybridů naznačuje, že se i zde účastní fenotypu snížené plodnosti epistatické interakce alel chromosomu 17 z jiných dvou myších poddruhů a chromosomu X původu *M. m. musculus*. Tyto výsledky ovšem nevylučují možný vliv chromosomu Y, mitochondriálního genomu ani imprintovaných autosomálních genů. Analýzou pomocí zpětného křížení bylo nicméně možné přesněji určit lokusy zodpovědné za sledovaný fenotyp. Při zpětném křížení na B6 rodičovský kmen, N2((PWK x B6) x B6), jsme z celkových 63 samců získali tři samce s rekonstruovaným F1 fenotypem. U těchto samců kosegregovala snížená plodnost s proximální oblastí chromosomu 17 v heterozygotním stavu PWK/B6 s PWK oblastí chromosomu X (49 – 77 Mb). Pomocí zpětného křížení se tedy potvrdila role epistatické interakce alel genů heterozygotního chromosomu 17 a chromosomu X^{musculus} ve fertilitě F1(PWK x B6) samců.

5.4 **Genová dávka a původ alely *Prdm9* ovlivňuje také semisterilitu hybridů**

Abychom přímo testovali vliv *Prdm9* na sníženou plodnost F1(PWK x B6) hybridů, bylo možno využít kongenních a mutantních kmenů obdobným způsobem jako u F1 hybridů vycházejících z křížení s PWD kmenem. Nakřížili jsme PWK samičky s B6-BAC5 transgenním samcem, který nese úsek C3H genomu včetně C3H alely *Prdm9*, se samcem z kongenního kmene, kde byla alela *Prdm9*^{B6} přímo nahrazena (pomocí selektovaného zpětného křížení) alelou *Prdm9*^{C3H}. Podobně jako u analýzy sterilních F1(PWD x B6) hybridů se jednalo o přidání resp. náhradu jiných typů alel, ale stejného poddruhového původu - *M. m. domesticus*. Alelu *Prdm9*^{C3H} jsme nazývali „F1-fertilní“ alelou (*Hst1^f*), protože zachraňovala fertilitu u azoospermických F1(PWD x B6) hybridů. I v případě PWK hybridů tato fertilitní alela signifikantně zvýšila váhu testes a počet spermií ať už přidáním dalších kopií s použitím transgenních B6-BAC5 samců, nebo výměnou alel s použitím kongenního kmene B6-

Prdm9^{C3H} (obrázek 5, tabulka 5). Pro hybridy s transgenními B6 samci bylo provedeno kontrolní křížení užitím transgenu B6-BAC21, který nese C3H úsek překrývající většinu BACu 5 avšak s nefunkčním fragmentem *Prdm9* genu (obrázek 2). Kříženci F1(PWK x B6-BAC21) se fertilitou nelišili od kontrolních F1(PWK x B6) samců bez transgenu. Tímto výsledkem bylo možno vyloučit vliv ostatních genů obsažených v BAC5 i BAC21, či vliv integračního místa transgenu. Dále byl proveden test vlivu změny dávky tzv. sterilní *Prdm9*^{B6} alely na semisterilitu F1(PWK x B6) hybridů. Odstraněním B6 alely z F1(PWK x B6) hybridů použitím B6 kmene s mutantní *Prdm9* alelou se hodnoty fertility také významně zvýšily (obrázek 5, tabulka 5).

Obrázek 5. Účinek změny a odstranění *Prdm9*^{B6} alely v obou směrech křížení F1 hybridů



Legenda viz obrázek 3.

Tabulka 5. Efekt dávky a různých alel genu *Prdm9* na parametry plodnosti samčích PWK hybridů.

Křížení (samička první)	<i>Prdm9</i>	Věk	n	BW	TW	rTW	SCc	SCe	OFM
PWK×B6-KO	PWK/B6	9	5	26	89	3,4	0,005	0,2	0 (n = 5)
PWK×B6-KO	PWK/B6	17	4	29	104	3,2	0,08	3	1,6 (n = 6)
PWK×B6-KO	PWK/-	9	3	22	156	7,0	1,8	10	5,3 (n = 3)
PWK×B6-KO	PWK/-	20	2	27	188	5,9	2,2	27	8,0 (n = 4)
B6×PWK	B6/PWK	9	17	23	160	6,9	3,4	21	n/a
B6×PWK	B6/PWK	20	8	25	160	6,5	3,8	n/a	4,9 (n = 3)
PWK×B6- <i>Prdm9</i> ^{C3H}	PWK/C3H	9	5	26	192	7,4	2,2	n/a	n/a
PWK×B6- <i>Prdm9</i> ^{C3H}	PWK/C3H	14	4	28	202	7,3	2,4	n/a	4,8 (n = 1)
PWK×B6-BAC21	PWK/B6	9	3	25	77	3,2	0,002	n/a	n/a
PWK×B6-BAC21	PWK/B6	17	1	22	103	4,6	0,5	n/a	n/a
PWK×B6-BAC5	PWK/B6+2C3H	9	7	24	211	8,9	4,8	n/a	n/a

PWK×B6-BAC5	PWK/B6+2C3H	17	6	24	206	8,5	4,2	n/a	n/a
PWK×B6.PWD-Chr17	PWK/PWD	9	3	30	276	9,3	5,0	n/a	n/a
PWK×B6.PWD-Chr17	PWK/PWD	16	3	34	303	9,0	8,1	n/a	n/a

Prdm9 = genotyp *Prdm9* od (matka/otec), - = nulová alela; Věk = stáří samců v týdnech; n = počet samců; BW = průměrná váha těla; TW = průměrná váha obou varlat v miligramech; rTW = relativní váha varlat (k váze těla); SCc = průměrný počet spermií v milionech v páru hlaviček nadvarlat (caput epididymis); SCe = průměrný počet spermií v milionech v páru celých nadvarlat; OFM = počet mláďat na samici za měsíc (angl. offspring per female per month); BAC5 = transgenní kmen se dvěma kopiemi *Prdm9^{C3H}*; BAC21 = transgenní kmen nesoucí poškozenou alelu *Prdm9^{C3H}*; B6-KO = heterozygot nesoucí deletovanou – knock-out alelu *Prdm9*; n/a = hodnota není dostupná

5.5 Imunocytochemická a expresní analýza meiotického průběhu

5.5.1 Souhrnné parametry fertility jsou v souladu s úrovní meiotického bloku

Porovnáme-li hybridy F1(PWD x B6), F1(PWD x B6-*Prdm9*⁻) a F1(PWD x B6-*Prdm9*^{C3H}) (dále označováni podle kombinace alel *Prdm9*^{PWD/B6}, *Prdm9*^{PWD/-} a *Prdm9*^{PWD/C3H}), vidíme postupné zlepšování souhrnných parametrů fertility, ale přesto ani *Prdm9*^{PWD/C3H} F1 hybrid není tak plodný jako například samci rodičovských kmenů (tabulky 3 a 4). Poruchy plodnosti u těchto hybridů mohou způsobovat buď různé stupně té samé meiotické zástavy, nebo vícero selhání postihující různá stádia spermatogeneze. Abychom porovnali průběh spermatogeneze těchto hybridů, využili jsme metodu nepřímé imunofluorescence na mikroskopických preparátech s fixovanými rozprostřenými jádry testikulárních buněk dospělých samců. Analýza testikulárních preparátů potvrzovala výsledky získané počítáním spermií (SC – angl. sperm count) u těchto hybridů. Na rozdíl od sterilních hybridů nesoucích alely *Prdm9*^{PWD/B6} bylo na preparátech z *Prdm9*^{PWD/-} samců možno nalézt stádium kulatých spermatid, ale v relativním počtu nedosahujícím úrovně *Prdm9*^{PWD/C3H} samců (tabulka 6, p=0,001). V důsledku meiotického bloku na úrovni pachytenních spermatocytů bylo relativní početné zastoupení všech čtyř stádií primárních spermatocytů hybridů nesoucích *Prdm9*^{PWD/B6} odlišné od ostatních hybridů s alelami *Prdm9*^{PWD/-} a *Prdm9*^{PWD/C3H}.

Tabulka 6. Přehled samčích reprodukčních fenotypů.

<i>Prdm9</i>	-/-	PWD/B6	PWD-	B6/PWD	PWD/C3H	PWD/PWD	B6/B6
Gen. pozadí	B6	F1	F1	F1	F1	PWD	B6
Pohl.tělisko	21%	31%	67%	71%	88%	96%	99%
Diplotene	0,3%	5%	16%	17%	16%	18%	21%
Spermatidy	0,1%	0,2%	30%	45%	45%	80%	74%
SC	0,000	0,000	0,06	0,4	0,4	1,9	3,2
TW	54	61	85	105	110	119 ^a	195
OFM	0,0	0,0	0,3	3,6	3,4	6,3	6

Prdm9 = genotyp *Prdm9* od (matka/otec); Pohl.tělisko= procento spermatocytů ve stádiu pachytene se správně utvořeným pohlavním tělískem ze všech primárních spermatocytů; Diplotene = procento spermatocytů ve stádiu

diplojene ze všech primárních spermatocytů; Spermatidy = procento kulatých (round) spermatid z celkového počtu kulatých spermatid a primárních spermatocytů dohromady; SC = průměrný počet spermií v milionech v páru celých nadvarlat; TW = průměrná váha obou varlat v miligramech; OFM = počet mláďat na samici za měsíc (angl. offspring per female per month); ^a = signifikantně vyšší relativní váha varlat (vztaženo k váze těla) než v prvních sloupcích 1 až 5.

Podíl pachytenních spermatocytů se správně utvořeným pohlavním tělískem, jakožto ukazatelem jejich zdárného meiotického vývoje byl 67% u hybridů s alelou *Prdm9*^{PWD/-}, což je signifikantně vyšší procento než u sterilních samců *Prdm9*^{PWD/B6} (p=0,001), ale také signifikantně nižší v porovnání s plodnými samci *Prdm9*^{PWD/C3H} (p=0,001). Nicméně i preparáty z *Prdm9*^{PWD/C3H} hybrida obsahovaly nižší poměr normálních a abnormálních pachytenních spermatocytů než bylo možno nalézt na testikulárních preparátech rodičovských kmenů B6 (p=0,004) a PWD (p=0,03). Fenotyp průběhu meiózy koreloval s fenotypy ostatních fertálních parametrů jako váha testes, počet spermií a počet mláďat na samici za měsíc (tabulka 6). Souhrně se meiotický fenotyp ve shodě s obecnějšími parametry fertility postupně přibližoval parametrům rodičovských kmenů. Postupné zvyšování účinnosti záchrany fertility (zvratu sterilního fenotypu) záviselo na různých kombinacích alel, i když ani u plodného *Prdm9*^{PWD/C3H} hybrida nedosahovalo úrovně rodičovských kmenů.

Abychom určili, jestli je semifertilita reciprokých F1(B6 x PWD) (dále F1-*Prdm9*^{B6/PWD} a analogicky pro ostatní kombinace) způsobena také problémy v první meiotické fázi a jak se případně projevují po nahrazení, či přidávání alel *Prdm9*, připravili jsme imunopreparáty také z těchto hybridů. Poměrná část pachytenních spermatocytů s normálním pohlavním tělískem byla u hybridů *Prdm9*^{B6/PWD} nižší než u rodičovských kmenů a byla signifikantně zvýšena po odebrání *Prdm9*^{B6} alely použitím B6-*Prdm9*⁻ samice a PWD samce za vzniku F1-*Prdm9*^{-/PWD} samčích potomků (p=0,03). Obdobně se zvýšilo procento normálních pachytenních spermatocytů na testikulárních preparátech ze samců po záměně B6 alely C3H alelou za vzniku F1(B6 x PWD) - *Prdm9*^{C3H/PWD} (p=0,03). Měřeno podílem normálních pachytenních spermatocytů byl průběh meiózy lepší i u samců nesoucích BAC5 (z B6 rodičovské strany) ve srovnání s kontrolními transgeny nesoucími BAC21 s nefunkčním *Prdm9* genem (p=0,003). Také populační poměry jednotlivých stádií primárních spermatocytů neodpovídají buněčnému složení na preparátech z varlat plodných kontrolních samců. Fenotypizace všech hybridů pomocí počítání MLH1 rekombinačních nodulů a z toho vypočítaného procenta spermatocytů úspěšně dokončujících rekombinaci tato data potvrdila.

Z těchto výsledků vyplývá, že ani ve fenotypu F1 semifertility tohoto modelu recipročných *Prdm9*^{B6/PWD} hybridů nehrají významnou roli postmeiotické nekompatibility, protože i obecnější měřítka plodnosti (jako počet mláďat na samici za měsíc) jsou v souladu s úspěšností meiózy, přesněji její první profáze.

