

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Vývojová biologie

# **IDENTIFIKACE HETEROCHROMOZÓMŮ *XENOPUS LAEVIS***

Dizertační práce

**Tereza Tlapáková**

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Školitel: RNDr. Jaroslav Mácha

Praha 2006

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli, RNDr. Jaroslavu Máchovi nejen za odborné vedení mé dizertační práce, ale hlavně za vytvoření podnětného a tvůrčího prostředí, ve kterém vznikala.

Můj dík patří i celému kolektivu Oddělení vývojové biologie a imunologie, Katedry fyziologie živočichů a vývojové biologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, jmenovitě Ing. RNDr. Vladimíru Krylovi, Ph.D., Doc. RNDr. Janu Černému, Ph.D., Marii Hladečkové, Janě Dvořákové a dalším pracovníkům oddělení za plodnou spolupráci a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Mé poděkování patří i Mgr. Barboře Bartoňové za její neocenitelnou pomoc a přátelství.

V neposlední řadě bych touto cestou ráda poděkovala své rodině, především mé matce Evě Tlapákové, za její obětavost, trpělivost a toleranci a za vytvoření rodinného zázemí, které mi umožnilo se plně věnovat mému studiu a práci.

# OBSAH

<b>I. ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>I.1 <i>Xenopus</i> jako modelový organismus</b>	<b>3</b>
I.1.1 Systematické zařazení a zeměpisný původ	4
I.1.2 <i>Xenopus laevis</i>	4
I.1.2.1 Tetraploidní původ	4
I.1.2.2 Evoluce duplikovaných genů	5
I.1.2.3 Organizace genomu	7
I.1.2.3.1 Velikost genomu	7
I.1.2.3.2 Karyotyp	7
I.1.2.3.3 Repetitivní sekvence	8
I.1.2.4 Determinace pohlaví	9
I.1.3 <i>Xenopus tropicalis</i>	9
<b>I.2 Současné přístupy k řízení embryonálního vývoje</b>	<b>10</b>
I.2.1 Hledání genů podle nové funkce	11
I.2.2 Hledání genů podle ztráty funkce	11
I.2.3 Sekvenování genomu	12
I.2.4 Mapování genomu	13
I.2.4.1 Mapování chromozómů pomocí hyperdiploidních hybridů	13
I.2.4.2 Cytologické lokalizace pomocí <i>in situ</i> hybridizace	14
I.2.4.3 Gen-centromerové mapování	14
I.2.4.4 Vazebné mapování	15
<b>II. CÍLE PRÁCE</b>	<b>17</b>
<b>III. VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	<b>19</b>

<b>III.1</b> Xstir polymorfismus a absence vazby na pohlaví ME2 genu u <i>Xenopus laevis</i> .....	<b>19</b>
<b>III.2</b> Lokalizace c-src1 na chromozómech <i>Xenopus laevis</i> pomocí fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace .....	<b>21</b>
<b>III.3</b> Lokalizace, struktura a polymorfismus dvou paralogních genů pro mitochondriální malát dehydrogenázu u <i>Xenopus laevis</i> .....	<b>24</b>
<b>III.4</b> Struktura a lokalizace Mdh2 single-copy genu do chromozómů <i>Xenopus tropicalis</i> pomocí FISH-TSA techniky .....	<b>28</b>
<b>IV. ZÁVĚRY</b> .....	<b>30</b>
<b>V. LITERATURA</b> .....	<b>32</b>
<b>VI. SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>41</b>
<b>VII. PREZENTACE NA KONFERENCÍCH</b> .....	<b>42</b>
<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>43</b>

# I. ÚVOD

Výsledky studií zabývající se rozpoznáváním signálů, které řídí diferenciaci a organogenezi, ve svém důsledku umožňují provádět náhradu poškozených tkání a orgánů. Vývojová biologie se díky tomu stala v nedávných letech strategicky nejdůležitějším odvětvím biologie. Budoucnost tohoto oboru tkví v implementaci a dalším rozvoji poznatků získaných z „embryonálně přístupných“ modelových organismů (např. *Xenopus*) na savčí, potažmo lidský, model. Dobrou ukázkou je výzkum skupiny prof. Asashimy z Tokijské Univerzity, při němž byli jako první schopni vytvořit celou řadu nadpočetných funkčních orgánů (chorda, pronefros, pankreas, oko a srdce) u *Xenopus laevis* tím, že ošetřili izolované animální čepičky různými koncentracemi aktivinu (mezodermální induktor) a kyseliny retinové (Ariizumi *et al.*, 2003). Výsledky těchto prací se zdají být klíčové nejen pro pochopení organogeneze u žab rodu *Xenopus*, ale i pro studium těchto procesů u vyšších obratlovců včetně člověka.

V minulosti se výzkum vývojové biologie ubíral dvěma směry. U savců lze sledovat pouze závěrečné fáze diferenciaci, neboť po provedení experimentu již není možné vrátit embryo zpět do dělohy. Jediná metoda, jež umožňuje zásah do rané embryogeneze savců, spočívá v náročném a pracném knockout genu. Využití objevu kmenových buněk zatím brzdí jejich omezený růst a nedostatečná znalost přirozených diferenciacních signálů. Druhý způsob studia embryogeneze vychází z výzkumů prováděných na embryích obojživelníků, přičemž jako hlavní modelový organismus zde slouží *Xenopus*.

Žába rodu *Xenopus* představuje jedinečný živočišný systém, který v základním biologickém výzkumu významně přispěl a i nadále přispívá k rozšíření vědomostí v mnoha různých odvětvích. Tento modelový systém má zásadní význam jak při výzkumu raného vývoje embrya obratlovců, tak v

buněčné biologii. Použití žab rodu *Xenopus* je výhodné i vzhledem k tomu, že je možné načasovat ovulaci pomocí injekce lidského choriogonadotropinu (hCG). V laboratorních podmínkách lze tedy každodenně snadno získat velké množství embryí (za použití dvou až tří samic až několik tisíc). Nedostatek biologického materiálu je tak zřídka omezením. Vývoj lze díky značné velikosti embryí i jejich vnějšímu vývoji studovat okamžitě po oplodnění. Poté, co zárodek stráví značnou část žloutkových granul, se ve stádiu pulce stává transparentním, což umožňuje při studiu vývojových procesů (knockout, gene trap, promotor trap apod.) využívat fluorescenční reportérové geny (např. GFP - green fluorescent protein).

Velikost oocytů i embryí dovoluje mikrochirurgické manipulace včetně mikroinjekcí a navíc embrya žab rodu *Xenopus* vykazují po použití těchto technik neobvykle vysokou schopnost regenerace. Díky tomu se v uplynulých pěti letech podařilo do oocytů nebo embryí žab rodu *Xenopus* v různém stádiu vývoje vpravit desítky antisense RNA a morfolino oligonukleotidů. Oba přístupy jsou určeny k blokování exprese zkoumaných genů a to buď na úrovni transkripce (antisense RNA), nebo translace (morfolino oligonukleotidy), čímž je na základě výsledného fenotypu identifikována jejich funkce.

Mohutný rozvoj studia exprimovaného genomu u *X. laevis* a *X. tropicalis* se doposud jen málo odráží v takových oblastech, jakými jsou genetika a cytogenetika, kde jsou dostupná data buď neúplná, nebo zcela chybí. Lokalizace genů na chromozómech a genetické a fyzikální mapy vytvořené pomocí polymorfních markerů umožní rozvinout obrovský potenciál tohoto modelového organismu.

Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem genetiky a cytogenetiky *X. laevis*, přičemž jedním z hlavních úkolů zde byla identifikace heterochromozómů. Důležitou součástí práce bylo zavedení metodiky

umožňující chromozómovou lokalizaci u studovaných genů a nalezení polymorfních intronových markerů, které naznačují jednu z možností konstruování genetických a fyzikálních map s využitím intronových sekvencí.

## I.1 *Xenopus* jako modelový organismus

*Xenopus* patří ve vývojové biologii mezi klíčové modelové organismy. Při objasňování časně embryonální indukce, uspořádání základního tělního plánu obratlovců a rané organogenezi stál *Xenopus laevis* v čele výzkumu. Společně s moderní molekulární biologii vedly důležité metody experimentální embryologie k prvním průlomům v chápání mechanismů tvorby zárodečných listů obratlovců a jejich tělní osy, včetně porozumění indukce a vzniku jejich nervového systému. V oblasti buněčné biologie je jeho význam patrný při studiu replikace chromozómů, struktury chromatinu a jádra, molekul ovlivňujících buněčný cyklus, cytoskeletálního aparátu a signálních drah.

Embrya obojživelníků si svou výsadní pozici při embryologických experimentech udržela po mnoho desetiletí. Evropští embryologové používali zejména embrya čolků (např. *Triturus*) a embrya žáby *Rana temporaria*, příbuzné severoamerickému druhu *Rana pipiens*. V 50. letech 20. století používala Fischbergova laboratoř v Ženevě *X. laevis* a podařilo se jim prokázat, že po transplantaci jader buněk epitelu střeva pulce do enukleovaných vajíček dojde k normálnímu vývoji dospělého. Dalším podnětem k využití rodu *Xenopus* se v 70. letech 20. století stal experiment, který prokázal, že oocyt u žab rodu *Xenopus* dokáže translatovat injektovanou mRNA (Gurdon *et al.*, 1971). Nedlouho nato se zjistilo, že oocyt lze u rodu *Xenopus* využít i jako *in vivo* zkumavku při studiu funkcí biologických makromolekul (Gurdon, 1975). Žáby rodu *Xenopus* se tak postupně staly jedním z nejoblíbenějších modelových systémů.

### **I.1.1 Systematické zařazení a zeměpisný původ**

Rody *Xenopus* a *Silurana* tvoří skupinu takzvaných drápkatých žab (z angl. Clawed frogs) z podčeledi *Xenopodinae* a čeledi *Pipidea* (de Sa and Hillis, 1990; Cannatella and de Sa, 1993). Do stejné čeledi je řazena i podčeď *Pipinae*, kterou tvoří sedm druhů amerických Pip. Druhá, africká větev obsahuje čtyři druhy rodu *Hymenochirus* a jeden druh rodu *Pseudhymenochirus* (Cannatella and Trueb, 1988a; Cannatella and Trueb, 1988b).

Zeměpisný původ *Xenopus laevis* (drápatka vodní) určeného k výzkumným účelům, je odvozen z oblasti Cape Flats kolem Kapského města v jižní Africe. Jeho výskyt je dále zaznamenán od Nigérie a Súdánu až po Agulhaský mys.

### **I.1.2 *Xenopus laevis***

#### **I.1.2.1 Tetraploidní původ**

Zvláštností rodu *Xenopus* je fakt, že až na jediný druh vykazují všechny ostatní (16-20) polyploidní původ, tvořící série 2:4:8:12 (Kobel and Du Pasquier, 1986). *Xenopus laevis* je řazen mezi tetraploidy, což bylo prokázáno porovnáním obsahů DNA mezi různými druhy z čeledi *Pipidae* a dále jeho tetraploidii potvrzuje fakt, že u *X. laevis* jsou některé geny reprezentovány dvěma kopiemi, jejichž rozdíl v sekvenci je obvykle nižší než 10%. Z evolučního hlediska má alespoň část duplikovaných genů podobná omezení (Hughes and Hughes, 1993).

Na druhou stranu však *X. laevis* vykazuje řadu vlastností diploidního organismu: karyotyp 18ti párů chromozómů, jež v meióze tvoří bivalenty (Tymowska and Fischberg, 1973; Muller, 1974), nezávislá segregace duplikovaných genů (Graf, 1989a) a neschopnost života haploidních (18-ti



chromozómových) zygot (Hamilton, 1963). Dále je u tohoto druhu známo přibližně 40 recesivních mutant. Poslední dva zmiňované údaje naznačují, že část genetické informace je přítomna v neduplikované formě, což se také potvrdilo u celé řady enzymů a jiných proteinů (Graf, 1989a) i u vícegenových lokusů, jako je organizátor jadérka (Tymowska and Kobel, 1972; Pardue *et al.*, 1973), hlavní histokompatibilní komplex MHC (Du Pasquier *et al.*, 1977) a lokus pro těžký imunoglobulinový řetězec (Schwager *et al.*, 1988). Shrňeme-li výše uvedená pozorování, lze říci, že *X. laevis* vykazuje všechny vlastnosti evolučně mladého tetraploidního organismu, který je v současné době kompletně diploidizován.

Tetraploidní původ *X. laevis* a vysoký výskyt duplikovaných genů genetickou analýzu komplikují. I přes tyto obtíže bylo dosaženo některých významných výsledků, například kompletní sekvenování mitochondriálního genomu. Jeho 17 553 bp obsahuje geny jak pro 12 S a 16 S rRNA tak i pro 22 tRNA a 13 proteinů (Roe *et al.*, 1985).

### **I.1.2.2 Evoluce duplikovaných genů**

Ohno (1970) jako první zdůraznil význam genové duplikace v evoluci. Podle jeho teorie umožní přítomnost funkčního lokusu jeho kopii po duplikaci volně akumulovat mutace. To má za následek ztrátu funkce případně získání funkce nové. K podobným závěrům dospěla i další práce, která usuzuje, že funkční divergence je přímo podmíněna genovou duplikací (Kimura and Ota, 1974). Na druhou stranu pravděpodobnost, že kopie duplikovaného genu bude po akumulaci náhodných mutací umlčena (z angl. silencing), je daleko větší než, že získá novou funkci (Nei, 1969; Nei and Roychoudhury, 1973).

Při identifikaci izoenzymů kódovaných paralogními geny u tetraploidních ryb z čeledi *Catostomidae* však bylo dokázáno, že i přes dlouhý evoluční čas, 50 milionů let od duplikace (Uyeno and Smith, 1972), ztratil duplikovaný gen svou

funkci u pouhých 53% paralogů (Ferris and Whitt, 1977). U 47% paralogních genů byly obě kopie transkripčně aktivní. Několik teorií se pokoušelo vysvětlit nižší rychlost umlčování genů než jaká odpovídá pravděpodobnosti (Bailey *et al.*, 1978; Takahata and Maruyama, 1979; Li, 1980; Watterson, 1983). Podle těchto teorií, je jedinou možností jak zachovat oba paralogy transkripčně aktivní, získání výhodné mutace, která by změnila funkci u jedné z kopií, přičemž druhá kopie by si svou původní funkci ponechala.

Tyto zřejmé rozpory se pokusila vysvětlit hypotéza založená na subfunkcionalizaci paralogních genů, jež se zabývá rozdíly v jejich regulačních oblastech (Force *et al.*, 1999). Tyto struktury jsou většinou rozsáhlejší než vlastní kódující sekvence. Pravděpodobnost, že k případné mutaci dojde právě zde je tedy daleko vyšší. Regulační oblasti se podílejí na diferenční aktivitě genové exprese. Jinými slovy, jeden a tentýž gen je v jedné tkáni přepisován do RNA, zatímco v jiné je transkripčně umlčen. Případná bodová mutace nebo inserce transpozibilního elementu do regulační oblasti může způsobit změnu v afinitě příslušných tkáňově specifických transkripčních faktorů. Takto se obě kopie stávají nepostradatelnými, protože jsou přepisovány v různých tkáních, tzn. proběhla jejich subfunkcionalizace. To má za následek i selekční tlak vedoucí k zachování sekvenční struktury obou genů.

V jiné práci se vědci zabývají evolucí duplikovaných genů u *Xenopus laevis* (Hughes and Hughes, 1993) a popisují několik paralogních genů, u nichž prokázali tkáňově specifickou expresi (každá z kopií byla transkripčně aktivní v jiné tkáni, např. geny pro c-ets nebo thyreotropin-releasing hormon). Dále také pozorovali diferenční expresi některých paralogů v závislosti na vývojovém stádiu při embryogenezi (geny pro skeletální aktin, kalmodulin nebo c-myc). Na základě porovnání synonymních a nesynonymních nukleotidových substitucí mezi kopiemi 17ti paralogních genů a mezi paralogními kopiemi a příslušným

lidským nebo myším ortologem došli autoři k závěru, že ve všech případech jsou obě kopie pod stejným pozitivním selekčním tlakem.

### **I.1.2.3 Organizace genomu**

#### **I.1.2.3.1 Velikost genomu**

Velikost genomu *X. laevis* se pohybuje kolem  $3,1 \times 10^9$  bp. Jeho replikace je zahájena z  $1,5 \times 10^4$  replikonů o délce zhruba 195 kbp (20-100  $\mu\text{m}$ ). Interval 13 hodin potřebný pro duplikaci DNA odpovídá rychlosti syntézy 500 bp/min. Bylo zjištěno, že genom embryonálních buněk je schopen rychlejší replikace, přičemž jako pravděpodobný důvod se uvádí větší počet replikonů, než jaký se vyskytuje u adultních buněk (Callan, 1973).

#### **I.1.2.3.2 Karyotyp**

Mitotický karyotyp, obsahující 18 chromozómových párů, lze rozdělit do sedmi morfologicky odlišných skupin mediocentrických a akrocentrických chromozómů (Tymowska and Kobel, 1972). Na krátkém rameni chromozómu 12 je patrná sekundární konstriktce, která odpovídá organizátoru jadérka. U pohlavních chromozómů nebyl prokázán heteromorfismus. Ani techniky pruhování chromozómů nezaznamenaly do současnosti větších úspěchů. Existuje již popis barvení konstitutivního heterochromatinu (Schmid *et al.*, 1987), ale jako nejúčinnější se zatím jeví replikační pruhování, využívající inkorporaci bromdeoxiuridinu v S fázi buněčného cyklu (Schmid and Steinlein, 1991). Pomocí této techniky se podařilo rozlišit všech 18 párů chromozómů. Detailní analýza odhalila, že na základě délky, pozice centroméry a rozmístění replikačních pruhů lze chromozómy takto rozdělit do skupin po čtyřech (kvartety).

Jak již bylo zmíněno, meiotické buňky tvoří 18 bivalentů. Jejich identifikaci umožnilo studium štětkovitých chromozómů (Muller, 1974; Callan *et al.*, 1987). Pouze štětkovité chromozómy totiž v minulosti umožňovaly lokalizovat převážně repetitivní sekvence (Pardue *et al.*, 1973; Jamrich *et al.*, 1983; Fostel *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1984; Kay *et al.*, 1984). Nevýhodou jejich použití je dosud neznámá homologie mezi nimi a mitotickými chromozómy.

### **I.1.2.3.3 Repetitivní sekvence**

Genom *X. laevis* obsahuje kolem 20 až 30% repetitivních sekvencí (Davidson *et al.*, 1973). Vedle funkčně známých repetit, jakými jsou geny pro rRNA (Pardue *et al.*, 1973), byla již identifikována i řada dalších, například tandemové repetice (Spohr *et al.*, 1981; Lam and Carroll, 1983a; Lam and Carroll, 1983b; Carroll *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1984; Shain *et al.*, 1996), vmezežené repetice (Kay and Dawid, 1983; Schubiger *et al.*, 1985; Morgan and Middleton, 1990; Greene *et al.*, 1993; Unsal and Morgan, 1995), či transpozibilní elementy Tx1 (Garrett and Carroll, 1986) a Tx2 (Garrett *et al.*, 1989).

Mezi nejrozšířenější repetitivní elementy patří krátká tandemová a invertovaná repetice Xstir (*Xenopus* short tandemly and invertedly repeating element), která se skládá z opakování přibližně 86 bp jednotky (Hikosaka *et al.*, 2000). Její výskyt je odhadován na 1 milion kopií na haploidní genom. Vyskytuje se jak ve formě tandemových, tak invertovaných repetit s různým počtem opakování (průměrně 8 - 10). Za povšimnutí stojí, že elementy Xstir se vyskytují pouze u *X. laevis* a jemu příbuzných druhů. Komparativní analýza odhalila, že téměř shodné tandemové repetice jsou přítomny jako součást rag2 genu (recombination activating gene 2). Naopak invertované bloky vykazují podobnost s částmi sekvencí genů pro U7 snRNA, U1 snRNA a ribozomální protein S6 (Hikosaka *et al.*, 2000).

Další skupinu tvoří transkribované repetitivní sekvence, jako např. Xsirts (*Xenopus laevis* short interspersed repeat transcripts), jejichž společným znakem je přítomnost repetitivní sekvence, která po přepisu do RNA umožňuje lokalizaci do vegetálního kortexu (Zearfoss *et al.*, 2003). Sekvenční analýza odhalila, že některé z nich obsahují otevřený čtecí rámec, a kódují tudíž určité proteiny. Přítomnost repetitivních elementů Xsirts slouží ke kotvení některých vývojově důležitých mRNA, např. Vg1, Xwnt11 nebo Bicaudal-C, a to právě ve zmiňovaném vegetálním kortexu (Heasman *et al.*, 2001). Podobné sekvence byly nalezeny i u *Xenopus tropicalis* (Kloc *et al.*, 1993). Zda se podobné sekvence vyskytují i u vyšších organismů, je prozatím nejasné. Zdá se, že podobně jako v případě Xstir, je i výskyt Xsirts omezen na rod *Xenopus*.

#### **I.1.2.4 Determinace pohlaví**

Určení pohlaví u *Xenopus laevis* odpovídá typu Abraxas (samčí ZZ, samičí WZ). Tento fakt je podložen křížením samců po zvratu pohlaví s normálními samci, jehož výsledkem je čistě samičí pokolení (Chang and Witschi, 1955; Chang and Witschi, 1956; Gallien, 1956). Navíc křížením samců se zvráceným pohlavím se samicemi po zvratu pohlaví také vzniká výhradně samičí pokolení (Mikamo and Witschi, 1964). Analýza štětkovitých a mitotických chromozómů identifikaci pohlavních chromozómů bohužel nepřinesla. I přes důkladnou morfologickou analýzu se heterochromozómy *X. laevis* zatím nepodařilo identifikovat (Schmid and Steinlein, 1991).

#### **I.1.3 *Xenopus tropicalis***

V současnosti se stále více dostává do popředí příbuzný druh *Xenopus (Silurana) tropicalis*. Mezi obojživelníky (přes 4 500 druhů) nabízí *X. tropicalis* jeden z nejmenších genomů;  $1,7 \times 10^9$  bp (Thiebaud and Fischberg, 1977), a zároveň se jedná o jediný diploidní druh ( $2n = 20$ ). Mezi jeho další výhody patří

kratší generační doba, která oproti 1-2 rokům u *X. laevis* činí pouze 4-5 měsíců. Skutečnost, že oba druhy jsou evolučně příbuzné, umožňuje ve většině případů využít data nashromážděná při výzkumu *X. laevis* i u *X. tropicalis*.

Mitotický karyotyp *X. tropicalis* se skládá z 10ti chromozómových párů. Na základě velikosti a polohy centroméry lze chromozómy rozdělit do šesti morfologicky odlišných skupin submetacentrických a akrocentrických chromozómů, přičemž na dvou odlišných párech (č. 5 a 6) je patrná sekundární konstrikce (Tymowska, 1973).

Díky tomu, že je *X. tropicalis* diploidní, jsou genetická zkoumání výrazně jednodušší, a *X. tropicalis* tak bude moci v budoucnu vývojové biologii sloužit jako jeden z nejužitečnějších modelů (Beck and Slack, 2001; Hirsch *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2002).

## **I.2 Současné přístupy k řízení embryonálního vývoje**

Zásadní krok ve výzkumu rodu *Xenopus* byl učiněn v polovině 80. let 20. století. Vědci tehdy přišli s metodou velkoformátového expresního screeningu oocytů žab rodu *Xenopus*, která umožňuje *in vitro* produkci velkého množství syntetické mRNA pomocí promotorů bakteriofága. Po injikování do oocytů se tato syntetická mRNA účinně translatovala (Krieg and Melton, 1984; Melton *et al.*, 1984). Oocyty žab rodu *Xenopus* využily při velkoformátovém funkčním screeningu poprvé skupiny zabývající se identifikací receptorů neuropeptidů a neurotransmiterů (Masu *et al.*, 1987; Julius *et al.*, 1988). Další metoda screeningu oocytů byla použita při identifikaci sekretovaných molekul, jež spouštějí mezodermální nebo neurální činnosti (Lustig and Kirschner, 1995).

## I.2.1 Hledání genů podle nové funkce

V 90. letech 20. století byla zavedena metoda podobná klonování receptorů neuropeptidů, jejímž cílem bylo identifikovat geny, které by v časném embryu žaby dokázaly napodobit indukci dorzoventrální polarity. Zjistilo se, že gen *Xwnt8* je významným faktorem dorzoventrální symetrie (Smith and Harland, 1991) stejně jako nově objevený gen *noggin*, u něž se později prokázalo, že dokáže kódovat účinné extracelulární antagonisty proteinu BMP4 (bone morphogenetic protein 4) (Smith and Harland, 1992; Zimmerman *et al.*, 1996). Od dob prvních průkopnických prací Smithe a Harlanda byla u rodu *Xenopus* pomocí velkoformátového hledání genů podle nové funkce, tzv. screeningů expresních klonů, identifikována celá řada důležitých molekul. Zajímavé je, že většina z nich patří mezi signalizační molekuly, antagonisty signalizačních molekul či transkripční faktory řízené signalizačními molekulami (Amaya, 2005).

## I.2.2 Hledání genů podle ztráty funkce

I přestože se při identifikaci genů rodu *Xenopus* zapojených do buněčných a vývojových procesů po mnoho let s úspěchem využívalo hledání genů podle nové funkce, hledání genů podle ztráty funkce založené na overexpresi dominantně negativních variant genů (Amaya *et al.*, 1991) a na genetických metodách se v tomto systému běžně neuvádí. Jedním z důvodů je, že nejčastěji používaný druh *X. laevis* je alotetraploid. V posledních letech se však k výzkumu začal využívat i jeho diploidní příbuzný *X. tropicalis*, který je na genomický výzkum i experimenty s hledáním genů podle ztráty funkce mnohem příhodnější (Amaya *et al.*, 1998). A konečně, zavedení antisense morfolino oligonukleotidů (aMO) otevřelo nové možnosti studia žab rodu *Xenopus* pomocí hledání genů podle ztráty funkce (Heasman *et al.*, 2000; Heasman, 2002).

Použití aMO má však vážné nedostatky. Konstrukt se do malého embrya jen obtížně vpravuje a krátký poločas rozpadu mRNA neumožňuje jeho využití v pozdějších vývojových stádiích. Genový produkt může navíc napodobovat činnost svých ortologů. Tyto problémy lze obejít použitím transgenní technologie vyvinuté speciálně pro *Xenopus laevis* (Kroll and Amaya, 1996; Amaya and Kroll, 1999), díky níž lze v pozdějších vývojových stádiích vytvářet konkrétní tkáňové konstrukty. Nicméně odchylky v úrovni exprese a vývojové abnormality však mohou analýzu primárních produktů transgeneze jistým způsobem zkomplikovat. K využití u *X. tropicalis* byla upravena technika transgeneze známá jako REMI (restriction enzyme mediated insertion) (Offield *et al.*, 2000). Hlavní výhodou transgeneze u žab rodu *Xenopus* je, že použití GFP (green fluorescent protein) ve funkci reportérového genu umožňuje pozorovat expresi transgenu v živých embryích - k dispozici tak máme snadnou a rychlou analýzu reportérového genu (Hyde and Old, 2000; Lerchner *et al.*, 2000; Ryffel and Lingott, 2000; Rodriguez *et al.*, 2001).

### **I.2.3 Sekvenování genomu**

Paralelně s vývojem systému *X. tropicalis* se National Institutes of Health v USA (NIH - <http://www.nih.gov/science/models/xenopus/>) intenzivně zabývá i vývojem genetických a genomických informačních zdrojů. Od roku 2003 bylo již zveřejněno, převážně v podobě EST (náhodně exprimované sekvence), přes 320 000 sekvencí *X. laevis* a více než 1 000 000 sekvencí *X. tropicalis* z různých tkání a vývojových stádií. Při takovém množství nových informací o sekvencích, poskočil *X. tropicalis* na páté místo v seznamu organismů s největším množstvím určených EST sekvencí, hned za člověka, myš, rýži a danio pruhované ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)). Informace týkající se *Xenopus* EST sekvencí jsou k dispozici na internetových stránkách GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>), případně na stránkách databáze XEST



([http://www.dkfz-heidelberg.de/tbi\\_old/services/axelddb\\_images/nicolas/xest.html](http://www.dkfz-heidelberg.de/tbi_old/services/axelddb_images/nicolas/xest.html)).

V téže době se také pomocí smíšené metody sekvenoval genom *X. tropicalis* v laboratořích Joint Genome Institutes of the Department of Energy (DOE JGI - <http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>). Nedávno se podařilo dokončit sekvenaci genomu *X. tropicalis* s osminásobným přesahem (Amaya, 2005). Sekvence jsou uspořádány do scaffoldů a jejich velikost se pohybuje od 0,5 do 8 milionů párů bází. Soubor projektů NIH však nezahrnuje sjednocení výsledků z oblasti genetiky, cytogenetiky a sekvenčních map.

## **I.2.4 Mapování genomu**

### **I.2.4.1 Mapování chromozómů pomocí hyperdiploidních hybridů**

Chromozómové mapování pomocí hyperdiploidních hybridů, analogické s technikou buněčných hybridů u savců, využívá možnosti připravit žábu, která ve svých buněčných jádrech obsahuje své dvě chromozómové sady a zároveň i jeden či více chromozómů pocházejících z jiného živočišného druhu (např. myš) (Kobel and Du Pasquier, 1979). U *X. laevis* lze alotriploidní individua připravit poměrně snadno, buď zpětným křížením samic interspecifických hybridů nebo inhibicí vyloučení druhého pólového tělíska u oocytů oplozených spermii jiného druhu (Muller *et al.*, 1978). Takto vzniklé alotriploidní samice jsou životaschopné a lze je dochovat do dospělosti. Jejich gamety, vzniklé meiotickým dělením, jsou většinou aneuploidní. Jako příklad lze uvést alotriploidní samice *X. laevis*, které mají své dvě sady chromozómů plus jednu sadu pocházející z jiného druhu (*X. gilli*). V průběhu gametogeneze dochází ke vzniku aneuploidních oocytů obsahujících jednu sadu chromozómů *X. laevis* (18) a náhodnou kolekci chromozómů z *X. gilli*. Po oplození spermii *X. laevis* lze získat hyperdiploidní potomstvo nesoucí ve svých jádrech diploidní počet *X.*

*laevis* chromozómů (36) a navíc některý z chromozómů pocházející z *X. gilli* (Kobel and Du Pasquier, 1979). Zhruba 1 až 3% takto vzniklých potomků dosáhne dospělosti. Výše popsáný postup byl v minulosti použit při mapování imunologických markerů u *X. gilli* (Du Pasquier and Kobel, 1979). Na druhou stranu malý počet chromozómových markerů, jako např. RFLP (polymorfismus v délce restrikčních fragmentů) nebo AFLP (polymorfismus v délce amplifikovaných fragmentů) doposud neumožnil lokalizaci nalezených lokusů do vazebných skupin.

#### **I.2.4.2 Cytologické lokalizace pomocí *in situ* hybridizace**

Štětkovité chromozómy byly v minulosti hlavním objektem lokalizace. Vizualizovaly se na nich některé repetitivní sekvence nebo genové skupiny (Pardue *et al.*, 1973; Jamrich *et al.*, 1983; Fostel *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1984; Kay *et al.*, 1984). Dodnes však neexistuje jejich klasifikace, která by dovolila jejich přiřazení k mitotickým chromozómům. Jako první se do metafázních chromozómů podařilo lokalizovat repetitivní lokus hlavního histokompatibilního komplexu (Courtet *et al.*, 2001). O dva roky později byla provedena první vizualizace single-copy genu *c-src1* (Krylov *et al.*, 2003). V obou pracích se osvědčilo použití cDNA sondy, která při následném amplifikačním kroku (tyramidová amplifikace signálu) zajišťuje nižší výskyt nespecifického signálu. Zajímavostí je, že se zároveň jedná o první genovou lokalizaci u řádu *Anura*.

#### **I.2.4.3 Gen - centromerové mapování**

U obojživelníků, včetně *Xenopus laevis*, lze diploidní gynogenetické potomstvo získat poměrně snadno. U oocytu aktivovaného spermii, které byly nejdříve ošetřeny UV zářením, se vysokým hydrostatickým tlakem zabrání vyloučení druhé pólkové buňky. Ozářené spermie jsou schopny oocyt aktivovat,

ale vzhledem k rozsáhlému poškození DNA se na vývoji budoucího zárodku nemohou podílet (Tompkins, 1978). Zárodek tedy obsahuje pouze diploidní genetickou informaci matky. Analýza gynogenetických potomků zaměřená na heterozygotní znaky pocházející od matky poskytuje na základě rekombinační četnosti informace o mapové vzdálenosti mezi odpovídajícími lokusy a centroméry (hemitetrátová analýza). Tímto způsobem již bylo zmapováno kolem 30 lokusů, které se podílejí na určení nebo regulaci pohlaví (Colombelli *et al.*, 1984). Předmětem dalších výzkumů je také gen-centromerové mapování genů podílejících se na některých vývojových defektech (Thiebaud *et al.*, 1984; Reinschmidt *et al.*, 1985).

#### **I.2.4.4 Vazebné mapování**

U *X. laevis* vazebné mapování značně ztěžuje jeho dlouhá růstová fáze a nedostatek dobře charakterizovaných genetických markerů. Na základě elektroforetické analýzy izoenzymů u potomstva vznikla provizorní vazebná mapa obsahující 35 genů v deseti skupinách (Graf, 1989a; Graf and Kobel, 1991). Nevýhodou tohoto klasického postupu je dlouhé období vývoje živočichů do doby, než dorostou do velikosti, kdy lze k rozboru použít vzorky jejich tkání. Další a ještě větší překážku představuje malé rozlišení při elektroforetické analýze spolu s histochemickou detekcí izoenzymů, a to zejména v případech multimerních genových produktů.

U *X. tropicalis* byla zkonstruována vazebná mapa pomocí metody AFLP (polymorfismus v délce amplifikovaných fragmentů), která se stává stále populárnější. Technika AFLP pracuje na principu selektivní PCR (polymerázová řetězová reakce) amplifikace restričních fragmentů (Vos *et al.*, 1995), a umožňuje tak detekci polymorfních markerů bez předchozí znalosti DNA sekvence. Dále byly také zveřejněny dvě mapy vytvořené na základě analýzy společné segregace AFLP markerů meziliniového hybridu *X. tropicalis*. Na mapě

mateřské linie je 13ti vícebodovým vazebným skupinám přiřazeno celkem 53 markerů, z toho 51 AFLP markerů a 2 izoenzymové markery. Na oddělené mapě bylo třem vazebným skupinám přiřazeno 9 AFLP markerů z otcovské linie (Kochan *et al.*, 2003). Technika AFLP byla také využita při genetickém mapování různých rostlin a živočichů, např. rýže (Mackill *et al.*, 1996), bource morušového (Tan *et al.*, 2001), dania pruhovaného (Ransom and Zon, 1999) nebo kuřete (Herbergs *et al.*, 1999).