5.5.2 Úroveň částečné meiotické zástavy závisí na věku F1(PWK x B6) hybridů

V další fázi jsme pomocí imunobarvení meiotickými markery SYCP1, SYCP3 a γ H2AX vyšetřili i průběh meiózy u semifertilních F1(PWK x B6) samců, u kterých se navíc jejich plodnost odvíjí od jejich stáří. Stanovení počtu jednotlivých vývojových stádií primárních spermatocytů může poukázat na blok v konkrétním stádiu profáze I, který by se projevil nižším výskytem či absencí pachytenních a diplotenních spermatocytů a následným hromaděním předcházejících stádií leptotenních a zygotenních spermatocytů podobně jako tomu je u sterilních F1(PWD x B6) hybridů. Nejprve jsme připravili preparáty z varlat devítitýdenních F1(PWK x B6) hybridů, což odpovídá standardnímu dospělému věku, ve kterém jsme se snažili jednotně odebírat vzorky i od samců většiny ostatních hybridních a rodičovských genotypů. Po srovnání se sterilními hybridy a myšáky z rodičovských kmenů se hodnoty buněčné kompozice semifertilních F1(PWK x B6) hybridů nacházely mezi oběma porovnávanými genotypy a rozdíl byl signifikantní jak pro sterilní F1(PWD x B6) hybridy s úplnou meiotickou zástavou ($p=0,001$), tak pro fertilní kontrolu kmene B6 ($p=0,006$) (tabulka 6 a 7).

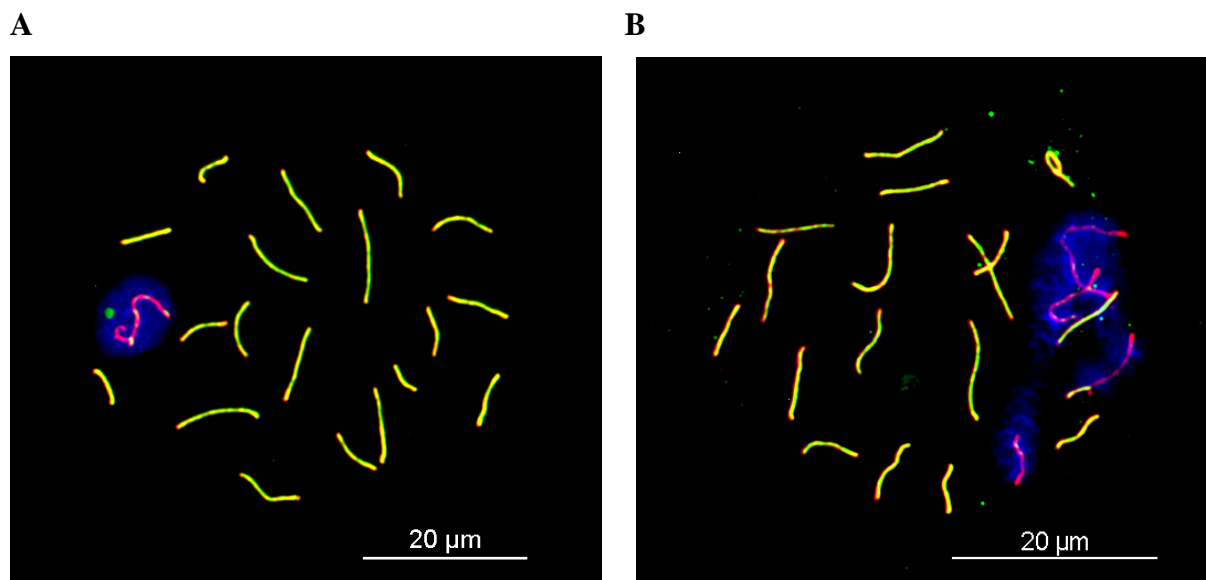
Tabulka 7. Fenotypy pachytenních spermatocytů PWK F1 samců.

Křížení (samička první)	<i>Prdm9</i>	Věk	N	SB	AB	OB
PWK×B6-KO	PWK/B6	9	137	42	27	31
PWK×B6-KO	PWK/B6	20	115	55	17	28
PWK×B6-KO	PWK/-	9	107	69	15	16
PWK×B6-KO	PWK/-	20	127	68	17	15
PWK×B6-BAC21	PWK/B6	14	54	39	28	33
PWK×B6.PWD-Chr 17	PWK/PWD	12	66	82	12	6
PWK×PWK	PWK/PWK	9	58	88	7	5
PWK×PWK	PWK/PWK	16	61	92	5	3

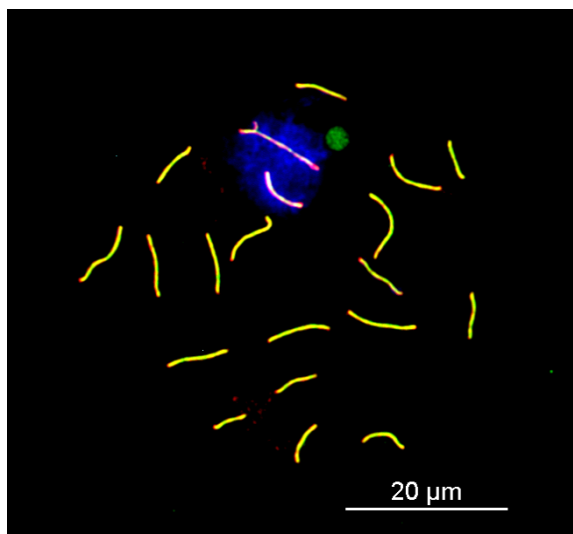
Věk je udán v týdnech od narození; N = počet počítaných pachytenních spermatocytů z celkem dvou až tří samců; SB = procento pachytenních spermatocytů (%pSC) obsahujících správně utvořené pohlavní tělísko; AB = %pSC se správně utvořeným, ale abnormálním pohlavním tělískem, které obsahovalo asynapsované autosomy; OB = %pSC se špatně nebo vůbec neutvořeným pohlavním tělískem (tyto pSC vždy obsahovaly i asynapsovaný chromatin autosomů).

Abychom určili, jestli se částečný meiotický blok mění ve vztahu k věku F1(PWKxB6) hybridů podobně jako jejich schopnost plodit potomky, připravili a porovnali jsme preparáty z devíti a dvacetitýdenních samců. Meiotické stádium jader spermatocytů jsme opět určovali na základě utváření synaptonemálního komplexu a pohlavního tělíska a frekvence aberantních pachytenních spermatocytů odrážela sílu meiotického bloku. Ukázalo se, že četnost aberantních pachytenních spermatocytů se významně snížila u starších, dvacetitýdenních samců, z 55% na 42% ($p=0,037$), což naznačuje, že opožděná plodnost F1(PWK x B6) samců je způsobena faktorem zapříčiňujícím meiotický blok (tabulka 7).

Obrázek 6. Imunofluorescenční analýza meiotického průběhu – tvorba pohlavního tělíska primárních spermatocytů ve stádiu pachytene



C



Jádra primárních spermatocytů v pokročilém stádiu pachytene meiotické profáze I z dospělého samce F1(PWD x B6). Nepřímou imunofluorescenční metodou jsou značeny proteiny synaptonemálního komplexu SYCP1 (zeleně), SYCP3 (červeně) a fosforylovaná varianta histonu γ H2AX (modře). A = normální pachytenní spermatocyt se správně utvořeným pohlavním tělískem, B = patologický spermatocyt s nezatelným pohlavním tělískem a nesynapsovanými autosomy, C = jádro spermatocytu s pohlavním tělískem, které však zahrnuje i autosomální chromatin.

5.5.3 Nekompatibilita alely *Prdm9*^{B6} v hybridních samcích nejsou způsobeny rozdílnou úrovní transkripce *Prdm9*

Umělým zvýšením exprese *Prdm9* lze zvrátit sterilitu jinak azoospermických F1 mezi-(pod)druhových hybridů nesoucích kombinaci alel *Prdm9*^{PWD/B6} (Mihola et al. 2009). Nicméně mezi těmito sterilními hybridy a fertillními mezi-(pod)druhovými hybridy s kombinací *Prdm9*^{PWD/C3H} není v nedospělých prepubertálních samcích rozdíl v expresi *Prdm9* transkriptu. Tito samci se tedy diametrálně liší potenciální plodností, ale genová dávka *Prdm9* je stejná (Mihola et al. 2009). Abychom zjistili, jakým způsobem dochází k částečné záchraně plodnosti F1(PWDxB6) hybridů odebráním jedné alely, tedy s výsledným genotypem *Prdm9*^{PWD/-}, změřili jsme úroveň transkripce *Prdm9* u hybridních čtrnáctidenních mláďat. Expresi *Prdm9* jsme analyzovali metodou kvantitativní real-time PCR spojenou s reverzní transkripcí (qRT-PCR) popsanou v předešlé práci (Mihola et al. 2009) a pomocí pěti ampliconů podél genové oblasti *Prdm9*, abychom pokryli všechny alternativní transkripty. Úroveň *Prdm9* mRNA se nelišila u čtyř z pěti zkoumaných čtrnáctidenních varlat genotypů *Prdm9*^{PWD/B6}, *Prdm9*^{PWD/C3H}, *Prdm9*^{B6/PWD}, *Prdm9*^{C3H/PWD}, ale byla signifikantně nižší (o 53 %) u potenciálně plodných *Prdm9*^{PWD/-} v porovnání s jejich kontrolními sourozenci „F1-sterilního“ genotypu *Prdm9*^{PWD/B6}. Tímto jsme dokázali, že transkripce alel genu *Prdm9* původu PWD, B6 a C3H je

podobná, z čehož lze vyvodit, že nekompatibility *Prdm9^{B6}* alely způsobující sterilitu mezi-(pod)druhových hybridů nejsou následkem rozdílů nebo změn v *Prdm9* transkripci.

5.6 Částečná haploinsuficience *Prdm9* u vnitrodruhových kříženců

Je prokázáno, že samci homozygotní pro nulovou alelu *Prdm9* jsou zcela sterilní v důsledku kompletní meiotické zástavy (Hayashi et al. 2005; Fairfield et al. 2011; Weiss et al. 2012). Na druhou stranu výsledky fenotypizace myších samců s odejmutou jednou alelou *Prdm9* jsou nejednoznačné a zdánlivě v rozporu. Myšáci nesoucí nulovou mutaci *Prdm9^{tm1Ymat}* v heterozygotním stavu, tedy s jednou funkční alelou genu, vykazují podobnou váhu testes i počet spermií jako kontrolní zvířata, jak na smíšeném (129 x B6) pozadí (Hayashi et al. 2005), tak na čistém B6 genetickém pozadí (Flachs et al. 2012). Někteří samci heterozygotní pro jinou alelu, *Prdm9^{M1045Lja}*, která exprimuje zkrácenou formu PRDM9 proteinu (Sun et al. 2015) vykazují sníženou váhu testes a počet spermatid a nenesou spermie (Weiss et al. 2012). Pro bližší popsání efektu přítomnosti jedné alely *Prdm9^{tm1Ymat}* na B6 pozadí jsme z heterozygotních samců připravili jednobuněčnou testikulární suspenzi, fixovali rozprostřená jádra ze suspenze na mikroskopické preparáty a pomocí imunocytochemického barvení zkontrolovali meiotický průběh. Po nakřížení samců nesoucích alelu *Prdm9^{B6/tm1Ymat}* na B6 pozadí s rodičovským B6 kmenem bylo možno porovnat sourozence s jednou nebo oběma funkčními alelami *Prdm9*, tedy B6-*Prdm9^{B6/-}* versus B6-*Prdm9^{B6/B6}*. Srovnání ukázalo, že heterozygotní samci měli mírně, ale signifikantně zvýšený podíl pachytenních spermatocytů s abnormálním, nebo vůbec nedefinovaným pohlavním tělískem. Zvýšený výskyt abnormálních spermatocytů ve srovnání s kontrolami na stejném pozadí byl také pozorován za přítomnosti jediné alely jiného *M. m. domesticus* odvozeného inbredního kmene - C3H-*Prdm9^{C3H/-}*. Navíc i obecnější parametr fertility se lišil u heterozygotních samců, protože po jejich přípuštění ke kontrolním B6 samicím byli schopni plodit méně potomků ve srovnání s homozygotními samci ($4,3 \pm 1,4$ oproti $6,2 \pm 1,0$ potomků na samici za měsíc, $p=0,01$, Welschův t-test). Heterozygotní samci také potřebovali delší čas do prvního úspěšného zabřeznutí samic ($p=0,01$, Welschův t-test). Z čehož plyne, že *Prdm9* je částečně haploinsuficientní jak pro meiotický průběh, tak pro schopnost plodit potomstvo.