Zásadním požadavkem při studiu genetiky *Xenopus tropicalis* je vytvoření genomických informačních zdrojů, které by napomáhaly mapovat a klonovat geny identifikované pomocí mutací. Mezi současné projekty, kterými se zabývá University of Houston a Baylor College of Medicine v USA, patří i snaha o vytvoření genetické mapy *X. tropicalis* sestavené na základě identifikace polymorfních markerů. Podle projektu budou při pozičním klonování mapovány geny identifikované pomocí mutantního fenotypu s následným vyhledáváním společné segregace polymorfních markerů se specifickými mutacemi. V rámci tohoto modelového systému tak projekt vytváří základy pro integraci genetické, molekulární a mutační analýzy a zajišťuje, aby byl genetický výzkum *X. tropicalis* použitelný i ke studiu molekulárních mechanismů, jež tvoří základ vývoje obratlovců. První část genetické mapy *X. tropicalis* byla zveřejněna na internetu v červnu 2006 (<http://tropmap.biology.uh.edu>).

Je s podivem, že plány na širší využití modelu *Xenopus* zcela přehlíží nutnost cytogenetiky. Geny se známou sekvencí, genetickým markerem a pozicí na chromozómu mohou všechny používané metody vhodně sjednotit do jednoho celku.

## II. CÍLE PRÁCE

Provizorní genetická mapa *Xenopus laevis* popisuje 10 vazebných skupin a prokazuje vazbu mezi pohlavím a glycerol-3-fosfát dehydrogenázou I (GPD1), mitochondriální malic enzymem 2 (ME2) a superoxid dismutázou I (SOD1) (Graf, 1989a). U ME2 byla popsána silná vazba na pohlaví s 6% rekombinantů (Graf, 1989b). Z tohoto důvodu byl ME2 vybrán jako kompetentní marker pro identifikaci heterochromozómů *X. laevis*.

Strategie výzkumu identifikace heterochromozómů byla jednoduchá – lokalizace genu jednoho z enzymů vázaných na pohlaví pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Aminokyselinové sekvence zmiňovaných enzymů nebyly v té době známe, což znamenalo izolaci enzymů, stanovení aminokyselinové sekvence, amplifikaci cDNA za použití RT-PCR (reverzní transkripce-PCR), její klonování a sekvenování. Poslední fáze by byla zaměřena na lokalizaci genu a identifikaci heterochromozómů pomocí *in situ* hybridizace.

Jak již bylo zmíněno, *Xenopus laevis* je významný organismus vhodný k objasnění vývojových procesů a ke studiu buněčné biologie. Zdokonalení genetických a cytogenetických metod usnadní genomický přístup při využití žab rodu *Xenopus* jako modelu ve vývojové biologii.

### **Cíle předkládané práce byly následující:**

1. Zjistit strukturu a polymorfismus genů u vybraných pohlavně vázaných enzymů *Xenopus laevis*.

2. Vyvinout techniku fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňující chromozómové lokalizace single-copy genů *X. laevis*, případně *X. tropicalis*.
3. Identifikovat heterochromozómy *Xenopus laevis*.

Pokusy o purifikaci enzymu ME2 z mitochondrií *X. laevis* byly díky jeho extrémně hydrofóbním vlastnostem zcela neúspěšné. Naštěstí bylo v roce 2001 publikováno zhruba 60 000 náhodně exprimovaných sekvencí (EST) *X. laevis*, z nichž dvě byly využity k nalezení primerů a sekvenování ME2 genu pomocí molekulárně biologických technik. Současně probíhal vývoj techniky zjišťování chromozómové lokalizace single-copy genů na *c-src1* genu, který se v laboratoři studoval již delší dobu. Bohužel, genetická analýza ukázala, že ani jeden z obou paralogních genů ME2 není vázán na pohlaví. V publikaci o vazbě ME2 na pohlaví (Graf, 1989b) mohlo dojít k záměně mezi ME2 a mitochondriální malát dehydrogenázou 2 (Mdh2), která dává za stejných podmínek intenzivnější histochemickou reakci. Proto byl jako další kandidát vybrán gen pro mitochondriální malát dehydrogenázu 2 (Mdh2). Jak přístup, tak konečné směřování projektu bylo nutno rozsáhle modifikovat.

### III. VÝSLEDKY A DISKUSE

#### III.1 Xstir polymorfismus a absence vazby na pohlaví ME2 genu u *Xenopus laevis*

**Xstir polymorphism and absence of sex linkage in *Xenopus laevis* ME2 gene.**

Macha J., Tlapakova T., Krylov V., Kopsky V.

Folia Biol. (Praha) (2003), 49: 115-117.

Vazebné mapování je u *Xenopus laevis* dosud omezeno na provizorní mapu založenou na elektroforetické analýze izoenzymů (Graf, 1989a). Touto metodou byla prokázána vazba mezi pohlavím a glycerol-3-fosfát dehydrogenázou I (GPD1), mitochondriální malic enzymem 2 (ME2) a superoxid dismutázou I (SOD1). Díky vyvinuté technice lokalizace bylo naším původním záměrem detekovat po předchozí vazebné analýze ME2 gen na chromozómech *Xenopus laevis*. Výsledkem by byla detekce pohlavních chromozómů, které zatím nejsou u tohoto modelového organismu známy.

ME2 katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát. Mimo něj existují ještě dvě odlišné formy, a to ME1 (cytoplasmatická) a ME3 (další mitochondriální forma) kódované různými geny. ME2 a ME3 se značně liší z pohledu struktury a izoelektrického bodu. ME3 je bazický enzym s izoelektrickým bodem kolem 9,0. Tato vlastnost předem vylučuje jeho vazbu na pohlaví, protože zmíněná elektroforetická analýza byla provedena při pH = 6,0, kdy se ME3 pohybuje směrem ke katodě (Graf, 1989b).

Na základě dostupných EST sekvencí byla metodou RT-PCR získána sekvence ME2 genu (GenBank: AY225508). Porovnání aminokyselinové sekvence se sekvencí lidského ME2 enzymu ukázalo 80% shodu. PCR analýza ME2 intronových oblastí odhalila délkový polymorfismus mezi samicí a samcem

u jednoho z předem vybraných párů *X. laevis*. Na základě elektroforetické mobility byly jednotlivé proužky označeny A (670 bp), B (940 bp) a C (1100 bp). DNA ze samce obsahovala proužky B + C, samičí vzorek A + C. Sekvence fragmentu A odhalila přítomnost tandemové Xstir repetice (Hikosaka *et al.*, 2000) se třemi jednotkami o délce 86 bp. Analýza provedená restriční endonukleázou *ScaI*, jejíž rozpoznávací místo se nachází mezi jednotkami, ukázala uniformní obraz jak u rodičů, tak u F1 generace. Kromě fragmentů, které pocházely z okolní sekvence, byl na elektroforetickém gelu patrný i proužek o velikosti 86 bp. Vzhledem k původním délkám všech tří fragmentů (A, B a C) byl zjištěn počet opakování v každém z nich 3x (A), 6x (B) a 8x (C).

Potomci F1 generace (42 samců a 26 samic) vykazovali distribuci fragmentů AB:AC:BC:C v poměru 19:12:14:23. Následná statistická analýza potvrdila shodu se štěpným poměrem 1:1:1:1 s tím, že zastoupení samic a samců v každé z kategorií bylo zhruba stejné. V případě těsné vazby na pohlaví je povolen výskyt pouze dvou alel v každém pohlaví, což neodpovídalo našemu pozorování. Uvedené výsledky jasně ukazují na nezávislou segregaci, a jsou tudíž v rozporu s pozorováním autora již zmiňované publikace (Graf, 1989b). Jako možné vysvětlení přichází v úvahu fakt, že byl detekován ještě jiný ME2 (paralogní) gen, anebo že došlo k záměně s mitochondriální malát dehydrogenázou 2 (Mdh2), která stejně jako ME2 reaguje s NADP a NAD a tudíž ji tímto způsobem nelze histochemicky odlišit.

Výsledky této práce představují dosud nepopsaný délkový polymorfismus Xstir. Vzhledem k tomu, že v genomu *X. laevis* je rovnoměrně rozmístěno milión kopií tohoto elementu (Hikosaka *et al.*, 2000), existuje zde reálná možnost jeho využití jako markeru pro segregční analýzy a při konstrukci vazebných map.



### III.2 Lokalizace *c-src1* na chromozómech *Xenopus laevis* pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace

**The *c-src1* gene visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes.**

Krylov V., Macha J., **Tlapakova T.**, Takac M., Jonak J.

Cytogenet. Genome Res. 2003, 103: 169-172.

Proto-onkogen *c-src* je jedním z členů rodiny receptorových tyrozinových proteinkináz, které se převážně uplatňují v regulaci růstu buněk a jejich diferenciaci (Cooper and Howell, 1993; Courtneidge *et al.*, 1993). Haploidní genom *Xenopus laevis* obsahuje dva paralogní geny *c-src1* a *c-src2*, jejichž cDNA sekvence byly získány z RNA oocytů pomocí reverzní transkripce (Steele, 1985; Steele *et al.*, 1989).

Karyotyp *Xenopus laevis* se skládá z 18ti párů chromozómů, které lze na základě jejich morfologie rozdělit do sedmi skupin mediocentrických a akrocentrických chromozómů (Tymowska and Kobel, 1972). Z testovaných technik pruhování chromozómů se jako nejúčinnější ukázala inkorporace BrdU/dT (Schmid and Steinlein, 1991). Její nevýhodou je nekompatibilita s hybridizačními technikami (FISH). Lokalizace, převážně repetitivních sekvencí, byly již dříve provedeny na štetkovitých chromozómech (Graf and Kobel, 1991), které ovšem svou morfologií neodpovídají mitotickým chromozómům. Poprvé byla popsána úspěšná vizualizace repetitivního lokusu MHC a Ig genů na mitotických chromozómech *Xenopus laevis* pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace spojené s tyramidovou amplifikací signálu (FISH-TSA) (Courtet *et al.*, 2001). Na druhou stranu, tato metoda neumožňovala lokalizaci single-copy genů.

Cílem této práce bylo vyvinout metodiku umožňující lokalizace single-copy genů na chromozómech *Xenopus laevis*. Jako klíčová se ukázala příprava

cDNA sondy digoxigeninovým značením pomocí náhodných primerů (dekanukleotidy), kde se velikost označených fragmentů pohybovala kolem 200 bp. Tyto krátké úseky se byly bez větších potíží schopny dostat k cílové komplementární sekvenci. Jako zbytečné se ukázalo ošetření preparátů RNázou, které je všeobecně zahrnuto ve většině *in situ* hybridizačních protokolech. Kvůli morfologii chromozómů byla po předchozím zvýšení permeability preparátu pepsinem provedena postfixace rozložených metafázních mitóz 2% paraformaldehydem. Dostatečně vysoká citlivost metody byla zajištěna tyramidovou amplifikací signálu.

Účinnost námi vyvinuté metody byla jako první testována na lokalizaci MHC1b lokusu, který byl již předtím vizualizován původní technikou (Courtet *et al.*, 2001). Aneuploidní linie XL6 ( $n = 34$ ), použitá při pilotních experimentech, poskytla signál na konci dlouhého ramene nepárového submetacentrického chromozómu. Po zavedení metody přípravy metafázních preparátů ze slezin dospělých jedinců byl MHC1b lokus vizualizován na konci dlouhých ramen dvou homologních akrocentrických chromozómů patřících do kategorie G (Tymowska and Kobel, 1972; Graf and Kobel, 1991). Výsledky získané naší metodou byly tudíž ve shodě s pozorováním autorů již zmíněné publikace (Courtet *et al.*, 2001).

Lokalizace single-copy genu *c-src1* byla pozorována v subcentromerické oblasti dvou homologních akrocentrických chromozómů z téže kategorie. Výsledky experimentu jsou založeny na pozorování více než 100 mitóz. Z morfologického hlediska patří do kategorie G malé akrocentrické chromozómy, které je obtížné současnými barvicími technikami od sebe rozlišit. Odpověď na otázku, zda MHC1b lokus a *c-src1* gen leží na stejných nebo odlišných chromozómech, nám poskytla dvojitá hybridizace sond pro obě oblasti na preparátech připravených ze slezinných buněk. Z provedených lokalizačních

experimentů jasně vyplývá, že MHC1b lokus a *c-src1* gen leží na dvou odlišných chromozómech.

Výsledkem této publikace je účinná technika umožňující vizualizaci single-copy genů *X. laevis* a zároveň se jedná o první lokalizaci single-copy genu u řádu *Anura*.

### **III.3 Lokalizace, struktura a polymorfismus dvou paralogních genů pro mitochondriální malát dehydrogenázu u *Xenopus laevis***

**Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes.**

**Tlapakova T.**, Krylov V., Macha J.

Chromosome Res. 2005, 13: 699-706.

*Xenopus laevis* hraje klíčovou roli při studiu embryonálního vývoje a buněčné biologie. Jako modelový organismus se velkou měrou podílí na zodpovězení otázek, týkajících se buněčné determinace, indukce v embryogenezi, buněčné a tkáňové kompetence a organogeneze. Navíc jeho tetraploidní původ umožňuje studovat evoluční aspekty související s genovou duplikací. Důkaz tetraploidie vychází z porovnání obsahů DNA mezi různými druhy z čeledi *Pipidae* a potvrzuje ji i fakt, že u *X. laevis* je velká část jeho genů zastoupena v duplikované formě (Graf and Kobel, 1991). Na druhou stranu, 18 párů chromozómů tvoří v meióze bivalenty (Tymowska and Fischberg, 1973; Muller, 1974). Z těchto pozorování vyplývá, že *Xenopus laevis* vykazuje všechny vlastnosti evolučně mladého tetraploidního organismu, který je v současné době kompletně diploidizován.

Lokalizační experimenty byly u obojživelníků donedávna omezeny pouze na repetitivní sekvence (satelitová DNA) (Picariello *et al.*, 2002; Odierna *et al.*, 2004), oblast rDNA (Owens, Jr. and Wiley, 2001; Wiley, 2003) a MHC1 lokusy (Courtet *et al.*, 2001). Modifikovaná metoda fluorescenční *in situ* hybridizace spojená s tyramidovou amplifikací signálu (FISH-TSA) umožnila vizualizaci single-copy genu *c-src1* (Krylov *et al.*, 2003).

Cílem této práce bylo lokalizovat dva paralogní geny pro mitochondriální malát dehydrogenázu 2 (Mdh2a, Mdh2b) pomocí námi vyvinuté metody

lokalizace single-copy genů. Intronový polymorfismus nalezený v obou studovaných genech poskytuje jednu z možností jak konstruovat genetické nebo fyzikální mapy u *Xenopus laevis*.

Při přípravě cDNA obou genů jsme vycházeli z dostupných EST sekvencí, které vykazovaly vysokou sekvenční shodu s myším Mdh2 genem. 5' a 3' koncově specifické EST obsahovaly nukleotidové záměny umožňující rozlišení obou genů pomocí PCR. Sekvenace jejich cDNA a následné porovnání ukázalo v kódující sekvenci 95% shodu. Nukleotidové pořadí obou cDNA bylo zaneseno do databáze GenBank pod identifikačními čísly AY681346 pro Mdh2a a AY681347 pro Mdh2b. *In silico* analýza aminokyselinových sekvencí detekovala pouhých 7 záměn. Provedená PFAM analýza odhalila konzervované domény typické pro mitochondriální a glykozomální malát dehydrogenázy z nadrodiny NAD-dependentních 2-hydroxykarboxyl dehydrogenáz. Komparativní studie zahrnující rostlinnou, savčí, kvasinkovou a bakteriální (*E. coli*) Mdh2 dehydrogenázu vykazovala 55-60% aminokyselinovou shodu. Vysoká evoluční konzervace aminokyselinových zbytků byla nalezena v oblasti enzymového aktivního centra (Goward and Nicholls, 1994), zvláště pak u argininu 104, který definuje substrátovou specifitu. Program TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) lokalizoval na základě signální 17 aminokyselinové N-koncové sekvence oba proteiny do mitochondrií.

Exon-intronová struktura a intronový polymorfismus Mdh2 genů byl studován pomocí PCR amplifikace genomových sekvencí pocházejících z několika jedinců. Exonová segmentace je u obou Mdh2 genů *X. laevis* totožná s myším ortologem. Po sekvenování byla mezi introny zjištěna nižší sekvenční podobnost (71%, 9% mezer) než mezi exony. PCR analýza odhalila přítomnost dvou variant intronu 6 v Mdh2b genu. Delší sekvence obsahovala 482 bp dlouhý inzert, který odpovídá nekompletnímu non-LTR retrotranspozónu L1X1. U paralogního genu (Mdh2a) tento délkový polymorfismus nebyl objeven. Na

druhou stranu *Mbo*I restrikce PCR amplifikátu o velikosti 5,2 kbp, který obsahoval intron 1, odhalila přítomnost dvou alel u *Mdh2a* genu.

Oba nalezené polymorfismy vykazovaly štěpení podle Mendelových zákonů. U jedinců F1 generace, pocházejících z heterozygotních rodičů byl nalezen štěpný poměr 24:53:16, který na základě statistického vyhodnocení odpovídá poměru 1:2:1 ( $\chi^2_{0,05} > 3,2553$ ). Výsledkem křížení heterozygotní samice s homozygotním samcem bylo homozygotní a heterozygotní potomstvo v poměru 44:43 (1:1).

Oba studované geny byly lokalizovány do subcentromerických oblastí dlouhých ramen chromozómů 3 (*Mdh2a*) a 8 (*Mdh2b*). Vzhledem k vysoké sekvenční shodě obou cDNA byla specifita hybridizace 85 - 86%. Zbýlých 14 - 15% mitóz vykazovalo lokalizaci příslušného paralogního genu. Identifikace chromozómů byla provedena na základě velikosti chromozómů a poměru délky p a q ramen (Tymowska and Kobel, 1972). Umístění obou genů na chromozómy 3 a 8 také podporuje podobné schéma jejich pruhů po replikačním pruhování. Při rekonstrukci tetraploidního karyotypu tvoří oba chromozómové páry kvartet (Schmid and Steinlein, 1991).

Tetraploidní původ *Xenopus laevis* umožňuje provádět evoluční studie z pohledu genové duplikace. Byla provedena analýza četnosti nukleotidových substitucí mezi duplikovanými paralogy 17ti genů u *X. laevis* a mezi každým z genů a lidským nebo myším ortologem (Hughes and Hughes, 1993). Výsledky této studie ukazují na podobnou mutační rychlost mezi paralogními kopiemi všech 17ti genů a to jak z pohledu synonymních, tak nesynonymních nukleotidových záměn. Podobných výsledků jsme dosáhli analýzou *Mdh2* genů, kdy byly po zjištění nukleotidové sekvence ortologu u *Xenopus tropicalis* porovnány nukleotidové substituce. Získané výsledky podporují duplikační-degenerativní-komplementační (DDC) hypotézu, kde se na základě degenerativní

mutace v regulační oblasti jedné z kopií následně oba paralogy stávají nepostradatelnými díky své subfunkcionalizaci (Force *et al.*, 1999).

Závěrem lze říci, že námi vyvinutá metoda lokalizace pomocí FISH-TSA umožňuje nejen vizualizovat single-copy geny, ale také účinně rozlišit sekvenčně velmi podobné paralogní geny, což do budoucna otevírá cestu nejen pro mapování genů *Xenopus laevis*, ale i jiných tetraploidních organismů. Nalezený intronový polymorfismus lze využít k identifikaci markerů sloužících při konstruování genetických a fyzikálních map. Stejný přístup lze použít i u *X. tropicalis*, který se stává stále aktuálnějším modelovým organismem.

### III.4 Struktura a lokalizace Mdh2 single-copy genu do chromozómů *Xenopus tropicalis* pomocí FISH-TSA techniky

**Structure and localization of Mdh2 single-copy gene on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA technique.**

Krylov V., Tlapakova T., Macha J.

Cytogenet. Genome Res., v tisku.

Tato práce se zabývá klonováním a chromozómovou lokalizací Mdh2 genu u *Xenopus tropicalis*. Je to poprvé, kdy byl na chromozómech *X. tropicalis* vizualizován single-copy gen.

Při přípravě cDNA Mdh2 genu jsme vycházeli z dostupných EST sekvencí, které vykazovaly vysokou sekvenční shodu s Mdh2 paralogy *X. laevis*. Kódující sekvence byla klonována, sekvenována a poslána do databáze GenBank (AY842260). Po srovnání aminokyselinové sekvence Mdh2 *X. tropicalis* s paralogními proteiny *X. laevis* byla zjištěna 95% shoda a 97% podobnost bez mezer v sekvencích. Mitoprot program (Claros and Vincens, 1996) předpověděl, že protein je do mitochondrií exportován s pravděpodobností signální sekvence 0,9918.

Gen Mdh2 byl lokalizován pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace spojené s tyramidovou amplifikací signálu (FISH-TSA). Ve srovnání s lokalizacemi u *X. laevis* byla zavedena drobná úprava v postupu znamenající zjednodušení hybridizační směsi. Lze tedy říci, že metoda lokalizace pomocí FISH-TSA, která byla původně vyvinuta pro *X. laevis*, vyhovuje i pro *X. tropicalis*. Mdh2 gen byl lokalizován do subcentromerické oblasti dlouhých ramen homologního páru chromozómu 3. Identifikace chromozómů byla provedena na základě velikosti chromozómů a poměru délky p a q ramen



(Tymowska, 1973). Morfologie chromozómu 3 *X. tropicalis* a chromozómu 3 *X. laevis* jsou si velmi podobné, stejně jako polohy Mdh2 genů v chromozómech.

*Xenopus tropicalis* je v současné době zaváděn do výzkumu v oblasti funkční genomiky, protože jeho diploidní genom je na rozdíl od alotetraploidního genomu *X. laevis* vhodný k sekvenování. Kromě toho, údaje týkající se chromozómové pozice různých genů *X. laevis* a *X. tropicalis* mohou být využity v evolučních studiích, které se zabývají syntenními skupinami genů s ohledem na duplikaci genomu u obojživelníků, a přispět tak k výzkumu genových rodin formujících se u vyšších obratlovců.

## IV. ZÁVĚRY

1. Byl sekvenován ME2 gen *X. laevis* a zároveň byl u něj objeven dosud nepopsaný intronový polymorfismus Xstir elementů v počtu opakování repetece vykazující standardní Mendelovskou dědičnost. Nalezené polymorfismy je možné využít při konstrukci genetických nebo fyzikálních map u *X. laevis*.
2. Na základě modifikované metody fluorescenční *in situ* hybridizace spojené s tyramidovou amplifikací signálu (FISH-TSA) byla vyvinuta účinná metoda lokalizace single-copy genů *Xenopus laevis*.
3. Vůbec poprvé u obojživelníků byl do subcentromerické oblasti dvou homologních akrocentrických chromozómů *X. laevis* patřících do skupiny G vizualizován single-copy gen, *c-src1*.
4. Byla určena sekvence paralogních genů Mdh2a a Mdh2b *Xenopus laevis* včetně jejich exon-intronové struktury.
5. Pomocí FISH-TSA metody, která je schopna rozlišit geny s 95% podobností, byla úspěšně provedena první lokalizace dvou paralogních *X. laevis* Mdh2 genů do subcentromerické oblasti dlouhých ramen chromozómů 3 (Mdh2a) a 8 (Mdh2b). U obou genů byl zjištěn intronový polymorfismus poskytující při křížení štěpné poměry v souladu s Mendelovými zákony.
6. Vazba na pohlaví nebyla potvrzena ani u Mdh2 paralogů, ani u ME2 genu *X. laevis*. Některé údaje z již publikované vazebné mapy (Graf, 1989a; Graf, 1989b) byly tudíž vyvráceny.

7. Byl sekvenován a lokalizován Mdh2 gen *Xenopus tropicalis*. Metoda FISH-TSA, původně navržená pro *X. laevis*, odhalila tento gen v subcentromerické oblasti dlouhých ramen chromozómů 3, tzn. ve stejné oblasti jako u velmi podobného chromozómu *X. laevis*.
  
8. Geny se známou strukturou, chromozómovou pozicí a snadno zjistitelnými alelami se hodí k uspořádání contigů a propojení nukleotidových sekvencí s vazebnou analýzou. Vysoký výskyt intronových mutací lze obecně využít při vazebných analýzách. FISH-TSA metoda, používající kratší cDNA sekvence k lokalizaci do chromozómů, usnadňuje analýzu genomu přinejmenším u obratlovců.

## V. LITERATURA

**Amaya, E.** (2005) Xenomics. *Genome Res.* **15**: 1683-1691.

**Amaya, E., Kroll, K.L.** (1999) A method for generating transgenic frog embryos. *Methods Mol.Biol.* **97**: 393-414.

**Amaya, E., Musci, T.J., Kirschner, M.W.** (1991) Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **66**: 257-270.

**Amaya, E., Offield, M.F., Grainger, R.M.** (1998) Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends Genet.* **14**: 253-255.

**Ariizumi, T., Kinoshita, M., Yokota, C., Takano, K., Fukuda, K., Moriyama, N., Malacinski, G.M., Asashima, M.** (2003) Amphibian *in vitro* heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development. *Int.J.Dev.Biol.* **47**: 405-410.

**Bailey, G.S., Poulter, R.T., Stockwell, P.A.** (1978) Gene duplication in tetraploid fish: model for gene silencing at unlinked duplicated loci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**: 5575-5579.

**Beck, C.W., Slack, J.M.** (2001) An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biol.* **2**: REVIEWS1029.

**Callan, H.G.** (1973) Replication of DNA in eukaryotic chromosomes. *Br.Med.Bull.* **29**: 192-195.

**Callan, H.G., Gall, J.G., Berg, C.A.** (1987) The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis*: preparation, identification, and distribution of 5S DNA sequences. *Chromosoma* **95**: 236-250.

**Cannatella, D.C., de Sa, R.O.** (1993) *Xenopus laevis* as a model organism. *Syst.Biol.* **42**: 476-507.

**Cannatella, D.C., Trueb, L.** (1988a) Evolution of pipoid frogs: intergeneric relationships of the aquatic frog family *Pipidae* (*Anura*). *Zool.J.Linn.Soc.* **94**: 1-38.

**Cannatella, D.C., Trueb, L.** (1988b) Evolution of pipoid frogs: morphology and phylogenetic relationships of *Pseudohymenochirus*. *J.Herpetol.* **22** : 439-456.

- Carroll, D., Garrett, J.E., Lam, B.S.** (1984) Isolated clusters of paired tandemly repeated sequences in the *Xenopus laevis* genome. *Mol.Cell Biol.* **4**: 254-259.
- Chang, C.Y., Witschi, E.** (1955) Breeding of sex-reversed males of *Xenopus laevis* Daudin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **89**: 150-152.
- Chang, C.Y., Witschi, E.** (1956) Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **93**: 140-144.
- Claros, M.G., Vincens, P.** (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur.J.Biochem.* **241**: 779-786.
- Colombelli, B., Thiebaud, C.H., Muller, W.P.** (1984) Production of WW superfemales by diploid gynogenesis in *Xenopus laevis*. *Mol.Gen.Genet.* **194**: 57-59.
- Cooper, J.A., Howell, B.** (1993) The when and how of Src regulation. *Cell* **73**: 1051-1054.
- Courtet, M., Flajnik, M., Du Pasquier, L.** (2001) Major histocompatibility complex and immunoglobulin loci visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus* chromosomes. *Dev.Comp.Immunol.* **25**: 149-157.
- Courtneidge, S.A., Fumagalli, S., Koegl, M., Superti-Furga, G., Twamley-Stein, G.M.** (1993) The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Dev.Suppl.* 57-64.
- Davidson, E.H., Hough, B.R., Amenson, C.S., Britten, R.J.** (1973) General interspersion of repetitive with non-repetitive sequence elements in the DNA of *Xenopus*. *J.Mol.Biol.* **77**: 1-23.
- de Sa, R.O., Hillis, D.M.** (1990) Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol.Biol.Evol.* **7**: 365-376.
- Du Pasquier, L., Kobel, H.R.** (1979) Histocompatibility antigens and immunoglobulin genes in the clawed toad: Expression and linkage studies in recombinant and hyperploid *Xenopus* hybrids. *Immunogenetics* **8**: 299-310.
- Du Pasquier, L., Miggiano, V.C., Kobel, H.R., Fischberg, M.** (1977) The genetic control of histocompatibility reactions in natural and laboratory-made polyploid individuals of the clawed toad *Xenopus*. *Immunogenetics* **5**: 129-141.

**Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J.Mol.Biol.* **300**: 1005-1016.

**Ferris, S.D., Whitt, G.S.** (1977) Loss of duplicated gene expression after polyploidisation. *Nature* **265**: 258-260.

**Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., Postlethwait, J.** (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531-1545.

**Fostel, J., Narayanswami, S., Hamkalo, B., Clarkson, S.G., Pardue, M.L.** (1984) Chromosomal location of a major tRNA gene cluster of *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **90**: 254-260.

**Gallien, L.** (1956) Inversion experimentale du sexe chez un Anoure inferieur, *Xenopus laevis* (Daudin). Analyse des consequences genetiques. *Bull.Biol.Fr.Belg.* **90**: 163.

**Garrett, J.E., Carroll, D.** (1986) Tx1: a transposable element from *Xenopus laevis* with some unusual properties. *Mol.Cell Biol.* **6**: 933-941.

**Garrett, J.E., Knutzon, D.S., Carroll, D.** (1989) Composite transposable elements in the *Xenopus laevis* genome. *Mol.Cell Biol.* **9**: 3018-3027.

**Goward, C.R., Nicholls, D.J.** (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* **3**: 1883-1888.

**Graf, J.D.** (1989a) Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established. *Genetics* **123**: 389-398.

**Graf, J.D.** (1989b) Sex linkage of malic enzyme in *Xenopus laevis*. *Experientia* **45**: 194-196.

**Graf, J.D., Kobel, H.R.** (1991) Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol.* **36**: 19-34.

**Greene, J.M., Otani, H., Good, P.J., Dawid, I.B.** (1993) A novel family of retrotransposon-like elements in *Xenopus laevis* with a transcript inducible by two growth factors. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2375-2381.

**Gurdon, J.B.** (1975) Attempts to analyse the biochemical basis of regional differences in animal eggs. *Ciba Found.Symp.* **0**: 223-239.

**Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., Marbaix, G.** (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**: 177-182.

**Hamilton, L.** (1963) An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of *Xenopus laevis*. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **11**: 267-278.

**Heasman, J.** (2002) Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev.Biol.* **243**: 209-214.

**Heasman, J., Kofron, M., Wylie, C.** (2000) Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev.Biol.* **222**: 124-134.

**Heasman, J., Wessely, O., Langland, R., Craig, E.J., Kessler, D.S.** (2001) Vegetal localization of maternal mRNAs is disrupted by VegT depletion. *Dev.Biol.* **240**: 377-386.

**Herbergs, J., Siwek, M., Crooijmans, R.P., Van der Poel, J.J., Groenen, M.A.** (1999) Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). *Anim Genet.* **30**: 274-285.

**Hikosaka, A., Yokouchi, E., Kawahara, A.** (2000) Extensive amplification and transposition of a novel repetitive element, Xstir, together with its terminal inverted repeat in the evolution of *Xenopus*. *J.Mol.Evol.* **51**: 554-564.

**Hirsch, N., Zimmerman, L.B., Grainger, R.M.** (2002) *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev.Dyn.* **225**: 422-433.

**Hughes, M.K., Hughes, A.L.** (1993) Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol.Biol.Evol.* **10**: 1360-1369.

**Hummel, S., Meyerhof, W., Korge, E., Knochel, W.** (1984) Characterization of highly and moderately repetitive 500 bp *EcoRI* fragments from *Xenopus laevis* DNA. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4921-4938.

**Hyde, C.E., Old, R.W.** (2000) Regulation of the early expression of the *Xenopus* nodal-related 1 gene, Xnr1. *Development* **127**: 1221-1229.

**Jamrich, M., Warrior, R., Steele, R., Gall, J.G.** (1983) Transcription of repetitive sequences on *Xenopus* lampbrush chromosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**: 3364-3367.

**Julius, D., MacDermott, A.B., Axel, R., Jessell, T.M.** (1988) Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* **241**: 558-564.

**Kay, B.K., Dawid, I.B.** (1983) The 1723 element: a long, homogeneous, highly repeated DNA unit interspersed in the genome of *Xenopus laevis*. *J.Mol.Biol.* **170**: 583-596.

- Kay, B.K., Jamrich, M., Dawid, I.B.** (1984) Transcription of a long, interspersed, highly repeated DNA element in *Xenopus laevis*. *Dev.Biol.* **105**: 518-525.
- Kimura, M., Ota, T.** (1974) On some principles governing molecular evolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **71**: 2848-2852.
- Klein, S.L., Strausberg, R.L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S.W., Richardson, P.** (2002) Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev.Dyn.* **225**: 384-391.
- Kloc, M., Spohr, G., Etkin, L.D.** (1993) Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science* **262**: 1712-1714.
- Kobel, H.R., Du Pasquier, L.** (1979) Hyperdiploid species hybrids for gene mapping in *Xenopus*. *Nature* **279**: 157-158.
- Kobel, H.R., Du Pasquier, L.** (1986) Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genet.* **2**: 310-315.
- Kochan, K.J., Wright, D.A., Schroeder, L.J., Shen, J., Morizot, D.C.** (2003) Genetic linkage maps of the West African clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Dev.Dyn.* **226**: 99-102.
- Krieg, P.A., Melton, D.A.** (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**: 7057-7070.
- Kroll, K.L., Amaya, E.** (1996) Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**: 3173-3183.
- Krylov, V., Macha, J., Tlapakova, T., Takac, M., Jonak, J.** (2003) The *c-src1* gene visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenet.Genome Res.* **103**: 169-172.
- Lam, B.S., Carroll, D.** (1983a) Tandemly repeated DNA sequences from *Xenopus laevis*. I. Studies on sequence organization and variation in satellite 1 DNA (741 base-pair repeat). *J.Mol.Biol.* **165**: 567-585.
- Lam, B.S., Carroll, D.** (1983b) Tandemly repeated DNA sequences from *Xenopus laevis*. II. Dispersed clusters of a 388 base-pair repeating unit. *J.Mol.Biol.* **165**: 587-597.
- Lerchner, W., Latinkic, B.V., Remacle, J.E., Huylebroeck, D., Smith, J.C.** (2000) Region-specific activation of the *Xenopus* brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. *Development* **127**: 2729-2739.