5.6.1 Vliv genové dávky na dostupnost PRDM9 katalytické aktivity u fertilních vnitrodruhových křížení

PRDM9 patrně reguluje meiotickou rekombinaci svou katalytickou aktivitou, která spočívá ve vytváření H3K4me3 značek a na místech takto určených dojde k iniciaci DSB. V těchto pozicích tak PRDM9 stanovuje budoucí rekombinační hotspoty. Protože byla zjištěna částečná haploinsuficience genu *Prdm9* pro fertilitu vnitrodruhových hybridů, bylo zajímavé ověřit, jestli je u těchto myšáků dostupnost PRDM9 katalytické aktivity také závislá na dávce genu *Prdm9*. K této hypotéze přispíval i fakt, že u *Prdm9* heterozygotních myší byla ve srovnání s rodičovskými kmeny prokázána snížená hladina proteinu PRDM9, což naznačuje i potenciální sníženou H3K4me3 katalytickou aktivitu (Baker et al. 2015a; Sun et al. 2015). V rámci spolupráce byla provedena analýza celogenomové úrovně H3K4me3 u B6 samců heterozygotních pro nulovou alelu *Prdm9^{tm1Ymat}* (tedy B6-*Prdm9^{B6/-}*) a porovnána s homozygotními rodičovskými samci B6 s oběma funkčními alelami B6-*Prdm9^{B6/B6}* (Baker et al. 2015a). Na základě dříve zjištěných pozic PRDM9^{B6} specifických rekombinačních hotspotů (Baker et al. 2014) bylo možno uskutečnit H3K4me3 specifickou chromatinovou imunoprecipitaci spojenou s následným sekvenováním DNA (H3K4me3 ChIP-seq) a porovnat tak úroveň H3K4me3 značek řízených PRDM9 proteinem u myší se sníženou dávkou tohoto proteinu. ChIP-seq analýza ukázala, že B6-*Prdm9^{B6/-}* samci měli přibližně polovinu H3K4me3 aktivovaných hotspotů specifických pro PRDM9^{B6} oproti kontrolním B6 samcům (9 707 vs. 18 849). Zbylé hotspoty u heterozygotních samců představují ty nejvíce aktivní u homozygotů. V návaznosti na to byla data normalizována a byla porovnána relativní aktivita všech hotspotů společných pro B6-*Prdm9^{B6/-}* heterozygoty i kontrolní B6-*Prdm9^{B6/B6}* homozygoty (metodika popsána v (Baker et al. 2015b)). Hotspoty specifické pro PRDM9^{B6} vykazovaly třetinovou úroveň H3K4me3 u heterozygotů v porovnání s homozygoty. Ostatní H3K4me3 značená místa, nezávislá na *Prdm9*, byla použita jako kontrola. Byly to úseky DNA typicky představující transkripční počátky jako genové promotory a úroveň těchto úseků nebyla dávkou genu *Prdm9* nijak ovlivněna (Baker et al. 2015b). Proteinová aktivita PRDM9 je tudíž během meiózy přesně regulována. Celkově z těchto dat porovnání *Prdm9^{B6/-}* heterozygotních samců s homozygotními vyplývá, že PRDM9 katalytická funkce (vytváření H3K4me3 značek v místech budoucích rekombinačních hotspotů) je závislá jeho genové dávce.

5.6.2 Počet DSB zůstává podobný i po snížení dávky *Prdm9*

Heterozygotní samci B6-*Prdm9*^{B6/-} jen s jednou funkční alelou *Prdm9* vykazovali mírný, ale prokazatelně zvýšený podíl spermatocytů, se strukturními abnormalitami pohlavního tělíska. Také bylo prokázáno, že i počet H3K4me3 hotspotů je u těchto heterozygotních samců nižší, a proto bylo také zajímavé zkontrolovat, jestli se se sníženou dávkou *Prdm9* sníží i počet meiotických DSB. Počet DSB byl analyzován imunofluorescenčním barvením mikroskopických testikulárních preparátů (použitých i pro analýzu meiotického průběhu) a počítáním RAD51 a DMC1 specifických spotů v zygotenních spermatocytech. B6-*Prdm9*^{B6/-} samci vykazovali průměrně 189 (+/-18) DSB na jádro a průměrný počet DSB jejich sourozenců B6-*Prdm9*^{B6/B6} byl 202 (+/-29). Rozdíl nebyl statisticky signifikantní s hodnotou $p=0,12$ (Welschův t-test). Tento náš závěr je také v souladu s předchozí publikací o vlivu různých kombinací alel *Prdm9* na frekvenci DSB (Sun et al. 2015).

6 Diskuse

Při této práci byly vzaty do úvahy všechny výhody a zároveň úskalí použití částečně umělého laboratorního modelu využívajícího (v přírodě se nevyskytující) inbrední kmeny. Na první pohled nejpřirozenějším přístupem k pochopení genetických interakcí, které vedou k vytváření reprodukčních bariér a tak vzniku druhů, je zkoumání volně žijících druhů nebo poddruhů, kde se tyto bariéry přímo vyskytují a skutečně přispívají k udržování rozdílů mezi nově utvářejícími se formami organismů. Takové studie samozřejmě existují, například (Vyskocilova et al. 2005), nicméně vedle zjevných výhod tohoto přístupu (především zkoumání konkrétních mechanismů, které reálně fungují ve volné přírodě), se jejich omezení týká složitosti nestandardizovaných systémů, kde velké množství faktorů a vysoká variabilita komplikují nalezení hledaných konkrétních biologických procesů. Kombinace výsledků této práce s výzkumy na divokých myších ovšem může přinést kýžený efekt pro poznání fenoménu speciace.

Přidávání a ubírání *Prdm9* kopií a kombinování jeho různých alel přineslo nové poznatky do studia interakcí *Prdm9* a dalších potencionálních genů participujících na hybridní sterilitě ve formě D-M nekompatibilit způsobujících snížení reprodukčního potenciálu modelu mezidruhových myších kříženců. Nové vědomosti se týkají především alely *Prdm9^{B6}*, která snižuje samčí fertilitu různých hybridů s mezidruhovým genetickým pozadím. Zvrat tohoto fenotypu může být proveden zvýšením dávky pomocí transgeneze, a to jak přidáním této sterilní B6 alely, tak i fertillní C3H alely genu *Prdm9*. Nahrazením *Prdm9^{B6}* alely *Prdm9^{C3H}* alelou také vede ke schopnosti plodit potomky u mezi-poddruhových kříženců, ale nezvyšuje jejich plodnost tak, jako zvýšení dávky *Prdm9* přidáním více jeho kopií. Míra zlepšení plodnosti je také přímo úměrná počtu kopií *Prdm9*. Fakt, že F1 pozadí mezi-poddruhových kříženců je citlivé na dávku genu *Prdm9*, indikuje přítomnost D-M nekompatibilit mezi PWD a B6 genomem. Tyto nekompatibilní interakce mohou být jak mezi genem *Prdm9* a dalšími lokusy hybridní sterility, tak mezi lokusy hybridní sterility samotnými bez přímé účasti *Prdm9*, jehož změněná dávka tyto interakce jen senzitivizuje. Přidání více kopií alel *Prdm9^{B6}* i *Prdm9^{C3H}* zvyšuje plodnost, ale tento efekt je různě účinný. To může být vysvětleno buď různou silou stejných nekompatibilních interakcí, kterých se účastní obě alely, nebo odlišně špatně fungující interakce buď pro *Prdm9^{B6}* nebo pro *Prdm9^{C3H}*. *Prdm9^{B6}* je jediná alela, která má za následek

horší fenotyp, když se vyskytuje v jedné kopii společně s alelou *Prdm9^{PWD}* na F1 pozadí obou typů reciprokých hybridů F1(PWD x B6) i F1(B6 x PWD). Přínos ke zlepšení fertility přidáním kopií kteréhokoliv typu *Prdm9*, včetně *Prdm9^{B6}* sterilní alely, může být vysvětlen naředěním toxických účinků D-M nekompatibilit jedné *Prdm9^{B6}* alely.

Snížená plodnost reciprokých F1(B6 x PWD) kříženců oproti kontrolním F1(B6-*Prdm9^{C3H}* x PWD) nebo F1(B6-*Prdm9⁻* x PWD) samcům může být zapříčiněna nekompatibilitami *Prdm9* s chrX^{B6} nebo jinými autosomálními lokusy. Vzhledem k tomu, že při záchraně fertility vyjmutím *Prdm9^{B6}* alely nedojde k úplnému zlepšení plodnosti na úroveň kontrol či rodičovských kmenů, je pravděpodobné, že se v F1 hybridech vyskytují ještě další D-M nekompatibility nezahrnující *Prdm9^{B6}*. Fertilita mezi-poddruhových F1 samců se také liší mezi potomky reciprokých křížení s použitím samce respektive samice B6 s nefunkční *Prdm9* alelou, což naznačuje další možnost nekompatibility nezávislé na *Prdm9^{B6}*, ale zahrnující chrX^{PWD}. A obdobně naopak pravděpodobně existuje nekompatibilní interakce *Prdm9^{B6}* bez účasti chrX^{PWD}, protože u hybridních samců s použitím B6 samičky a tedy neobsahujících chrX^{PWD} se úroveň fertility také zlepšila, buď eliminací *Prdm9^{B6}* nebo i zvýšením exprese genu *Prdm9*. Předpokládáme-li podobný typ nekompatibilní interakce i u sterilních F1(PWD x B6) hybridů, můžeme uvažovat celkem o minimálně třech sadách špatně fungujících nekompatibilních interakcí způsobujících meiotickou zástavu u těchto samců. Mezi tyto interakce patří: *Prdm9^{B6}* s chrX^{PWD}, *Prdm9^{B6}* s neznámým autosomálním lokusem (či lokusy) a chrX^{PWD} s autosomálními lokusy; nebo alternativní sestavy nekompatibilních interakcí: autosomální interakce lokusu (lokusů) mezi PWD a B6 genomy citlivé na genovou dávku *Prdm9*, chrX^{PWD} s B6 autosomy a nakonec *Prdm9^{B6}* s *Prdm9^{PWD}* nebo s jinými autosomálními lokusy.

Jeden z vhodných kandidátních lokusů se označuje *Hstx2* a mapuje do 4,7 Mb dlouhého úseku na chrX (Bhattacharyya et al. 2014). Nejnovější studie popisuje možný mechanismus, jakým způsobuje nekompatibilita *Hstx2* a *Prdm9* potíže s fertilitou mezi-poddruhových kříženců (Balcova et al. 2016). Pomocí panelu mezi-poddruhových konsomických (chromosomálně substitučních) kmenů a imunofluorescenční analýzy cytologického markeru rekombinace MLH1 zkoumali autoři vliv jednotlivých chromosomů na frekvenci rekombinace. Nejsilnější modifikátor frekvence rekombinace nazvali *Meir1* (angl. Meiotic recombination 1), jenž mapuje do stejné oblasti jako *Hstx2* (Balcova et al. 2016). Účinek genů *Hstx2* a *Meir1* se

projevuje výrazněji u potomků než u rodičovských kmenů (tzv. transgrese) a je omezený pouze na samce. Transgresivní účinek těchto dvou genů podporuje hypotézu o propojení regulace meiotické rekombinace a hybridní sterility.

Další z kandidátních lokusů v genomu poddruhu *M. m. musculus* byl nazván *Hstw* (angl. hybrid sterility wild) a nachází se na chr17^{PWD} (Dzur-Gejdosova et al. 2012). Nekompatibilita *HstI^s* (*Prdm9^{B6}*) s *Hstw^s* (chr17^{PWD}), která způsobuje fenotyp F1 sterilních hybridů může být částečně překonána odstraněním sterilní *Prdm9^{B6}* alely nebo i (v generaci BC1) nahrazením chr17^{PWD} za chr17^{B6}. Pro vytvoření samčího sterilního fenotypu při zpětném křížení BC1(PWD x B6) x B6 je epistatická interakce heterozygotního chr17^{PWD/B6} s chrX^{PWD} nutná, ačkoliv ne jediná dostačující podmínka (Dzur-Gejdosova et al. 2012). Z doposud nashromážděných dat ovšem není možné s jistotou rozlišit, jestli se jedná o interalelickou interakci *Prdm9^{B6}* a *Prdm9^{PWD}*, tedy zda *Hstw* lokus odpovídá genu *Prdm9^{PWD}*. Mimojiné je to proto, že vliv *Prdm9^{PWD}* alely na hybridní sterilitu nebyl přímo zkoumán. Nicméně existují některé poznatky podporující kandidaturu genu *Prdm9* na *Hstw*. Gen *Prdm9* obsahuje doménu zinkových prstů, což je jedna z nejrychleji se vyvíjejících domén u mnohobuněčných živočichů (Oliver et al. 2009) a také hybridní samci *Prdm9^{PWD/-}* vykazují znaky poškozeného meiotického průběhu jako je snížený počet pachytenních spermatocytů se správně utvořeným pohlavním tělískem, takže neúplná záchrana fertility eliminací *Prdm9^{B6}* alely u F1(PWD x B6) hybridů může být interpretována jako haploinsuficience alely *Prdm9^{PWD}*.

Fenotyp porušené spermatogeneze hybridní sterility (Mihola et al. 2009) je velice podobný fenotypu *Prdm9* knock-out samců- *Prdm9^{-/-}* s vydeletovaným *Prdm9* genem na B6 genetickém pozadí (Hayashi et al. 2005). Tento fakt naznačuje, že se alela *Prdm9^{B6}* účastní nekompatibilní interakce, která je podle D-M modelu klasifikována jako ztráta funkce (angl. Loss of Function Dobzhansky-Muller Incompatibility). Jinými slovy, nekompatibilita interakčních partnerů vyústí ve ztrátu jejich funkce, která je zásadní například pro zdárný průběh spermatogeneze (Maheshwari and Barbash 2011). D-M model interakčních nekompatibilit popisuje ještě druhou variantu, která se dá nazvat získání funkce (angl. Gain of Function D-M Incompatibility), kdy interakční partneři nevyzkoušenou společnou evolucí získávají novou funkci. Tato nová funkce je odlišná od původní a neplní tak v hybridech svůj účel, nebo přímo znemožňuje zajištění procesů zásadních pro spermatogenezi. Jedna z dalších nekompatibilit zahrnujících *Prdm9^{B6}* je pravděpodobně právě typu získání funkce, protože při odebrání i

přidání této alely s porušenou nebo sníženou fertilitou u F1 hybridních samců dojde ke zlepšení jejich plodnosti díky (částečné) nápravě správné funkce potřebné pro spermatogenezi.

Přestože zvýšená dávka genu *Prdm9* zlepšuje hybridní fertilitu, nejedná se v případě rozdílu mezi „F1-fertilní“ *Prdm9^{C3H}* a „F1-sterilní“ *Prdm9^{B6}* alelou o jinou míru transkripce jednotlivých alel, protože exprese mRNA *Prdm9* genu ve varlatech stejně starých prepubertálních hybridních samců genotypu *Prdm9^{PWD/B6}*, *Prdm9^{PWD/C3H}*, *Prdm9^{B6/PWD}* a *Prdm9^{C3H/PWD}* je srovnatelná navzdory jejich odlišné fertilitě v dospělosti. Existuje teoretická možnost odlišné alelické translační účinnosti mezi mRNA *Prdm9^{C3H}* a *Prdm9^{B6}* vzhledem k rozdílu v 5' nepřekládané oblasti (Mihola et al. 2009). Sekvenční polymorfismy v rychle se vyvíjející C-koncové doméně zinkových prstů PRDM9 proteinu ale lépe vysvětlují funkční rozdíly jednotlivých alel (Davies et al. 2016).

Při navrhování experimentů pro objasnění funkčních rozdílů mezi alelami na základě jejich sekvenčních polymorfismů se musí brát zřetel na počet kopií *Prdm9* alel, protože fenotyp hybridní sterility může být překonán zvýšením dávky jakékoliv *Prdm9* alely. Umístění meiotických rekombinačních hotspotů je závislé na zinkových prstech PRDM9 (Grey et al. 2011), což bylo prokázáno jejich manipulací pomocí BAC transgeneze. V kontrolních *Prdm9^{B6}* BAC transgenech bylo pozorováno podobné rozmístění rekombinačních hotspotů jako v B6, takže vyšší dávka té samé alely neovlivňuje umístění hotspotů. Zvýšená dávka *Prdm9* u hybridů ovšem může teoreticky vést k překonání D-M nekompatibilních interakcí a tím možná i ke změně lokalizace hotspotů. Není zatím potvrzeno, jak přesně může přemístování rekombinačních hotspotů vést ke sterilitě (viz ale níže). Zvláště s přihlédnutím k popsané situaci u psů, kteří se obejdou bez funkční formy *Prdm9* genu a kde jsou hotspoty redistribuovány směrem k funkčním oblastem genomu podobně jako u myši s deletovaným *Prdm9* (Munoz-Fuentes et al. 2011; Axelsson et al. 2012). Proto nelze zatím úplně zamítnout i možnost dalších funkcí *Prdm9* ve vztahu k hybridní sterilitě, jako například transaktivace dalších meiotických genů.

V přírodě se nekompatibility mezi-poddruhových kříženců projevují v místech kontaktu druhů (poddruhů) a výskyt zcela sterilních – azoospermických - samců v těchto hybridních zónách je spíše výjimečný (Turner et al. 2012). Nicméně například v bavorské části hybridní zóny myši domácí má třetina z nalezených samců nižší fertilitu než je obvyklá v čistých populacích

jednotlivých poddruhů (Turner et al. 2012). Vzácnost azoospermických samců může být vysvětlena nedostatkem kříženců, kteří by byli geneticky podobní F1 generaci. Hybridní sterilita vycházející z F1 hybridního genetického pozadí tak možná spíše sehrála roli v utváření hybridní zóny během prvních kontaktů populací různých poddruhů, než v jejím udržování (Macholan et al. 2007; Turner et al. 2012). Nedostatek hybridů podobných F1 ale nemusí být pravidlem pro celou zónu. Naše modely s různě porušenou fertilitou jsou natolik robustní, že se většinou projeví i fenotyp signifikantně nižšího počtu potomků, což má pravděpodobně ještě větší význam i ve volné přírodě vzhledem k tomu, že spermie z různých samců mezi sebou po vícenásobném páření soutěží (Dean et al. 2006).

6.1 Univerzální vliv *Prdm9* na fertilitu hybridních samců

Po publikaci prvního článku o vlivu *Prdm9* na plodnost kříženců (Mihola et al. 2009) se mohlo zdát, že význam hybridní sterility například pro speciaci v přírodě je omezen, protože sterilní hybridi vznikají jen specifickým křížením dvou vybraných inbredních kmenů ve správném směru (s ohledem na původ mateřského respektive otcovského kmene) a závisí na jedné sterilní *Prdm9* alele (Mihola et al. 2009). Tato disertace je však založena na výsledcích, které dokazují účast *Prdm9* i u sterilních samců F1(STUS x B6) a F1(B6 x STUS), u F1 samců z křížení B6 x PWD, jenž mají sníženou fertilitu (Flachs et al. 2012), jakož i u dalších typů semifertilních hybridů kmene PWK odvozeného od *M. m. musculus* (Flachs et al. 2014). Navíc jsme ukázali, že i kříženci s “F1-fertilní” alelou F1(PWD x B6-*Prdm9*^{C3H}) mají meiotický průběh poškozený obdobnými D-M nekompatibilitami, což může být opět překonáno zvýšením dávky *Prdm9* nebo reciprokým křížením F1(B6-*Prdm9*^{C3H} x PWD).

Skutečný dosah *Prdm9* pro speciaci myši domácí v hybridní zóně závisí na dosud neznámé frekvenci alel *Prdm9*, které snižují plodnost hybridních samců. Nicméně význam tohoto genu pro hybridní fertilitu se prokázáním jeho úlohy u subfertilních hybridních samců zdá být větší, než bylo prokázáno původně (Mihola et al. 2009).

V částečné neplodnosti mezi-(pod)druhových kříženců F1(PWK x B6) se také uplatňují D-M nekompatibilní interakce *Prdm9*^{B6} s lokusem (či lokusy) na chrX. Přestože pro semisterilitu F1(PWK x B6) hybridů je důležitá heterozygotní kombinace chr17, není tato autosomální heterozygotita příčinou rozdílů mezi F1(PWK x B6) a sterilními F1(PWD x B6). Locus *Hstx2*

má měřitelný dopad na reprodukční fitness F1(PWK x B6) hybridů a také pravděpodobně obsahuje polymorfismy mezi *M. m. musculus* kmeny PWD a PWK, které modifikují výsledný fenotyp F1 fertility. Velmi pravděpodobně i další oblasti mají vliv na rozdíl mezi F1(PWK x B6) a F1(PWD x B6) kříženci a jedna mapuje distálně od *Hstx2* na chrX.

U poddruhu *M. m. domesticus* jsou tedy rozdíly v alelách *Prdm9*, kde alela *Prdm9^{B6}* způsobuje kompletní sterilitu F1(PWD x B6) hybridů a alela *Prdm9^{C3H}* a některé další jen částečnou neplodnost. Celkem vzato D-M nekompatibility mezi *Prdm9* a *Hstx2* lokusem hrají klíčovou roli v utváření fenotypu hybridní sterility, zatímco polymorfismy mezi těmito faktory a také další (minoritní) oblasti v genomu zeslabují nebo naopak zesilují účinek interakcí *Prdm9* a *Hstx2*. Toto vše je v souladu s výzkumy zabývajícími se počínajícím oddělováním poddruhů (speciací) *M. m. musculus*. a *M. m. domesticus* (Forejt et al. 1999; Vyskocilova et al. 2005; Good et al. 2008; Vyskocilova et al. 2009). Chromosom X všech dosud podrobněji zkoumaných kmenů *M. m. musculus*. (PWD, PWK, STUP, STUS) přispívá ke snížené fertilitě mezi-(pod)druhových kříženců a data z hybridní zóny předpovídají více takových speciálních genů na chrX (Payseur et al. 2004; Dufkova et al. 2011; Janousek et al. 2012).

Fenotyp meiotického bloku spojený s hybridní sterilitou se projevuje nedokončenou synapsí heterozygotních chromosomů pocházejících ze dvou různých poddruhů rodičovských kmenů. Tyto asynapse jsou považovány za hlavní příčinu zástavy spermatogeneze u F1(PWD x B6) a F1(PWD x SCHEST) samců (Bhattacharyya et al. 2013; Bhattacharyya et al. 2014). Zvýšený podíl pachytenních spermatocytů s asynapsovanými chromosomy je také pozorován u F1(PWK x B6) samců se sníženou fertilitou a procento těchto aberantních spermatocytů lze snížit odebráním alely *Prdm9^{B6}*. Asynapse heterosubspecifických chromosomů tak hrají roli v částečné či úplné zástavě spermatogeneze u více hybridních samců s různým stupněm postižené plodnosti. Samci F1(PWK x B6) mají snížený počet spermií a navíc omezený věkový rozsah, kdy jsou schopni plodit potomky. V této disertaci (Flachs et al. 2014) je popsán věk, kdy většina připuštěných samců F1(PWK x B6) dokáže úspěšně oplodnit kontrolní samice. Data jiného výzkumného týmu používajícího PWK křížence ukazují jejich ztrátu schopnosti počít potomky po dosažení věku asi 7 měsíců (Aylor, Pardo-Manuel de Villena F et al, osobní komunikace). Opožděná plodnost může být také pozorována u samců s přenesenou oblastí *Hstx2* z kmene PWD na F1(PWK x B6) genetické pozadí, což mimo jiné poukazuje na možnost, že rozdíly modifikující azoospermii F1(PWD x B6) hybridů mapují mimo oblast

Hstx2. Fenotyp opožděného nástupu fertility není asi u myších hybridů výjimečný, jelikož je tento fenomén pozorován i u samců F1(STUP x B6) a F1(B6 x STUP) (Flachs et al. 2014). Navíc počet spermií F1(STUP x B6) samců klesá po dosažení pěti měsíců stáří, což napovídá, že i předčasná ztráta plodnosti může být obecnější jev u mezi-poddruhových kříženců. Tito kříženci s kmenem STUP nemají rozdíly ve fertilitě závislé na směru křížení (F1(STUP x B6) vs. F1(B6 x STUP)). A také další myší kmeny při mezidruhovém křížení nevykazují rozdílný fenotyp u navzájem reciprokých hybridů, jak je tomu u kmenů PWK a PWD. Mezi ně patří kmeny STUS a STUF odvozené z divokých myší ze stejné lokality jako STUP (Pialek et al. 2008) a dále kmen PWB stejného geografického původu jako PWK a PWD (Gregorova and Forejt 2000). Křížením kmenů STUS i PWB s kmenem B6 vznikají zcela sterilní F1 samci, a to bez ohledu na to, který poddruh byl použit jako matka respektive otec. Výsledkem křížení kmenů STUF a B6 jsou plodní samci genotypů F1(STUF x B6) i F1(B6 x STUF), kteří se neliší v parametrech fertility (Pialek et al. 2008; Vyskocilova et al. 2009). Z toho vyplývá, že rozdíl způsobující odlišný fenotyp reciprokých hybridů existuje nezávisle na úrovni či zpoždění samčí fertility. Rozdíly, které způsobují odlišné následky na fertilitu reciprokých kříženců kmenů PWD a STUS s kmenem B6, byly pomocí QTL mapování předpovězeny na chromosomy 3, 9 a 13 (Bhattacharyya et al. 2014). Meiotický blok způsobený chromosomem X z kmene B6 byl tedy závislý na těchto třech autosomálních polymorfních modifikátorech.

Omezení fertility v čase by mělo být bráno v potaz při navrhování a plánování křížení, zahrnující samčí hybridy kmenů odvozených od divokých myší jako PWK a další. Samčí plodnost omezená určitým věkem může být úplně zdokumentována jen v laboratorních podmínkách, protože u myší odchycených v přírodě může být věk nejasný nebo pokročilý. Takže tato pozorování by se měla vzít do úvahy při studování a následné interpretaci výsledků experimentů zabývajících se plodností divokých myší v přírodních podmínkách v hybridní zóně (Albrechtova et al. 2012; Turner et al. 2012).

6.1.1 Kontrast mezi fenotypem vyjmutí jedné kopie *Prdm9* u fertálních myší a (semi)sterilních hybridů

Analýza vlivu genové dávky *Prdm9* na plodnost fertálních myšáků ukázala, že odstranění alely genu *Prdm9^{B6}* na jinak inbredním homozygotním genetickém pozadí kmene B6 má negativní vliv na samčí plodnost. Tento vliv se projevuje mírně, ale statisticky významně a to jak na

sníženém počtu potomků, které tito samci dokáží zplodit s kontrolními samicemi, tak i na zvýšeném počtu abnormálních spermatocytů, což vypovídá o narušeném meiotickém průběhu. Tento poznatek se může zdánlivě jevit v rozporu se situací u hybridů F1(PWD x B6), kde naopak odstraněním *Prdm9^{B6}* alely dojde k výraznému zlepšení fertility. Dokonce se jedná o úplný zvrát sterilního fenotypu a odebrání *Prdm9^{B6}* umožní mezi-(pod)druhovým samcím křížencům plodit potomky. Vysvětlení ovšem nemusí být tak složité s přihlédnutím na úroveň zlepšení fertility odebráním *Prdm9^{B6}* alely z hybridního genotypu. Takto zachráněná plodnost F1(PWD x B6) hybridů totiž nedosahuje parametrů fertálních myší a proto se zde může zároveň jednat o částečnou haploinsuficienci *Prdm9^{PWD}* alely (Flachs et al. 2012). Naopak zvýšením počtu kopií *Prdm9* na hybridním pozadí má ještě výraznější pozitivní vliv na plodnost kříženců, a to platí přímo i pro takzvanou „F1-sterilní“ *Prdm9^{B6}* alelu. U záchrany sterility hybridů se tak nejspíš jedná o odstranění mezi-(pod)druhových nekompatibilit, které jsou škodlivější (mají mnohem silnější negativní vliv) pro fertilitu než částečná *Prdm9* haploinsuficience u fertálních vnitrodruhových potomků.