- Li, W.H.** (1980) Rate of gene silencing at duplicate loci: a theoretical study and interpretation of data from tetraploid fishes. *Genetics* **95**: 237-258.
- Lustig, K.D., Kirschner, M.W.** (1995) Use of an oocyte expression assay to reconstitute inductive signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 6234-6238.
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D., Colowit, P.M.** (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* **39**: 969-977.
- Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M., Nakanishi, S.** (1987) cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* **329**: 836-838.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R.** (1984) Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**: 7035-7056.
- Mikamo, K., Witschi, E.** (1964) Masculinization and breeding of the WW *Xenopus*. *Experientia* **20**: 622-623.
- Morgan, G.T., Middleton, K.M.** (1990) Short interspersed repeats from *Xenopus* that contain multiple octamer motifs are related to known transposable elements. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5781-5786.
- Muller, W.P.** (1974) The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis* (Daudin). *Chromosoma* **47**: 283-296.
- Muller, W.P., Thiebaud, C.H., Ricard, L., Fischberg, M.** (1978) The induction of triploidy by pressure in *Xenopus laevis*. *Rev.Suisse Zool.* **85**: 20-26.
- Nei, M.** (1969) Gene duplication and nucleotide substitution in evolution. *Nature* **221**: 40-42.
- Nei, M., Roychoudhury, A.K.** (1973) Probability of fixation of nonfunctional genes at duplicate loci. *Am.Nat.* **107**: 362-372.
- Odierna, G., Aprea, G., Capriglion, T., Castellano, S., Balletto, E.** (2004) Evidence for chromosome and *PstI* satellite DNA family evolutionary stasis in the *Bufo viridis* group (*Amphibia, Anura*). *Chromosome Res.* **12**: 671-681.
- Offield, M.F., Hirsch, N., Grainger, R.M.** (2000) The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. *Development* **127**: 1789-1797.

- Ohno, S.** (1970) Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Owens, G., Jr., Wiley, J.E.** (2001) Cloning of the 18S rDNA gene, an internal transcribed spacer, and the 5' region of the 28S rDNA gene of Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. Cytogenet.Cell Genet. **92**: 111-115.
- Pardue, M.L., Brown, D.D., Birnstiel, M.L.** (1973) Location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. Chromosoma **42**: 191-203.
- Picariello, O., Feliciello, I., Bellinello, R., Chinali, G.** (2002) S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. Genome **45**: 63-70.
- Ransom, D.G., Zon, L.I.** (1999) Mapping zebrafish mutations by AFLP. Methods Cell Biol. **60**: 195-211.
- Reinschmidt, D., Friedman, J., Hauth, J., Ratner, E., Cohen, M., Miller, M., Krotoski, D., Tompkins, R.** (1985) Gene-centromere mapping in *Xenopus laevis*. J.Hered. **76**: 345-347.
- Rodriguez, T.A., Casey, E.S., Harland, R.M., Smith, J.C., Beddington, R.S.** (2001) Distinct enhancer elements control Hex expression during gastrulation and early organogenesis. Dev.Biol. **234**: 304-316.
- Roe, B.A., Ma, D.P., Wilson, R.K., Wong, J.F.** (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. J.Biol.Chem. **260**: 9759-9774.
- Ryffel, G.U., Lingott, A.** (2000) Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1alpha promoter in transgenic *Xenopus*. Mech.Dev. **90**: 65-75.
- Schmid, M., Steinlein, C.** (1991) Chromosome banding in *Amphibia*. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. Chromosoma **101**: 123-132.
- Schmid, M., Vitelli, L., Batistoni, R.** (1987) Chromosome banding in *Amphibia*. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in *Ascaphidae*, *Pipidae*, *Discoglossidae* and *Pelobatidae*. Chromosoma **95**: 271-284.
- Schubiger, J.L., Germond, J.E., ten Heggeler, B., Wahli, W.** (1985) The Vi element. A transposon-like repeated DNA sequence interspersed in the vitellogenin locus of *Xenopus laevis*. J.Mol.Biol. **186**: 491-503.

- Schwager, J., Grossberger, D., Du Pasquier, L.** (1988) Organization and rearrangement of immunoglobulin M genes in the amphibian *Xenopus*. *EMBO J.* **7**: 2409-2415.
- Shain, D.H., Stone, R.T., Yoo, J., Zuber, M.X.** (1996) Characterization of a single-locus minisatellite DNA in *Xenopus laevis*. *Genome* **39**: 230-233.
- Smith, W.C., Harland, R.M.** (1991) Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* **67**: 753-765.
- Smith, W.C., Harland, R.M.** (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**: 829-840.
- Spohr, G., Reith, W., Sures, I.** (1981) Organization and sequence analysis of a cluster of repetitive DNA elements from *Xenopus laevis*. *J.Mol.Biol.* **151**: 573-592.
- Steele, R.E.** (1985) Two divergent cellular src genes are expressed in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1747-1761.
- Steele, R.E., Unger, T.F., Mardis, M.J., Fero, J.B.** (1989) The two *Xenopus laevis* src genes are co-expressed and each produces functional pp60src. *J.Biol.Chem.* **264**: 10649-10653.
- Takahata, N., Maruyama, T.** (1979) Polymorphism and loss of duplicate gene expression: a theoretical study with application of tetraploid fish. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**: 4521-4525.
- Tan, Y.D., Wan, C., Zhu, Y., Lu, C., Xiang, Z., Deng, H.W.** (2001) An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics* **157**: 1277-1284.
- Thiebaud, C.H., Colombelli, B., Muller, W.P.** (1984) Diploid gynogenesis in *Xenopus laevis* and the localization with respect to the centromere of the gene for periodic albinism ap. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **83**: 33-42.
- Thiebaud, C.H., Fischberg, M.** (1977) DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **59**: 253-257.
- Tompkins, R.** (1978) Triploid and gynogenetic diploid *Xenopus laevis*. *J.Exp.Zool.* **203**: 251-256.
- Tymowska, J.** (1973) Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, *Pipidae*. *Cytogenet.Cell Genet.* **12**: 297-304.

**Tymowska, J., Fischberg, M.** (1973) Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **44**: 335-342.

**Tymowska, J., Kobel, H.R.** (1972) Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin), *Pipidae*. *Cytogenetics* **11**: 270-278.

**Unsal, K., Morgan, G.T.** (1995) A novel group of families of short interspersed repetitive elements (SINEs) in *Xenopus*: evidence of a specific target site for DNA-mediated transposition of inverted-repeat SINEs. *J.Mol.Biol.* **248**: 812-823.

**Uyeno, T., Smith, G.R.** (1972) Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science* **175**: 644-646.

**Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de, L.T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., .** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.

**Watterson, G.A.** (1983) On the time for gene silencing at duplicate loci. *Genetics* **105**: 745-766.

**Wiley, J.E.** (2003) Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenet.Genome Res.* **101**: 80-83.

**Zearfoss, N.R., Chan, A.P., Kloc, M., Allen, L.H., Etkin, L.D.** (2003) Identification of new Xlsirt family members in the *Xenopus laevis* oocyte. *Mech.Dev.* **120**: 503-509.

**Zimmerman, L.B., Jesus-Escobar, J.M., Harland, R.M.** (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**: 599-606.

## VI. SEZNAM PUBLIKACÍ

Macha J., **Tlapakova T.**, Krylov V., Kopsky V. (2003) Xstir polymorphism and absence of sex linkage in *Xenopus laevis* ME2 gene. *Folia Biol. (Praha)* **49**: 115-117.

Krylov V., Macha J., **Tlapakova T.**, Takac M., Jonak J. (2003) The *c-src1* gene visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* **103**: 169-172.

**Tlapakova T.**, Krylov V., Macha J. (2005) Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. *Chromosome Res.* **13**: 699-706.

Krylov V., Kren R., Okada K., Vackova I., **Tlapakova T.**, Fulka J. (2005) Effect of protein supplement source on porcine oocyte maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation. *Folia Biol. (Praha)* **51**: 29-33.

Krylov V., **Tlapakova T.**, Macha J. Structure and localization of *Mdh2* single-copy gene on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA technique. *Cytogenet. Genome Res.*, in press.

## VII. PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

Macha J., Krylov V., **Tlapakova T.**, Kopsky V., Jonak J.

Genetics and cytogenetics of *Xenopus laevis*.

XVII<sup>th</sup> Biological Days – Memory in living systems (19.-20.11.2003), Brno, Czech Republic.

Krylov V., Macha J., **Tlapakova T.**, Jonak J.

Single-copy genes visualised on *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* chromosomes.

10<sup>th</sup> International *Xenopus* Meeting (14.-18.9.2004), Woods Hole, Massachusetts, USA.

**Tlapakova T.**, Macha J., Krylov V., Jonak J.

Structure, polymorphism and localization of MDH2 genes of *Xenopus laevis*.

10<sup>th</sup> International *Xenopus* Meeting (14.-18.9.2004), Woods Hole, Massachusetts, USA.

Macha J., **Tlapakova T.**, Krylov V., Jonak J.

Intron variability: a way to genetic dimension of *Xenopus*.

10<sup>th</sup> International *Xenopus* Meeting (14.-18.9.2004), Woods Hole, Massachusetts, USA.

**Tlapakova T.**, Macha J., Krylov V.

Genetics and cytogenetics of *Xenopus*.

Biotechnology 2006 (15.-16.2.2006), Ceske Budejovice, Czech Republic.

## **PŘÍLOHY**

# Xstir Polymorphism and Absence of Sex Linkage in *Xenopus laevis* ME2 Gene

( *Xenopus laevis* / malic enzyme 2 / polymorphism / Xstir / intron )

J. MÁCHA, T. TLAPÁKOVÁ, V. KRYLOV, V. KOPSKÝ

Department of Animal Physiology and Developmental Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

**Abstract.** A fragment of ME2 cDNA from exon 2 to exon 11 was sequenced and the sequence submitted to GenBank. Analysis of the intron, probably intron 13, revealed a polymorphism which is due to the presence of tandem repetitions of Xstir elements. Genetic analysis of the parents and the offspring showed a standard distribution of intron variants. This distribution was not dependent on sex. We conclude, contrary to previous reports, that the ME2 gene is not linked to sex. Consequently, the Xstir polymorphism can be used as a tool for genetic analysis.

In developmental biology *Xenopus laevis* is a widely used model organism, yet its genetics is far from clear so far due to its long generation time and few well-characterized genetic markers. Almost all members of the *Xenopus* genus are of polyploidic origin and form a polyploid series of 2n, 4n, 8n, 12n starting with diploid *X. tropicalis* and tetraploid *X. laevis* (Tymowska and Kobel, 1972; Tymowska and Fishberg, 1973; Kobel and Du Pasquier, 1986). During meiosis *X. laevis* forms bivalents (Tymowska and Fishberg, 1973). This reveals its ancient, tetraploid, strongly diploidized character, which is consistent with the high proportion of gene duplications in its genome (review Graf and Kobel, 1991). Breeding sex-reversed males with normal males produces only male progeny (Chang and Witschi, 1955, 1956; Gallien, 1955, 1956). Crosses of sex-reversed males and sex-reversed females result in all female progeny (Mikamo and Witschi, 1964). These results indicate the Abraxas type sex determination in *X. laevis*, in other words: the *Xenopus* male is homogametic (ZZ) and the *Xenopus* female is heterogametic (WZ).

The genetics of *X. laevis* was studied mostly by electrophoretic analysis of isoenzymes (Graf, 1989b). The

same method was used for determination of the sex linkage of mitochondrial malic enzyme (Graf, 1989a). Here the author detected malic enzyme activity in the mitochondrial extract from liver of frogs bred by backcrossing hybrids of four *X. laevis* subspecies with respective parental subspecies. The enzymes were separated by starch gel electrophoresis at pH 6.0 and detected histochemically. Based on the results of the segregation analysis the author concluded that alleles do segregate as expected for a sex-linked gene with 6% of recombinants. Malic enzyme (ME) catalyzes the oxidative decarboxylation of malate to pyruvate. It is found in three forms coded by separate genes. Cytoplasmic malic enzyme is labelled as ME1, mitochondrial ME2 and ME3. ME2 and ME3 differ in structure and isoelectric point. ME3 is the basic enzyme with isoelectric point of approximately 9.0. These properties exclude ME3 as the protein detected in Graf's study (1989a). During electrophoresis at pH 6.0 ME3 migrates catodically and cannot be detected under such circumstances.

Heterochromosomes of *X. laevis* were not identified despite a detailed morphological analysis (Schmid and Steilein, 1991). Therefore we searched for a sex-linked marker gene appropriate for chromosomal localization. Since the malic gene showed the lowest recombination with sex, we were interested in its further characterization, with the prospect of using it as a heterochromosome marker.

## Material and Methods

RNA and DNA were isolated from *X. laevis* liver by the guanidine hydrochloride method (Kingston and Gilman, 1994-1997) and the proteinase K – phenol method (Moore, 1994-1997). RT-PCR and PCR were performed according to manufacturer's instructions (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Cloning was done using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA).

The human ME2 exon-intron structure, deduced from comparing the genomic contig NT\_033905 (GenBank) and messenger RNA sequence NM\_002396 (GenBank), was used to establish the provisional exon-intron structure in *X. laevis*. Primers, fitted to the exon-intron structure of human ME2, were designed using *X. laevis* EST sequences similar to the human ME2 gene (GenBank

---

Received January 30, 2003. Accepted March 21, 2003.

This project was supported by grant No. 304/01/1125 from the Grant Agency of the Czech Republic.

Corresponding author: Jaroslav Mácha, Department of Animal Physiology and Developmental Biology, Faculty of Science, Charles University, Vinicna 7, Prague 2, 128 44, Czech Republic. e-mail: machaj@volny.cz.

Abbreviations: MDH – malate dehydrogenase, ME – malic enzyme.



BG730283, BE508129, BG406935). Primers XM2F2 (5'-GCA AGA AAG GCA AAT CCT CGA - 3') and XM2R4 (5' - CGT CTT CTG TAA ACA GCC GTC C - 3') expected to span from exon 2 to exon 11 were used for RT-PCR. Primers XM2F7 (5' - AGT TCG ACA CAT AAG TGA CCG GTT - 3') and XM2R6 (5' - CCT GGT CCC ATC TCT TCA ACA G - 3') expected to span from exon 13 to exon 14 and containing the sequence of the intron were used for analysis of intronic polymorphism. Sequencing was done by AGOWA (Berlin, Germany).

**Results and Discussion**

RT-PCR yielded a partial *X. laevis* ME2 sequence that was submitted to GenBank (AY225508). The corresponding protein sequence was compared with human ME2 (Fig. 1), showing 80% identity. The comparison of the *X. laevis* and human ME2 protein sequences confirmed that the chosen EST corresponds

to the *ME2* gene, since these sequences are in substantial length overlapping with the RT-PCR sequence. Since the primers used for genomic analysis are complementary to sites within this EST sequence, we can assume that the observed polymorphism occurs in the *ME2* gene of *X. laevis*.

The analysis of one couple and its offspring using PCR with primers XM2F7 and XM2R6 demonstrated polymorphism in the respective *ME2* gene segment (Fig. 2). The fragments were labelled as follows: 670 bp as A, 940 bp as B and 1100 bp as C. The male parent had B and C fragments and the female parent A and C fragments. Offspring (42 males, 26 females) had an AB:AC:BC:C distribution of 19:12:14:23. This result is in agreement with the distribution of alleles a/c and b/c with 17a/b:17a/c:17b/c:17c/c ratio ( $\chi^2 = 4.35 < \chi^2_{0.05} = 7.8$ ). All offspring combinations were of both sexes (a/b 58% males, a/c 50%, b/c 50%, c 78% males). In the case of the complete sex linkage only two alelic combinations can

ME2 <i>X.laevis</i>	LQGLLPKIESQDIQAARFHRNLSRIDDPLOKYIYLMGIQERNEKLFYRVLLDDIEHLMP
ME2 Homo	.....T.....L.....KKMST..E...I.....I.Q....S...
ME2 <i>X.laevis</i>	IVYTPTVGLACSQYGHIFRRPKGLYISILDRGHIPSILDHWPETDVKAVVVTGGERILGL
ME2 Homo	.....F...S....VR..V.N...NH.....
ME2 <i>X.laevis</i>	GDLGVYGMGIPVGGKLCCLYTACAGIRPQTCLPVLIDVGTDNPSLLKDPFYMGlyQKRDRTO
ME2 Homo	.....DR....C.....IA.....
ME2 <i>X.laevis</i>	LYDELIDEFMDAVTDRYQNTLIQFEDFGNHNAFRFLRKYREKYCTFNDDIQGTASVALA
ME2 Homo	Q..D.....K.I.....R.....A....
ME2 <i>X.laevis</i>	GMLAAQKAIRKPITEHRILFLGAGEAALGIANLIVMSMEHGISA EAARERIWMFDQFGL
ME2 Homo	.L.....V.S...S..K.....V.N.L.EQE.QKK.....KY..
ME2 <i>X.laevis</i>	LIQGRGEGIDGNQELFAHSAPEKPVSSFLDAVKVLQPTAIIGVSGA
ME2 Homo	.VK..KAK..SY..P.T.....SIPDT.E...NI.K.ST....A..

Fig. 1. Sequence comparison of *X. laevis* ME2 sequence (GenBank AY225508) and human ME2 sequence (GenBank NM\_002396).

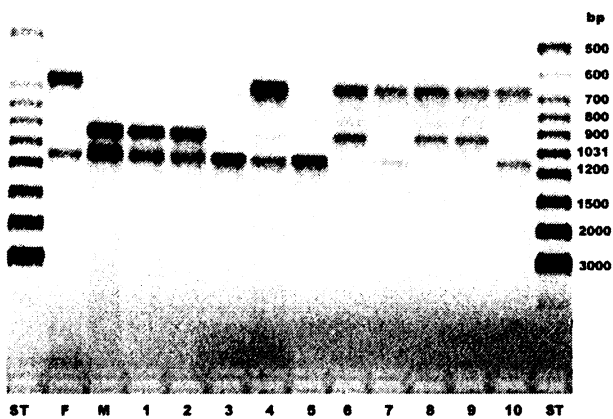


Fig. 2. Distribution of intron variants in parents and offspring (ST = standard DNA fragments, F = female, M = male, 1-10 = offspring number).

occur in each sex in the offspring, which is far from observed results. Theoretical frequencies without sex linkage (10.5 males and 6.5 females for each alelic combination) are not significantly different from experimental values (11:6:7:18 in males and 8:6:7:5 in females) according to the  $\chi^2$  test ( $\chi^2 = 9.2 < \chi^2_{0.05} = 14.1$ ).

These results are in contrast to the results of Graf (1989a). There are two different explanations of the discrepancy. The first rests on the possibility that there is another *ME2* gene linked to sex. The second possibility is that Graf worked with mitochondrial malate dehydrogenase MDH2. Both enzymes react with NADP and NAD and produce the histochemical detection pattern used by Graf.

Sequencing of the fragment A containing an intron, probably intron 13 (Fig. 3), revealed the presence of tandem repetitions of 86 bp elements corresponding to

TTTTCTGAAGCTGCTAAGgtcagttgcttaacctgcaatattatataataaaagcatc  
 acatgtgacgtgtaggcatgtctccatgtatgactcttgataat**acagtagataacagac**  
**aa**gtactactatagtttatataaacaagctgtgtagccatgggggcagacattcaagcac  
 agga**acacagtagataacagataa**gtactactatagtttatataaacaagctgctgtgt  
 agccatgggggcagccattcaagcacaggat**acacagtagataacagataa**gtactacta  
 tagtttaataaacaagctgctgtgtagccatgggggcagccattcaagcacatgatata  
 cacctctctattcatattccagacttttattcaaatcaatgcatgggtgttaggagaa  
 ttggaccatagcaaccaaattgctcaaattgcaaactggagagctgctgaataaaagc  
 taatatataaaaattgaaaaccaactgcaaatgttctcagaatatccctctctacatcat  
 tgcaaaagtttaattgaaaggtgaacagcctctttaaaccatgaaatgtgtattttaataaa  
 tgtagGCGCTTGCTGAGCAATTGA

Fig. 3. Sequence of fragment A containing an intron sequence with three Xstir repetitions. Homology with the Xstir sequence (GenBank AB039922) shown in grey (non-homologous bases within the Xstir sequence shown in white). Upper case marks exonic sequences, bold face represents the beginning of each repetition and underlined are Sca I cleavage sites.

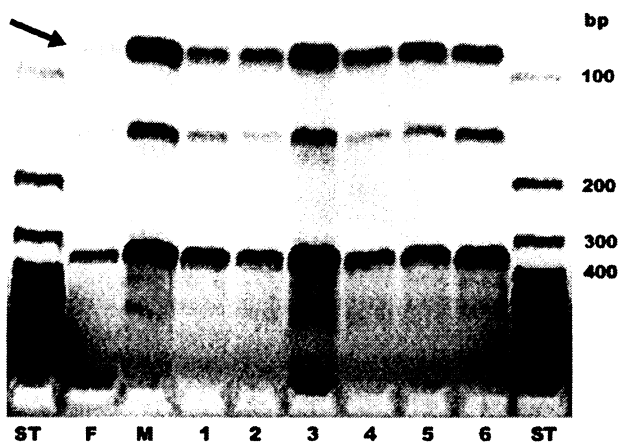


Fig. 4. Sca I DNA restriction of intron fragments (F = female, M = male, 1–6 = offspring number corresponding to Fig. 2, arrow = 86 bp Xstir band).

Xstir as described by Hikosaka et al. (2000). The repetitions contain a Sca I restriction site. The restriction of PCR products from parents and offspring containing fragments A, B and C and their combinations with Sca I resulted in a uniform pattern of 86 bp and flanking sequence bands (Fig. 4). This demonstrates the presence of 3, 6 and 8 Xstir tandem repetitions. This is the first described example of Xstir polymorphism. We have evidence of a broad distribution of this marker (unpublished results). Therefore, Xstir repetitions could become a useful marker for segregation analysis.

## References

- Chang, C. Y., Witschi, E. (1955) Breeding of sex-reversed males of *Xenopus laevis* Daudin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 150-152.
- Chang, C. Y., Witschi, E. (1956) Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **93**, 140-144.
- Gallien, L. (1955) Unisex progeny of a *Xenopus laevis* Daud. Female having undergone, during its larval phase, the gynogenic action of oestradiol benzoate. *C. R. Acad. Sci.* **240**, 913-915. (in French)
- Gallien, L. (1956) Experimental sex inversion in an inferior anuran *Xenopus laevis* Daudin. Analysis of genetic consequences. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **90**, 163-183. (in French)
- Graf, J.-D. (1989a) Sex linkage of malic enzyme in *Xenopus laevis*. *Experientia* **45**, 194-196.
- Graf, J.-D. (1989b) Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established. *Genetics* **123**, 389-398.
- Graf, J.-D., Kobel, H. R. (1991) Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol.* **36**, 19-34.
- Hikosaka, A., Yokouchi, E., Kawahara, A. (2000) Extensive amplification and transposition of a novel repetitive element, Xstir, together with its terminal inverted repeat in the evolution of *Xenopus*. *J. Mol. Evol.* **51**, 554-564.
- Kingston, R. E., Gilman, M. (1994-1997) Single-step RNA isolation from cultured cells or tissues. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. F., Moorf, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., pp. 4.2.1., John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Kobel, H. R., Du Pasquier, L. (1986) Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genet.* **2**, 310-315.
- Mikano, K., Witschi, E. (1964) Masculinization and breeding of the WW *Xenopus*. *Experientia* **20**, 622-623.
- Moore, D. (1994-1997) Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. F., Moorf, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., pp. 2.2.1., John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Schmid, M., Steinlein, C. (1991) Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **101**, 123-132.
- Tymowska, J., Fischberg, M. (1973) Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **44**, 335-342.
- Tymowska, J., Kobel, H. R. (1972) Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin), Pipidae. *Cytogenetics* **11**, 270-278.

## The *c-src1* gene visualized by in situ hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes

V. Krylov,<sup>a</sup> J. Mácha,<sup>a</sup> T. Tlapáková,<sup>a</sup> M. Takáč,<sup>b</sup> and J. Jonák<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology and Developmental Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague;

<sup>b</sup>Laboratory of Protein Biosynthesis, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague (Czech Republic)

**Abstract.** Fluorescent in situ hybridization followed by tyramide signal amplification was used to map the site of the *c-src1* gene on *Xenopus laevis* chromosomes. Positive results were obtained with a cDNA probe of about 1 kb. The *c-src1* gene is located in the subcentromeric region in the long arm of one of the acrocentric chromosomes of the G category (classi-

fied according to Graf and Kobel, 1991). The *c-src1* gene and the *Xenopus* major histocompatibility complex (MHC) 1b locus, which consists of 20 tandemly arranged gene copies, are situated on different chromosomes of the G category.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

The proto-oncogene *c-src* is one of a family of nine non-receptor tyrosine kinases, the *src* family, whose members have been implicated in the regulation of cell growth and differentiation (Cooper and Howell, 1993; Courtneidge et al., 1993). Its product, highly conserved pp60<sup>src</sup>, is ubiquitously expressed in vertebrates. The haploid genome of *Xenopus laevis* contains two functional *src* genes, *src1* and *src2*, as revealed by the sequence analysis of two *src* cDNAs obtained from the maternal RNA pool of the oocyte by reverse transcription (Steele, 1985; Steele et al., 1989).

*Xenopus* was chosen by the NIH as one of five important non-mammalian models of human development and disease (see [www.nih.gov/science/models/xenopus](http://www.nih.gov/science/models/xenopus)), but the tetraploid origin of *X. laevis*, the most widely employed species of the genus, and the high proportion of conserved gene duplications in its genome (approximately 87% in a sample of 100; Black-

shear et al., 2001), highly complicate its genetic analysis. The conventionally stained mitotic karyotype of 18 chromosome pairs can be divided into seven groups of morphologically more or less distinct metacentric and acrocentric chromosomes (Tymovska and Kobel, 1972). An exact identification of all chromosome pairs of *X. laevis* using BrdU/dT labeling was described (Schmid and Steinlein, 1991) but, unfortunately, it is not compatible with in situ hybridization. Thus, the gene map of *X. laevis* is in its infancy; chromosomal localization by in situ hybridization on mitotic or lamp-brush chromosomes has hitherto been mainly restricted to repetitive sequences and repetitive gene clusters (Graf and Kobel, 1991). Only recently, Courtet et al. (2001) described the first successful mapping of some Ig and MHC genes by the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique with tyramide signal amplification (TSA). Despite this clear breakthrough, the authors reported that their protocol was efficient only when at least three adjacent copies of the gene were present and attempts to monitor a single copy gene failed, apparently due to the lack of sensitivity.

In our previous work we described the preparation of transgenic *X. laevis* embryos and frogs harboring in their genomes the Rous sarcoma virus (RSV) long terminal repeat (LTR) and *v-src* gene (in the first generation) and RSV LTR only (in the second generation). The presence of the RSV LTR and *v-src* gene correlated with a high expression of *v-Src* kinase and the presence of RSV LTR with an enhanced expression of *c-Src*

Supported by grants No. 301/02/0408 and No. 304/01/1125 from the Grant Agency of the Czech Republic.

Received 23 July 2003; revision accepted 13 October 2003.

Request reprints from Dr. Jiří Jonák, Department of Protein Biosynthesis, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 16637 Prague 6 (Czech Republic); telephone: +420-220183273; fax: +420-224310955; e-mail: jona@img.cas.cz

kinase in tissues of the embryos and a highly aberrant morphogenesis (Habrová et al., 1996; Takáč et al., 1998; Jonák, 2000). As the first step to elucidate the mechanism of the assumed activating effect of RSV LTR on *c-src* gene expression in the second generation of transgenic *X. laevis* we describe here the chromosomal localization of its *c-src1* gene by the FISH-TSA technique

## Materials and methods

### Chromosomal source and preparation

The conditions of FISH-TSA technology were first set using chromosomes from an aneuploid cell line XL6 ( $n = 34$ ) derived from an embryo of F1 generation of transgenic *X. laevis* frogs (Habrová et al., 1996). Final experiments were carried out with the euploid spleen cells of normal adult frogs. Chromosome preparation and examination by FISH-TSA were carried out essentially according to Courtet et al. (2001) with minor modifications. Shortly, the RNase treatment was avoided and the chromosomal preparations on slides were fixed with 2% paraformaldehyde for 90 min at room temperature (RT) following the digestion with pepsin (50 µg/ml in 0.01N HCl at 37 °C for 10 min). The slides were then washed with 1 × PBS (136 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and 70% ethanol and could be stored in 70% ethanol at 4 °C for about one month.

To prepare chromosome samples from spleen cells, colchicine at a concentration of 15 µg/g (*w/w*) was injected into the lymphatic sac of the frogs 4 h before their decapitation. Then the spleen was torn to shreds with needles in 1 ml diluted PBS (2 volumes PBS, 1 volume H<sub>2</sub>O) and the suspension was filtered through a polyamide sieve with 60 µm meshes. The suspension of cells was then trypsinized with Sigma T4174 (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) diluted 1:9 with PBS at RT for 1 min and the enzyme was inactivated by addition of 5 volumes of diluted bovine serum (2 volumes serum, 1 volume H<sub>2</sub>O). The cells were spun down at 900 rpm for 10 min at RT, the medium was carefully removed and further treatment (starting with a hypotonic shock) was carried out according to Courtet et al. (2001) with modifications described below.

### Probe preparation and labeling

cDNA for probes was obtained by RT-PCR from *X. laevis* liver RNA and cloned into the pCR 2.1-TOPO plasmid using the TOPO TA Cloning kit from Invitrogen (KRD, Prague, Czech Republic). cDNA for probes for the MHC 1b locus was derived using primers described in Courtet et al. (2001). The probe for *X. laevis src1* gene (M24704, GI:15324730) was obtained by PCR from cDNA clones using a forward primer in exon 3: 5'-AATCTCGC-ACAGAGACGGACT-3' and a reverse primer in exon 11: 5'-GAATCTA-CCATACAGCGCAGCCT-3'. The amplification yielded a fragment of 1040 bp and its structure was verified by sequencing.

The labeling with digoxigenin (dig-11-dUTP) was performed by random priming using the Decalabel DNA Labeling kit from MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania) according to the instructions of the manufacturer. Labeling of 1 mg DNA was carried out. Following the labeling, the sample was purified on a column (PCR purification kit, Qiagen, Bio-Consult Lab, Prague, Czech Republic) and obtained in a final volume of 50 µl. The quality of the labeling was tested on a dot blot.

### Hybridization, staining and visualization

After storage in 70% ethanol, slides were equilibrated in PBS for 10 min. The slides were then incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS at RT for 30 min to inactivate endogenous peroxidases, washed three times for 5 min each in PBS at RT and dehydrated in three baths of 70, 90 and 100% methanol for 3 min each and left to air-dry.

### Denaturation and hybridization

The mix (50 µl) composed of 50% deionized formamide in 2 × SSC, 10 × Denhardt solution, 1 mg/ml salmon sperm DNA, 0.1% SDS, and 2 µl of the probe was deposited on the chromosome preparations and covered by a 24 × 50 mm coverslip. Denaturation was carried out in a cycler (TECHNE Inc., Princeton, USA) at 95 °C for 5 min. The slides were then installed in a humid chamber. Hybridization was carried out at 37 °C for 12–16 h in a thermostat.

The slides were then washed three times for 10 min each in 50% formamide, 2 × SSC, pH 7.0 at 45 °C and three times for 5 min each in 2 × SSC at RT.

### Staining with tyramide signal amplification and visualization

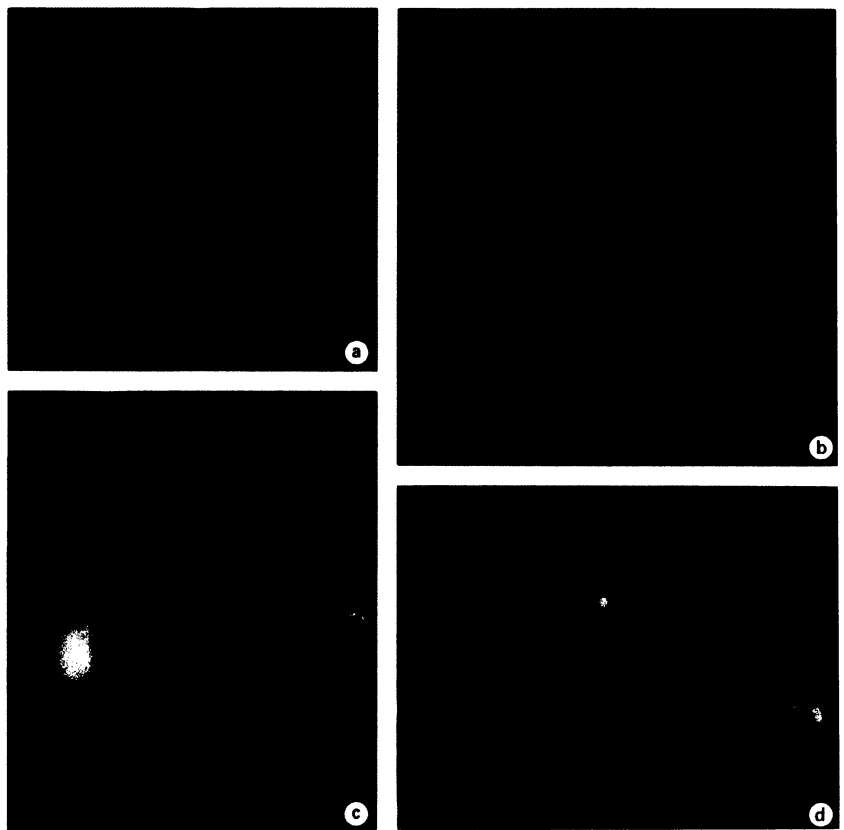
The blocking of slides was carried out in 1 ml TNB buffer/slide (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% Blocking Reagent, Boehringer, Mannheim, Germany) at RT for 30 min. The buffer was removed and the slide was incubated with 1 ml of a conjugate antibody-peroxidase solution (anti-digoxigenin-POD, Fab fragment, 150 U, Roche, Mannheim, Germany) diluted 1:1000 in TNB buffer at RT for 1 h. The slides were washed three times for 5 min each in TNT buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20). Tyramide amplification was carried out using the TSA Plus Fluorescence System kit with a fluorescein derivative (NEL 741, Perkin Elmer, Prague, Czech Republic) according to the instructions of the manufacturer. One hundred µl of the solution was layered on a slide, the slide was covered with a 24 × 50 mm coverslip and left to incubate for 10 min in a humid chamber at RT. The slides were then washed three times for 5 min each in TNT, 3 min in water and air-dried. To mount the preparation, 50 µl Mowiol + DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole, 500 ng/ml) were added and the preparation was checked under a fluorescence microscope Olympus BX-40. Pictures were taken with a SONY Exwave HAD black and white camera and images were processed and colored with the ACC Program v. 5.0 (SOFO, Brno, Czech Republic).