Alela *Prdm9^{B6}* tedy nepříznivě ovlivňuje průběh meiózy a plodnost nejen u F1 hybridů vzešlých z křížení kmenů B6 a PWD, ale také (v menším rozsahu) když je přítomna pouze v jedné kopii na vnitrodruhovém B6 genetickém pozadí.

6.2 Soutěž homo- a heterodimerů proteinu PRDM9 o vazebná místa může vysvětlit závislost rozložení hotspotů na alelické dávce *Prdm9*

QTL mapování na základě regulace aktivity meiotického hotspotu, kterým byla prokázána závislost na oblasti obsahující *Prdm9*, ukázalo také potenciální citlivost na dávku genu a alelickou kompetici (Baker et al. 2015b). Měření úrovně H3K4me3 v hotspotech samců heterozygotních pro porušenou alelu *Prdm9* (*Prdm9^{B6/-}*) a homozygotních pro B6 alelu potvrdilo jak závislost na genové dávce, tak soutěž mezi alelami *Prdm9* (Baker et al. 2015b). *Prdm9* je proto částečně haploinsuficientní pro průběh meiózy i fertilitu. Nicméně potlačování aktivity hotspotů není přímo úměrné dávce genu. Tento jev byl objeven díky hotspotu, který je na genetickém pozadí *M. m. domesticus* aktivován proteinem PRDM9^{B6} a přímo umlčován přítomností alely *Prdm9^{Cst}* (alela původu *M. m. castaneus*). Prokázali jsme, že protein PRDM9 exprimovaný v somatických buňkách je schopen tvořit homo- i heterodimery, které se společně

vážou na DNA v místě hotspotů, což přineslo i molekulární vysvětlení kompetice PRDM9 alel u myší (Baker et al. 2015b).

Vedle myších studií existují důkazy kompetice mezi lidskými alelami *PRDM9* (Berg et al. 2010; Berg et al. 2011; Segurel et al. 2011). U lidských spermatogenních buněk nesoucích různé kombinace alel *PRDM9* typu A a C byla na několika hotspotech měřena míra rekombinace. Takzvané C hotspoty, specifické pro alelu *PRDM9^C*, vykazovaly podobnou rekombinační aktivitu jak u lidí homozygotních pro tuto alelu, tak pro heterozygoty *PRDM9^{A/C}*, u kterých byla naopak aktivita A hotspotů menší ve srovnání s homozygoty *PRDM9^{A/A}*. Navíc analýza celkové genomové distribuce dvouřetězcových zlomů rekombinace našla jednoho heterozygotního muže, u kterého se 58% zlomů nacházelo v C hotspotech a C hotspoty byly v průměru silnější (Pratto et al. 2014). Kombinace těchto poznatků spolu s našimi (Baker et al. 2015b), které svědčí o tom, že proteiny *PRDM9^C* a *PRDM9^A* mohou tvořit heterodimery a proteinová varianta *PRDM9^A* může být nalezena na C hotspotech, podporuje hypotézu alelické kompetice *PRDM9* i u lidí. Z těchto studií je možné vyvodit dominantní postavení *PRDM9^C* nad *PRDM9^A* podobné vztahu myších alel dominance *Prdm9^{Cst}* nad *Prdm9^{B6}*.

Na základě studie proteinové funkce *PRDM9* je možné fenomén dominance mezi jeho alelami nejjednodušeji vysvětlit, předpokládáme-li odlišnou afinitu jednotlivých alel na základě specifické vazby jejich domén zinkových prstů na DNA. Dejme tomu, že například u heterozygotních myší jako jsou kříženci kmene B6 s kmenem CAST, by byly různé *PRDM9* komplexy tvořeny buď homodimerem *PRDM9^{Cst}* nebo heterodimerem *PRDM9^{Cst}-PRDM9^{B6}* a také homodimerem *PRDM9^{B6}* v přibližném poměru 1:2:1. Jestliže *PRDM9^{Cst}* je dominantní nad *PRDM9^{B6}* a celková aktivita *PRDM9* je limitní faktor, jak ukazuje částečná haploinsuficience *Prdm9^{B6/-}* myšáků, pak heterodimery *PRDM9^{Cst}-PRDM9^{B6}* častěji (přednostně) aktivují hotspoty specifické pro *PRDM9^{Cst}* než ty pro *PRDM9^{B6}*. Teoretický poměr použití hotspotů by pak odpovídal 3:1, což přibližně souhlasí s výsledky předchozích studií zkoumající aktivitu hotspotů u heterozygotních samic F1(B6 x B6-*Prdm9^{Cst}*), kde *Prdm9^{Cst}* představuje knock-in alelu (Brick et al. 2012; Baker et al. 2014). Obecněji řečeno, pokud by průměrná afinita jedné alely k jejímu hotspotu byla znatelně vyšší než afinita druhé alely k jejímu specifickému hotspotu, pak by se spolu obě navzájem navázané alely zjednodušeně řečeno „molekulárně přetahovaly“ s tím, že první alela by měla „lépe vyvinuté svaly“ a efektivně snižovala účinnou dávku druhé alely s nižší afinitou. Výsledek u

heterozygotů by znamenal častější nasedání heterodimeru na hotspot specifický pro alelu se silnější afinitou. Tento model může být potvrzen několika následujícími faktory: činnost genu *Prdm9* je závislá na jeho genové dávce (výsledky této práce v (Baker et al. 2015b)), což naznačuje jeho limitující molekulární aktivitu v meiotických buňkách; jednotlivé formy proteinu PRDM9 spolu soutěží o prosazení své specifické vazby na DNA hotspotech (Baker et al. 2015b), o H3K4 trimetylační aktivitu (Baker et al. 2015b), o distribuci dvouřetězcových zlomů (Brick et al. 2012; Pratto et al. 2014), a o lokalizaci genetické rekombinace (Berg et al. 2010; Berg et al. 2011; Segurel et al. 2011); PRDM9 tvoří heteromerické komplexy dovolující přímé vzájemné působení jednotlivých proteinových variant (Baker et al. 2015b). Tyto efekty by mohly hrát významnou roli v populacích, s přihlédnutím k velmi vysoké frekvenci výskytu *Prdm9* heterozygotů v přírodě (Berg et al. 2010; Berg et al. 2011; Buard et al. 2014; Kono et al. 2014; Pratto et al. 2014; Schwartz et al. 2014).

6.3 Počet DSB a správné párování chromosomů

PRDM9 je exprimován v časných stádiích meiotické profáze I, konkrétně od spermatocytů ve stádiu preleptotene/leptotene až do pozdní fáze zygotene (Sun et al. 2015). V pachytenních spermatocytech je jeho výskyt v jádře nedetekovatelný, alespoň při použití metody nepřímé imunofluorescence s nukleárně specifickou protilátkou na testikulárních řezech i izolovaných spermatocytech. Také PRDM9-specifické značky H3K4me3 v obohacených populacích pachytenních spermatocytů již téměř zcela vymizely (Sun et al. 2015). Mechanismus či proteiny (demetylasý či proteinasy) odstraňující H3K4me3 PRDM9-specifické značky jsou však neznámé. Ve stejné studii bylo také pomocí nulových mutací *Prdm9* genu potvrzeno, že nepřítomnost proteinu PRDM9 nemá vliv na některé zásadní procesy v těchto časných stádiích profáze I. Jedná se o kondenzaci chromatinu navázáním kohesinových komplexů a tvorbu osy sesterských chromatid skládající se z proteinů AE. Další důležitý proces ve fázi leptotenních spermatocytů je programovaný vznik endogenních DSB, které zprostředkovávají pozdější hledání respektive párování homologních chromosomů skrze mechanismus opravy těchto dvouřetězcových zlomů. Ve studii (Sun et al. 2015) bylo dále na B6 (*M. m. domesticus*) pozadí ukázáno, že snížená dávka či úplná nepřítomnost kompletního PRDM9, nemá výrazný vliv na počet vytvářených DSB. V rámci mého postgraduálního studia jsem nezávisle ověřil, že v heterozygotních mutantech není výrazně porušeno vytváření DSB z hlediska jejich počtu na

buňku (Baker et al. 2015b). Jak bylo prokázáno v předchozích pracích (Hayashi et al. 2005; Bhattacharyya et al. 2013), meiotická zástava přichází až během časných stádií pachytene, v momentě vytváření synapsí homologních chromosomů. Podle Kauppi a spoluautorů ((Kauppi et al. 2013) a další jimi citované), kteří se zabývali vlivem počtu DSB na párování chromosomů a na fertilitu myši, se zdá, že počet snížený o ~20-30% nestačí pro vytvoření meiotické zástavy, která by vedla k narušení spermatogeneze. Kauppi a spol s použitím *Spo11* knock-outů a transgenů docílili postupného snižování počtu DSB a určili, o kolik procent méně DSB již způsobí problémy s párování bivalentů a následný meiotický blok s negativním vlivem na samčí fertilitu. Teprve pokles o více jak 50% je limitní zejména pro správné nalezení homologie a spárování krátkých chromosomů.

6.3.1 Odklon rekombinačních dějů od funkčních oblastí genomu

Zdaleka ne všechny PRDM9 vazebné motivy (potenciální hotspoty) jsou použity pro vytvoření DSBs, kterých je výrazný přebytek (desetitisíce aktivovaných sekvencí; (Brick et al. 2012) a další jimi citované), přitom SPO11 vytvoří „jen“ 200-400 programových DSBs na buňku a asi desetina těchto zlomů vyústí v crossing-overu (Brick et al. 2012). Pro detailnější prozkoumání mechanismu určování DSB využili autoři různé myší kmeny, respektive alely *Prdm9* včetně deletované alely *Prdm9* (*Prdm9*^{-/-}). Kombinace různých alel *Prdm9* u F1 potomků neznamena dvakrát tolik aktivovaných sekvencí, ale vzájemnou soutěž alel. Dominantnější alela převládne, úměrně afinitě její domény zinkových prstů k příslušné kombinaci DNA motivů na daném genetickém pozadí. Dále Brick a spoluautoři zkoumali myši *Prdm9*^{-/-}, kde se ukázalo, že rekombinace je také koncentrována ve specifických oblastech DNA, ale do takových, které se v převážné většině (99%) nepřekrývají s žádnými ze známých hotspotů u kteréhokoliv jiného kmene. Také tyto oblasti nicméně nesou značky H3K4me3. 44% těchto hotspotů je u *Prdm9*^{-/-} mutantů umístěno v anotovaných genových promotorech, zatímco u kontrolních myši nesoucích neporušený gen *Prdm9* jsou to necelá tři procenta. U *Prdm9*^{-/-} myši tak umístění hotspotů v místech startu transkripce připomíná situaci popsanou u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které nenesou žádný homolog genu *Prdm9* (Wu and Lichten 1994; Pan et al. 2011).

6.3.2 Regulátor rekombinačních hotspotů *Prdm9* a hybridní sterilita

Zatím jsou známy pouze teorie spojující funkci *Prdm9* jako regulátora preferovaných míst rekombinace a jeho nezpochybnitelnou stěžejní roli u sterility a snížené fertility některých

mezi-(pod)druhových hybridů. Jeden ze zajímavých návrhů byl naznačen v právě zmíněné práci (Brick et al. 2012). Z této studie vyplývá, že zpřístupnění chromatinu pomocí H3K4me3 značek a úspěšné zahájení rekombinace může být provedeno s pomocí PRDM9 nebo bez něj a rekombinace se přesouvá do funkčních oblastí genomu, kde se vyskytují PRDM9 nezávislé H3K4me3 značky. Pro aktivaci PRDM9-dependentních sekvencí by měl tento protein nejen vytvářet epigenetické modifikace, ale také přímo či nepřímo rekrutovat rekombinační mašinerii ve prospěch svých PRDM9-dependentních H3K4me3 značek (Brick et al. 2012). Pro následné problémy s dokončením meiózy u myši s inaktivovaným *Prdm9* genem nebo s nesprávně fungující kombinací jeho alel se nabízí vysvětlení, že by oprava dvouřetězcových zlomů alokovaných do funkčních oblastí genomu například nějak zabraňovala expresi meiotických genů. Na druhé straně přítomnost celkem čtyř kopií DNA, které by mohly nahradit narušenou funkci jedné z nich, která je v kolizi s opravnými komplexy, vypovídá spíše o opačném výkladu. Tedy, že transkripčně aktivní oblasti jsou již zaplněné různými faktory a u všech dvouřetězcových zlomů nedochází k jejich správnému a/nebo včasnému opravení. K tomuto závěru přispívají pozorování, že u *Prdm9*^{-/-} (Hayashi et al. 2005) a sterilních F1(PWD x B6) samců (Bhattacharyya et al. 2014) nedochází k úplné synapsi všech chromosomů a na asynapsovaných úsecích přetrvávají neopravené DSB. Chromatin s neopravenými DNA zlomy je dál značen odpovídajícími faktory poškozené DNA a nespárovaného chromatinu, který tak může být umlčován endogenním mechanismem MSUC (meiotic silencing of unsynapsed chromatin). Neblahé účinky na zdárný průběh meiózy pak může mít samotné umlčování autosomálních genů na nespárovaných chromosomech, anebo konflikt MSUC s endogenním procesem MSC1 (meiotic sex chromosome inactivation), který je naopak nutný k potlačení exprese genů vázaných na X nebo Y (Homolka et al. 2007). V závislosti na rozsahu těchto aberací může být značná část postižených spermatocytů určena k apoptóze, což způsobí úbytek spermí až úplný meiotický blok a následnou azoospermii.