## Results

The efficiency of our modified version of the FISH-TSA method of Courtet et al. (2001) was evaluated in experiments aimed at the detection of the MHC 1b locus already visualized by the original version of the method. The first experiments were carried out using an aneuploid cell line XL6 and the signals of a class MHC 1b probe occurred at the telomeric end of only one submetacentric chromosome (Fig. 1a). Hybridization of chromosomes from spleen cells of normal adult *X. laevis* resulted in labeling of two, apparently homologous chromosomes with a morphology different from that in the aneuploid cell line (Fig. 1b). This time the labeling with the probe for the MHC 1b locus occurred at the end of the long arm of acrocentric chromosomes belonging to the category G, or the results closely mimicked those originally described by Courtet et al. (2001). They also observed a different staining pattern of chromosomes from aneuploid and euploid cells.

The hybridization of chromosomes from spleen cells of normal adult frogs with a probe for the *c-src1* gene regularly labeled the subcentromeric region of the long arm of two acrocentric chromosomes as revealed by analysis of more than 100 mitoses (Fig. 1c). These chromosomes belong to the same category as the chromosomes carrying the MHC 1b locus. The labeling of a pair of morphologically undistinguishable chromosomes in the normal *X. laevis* set of 36 chromosomes with the *c-src1* gene probe is in agreement with the diploidized character of the species. However, the presence of the signals on all four chromatids was detectable less frequently than the labeling of the MHC 1b locus, which regularly exhibited a four-site hit. Two to four signals were also detected when interphase nuclei were investigated (results not shown).

Double hybridization of spleen cell chromosomes with the probe for the MHC 1b locus and the probe for the *c-src1* gene revealed that the MHC 1b locus and the *c-src1* gene are localized on different but morphologically similar chromosomes of the G category (Fig. 1d). The intensity of the signal obtained by the FISH-TSA detection of the one copy *c-src1* gene with the



**Fig. 1.** FISH on *Xenopus laevis* chromosomes. **(a)** Detection of the MHC 1b locus in the aneuploid cell line X16. The absence of the signal on the paralogous chromosome (red arrow) is apparently due to the lack of the region carrying this locus. **(b)** Detection of the MHC 1b locus on spleen cells of a normal adult frog. **(c)** Localization of the *src1* gene on the chromosomes of spleen cells of a normal adult frog. **(d)** Double hybridization of the MHC 1b locus and *src1* gene probes on chromosomes of spleen cells of a normal adult frog.

1040 bp cDNA probe was significantly lower than that obtained by the labeling of the MHC 1b locus, which consists of a tandem array of 20 gene copies.

## Discussion

Until now chromosomal localization of the cellular *src* genes has been reported for four vertebrates: cat, mouse, rat and human. The feline *c-src* has been localized to chromosome A3 (O'Brien et al., 1997), the murine *c-src* to chromosome 2 (Blatt et al., 1984; Glaser, 1989), the rat *c-src* to chromosome 3 (3q42, NBC1 Locus Link) and the human *c-src* to chromosome 20 (Sakaguchi et al., 1985). Our experiments revealed that the *c-src1* gene of *X. laevis* resides on one of the acrocentric chromosomes of the G category (classified according to the system of Tymovska and Kobel, 1972, and Graf and Kobel, 1991).

This is the first time that it was possible to map a single copy gene by FISH on *X. laevis* chromosomes. The mapping was achieved by a slightly adapted method of Courtet et al. (2001), although the authors reported that they were not able, by their procedure, to monitor single copy genes of the *X. laevis* MHC system. Experiments to map the chromosomal site of the *c-src2* gene of *X. laevis* are in progress.

The successful visualization of the *c-src1* gene on *X. laevis* chromosomes was only possible by coupling the FISH staining

with the tyramide signal amplification. All our earlier attempts to localize the *c-src1* gene by combining PRINS (Koch et al., 1989) or in situ PCR (Gosden and Hamratty, 1993) and tyramide amplification failed. We found that it was due to a starry background resistant to washing that developed as a result of an unspecific binding of the digoxigenin-labeled nucleotide to the sample followed by a strong enhancement of the signal in the tyramide amplification step. The pretreatment with ddNIP according to Koch et al. (1995) did not provide any improvement (results not shown). The starry background was apparently not encountered in original experiments using PRINS and in situ PCR in combination with fluorescently labeled conjugates described by Gosden and Lawson (1994) designed to localize predominantly repetitive regions on human chromosomes when the TSA was not applied.

Hybridization with a digoxigenin-labeled probe targeted against in situ PCR amplified *src1* region (Bagasra and Hansen, 1997) was found to stain telomeric regions of several chromosomes. However, the staining by this approximately 100-bp long probe labeled by digoxigenin combined with TSA also occurred without any PCR reaction. It appears that it was mainly due to a low specificity of the hybridization with this relatively short probe. Thus, the combination of PRINS or in situ PCR with TSA in our hands gave no satisfactory results.

Preparation of chromosomes of *X. laevis* for an efficient gene mapping appears to be particularly sensitive to the condi-

tions of hypotonic treatment. We could confirm the finding of Courtet et al. (2001) that hypotonic treatment by 0.038 M KCl gives optimal results. Already a small shift to a lower 0.033 M concentration brings about incomplete mitoses. The pepsin treatment was found to significantly reduce the staining of chromosomes and induce their loss. Therefore, a postfixation with paraformaldehyde was introduced.

Certainly the most important step in the successful detection of individual genes on chromosomes of *X. laevis* is the preparation of an efficient and specific probe. Labeling of the probe DNA by nick translation failed to give reproducible results. Apparently, the length of the labeled DNA fragments varied and specific activity was lower than that obtained by random priming. Staining with probes labeled by PCR was not successful either (see above).

In agreement with Courtet et al. (2001), a functional probe was obtained by the random priming technique using decanucleotides and digoxigenin-11-dUTP. The use of cDNA as a template for the preparation of probes can also be recommended in order to retain the specificity of the hybridization reaction as there are numerous repetitive DNA sequences in the *Xenopus* genome. X-stir, the most frequent, about 86-bp long repetitive element, has been found to be present in about 1 million copies per haploid genome (Hikosaka et al., 2000).

To elaborate the gene mapping in *Xenopus* into a versatile technology will require further concentrated and continuous effort. The next step should certainly also involve development of a procedure for simultaneous gene mapping and identification of individual *X. laevis* chromosomes.

## References

- Bagasra O, Hansen J: *In situ* PCR techniques (John Wiley and Sons Inc., New York 1997).
- Blackshear PJ, Lai WS, Thorn JM, Kennington EA, Staffa NG Jr, Moore DT, Boufard GG, Beckstrom-Sternberg SM, Touchman JW, Bonaldo MF, Soares MB: The NIEHS *Xenopus* maternal EST project: interim analysis of the first 13,879 ESTs from unfertilized eggs. *Gene* 267:71–87 (2001).
- Blatt C, Harper ME, Franchini G, Nesbitt MN, Simon MI: Chromosomal mapping of murine *c-fos* and *c-src* genes. *Mol cell Biol* 4:978–981 (1984).
- Cooper JA, Howell B: The when and how of Src regulation. *Cell* 73:1051–1054 (1993).
- Courtet M, Flajnik M, Du Pasquier L: Major histocompatibility complex and immunoglobulin loci visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus* chromosomes. *Dev Comp Immunol* 25:149–157 (2001).
- Courtneidge SA, Fumagalli S, Koegl M, Superti-Furga G, Twamley-Stem GM: The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Dev Suppl* 57–64 (1993).
- Glaser I, Matthews KE, Hudson JW, Seth P, Housman DE, Crerar MM: Localization of the muscle, liver, and brain glycogen phosphorylase genes on linkage maps of mouse chromosomes 19, 12, and 2, respectively. *Genomics* 5:510–521 (1989).
- Gosden J, Harratty D: PCR *in situ*: a rapid alternative to *in situ* hybridization for mapping short, low copy number sequences without isotopes. *Biotechniques* 15:78–80 (1993).
- Gosden J, Lawson D: Rapid chromosome identification by oligonucleotide-primed *in situ* DNA synthesis (PRINS). *Hum molec Genet* 3:931–936 (1994).
- Graf J-D, Kobel HR: Genetics of *Xenopus laevis*. *Meth Cell Biol* 36:19–34 (1991).
- Habrova V, Takač M, Navrátil J, Máchá J, Češková N, Jonák J: Association of Rous sarcoma virus DNA with *Xenopus laevis* spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Mol Reprod Develop* 44:332–342 (1996).
- Hikosaka A, Yokouchi E, Kawahara A: Extensive amplification and transposition of a novel repetitive element, xstir, together with its terminal inverted repeat in the evolution of *Xenopus*. *J molec Evol* 51:554–564 (2000).
- Jonák J: Sperm-mediated preparation of transgenic *Xenopus laevis* and transmission of transgenic DNA to the next generation. *Mol Reprod Develop* 56, Suppl.298–300 (2000).
- Koch JF, Kolvraa S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L: Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* 98:259–265 (1989).
- Koch J, Hindkjaer J, Kolvraa S, Bolund L: Construction of a panel of chromosome-specific oligonucleotide probes (PRINS-primers) useful for the identification of individual human chromosomes *in situ*. *Cytogenet Cell Genet* 71:142–147 (1995).
- O'Brien SJ, Cevario SJ, Martenson JS, Thompson MA, Nash WG, Chang L, Graves JA, Spencer JA, Cho KW, Tsujimoto H, Lyons LA: Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felis catus*). *J Hered* 88:408–414 (1997).
- Sakaguchi AY, Mohandas T, Naylor SL: A human *c-src* gene resides on the proximal long arm of chromosome 20 (cen→q131). *Cancer Genet Cytogenet* 18:123–129 (1985).
- Schmid M, Steinlein C: Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* 101:123–132 (1991).
- Steele RE: Two divergent cellular *src* genes are expressed in *Xenopus laevis*. *Nucl Acids Res* 13:1747–1761 (1985).
- Steele RE, Unger TF, Mardis MJ, Fero JB: The two *Xenopus laevis* SRC genes are co-expressed and each produces functional pp60<sup>src</sup>. *J Biol Chem* 264:10649–10653 (1989).
- Takač M, Habrova V, Máchá J, Češková N, Jonák J: Development of transgenic *Xenopus laevis* with a high *c-src* gene expression. *Mol Reprod Dev* 50:410–419 (1998).
- Tymowska J, Kobel HR: Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin). *Papadac Cytogenetics* 11:270–278 (1972).

## Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes

Tereza Tlapakova\*, Vladimir Krylov & Jaroslav Macha

Department of Animal Physiology and Developmental Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicna 7, Prague 2, 128 43, Czech Republic; E-mail: tlapka@natur.cuni.cz

\*Correspondence

Received 4 April 2005. Received in revised form and accepted for publication by Paul Popescu 13 June 2005

**Key words:** fluorescence *in-situ* hybridization (FISH), intron variability, mitochondrial malate dehydrogenase 2 (Mdh2), retrotransposon L1X1, tyramide amplification, *Xenopus laevis*

### Abstract

Two paralogous mitochondrial malate dehydrogenase 2 (Mdh2) genes of *Xenopus laevis* have been cloned and sequenced, revealing 95% identity. Fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) combined with tyramide amplification discriminates both genes; Mdh2a was localized into chromosome q3 and Mdh2b into chromosome q8. One kb cDNA probes detect both genes with 85% accuracy. The remaining signals were on the paralogous counterpart. Introns interrupt coding sequences at the same nucleotide as defined for mouse. Restriction polymorphism has been detected in the first intron of Mdh2a, while the individual variability in intron 6 of Mdh2b gene is represented by an insertion of incomplete retrotransposon L1X1. Rates of nucleotide substitutions indicate that both genes are under similar evolutionary constraints. *X. laevis* Mdh2 genes can be used as markers for physical mapping and linkage analysis.

### Introduction

*Xenopus laevis* has been an invaluable source of knowledge for gaining a grasp of embryonic development and cell biology. The *X. laevis* model has contributed to elucidation of early fate decision, embryonic induction, competence, organogenesis and their underlying molecular mechanisms. Moreover, its tetraploid origin allows us to perform evolutionary studies relevant to gene duplication. Evidence for tetraploidy of *Xenopus laevis* comes from comparisons of DNA content in various species of the *Xenopus* genus as well as of some species of the Pipidae family. A high proportion of *X. laevis* genes is present in duplicated copies (Graf & Kobel 1991), while 18 pairs of distinct chromosomes form bivalents in meiosis (Tymowska &

Fischberg 1973, Muller 1974). *X. laevis* displays features of an ancient tetraploid species that has diploidized completely.

Linkage mapping of *X. laevis* has been severely hampered by its long generation time and shortage of well-characterized genetic markers. A linkage map containing 35 genes in 10 groups has been obtained by electrophoretic analysis of offspring isoenzymes (Graf & Kobel 1991). The disadvantage of this classical approach is the time span necessary for animals to grow large enough for tissue samples to be used for analysis. Still greater inconvenience results from the low resolution of electrophoresis combined with histochemical detection of isoenzymes, specifically in the case of multimeric gene products. PCR can distinguish polymorphism several days after crossing and its reliability is much higher.

In amphibians, chromosomal localization experiments have been restricted to repetitive sequences as satellite DNA (Picariello *et al.* 2002, Odierna *et al.* 2004), rDNA regions (Owens & Wiley 2001, Wiley 2003) or repetitive genes of *X. laevis* immunoglobulin, MHC1a and MHC1b loci (Courtet *et al.* 2001). Tyramide amplification of the fluorescence signal now permits localization of a single gene in *Xenopus laevis*. Gene *c-src1* has been situated in one of the G group chromosomes, different from a similar chromosome carrying the repetitive gene MHC1b (Krylov *et al.* 2003).

In fish, another important model for studying developmental processes and gene duplication, centromeric repeats (Reed & Phillips 1995), tandem repeat sequences (Crollius *et al.* 2000, Phillips & Reed 2000), sex-specific or sex-linked repetitive sequences have been visualized leading to identification of sex chromosomes in guppy (*Poecilia reticulata*) (Nanda *et al.* 1992) and in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Stein *et al.* 2001). In platyfish (Nanda *et al.* 2000) and medaka (Matsuda *et al.* 1998), cosmid clones containing sex-linked single-copy genes were used as a probe in fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) for their identification. Species-specific chromosome paint probes have been used to study chromosome elimination in hagfish *Eptatretus okinosearius* (Kubota *et al.* 1993) and salmonid hybrids (Fujiwara *et al.* 1997). In this paper, we demonstrate the ability of *in-situ* hybridization coupled with tyramide amplification to localize and distinguish very similar paralogous mitochondrial malate dehydrogenase 2 (Mdh2) genes. Intronic polymorphism found in both genes might provide a more convenient approach to integrated *X. laevis* genome mapping.

## Materials and methods

RNA was isolated from *X. laevis* liver by the guanidine hydrochloride method (Kingston & Gilman 1994–1997) and genomic DNA was prepared from erythrocytes of adults or hatched tadpoles by using a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Cloning was done using the TOPO TA and TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen).

Hybridization probes were prepared from respective cDNAs by using the following primers: Mdh2a: 5'-CTGAGTTTGTGCTTCCCTATCAGC-3' and 3'-

GCAGTCAGCTTGCCTAGTCCC-5', Mdh2b: 5'-CGGCACTGAGCTCGTGA-3' and 3'-GCAGTCAGCTTGCCTAGTCCC-5'. PCR amplicates were purified by gel electrophoresis and labelled with digoxigenin-11-dUTP (Roche) by means of a Deca-Label DNA Labeling kit following the manufacturer's instructions (Fermentas).

FISH from spleen cells of adult animals combined with tyramide signal amplification has been described previously (Krylov *et al.* 2003). Images were recorded at a resolution of 100 nm per pixel and processed in an ACC program (SOFO, Czech Republic).

Synonymous and non-synonymous rates of nucleotide substitution were conducted by Nei & Gojobori's method (1986) using the MEGA program, version 2.1 (Kumar *et al.* 2001).

## Results

### Cloning

The design of primers for two overlapping segments of cDNA was based on *X. laevis* ESTs, which were similar to the mouse Mdh2 gene. Clones from the 3' segment showed differences in restriction pattern and structure, thus revealing the presence of two expressed duplicated genes. Primers designed for dissimilar sequence sites also demonstrated two genes in the 5' segment. Sequences denominated Mdh2a (GenBank Accession number AY681346) and Mdh2b (GenBank Accession number AY681347) have a 95% identity and have no insertions or deletions in their coding parts, thus excluding splicing variants. Corresponding protein structures differ in 7 amino acid residues (97% identity and 99% positives).

### Structure analysis

PFAM analysis of translated Mdh2a and Mdh2b shows conserved domains typical for mitochondrial and glycosomal malate dehydrogenase from a superfamily of NAD-dependent 2-hydroxycarboxylate dehydrogenases. Comparison of plant, mammalian, yeast and *E. coli* Mdh2 results in 55–60% overall identity of amino acid residues. Mouse cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenases have only 23% identity (McAlister-Henn *et al.* 1987) and, respec-



tively, higher similarity exists between mitochondrial Mdh2 and lactate dehydrogenase (Setoyama *et al.* 1988). Enzyme sequences obtained by conceptual translation of Mdh2a and Mdh2b are aligned with mouse Mdh2 (Figure 1), resulting in 83% or 84% identity and 91% or 92% similarity as may be the case with the mouse protein. Amino acid residues from 'active site vacuole' (Goward & Nicholls 1994) are framed in the alignment. They are completely conserved in the described sequences of Vertebrata, as well as in *X. laevis* Mdh2a and Mdh2b. Arginine at position 104 (white characters on black background) defines substrate specificity of enzymes; in lactate dehydrogenases this is replaced by glutamine and in *E. coli* malate dehydrogenase this substitution relaxes the high degree of specificity for the substrate oxaloacetate (Goward & Nicholls 1994). Program TargetP (Emanuelsson *et al.* 2000) predicts a sub-

cellular location of both *Xenopus* proteins in mitochondrion; the predicted length of signal peptide is 17 amino acid residues. All these sequence features indicate that Mdh2a and Mdh2b encode mitochondrial malate dehydrogenases 2.