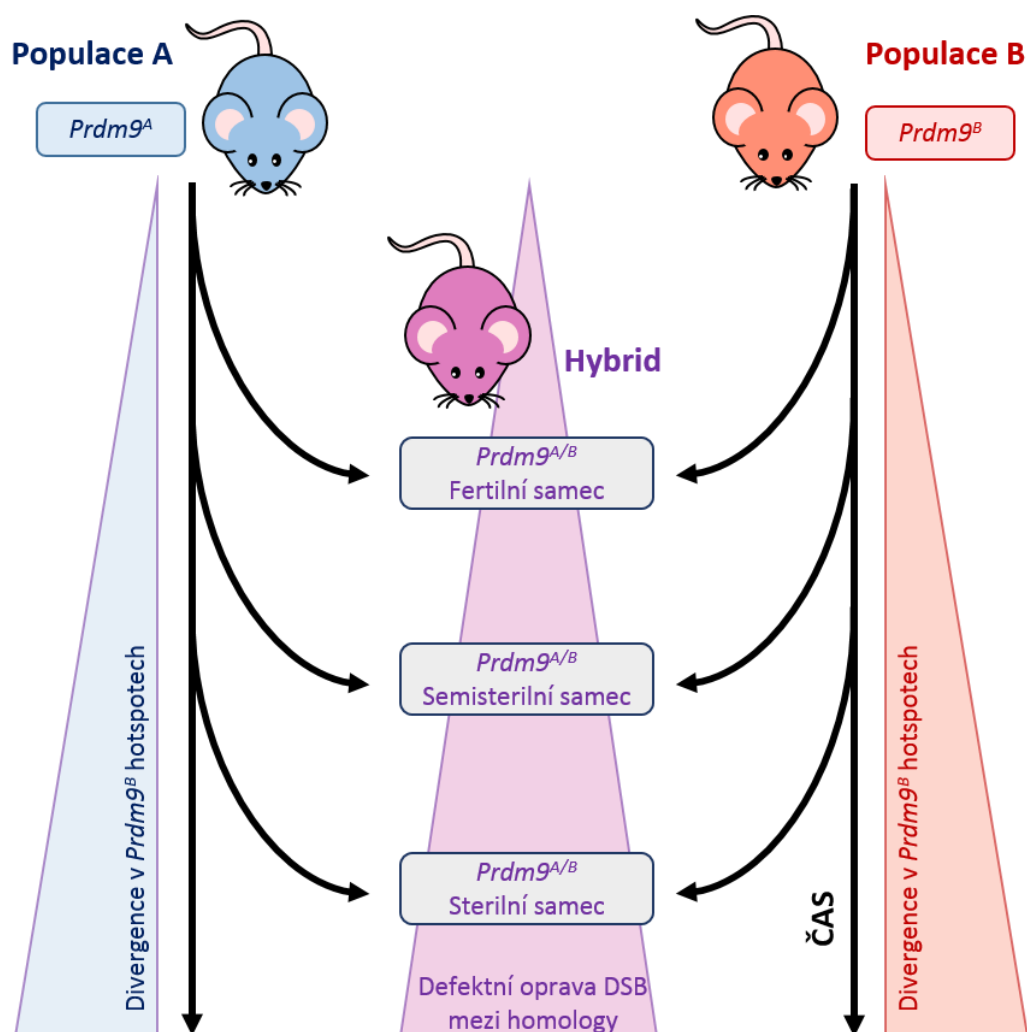
Ještě konkrétněji se na propojení rolí *Prdm9* zaměřili autoři nedávné studie (Davies et al. 2016), kteří vytvořili myši linii z kmene B6 s humanizovanou PRDM9 alelou. V genu *Prdm9* nahradili exon 10, který kóduje sestavu zinkových prstů, ortologní sekvencí z lidského genomu. Lidská alela se zjevně vyvíjela odděleně od té myši miliony let, a tak umožňuje studovat vlastnosti PRDM9 zinkových sestav bez navázaných vlivů genetického pozadí, jakoby to byla nově vzniklá myši alela v divokých populacích. Změna přesměrovala DSB

hotspoty a kompletně zvrátila fenotyp samčí hybridní sterility. Zlepšení fertility navíc korelovalo se schopností PRDM9 variant vázat se na oba homologní chromosomy v místě stejného hotspotu. Taková vazebná symetrie podél celého genomu pozitivně asociovala se zlepšujícím se meiotickým průběhem (Davies et al. 2016). Vzhledem k modelu, který přisuzuje vznik endogenních DSB pro usnadnění hledání homologních chromosomů, je nasnadě si domyslet, že symetrické DSB předurčují snažší hledání homologie na sobě blízkých místech na chromosomech.

Z modelu genetické rekombinace pomocí opravy DSB vyplývá důležitá vlastnost pomíjivosti rekombinačních hotspotů (Coop and Myers 2007). V případě, kdy je na jedné ze dvou chromatid přítomna sekvence silnějšího hotspotu, bude vytvoření DSB upřednostňováno právě na této chromatidě, která se ovšem v rámci DSB opravy nahradí sekvencí druhé chromatidy se slabším hotspotem. Sekvence slabších rekombinačních hotspotů se efektivně rozšiřuje v populaci na úkor eroze silnějších hotspotů. Tento fenomén má za následek neustále se proměňující krajinu rekombinančně preferovaných míst v genomu (Baker et al. 2015a; Smagulova et al. 2016).

Lze si pak představit příklad hybrida se dvěma různými alelami *Prdm9*. Produkty těchto alel vyhledají na chromosomech z jiného poddruhu neerodovaná původní místa (silné hotspoty) a navedou do nich DSB. V těchto místech homologního chromosomu je ovšem erodovaná alela, jenž neváže žádný PRDM9 protein, čímž vznikají asymetrické DSB. Předpokladem modelu je, že asymetrické DSB znesnadňují účinnou opravu. Neopravené DSB pravděpodobně ztěžují meiotickou synapsi a jsou rozpoznávány pachytenním kontrolním aparátem (angl. checkpointem), který tyto spermatocyty nasměruje do apoptózy, čímž se snižuje produkce spermií. Čím jsou větší rozdíly v krajině *Prdm9* rekombinačních hotspotů mezi dvěma oddělujícími se poddruhy, tím méně spermatocytů dokončí v jejich hybridech meiotické dělení a dá vzniknout spermiím (obrázek 7).

Obrázek 7. Model vysvětlující roli *Prdm9* ve speciaci.



Obrázek znázorňuje dvě barevně odlišené hypotetické rodičovské populace myší A (modrá) a B (červená). Mezi nimi se nacházejí samčí potomci (fialově), kteří vznikli křížením populací A a B. Modrý a červený trojúhelník rozšiřující se pod příslušnou rodičovskou populací znázorňuje zvyšující se genetickou divergenci v místech *Prdm9* hotspotů. Podle fylogenetického času (černé šipky), ve kterém se zkříží populace A a B se v hybridech setkají různě divergované rekombinační krajiny příslušných *Prdm9* alel a narůstá podíl defektní opravy DSB (fialový trojúhelník). Produkt alely *Prdm9^A* se totiž váže hlavně na chromosomy z populace B v místech, která ale v populaci A divergovala (a naopak). DSB zlom tak vzniká jen na jednom z homologních míst a vyhledání templátu během opravy homologní rekombinací je proto asi obtížnější. Meiotické problémy pak negativně ovlivňují plodnost samců. Takže hybridy, kteří vzniknou krátce po začátku divergence, mohou být plně fertiliční, protože většina DSB je opravena homologními místy lišícími se jen velmi málo mezi rodičovskými populacemi. Časem se zvyšuje množství erodovaných hotspotů společně se sekvenčními odlišnostmi v těchto místech, a tím narůstá podíl neopravených DSB. Pokud tento podíl překročí určitou mez, nastane kompletní apoptóza spermatocytů a hybridní samec je sterilní. Obrázek převzat a upraven ze (Smagulova et al. 2016).

7 Závěr

V této práci jsme manipulovali s dávkou a kombinacemi alel genu *Prdm9*, abychom detailněji charakterizovali jeho roli v myší hybridní sterilitě. Ukázali jsme, že plodnost všech testovaných mezi-poddruhových F1 kříženců je proporční k dávce *Prdm9* genu, přičemž nezáleží na původu jednotlivých testovaných alel. Jedinou výjimkou byla kombinace alely *Prdm9^{B6}* s alelou *Prdm9^{PWD}*. Tato kombinace alel vedla vždy ke sterilnějšímu fenotypu. Takto jsme poukázali na existenci minimálně jedné dominantně negativní interakce alely *Prdm9^{B6}* na F1 hybridním genetickém pozadí.

Na rozdíl od F1(PWD x B6) samců měli samci F1(PWK x B6) nízké množství spermií v epididymis. Použitím panelu geneticky modifikovaných myší, mezi-poddruhových chromosomálně substitučních kmenů a křížení PWK, PWD, B6 inbredních kmenů, jsme se i zde zaměřili na popsání role *Prdm9* genu a chromosomu X^{PWK}. Měřili jsme několik kvantitativních projevů různých stádií spermatogeneze hybridních samců. Hybridní nekompatibility alel *Prdm9^{domesticus}* a *Hstx2^{musculus}* ovlivňují meiózu samců F1(PWK x B6), která je jiná kvůli polymorfismům mezi PWD a PWK na chromosomu X, nikoli v oblasti *Prdm9*.

Naše závěry mají několik dopadů na úvahy o hybridní sterilitě. Analýza plodnosti dalších F1 hybridů dokázala, že *Prdm9* je jeden z hlavních regulátorů hybridní sterility. Fenotyp snížené plodnosti způsobené nekompatibilitami *Prdm9* se neprojevuje pouze jako kompletní sterilita a ani není omezen na konkrétní genetické pozadí. Také věk zkoumaných samců musí být brán v potaz ve všech studiích, které mají za cíl správně popsat fenotypy různých typů hybridní sterility. K výsledkům této práce by mělo být přihlédnuto při plánování experimentů zaměřených na plodnost kříženců *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*, jak v hybridních zónách, tak v laboratorních kříženích.

Kvantitativní aktivita rekombinačních hotspotů je patrně částečně kontrolována obsazeností hotspotů proteinem PRDM9, což je zase dáno jak počtem molekul PRDM9, tak DNA-vazebnou afinitou zinkových prstů jeho jednotlivých alel. U heterozygotů může tvořit PRDM9 heterodimery, které se preferenčně vážou na hotspoty silnější alely (a tím je aktivují). Projev hotspotů specifických pro slabší alelu je tímto potlačen. Jinými slovy, alelická dominance

PRDM9 je následkem protein-proteinových interakcí omezených množství molekul PRDM9 a následnou soutěží multimerů pro vazbu na DNA. Ve volně žijících myších populacích se vyskytuje hodně heterozygotů, a tak toto alelické soupeření utváří v genomu rozmanitou rekombinační krajinu.

7.1 Naplnění stanovených cílů práce

1. Objasnit vliv kombinací různých alel *Prdm9* či jejich genové dávky na sterilitu hybridních samců.
 - Sterilní fenotyp F1 hybridních samců dokáže zvrátit a tím těmto samcům zlepšit plodnost změna genové dávky *Prdm9* nehledě na původ jeho alely.
2. Popsat účinek kombinací alel a jejich různého množství u jiných modelů částečně neplodných hybridních samců.
 - *Prdm9* hraje roli i u jiných, jen částečně neplodných hybridů, snížení či zvýšení počtu kopií *Prdm9* koreluje se zlepšením plodnosti samců nehledě na typ alely *Prdm9*.
3. Porovnat změny plodnosti hybridních samců způsobené různými alelickými kombinacemi s meiotickým průběhem.
 - Narušení meiotického průběhu u hybridních samců, které mají sníženou plodnost, se projevuje zvýšeným počtem asynapsovaných chromosomů a nesprávně vytvořeným či chybějícím pohlavním tělískem pachytenních spermatocytů. Tyto meiotické defekty korelují s úrovní postižení plodnosti jednotlivých typů hybridů, například počtem spermií.
4. Zmapovat dopady genetických a molekulárních interakcí *Prdm9* v meióze hybridních samců a genetice samčí hybridní sterility.
 - Nekompatibilita PRDM9 se projevuje především v jeho proteinových doménách zinkových prstů zajišťujících specifickou vazbu na DNA, které určují umístění DSB, potažmo rekombinačních hotspotů. Posun umístění rekombinačních hotspotů

na méně vhodná místa v genomu pak nejspíš ztěžuje použití DSB pro správné párování homologních chromosomů na hybridním mezi-poddruhovém pozadí, a tím snižuje počty primárních spermatocytů schopných úspěšně dokončit meiózu.

8 Seznam použité literatury

- Adams IR, McLaren A. 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* **129**: 1155-1164.
- Albrechtová J, Albrecht T, Baird SJ, Macholan M, Rudolfson G, Munclinger P, Tucker PK, Pialek J. 2012. Sperm-related phenotypes implicated in both maintenance and breakdown of a natural species barrier in the house mouse. *Proc R Soc B* **279**: 4803-4810.
- Anderson LK, Reeves A, Webb LM, Ashley T. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* **151**: 1569-1579.
- Axelsson E, Webster MT, Ratnakumar A, Ponting CP, Lindblad-Toh K. 2012. Death of PRDM9 coincides with stabilization of the recombination landscape in the dog genome. *Genome Res* **22**: 51-63.
- Baker CL, Kajita S, Walker M, Saxl RL, Raghupathy N, Choi K, Petkov PM, Paigen K. 2015a. PRDM9 drives evolutionary erosion of hotspots in *Mus musculus* through haplotype-specific initiation of meiotic recombination. *PLoS Genet* **11**: e1004916.
- Baker CL, Petkova P, Walker M, Flachs P, Mihola O, Trachtulec Z, Petkov PM, Paigen K. 2015b. Multimer Formation Explains Allelic Suppression of PRDM9 Recombination Hotspots. *PLoS Genet* **11**: e1005512.
- Baker CL, Walker M, Kajita S, Petkov PM, Paigen K. 2014. PRDM9 binding organizes hotspot nucleosomes and limits Holliday junction migration. *Genome Res* **24**: 724-732.
- Balcova M, Faltusova B, Gergelits V, Bhattacharyya T, Mihola O, Trachtulec Z, Knopf C, Fotopulosova V, Chvatalova I, Gregorova S et al. 2016. Hybrid Sterility Locus on Chromosome X Controls Meiotic Recombination Rate in Mouse. *PLoS Genet* **12**: e1005906.
- Barbash DA, Siino DF, Tarone AM, Roote J. 2003. A rapidly evolving MYB-related protein causes species isolation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5302-5307.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-837.
- Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ. 2000. Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* **113** (Pt 6): 1033-1042.
- Bateson W. 1909. Heredity and variation in modern lights. in *Darwin and modern science* (ed. AC Steward), pp. 85–101. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, de Massy B. 2010. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* **327**: 836-840.

- Bayes JJ, Malik HS. 2009. Altered heterochromatin binding by a hybrid sterility protein in *Drosophila* sibling species. *Science* **326**: 1538-1541.
- Bellani MA, Romanienko PJ, Cairatti DA, Camerini-Otero RD. 2005. SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci* **118**: 3233-3245.
- Berg IL, Neumann R, Lam KW, Sarbajna S, Odenthal-Hesse L, May CA, Jeffreys AJ. 2010. PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat Genet* **42**: 859-863.
- Berg IL, Neumann R, Sarbajna S, Odenthal-Hesse L, Butler NJ, Jeffreys AJ. 2011. Variants of the protein PRDM9 differentially regulate a set of human meiotic recombination hotspots highly active in African populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12378-12383.
- Bergstrom DE, Bergstrom RA, Munroe RJ, Lee BK, Browning VL, You Y, Eicher EM, Schimenti JC. 2003. Overlapping deletions spanning the proximal two-thirds of the mouse t complex. *Mamm Genome* **14**: 817-829.
- Besansky NJ, Krzywinski J, Lehmann T, Simard F, Kern M, Mukabayire O, Fontenille D, Toure Y, Sagnon N. 2003. Semipermeable species boundaries between *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*: evidence from multilocus DNA sequence variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10818-10823.
- Bhalla N, Dernburg AF. 2008. Prelude to a division. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 397-424.
- Bhattacharyya T, Gregorova S, Mihola O, Anger M, Sebestova J, Denny P, Simecek P, Forejt J. 2013. Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E468-477.
- Bhattacharyya T, Reifova R, Gregorova S, Simecek P, Gergelits V, Mistrik M, Martincova I, Pialek J, Forejt J. 2014. X chromosome control of meiotic chromosome synapsis in mouse inter-subspecific hybrids. *PLoS Genet* **10**: e1004088.
- Birtle Z, Ponting CP. 2006. Meisetz and the birth of the KRAB motif. *Bioinformatics* **22**: 2841-2845.
- Bogdanov YF, Grishaeva TM, Dadashev SY. 2007. Similarity of the domain structure of proteins as a basis for the conservation of meiosis. *Int Rev Cytol* **257**: 83-142.
- Bolcun-Filas E, Schimenti JC. 2012. Genetics of meiosis and recombination in mice. *Int Rev Cell Mol Biol* **298**: 179-227.
- Bomblies K. 2010. Doomed lovers: mechanisms of isolation and incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 109-124.
- Borner GV, Kleckner N, Hunter N. 2004. Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* **117**: 29-45.
- Brick K, Smagulova F, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV. 2012. Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* **485**: 642-645.

- Brideau NJ, Flores HA, Wang J, Maheshwari S, Wang X, Barbash DA. 2006. Two Dobzhansky-Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science* **314**: 1292-1295.
- Buard J, Barthes P, Grey C, de Massy B. 2009. Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* **28**: 2616-2624.
- Buard J, Rivals E, Dunoyer de Segonzac D, Garres C, Caminade P, de Massy B, Boursot P. 2014. Diversity of Prdm9 zinc finger array in wild mice unravels new facets of the evolutionary turnover of this coding minisatellite. *PLoS One* **9**: e85021.
- Coop G, Myers SR. 2007. Live hot, die young: transmission distortion in recombination hotspots. *PLoS Genet* **3**: e35.
- Copsey A, Tang S, Jordan PW, Blitzblau HG, Newcombe S, Chan AC, Newnham L, Li Z, Gray S, Herbert AD et al. 2013. Smc5/6 coordinates formation and resolution of joint molecules with chromosome morphology to ensure meiotic divisions. *PLoS Genet* **9**: e1004071.
- Coyne JA. 1992. Genetics and speciation. *Nature* **355**: 511-515.
- Coyne JA, Charlesworth B. 1989. Genetic analysis of X-linked sterility in hybrids between three sibling species of *Drosophila*. *Heredity (Edinb)* **62 (Pt 1)**: 97-106.
- Coyne JA, Orr HA. 1989. Patterns of Speciation in *Drosophila*. *Evolution* **43**: 362-381.
- Coyne JAO, H.A. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Davies B, Hatton E, Altemose N, Hussin JG, Pratto F, Zhang G, Hinch AG, Moralli D, Biggs D, Diaz R et al. 2016. Re-engineering the zinc fingers of PRDM9 reverses hybrid sterility in mice. *Nature* **530**: 171-176.
- Dean MD, Ardlie KG, Nachman MW. 2006. The frequency of multiple paternity suggests that sperm competition is common in house mice (*Mus domesticus*). *Mol Ecol* **15**: 4141-4151.
- Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD et al. 1994. A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nat Genet* **7**: 220-245.
- Dobzhansky T. 1937. in *Genetics and the origin of species*. Columbia Univ. Press, New York.
- Dod B, Jermiin LS, Boursot P, Chapman VH, Nielsen JT, Bonhomme F. 1993. Counterselection on Sex-Chromosomes in the *Mus-Musculus* European Hybrid Zone. *J Evolution Biol* **6**: 529-546.
- Dufkova P, Macholan M, Pialek J. 2011. Inference of selection and stochastic effects in the house mouse hybrid zone. *Evolution* **65**: 993-1010.
- Dzur-Gejdosova M, Simecek P, Gregorova S, Bhattacharyya T, Forejt J. 2012. Dissecting the genetic architecture of F1 hybrid sterility in house mice. *Evolution* **66**: 3321-3335.
- Eom GH, Kim K, Kim SM, Kee HJ, Kim JY, Jin HM, Kim JR, Kim JH, Choe N, Kim KB et al. 2009. Histone methyltransferase PRDM8 regulates mouse testis steroidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **388**: 131-136.

- Fairfield H, Gilbert GJ, Barter M, Corrigan RR, Curtain M, Ding Y, D'Ascenzo M, Gerhardt DJ, He C, Huang W et al. 2011. Mutation discovery in mice by whole exome sequencing. *Genome Biol* **12**: R86.
- Ferree PM, Barbash DA. 2009. Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *PLoS Biol* **7**: e1000234.
- Flachs P, Bhattacharyya T, Mihola O, Pialek J, Forejt J, Trachtulec Z. 2014. Prdm9 incompatibility controls oligospermia and delayed fertility but no selfish transmission in mouse intersubspecific hybrids. *PLoS One* **9**: e95806.
- Flachs P, Mihola O, Simecek P, Gregorova S, Schimenti JC, Matsui Y, Baudat F, de Massy B, Pialek J, Forejt J et al. 2012. Interallelic and intergenic incompatibilities of the Prdm9 (Hst1) gene in mouse hybrid sterility. *PLoS Genet* **8**: e1003044.
- Forejt J. 1985. Chromosomal and genic sterility of hybrid type in mice and men. *Exp Clin Immunogenet* **2**: 106-119.
- . 1996. Hybrid sterility in the mouse. *Trends Genet* **12**: 412-417.
- Forejt J, Ivanyi P. 1974. Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). *Genet Res* **24**: 189-206.
- Forejt J, Pialek J, Trachtulec Z. 2012. Hybrid male sterility genes in the mouse subspecific crosses. in *Evolution of the House Mouse* (eds. SJE Baird, M Macholan, P Munclinger, J Pialek), pp. 482-503. Cambridge University Press.
- Forejt J, Trachtulec Z, Hamvas R. 1999. Mouse chromosome 17. *Mamm Genome* **10**: 958.
- Forejt J, Vincek V, Klein J, Lehrach H, Loudova-Mickova M. 1991. Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the Hybrid sterility-1 gene. *Mamm Genome* **1**: 84-91.
- Foret S, Knack B, Houliston E, Momose T, Manuel M, Queinnec E, Hayward DC, Ball EE, Miller DJ. 2010. New tricks with old genes: the genetic bases of novel cnidarian traits. *Trends Genet* **26**: 154-158.
- Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R. 2012. The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res* **318**: 1340-1346.
- Fumasoni I, Meani N, Rambaldi D, Scafetta G, Alcalay M, Ciccarelli FD. 2007. Family expansion and gene rearrangements contributed to the functional specialization of PRDM genes in vertebrates. *BMC Evol Biol* **7**: 187.
- Geraldes A, Basset P, Smith KL, Nachman MW. 2011. Higher differentiation among subspecies of the house mouse (*Mus musculus*) in genomic regions with low recombination. *Mol Ecol* **20**: 4722-4736.
- Good JM, Handel MA, Nachman MW. 2008. Asymmetry and polymorphism of hybrid male sterility during the early stages of speciation in house mice. *Evolution* **62**: 50-65.
- Gregorova S, Divina P, Storchova R, Trachtulec Z, Fotopulosova V, Svenson KL, Donahue LR, Paigen B, Forejt J. 2008. Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Res* **18**: 509-515.

- Gregorova S, Forejt J. 2000. PWD/Ph and PWK/Ph inbred mouse strains of *Mus m. musculus* subspecies--a valuable resource of phenotypic variations and genomic polymorphisms. *Folia Biol (Praha)* **46**: 31-41.
- Gregorova S, Mnukova-Fajdelova M, Trachtulec Z, Capkova J, Loudova M, Høglund M, Hamvas R, Lehrach H, Vincek V, Klein J et al. 1996. Sub-milliMorgan map of the proximal part of mouse Chromosome 17 including the hybrid sterility 1 gene. *Mamm Genome* **7**: 107-113.
- Grey C, Barthes P, Chauveau-Le Friec G, Langa F, Baudat F, de Massy B. 2011. Mouse PRDM9 DNA-binding specificity determines sites of histone H3 lysine 4 trimethylation for initiation of meiotic recombination. *PLoS Biol* **9**: e1001176.
- Grey C, Baudat F, de Massy B. 2009. Genome-wide control of the distribution of meiotic recombination. *PLoS Biol* **7**: e35.
- Habu T, Taki T, West A, Nishimune Y, Morita T. 1996. The mouse and human homologs of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res* **24**: 470-477.
- Haldane JBS. 1922. Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *J Genet* **12**: 101-109.
- Hamilton WJ. 1999. *Narrow Roads to Gene Land: Evolution of Sex*. Oxford University Press, Oxford.
- Harrison JS, Burton RS. 2006. Tracing hybrid incompatibilities to single amino acid substitutions. *Mol Biol Evol* **23**: 559-564.
- Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y. 2005. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**: 374-378.
- Heard E, Turner J. 2011. Function of the sex chromosomes in mammalian fertility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a002675.
- Hohenauer T, Moore AW. 2012. The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development* **139**: 2267-2282.
- Holliday R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res*: 282-304.
- Homolka D, Ivanek R, Capkova J, Jansa P, Forejt J. 2007. Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res* **17**: 1431-1437.
- Hunter N, Kleckner N. 2001. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* **106**: 59-70.
- Charlesworth B, Coyne JA, Barton NH. 1987. The Relative Rates of Evolution of Sex-Chromosomes and Autosomes. *American Naturalist* **130**: 113-146.
- Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M et al. 2009. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* **7**: e1000112.
- Imai Y, Baudat F, TAILLEPIERRE M, Stanzione M, Toth A, de Massy B. 2017. The PRDM9 KRAB domain is required for meiosis and involved in protein interactions. *Chromosoma*.

- Ivanyi P, Vojtiskova M, Demant P, Mickova M. 1969. Genetic factors in the ninth linkage group influencing reproductive performance in male mice. *Folia Biol (Praha)* **15**: 401-421.
- Janousek V, Wang L, Luzynski K, Dufkova P, Vyskocilova MM, Nachman MW, Munclinger P, Macholan M, Pialek J, Tucker PK. 2012. Genome-wide architecture of reproductive isolation in a naturally occurring hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*. *Mol Ecol* **21**: 3032-3047.
- Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M. 2011. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science* **331**: 916-920.
- Kauppi L, Barchi M, Lange J, Baudat F, Jasin M, Keeney S. 2013. Numerical constraints and feedback control of double-strand breaks in mouse meiosis. *Genes Dev* **27**: 873-886.
- Keeney S. 2008. Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab* **2**: 81-123.
- Kelly WG, Aramayo R. 2007. Meiotic silencing and the epigenetics of sex. *Chromosome Res* **15**: 633-651.
- Khalturin K, Hemmrich G, Fraune S, Augustin R, Bosch TC. 2009. More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? *Trends Genet* **25**: 404-413.
- Kono H, Tamura M, Osada N, Suzuki H, Abe K, Moriwaki K, Ohta K, Shiroishi T. 2014. Prdm9 polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res* **21**: 315-326.
- Laurie CC. 1997. The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane's rule. *Genetics* **147**: 937-951.
- Li XC, Bolcun-Filas E, Schimenti JC. 2011. Genetic evidence that synaptonemal complex axial elements govern recombination pathway choice in mice. *Genetics* **189**: 71-82.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**: 271-276.
- Maheshwari S, Barbash DA. 2011. The genetics of hybrid incompatibilities. *Annu Rev Genet* **45**: 331-355.
- Macholan M, Munclinger P, Sugerikova M, Dufkova P, Bimova B, Bozikova E, Zima J, Pialek J. 2007. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution* **61**: 746-771.
- Maret W, Li Y. 2009. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* **109**: 4682-4707.
- Masly JP, Jones CD, Noor MA, Locke J, Orr HA. 2006. Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. *Science* **313**: 1448-1450.
- Masly JP, Presgraves DC. 2007. High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol* **5**: e243.
- Matsuda Y, Habu T, Hori T, Morita T. 1996. Chromosome mapping of the mouse homologue of DMC1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene. *Chromosome Res* **4**: 249-250.
- Maynard Smith J. 1978. *The Evolution of Sex*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, Forejt J. 2009. A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* **323**: 373-375.
- 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.
- Mouse Genome Sequencing C Waterston RH Lindblad-Toh K Birney E Rogers J Abril JF Agarwal P Agarwala R Ainscough R Alexandersson M et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-562.
- Muller HJ. 1942. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. in *Biological Symposia*, pp. 71–125. Jaques Cattell Press, Lancaster.
- Munoz-Fuentes V, Di Rienzo A, Vila C. 2011. Prdm9, a major determinant of meiotic recombination hotspots, is not functional in dogs and their wild relatives, wolves and coyotes. *PLoS One* **6**: e25498.
- Myers S, Bowden R, Tumian A, Bontrop RE, Freeman C, MacFie TS, McVean G, Donnelly P. 2010. Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* **327**: 876-879.
- Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES. 2000. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* **24**: 221-225.
- Neale MJ, Keeney S. 2006. Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* **442**: 153-158.
- Oliver PL, Goodstadt L, Bayes JJ, Birtle Z, Roach KC, Phadnis N, Beatson SA, Lunter G, Malik HS, Ponting CP. 2009. Accelerated evolution of the Prdm9 speciation gene across diverse metazoan taxa. *PLoS Genet* **5**: e1000753.
- Orr HA. 1987. Genetics of male and female sterility in hybrids of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* **116**: 555-563.
- Orr HA, Madden LD, Coyne JA, Goodwin R, Hawley RS. 1997. The developmental genetics of hybrid inviability: a mitotic defect in *Drosophila* hybrids. *Genetics* **145**: 1031-1040.
- Orr HA, Presgraves DC. 2000. Speciation by postzygotic isolation: forces, genes and molecules. *Bioessays* **22**: 1085-1094.
- Otubanjo OA, Mosuro AA. 2007. An in vivo evaluation of the induction of abnormal sperm morphology by sulphamethoxypyridazine: pyrimethamine (Metakelfin). *Pak J Biol Sci* **10**: 156-159.
- Palopoli MF, Wu CI. 1994. Genetics of hybrid male sterility between *Drosophila* sibling species: a complex web of epistasis is revealed in interspecific studies. *Genetics* **138**: 329-341.
- Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, Tischfield SE, Zhu X, Neale MJ, Jasin M, Socci ND et al. 2011. A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* **144**: 719-731.
- Paques F, Haber JE. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404.

- Parvanov ED, Petkov PM, Paigen K. 2010. Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* **327**: 835.
- Payseur BA, Krenz JG, Nachman MW. 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution* **58**: 2064-2078.
- Perry J, Palmer S, Gabriel A, Ashworth A. 2001. A short pseudoautosomal region in laboratory mice. *Genome Res* **11**: 1826-1832.
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. 2003. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**: 423-440.
- Phadnis N, Orr HA. 2009. A single gene causes both male sterility and segregation distortion in *Drosophila* hybrids. *Science* **323**: 376-379.
- Pialek J, Vyskocilova M, Bimova B, Havelkova D, Pialkova J, Dufkova P, Bencova V, Dureje L, Albrecht T, Hauffe HC et al. 2008. Development of unique house mouse resources suitable for evolutionary studies of speciation. *J Hered* **99**: 34-44.
- Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, Eisold M, Fritsch C, Richter FM, Mittler G, Genoud C, Goyama S, Kurokawa M et al. 2012. Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* **150**: 948-960.
- Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T. 1998. Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci* **111** (Pt 4): 413-423.
- Powers NR, Parvanov ED, Baker CL, Walker M, Petkov PM, Paigen K. 2016. The Meiotic Recombination Activator PRDM9 Trimethylates Both H3K36 and H3K4 at Recombination Hotspots In Vivo. *PLoS Genet* **12**: e1006146.
- Pratto F, Brick K, Khil P, Smagulova F, Petukhova GV, Camerini-Otero RD. 2014. DNA recombination. Recombination initiation maps of individual human genomes. *Science* **346**: 1256442.
- Presgraves DC. 2003. A fine-scale genetic analysis of hybrid incompatibilities in *Drosophila*. *Genetics* **163**: 955-972.
- Presgraves DC, Orr HA. 1998. Haldane's rule in taxa lacking a hemizygous X. *Science* **282**: 952-954.
- Rieseberg LH, Blackman BK. 2010. Speciation genes in plants. *Ann Bot* **106**: 439-455.
- Rogacheva MV, Manhart CM, 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.
- Sawamura K. 1996. Maternal effect as a cause of exceptions for Haldane's rule. *Genetics* **143**: 609-611.
- Sawamura K, Roote J, Wu CI, Yamamoto MT. 2004. Genetic complexity underlying hybrid male sterility in *Drosophila*. *Genetics* **166**: 789-796.

- Segurel L, Leffler EM, Przeworski M. 2011. The case of the fickle fingers: how the PRDM9 zinc finger protein specifies meiotic recombination hotspots in humans. *PLoS Biol* **9**: e1001211.
- She JX, Bonhomme F, Boursot P, Thaler L, Catzeflis F. 1990. Molecular Phylogenies in the Genus *Mus* - Comparative-Analysis of Electrophoretic, Scndna Hybridization, and Mtdna Rflp Data. *Biol J Linn Soc* **41**: 83-103.
- Shifman S, Bell JT, Copley RR, Taylor MS, Williams RW, Mott R, Flint J. 2006. A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS Biol* **4**: e395.
- 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.
- Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H, Jauch A. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J Cell Sci* **111** (Pt 16): 2337-2351.
- Schilthuisen M, Giesbers MC, Beukeboom LW. 2011. Haldane's rule in the 21st century. *Heredity (Edinb)* **107**: 95-102.
- Schwartz JJ, Roach DJ, Thomas JH, Shendure J. 2014. Primate evolution of the recombination regulator PRDM9. *Nat Commun* **5**: 4370.
- Smagulova F, Brick K, Pu Y, Camerini-Otero RD, Petukhova GV. 2016. The evolutionary turnover of recombination hot spots contributes to speciation in mice. *Genes Dev* **30**: 266-280.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**: 1213-1226.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G et al. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6062-6067.
- Sun F, Fujiwara Y, Reinholdt LG, Hu J, Saxl RL, Baker CL, Petkov PM, Paigen K, Handel MA. 2015. Nuclear localization of PRDM9 and its role in meiotic chromatin modifications and homologous synapsis. *Chromosoma* **124**: 397-415.
- Sun S, Ting CT, Wu CI. 2004. The normal function of a speciation gene, *Odysseus*, and its hybrid sterility effect. *Science* **305**: 81-83.
- Sun XJ, Xu PF, Zhou T, Hu M, Fu CT, Zhang Y, Jin Y, Chen Y, Chen SJ, Huang QH et al. 2008. Genome-wide survey and developmental expression mapping of zebrafish SET domain-containing genes. *PLoS One* **3**: e1499.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35.
- Tang S, Presgraves DC. 2009. Evolution of the *Drosophila* nuclear pore complex results in multiple hybrid incompatibilities. *Science* **323**: 779-782.

- Thomas JH, Emerson RO, Shendure J. 2009. Extraordinary molecular evolution in the PRDM9 fertility gene. *PLoS One* **4**: e8505.
- Ting CT, Tsaur SC, Wu ML, Wu CI. 1998. A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* **282**: 1501-1504.
- Trachtulec Z, Mihola O, Vlcek C, Himmelbauer H, Paces V, Forejt J. 2005. Positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene: fine genetic mapping and evaluation of two candidate genes. *Biol J Linn Soc* **84**: 637-641.
- Trachtulec Z, Vincek V, Hamvas RM, Forejt J, Lehrach H, Klein J. 1994. Physical map of mouse chromosome 17 in the region relevant for positional cloning of the Hybrid sterility 1 gene. *Genomics* **23**: 132-137.
- Tsai JH, McKee BD. 2011. Homologous pairing and the role of pairing centers in meiosis. *J Cell Sci* **124**: 1955-1963.
- Tucker PK, Sage RD, Warner J, Wilson AC, Eicher EM. 1992. Abrupt Cline for Sex Chromosomes in a Hybrid Zone between Two Species of Mice. *Evolution* **46**: 1146-1163.
- Turelli M, Orr HA. 1995. The dominance theory of Haldane's rule. *Genetics* **140**: 389-402.
- . 2000. Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* **154**: 1663-1679.
- Turner JM. 2007. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**: 1823-1831.
- Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng CX. 2004. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* **14**: 2135-2142.
- Turner LM, Schwahn DJ, Harr B. 2012. Reduced male fertility is common but highly variable in form and severity in a natural house mouse hybrid zone. *Evolution* **66**: 443-458.
- Valouev A, Johnson SM, Boyd SD, Smith CL, Fire AZ, Sidow A. 2011. Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature* **474**: 516-520.
- Vervoort M, Meulemeester D, Behague J, Kerner P. 2016. Evolution of Prdm Genes in Animals: Insights from Comparative Genomics. *Mol Biol Evol* **33**: 679-696.
- Vyskocilova M, Prazanova G, Pialek J. 2009. Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus musculus* strains on proximal chromosome 17. *Mamm Genome* **20**: 83-91.
- Vyskocilova M, Trachtulec Z, Forejt J, Pialek J. 2005. Does geography matter in hybrid sterility in house mice? *Biol J Lin Soc* **84**: 663-674.
- Weiss J, Hurley LA, Harris RM, Finlayson C, Tong M, Fisher LA, Moran JL, Beier DR, Mason C, Jameson JL. 2012. ENU mutagenesis in mice identifies candidate genes for hypogonadism. *Mamm Genome* **23**: 346-355.
- Wilkins AS, Holliday R. 2009. The evolution of meiosis from mitosis. *Genetics* **181**: 3-12.
- Wittbrodt J, Adam D, Malitschek B, Maueler W, Raulf F, Telling A, Robertson SM, Scharl M. 1989. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in *Xiphophorus*. *Nature* **341**: 415-421.

- Wu CI, Davis AW. 1993. Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am Nat* **142**: 187-212.
- Wu CI, Johnson NA, Palopoli MF. 1996. Haldane's rule and its legacy: Why are there so many sterile males? *Trends Ecol Evol* **11**: 281-284.
- Wu CI, Xu EY. 2003. Sexual antagonism and X inactivation--the SAXI hypothesis. *Trends Genet* **19**: 243-247.
- Wu TC, Lichten M. 1994. Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* **263**: 515-518.
- Yang F, Wang PJ. 2009. The Mammalian synaptonemal complex: a scaffold and beyond. *Genome Dyn* **5**: 69-80.
- Zeng C, Kouprina N, Zhu B, Cairo A, Hoek M, Cross G, Osoegawa K, Larionov V, de Jong P. 2001. Large-insert BAC/YAC libraries for selective re-isolation of genomic regions by homologous recombination in yeast. *Genomics* **77**: 27-34.
- Zickler D, Kleckner N. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* **32**: 619-697.