*Intron variability*

Exon-intron structure and intron polymorphism of *X. laevis* Mdh2 genes were studied by PCR amplification of genomic sequences from several individuals. Results are listed in Table 1. Exon segmentation of *X. laevis* and mouse Mdh2 genes proved to be identical. Similarity between introns of Mdh2a and Mdh2b is substantially lower than between exons. Full sequences of intron 2 have 71% identity and 9% gaps. PCR experiments detected the presence of two

	10	20	30	40	50	60
<i>X. laevis</i> a	MFSRIARPA	HGLIRGLSTT	AQANARVTVL	GASGGIGQPL	LLLLKNSPLI	SNLALYDIAH
<i>X. laevis</i> b	.....	.....	.....A.....	.....	.....	.....
<i>M. musculus</i>	.L.AL...G	AA.R.SF..S	.N.K.A..	.....	.....V	.R.T.....
	70	80	90	100	110	120
<i>X. laevis</i> a	TPGVAADLSH	IETRAKVTGY	LGAEQLPESL	KSADVVPVIPA	GVPKPKGMTK	DDLFTNASI
<i>X. laevis</i> b	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....
<i>M. musculus</i>	.....	.....N.K..	..P...DC.	.GC.....	.....	.....T.
	130	140	150	160	170	180
<i>X. laevis</i> a	VATLTDACAK	HCPEAMICII	SNPVNSTIPI	TSEVFKKHGV	YNPNRIFGVT	TLDIVRANTF
<i>X. laevis</i> b	.....E.....	.....	A.....	.....	.....	.....
<i>M. musculus</i>	.....A...Q	.....V.	A.....	.A.....	.....K.....	.....
	190	200	210	220	230	240
<i>X. laevis</i> a	VAELKGLDPA	RVNVPVIGGH	AGKTIIP LIS	QSTPKVEFPQ	DQLEVLIGRI	QEAGTEVKA
<i>X. laevis</i> b	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....
<i>M. musculus</i>	.....	.....	.....	.C...D...	...AT.T...	.....
	250	260	270	280	290	300
<i>X. laevis</i> a	KAGAGSATLS	MAYAGARFVF	SLLDAMNGKE	GVIECSFVRS	EETESPYFST	PLLLGKNGIE
<i>X. laevis</i> b	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>M. musculus</i>	.....	.....	..V.....	..V...Q.	K...CT....	.....K.L.
	310	320	330			
<i>X. laevis</i> a	KNLGLGKLT	YEEKLVSEAM	AELKGSIKKG	EEFIKSRK		
<i>X. laevis</i> b	.....	.....I.....	.....	.....N..		
<i>M. musculus</i>	....I..I.P	F...MIA..I	P...A.....	.D.V.NM.		

Figure 1. Amino acid sequence homology of mouse and *X. laevis* mitochondrial malate dehydrogenases. Amino acid residues from the active centre of enzymes are framed in the alignment; white characters on black background mark arginine defining the specificity of enzymes.

Table 1. Introns of Mdh2 genes in *Xenopus laevis*.

Gene and intron no.	Size	GenBank Accession no.
<b>Mdh2a</b>		
1	5.2 kb	AY924294, AY924295
2	540 bp	AY924295
3	673 bp	AY924295
4	1.4 kb	AY924295, AY924296
5	1182 kb	AY924296
6	2 kb	AY924296, AY924297
7	1.5 kb	AY924297, AY924298
8	559 bp	AY924298
<b>Mdh2b</b>		
1	6 kb	AY924299, AY924300
2	506 bp	AY924300
3	700 bp	AY924300, AY924301
4	2.3 kb	AY924301, AY924302
5	828 bp	AY924302
6	2.699 kb	AY924302
7	1.2 kb	AY924302, AY924303
8	610 bp	AY924303

variants of intron 6 in Mdh2b genes. The longer sequence contains a 482-bp-long insert (Figure 2) of incomplete non-LTR retrotransposon L1X1 (GenBank Accession number AF027962). The distribution of intron variants in parents and some offspring is shown in Figure 3b. No variability has been proved in the same intron of the Mdh2a gene, but *Mbo*I cleavage of a 5.2-kb-long amplificate containing intron 1 reveals two alleles (Figure 3a). Another restriction polymorphism has been uncovered in the first intron of the Mdh2b gene (not shown). Both polymorphisms studied show simple Mendelian inheritance. Parents are heterozygous in the Mdh2a gene and their offspring had an allele distribution in the ratio of 24:53:16, which is in agreement with a 1:2:1 ratio ( $\chi^2_{0.05} > 3.2553$ ). Crossing of a female heterozygous and a male homozygous for the Mdh2b gene yields homozygotes and heterozygotes at a 44:43 ratio. Six classes of the allele distribution with frequencies 13:8:10:7:22:26 is in concordance with a 1:1:1:1:2:2 ratio ( $\chi^2_{0.05} > 3.4884$ ), excluding strong linkage of Mdh2 genes.

### Localization of Mdh2 genes

Gene Mdh2a was localized to chromosome 3q, gene Mdh2b to chromosome 8q (Figure 4). Identification of chromosomes was based on their size and p/q arms ratio (Tymowska & Kobel 1972). The specificity of hybridization was 85–86%; 14–15% resulted in labelling of paralogous counterpart. Only chromosomes labelled on both chromatids were evaluated.

### Rates of nucleotide substitutions

In order to determine the evolutionary constraints of duplicate Mdh2 genes in *X. laevis*, we compared rates of synonymous  $d_S$  and non-synonymous  $d_N$  nucleotide substitutions between both *X. laevis* Mdh2 paralogues and a *X. tropicalis* Mdh2 orthologue (GenBank AY842260). Results are summarized in Table 2. For all genes,  $d_S$  exceeded  $d_N$ . Differences within both  $d_S$  and  $d_N$  groups are not significant.

### Discussion

In the present study, we have demonstrated structural analysis, chromosomal localization and the evolutionary aspect of two paralogous Mdh2 genes in *X. laevis*. Both genes revealed the same exon–intron organization as in mouse. Although differences in intron positions are often emphasized in studies of genome evolution, most gene segmentation is conserved in human, *Drosophila*, *Caenorhabditis* and sponge genes. On the other hand, intron sequences are not conserved (Muller *et al.* 2002). Nevertheless, some intron regions show enough identity to produce alignment between man and mouse (Castresana 2002). Short evolutionary time (Bisbee *et al.* 1977, Evans *et al.* 2004) since the genome duplication in *X. laevis* causes 70% identity of Mdh2 intronic fragments outside gaps and repetitions. Intron sequences often contain blocks of repetitive sequences (Macha *et al.* 2003, Hikosaka & Kawahara 2004) or transposon residues useful for linkage analysis. The

**Intron 6 – TGACTACCTAATA == Part of transposon L1X1 == CAGTCTAATATATTC – Intron 6**  
**Intron 6 – TGACTACCTAATATTC – Intron 6**

Figure 2. Two variants of intron 6 in Mdh2b gene with incomplete non-LTR retrotransposon L1X1. Direct repeats of target sequence are framed; sequences used by retroviral integrases are in white characters on black background.

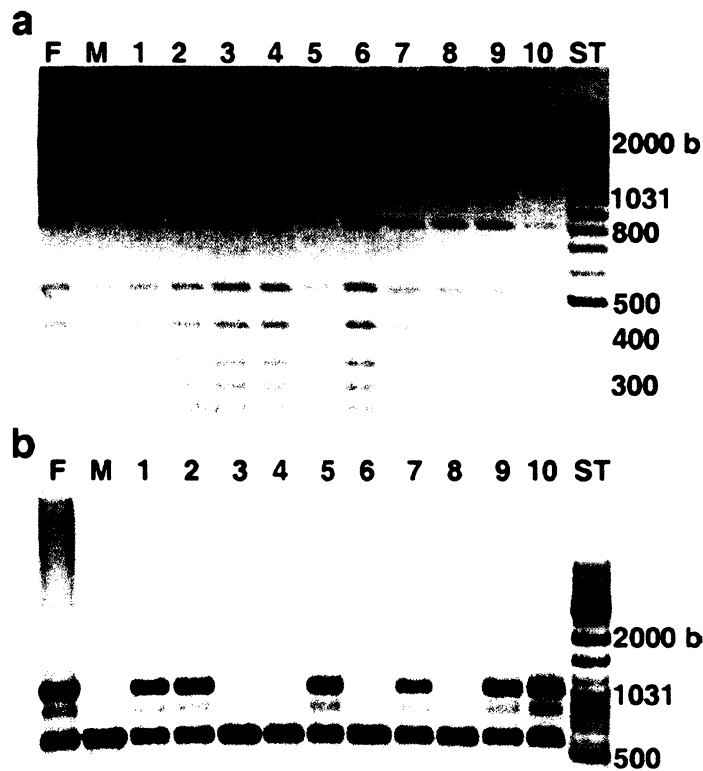


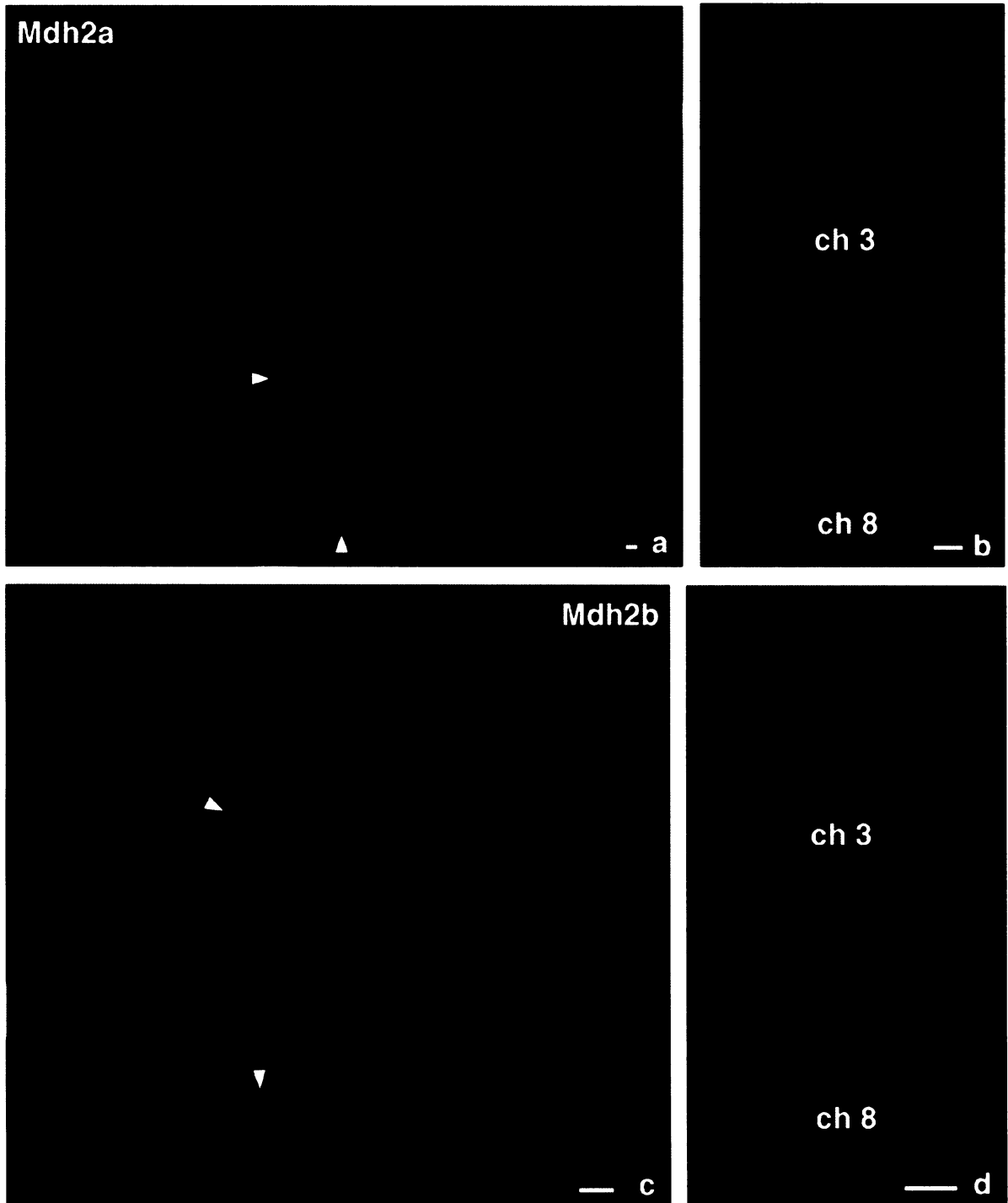
Figure 3. Intron variability of Mdh2 genes. (a) *Mbo*I restriction polymorphism of intron 1 of Mdh2a gene in parents and offspring (F = female, M = male, numbers indicate the number of offspring, ST = DNA ladder). Intronic sequence was amplified with primers: 5'-CTG AGTTTGTGCTTCCCTATCAGC-3' and 3'-GGGCAATATCATACAAAGCAAGTT-5'. (b) Variants of intron 6 of Mdh2b gene in parents and offspring (F = female, M = male, numbers indicate the number of offspring, ST = DNA ladder) which resulted from PCR amplification with primers: 5'-GTGTAGGTGACCGGTCCGATT-3' and 3'-TGAATTCGGCCAATCAGTACTTC-5'.

retrotransposon insert found in intron 6 is flanked by direct repeats of the genome target sequence. The intron, as well as the insert, contains a 4-bp-long terminal sequence characteristic for retroviral double-stranded DNA cleaved by retroviral integrase (Sherman & Fyfe 1990). The presence of an integrase-recognized region might be the reason for incomplete transposition.

Hughes & Hughes (1993) have demonstrated that nucleotide substitution rates between 17 pairs of non-allelic duplicated genes in *Xenopus laevis* compared with rates between human and rodent orthologous loci prove to be similar. The results hold well for both synonymous and non-synonymous mutations. The authors conclude that at least a portion of duplicated genes in *X. laevis* is under purifying selection during the evolution. Even *X. laevis* Mdh2 paralogues demonstrate no significant difference in mutation rates when com-

pared with the *X. tropicalis* gene. Similar nucleotide substitution rates of paralogous genes support the duplication-degeneration-complementation (DDC) hypothesis proposed by Force *et al.* (1999), where, after a single degenerative mutation of regulatory domain, both gene copies are necessary.

Localization of Mdh2 genes on q3 (Mdh2a) and q8 (Mdh2b) is supported by a replication banding pattern similar for both chromosome pairs. In reconstructing the tetraploid karyotype of *X. laevis*, the chromosomes form a quartet (Schmid & Steinlein 1991). Chromosomal positions of twin forms of mitochondrial malate dehydrogenase indicate appreciable synteny and support a conclusion of mutual origin of both chromosomal pairs. This is the second time that paralogous genes on a tetraploid chromosome set have been mapped. Previously, two regions of MH class I genes were located on rainbow trout chro-



*Figure 4.* Localization of Mdh2 genes. (a, b) Detection of Mdh2a on q arms of chromosome 3. White arrowheads indicate signals in the entire mitosis (a). Details of positive chromosomes together with their paralogous counterparts (ch 8) are depicted in b. (c, d) Detection of Mdh2b on q arms of chromosome 8. White arrowheads indicate signals in the entire mitosis (c). Details of positive chromosomes together with their paralogous counterparts (ch 3) are depicted in d. Scale bar = 2  $\mu$ m.

Table 2. Mean  $d_S$  and  $d_N/100$  sites ( $\pm$  SE) between *X. laevis* paralogous Mdh2 genes and between each of two duplicated sequences (a and b) in *X. laevis* and an orthologous *X. tropicalis* Mdh2 gene.

	$d_S \pm$ SE	$d_N \pm$ SE
<i>X. laevis</i> a vs. <i>X. laevis</i> b	42.0 $\pm$ 5.9	7.0 $\pm$ 2.6
<i>X. laevis</i> a vs. <i>X. tropicalis</i>	53.0 $\pm$ 6.5	16.0 $\pm$ 4.0
<i>X. laevis</i> b vs. <i>X. tropicalis</i>	41.0 $\pm$ 5.9	17.0 $\pm$ 4.1

$d_S$ : number of synonymous substitutions;  $d_N$ : number of non-synonymous substitutions; SE: standard error.

mosomes 14 and 18, containing duplicated *PSMB8-10* and *ABCB3B* genes (Phillips *et al.* 2003). Our preliminary results show that the Mdh2 gene is in the same position as on a similar chromosome 3 in *X. tropicalis* (unpublished observations).

Differentiation between positions of very similar duplicated genes on chromosomes allows for an advanced mapping of tetraploid genome. High intron mutation rate offers a rich source of individual variability necessary for linkage analysis. Introns are flanked by unequal sequences, ensuring the gene identity and easy design of PCR primers. Methods for detecting intronic polymorphisms are simple and offspring evaluation is fast. Genes with a known sequence, genetic marker and position in a chromosome as an anchoring point can complement mass throughput methods. With the use of such points, a linkage group of arbitrary genetic markers can be inserted into chromosomes and oriented or genomic contigs can be ordered even in the tetraploid genome.

## Acknowledgements

This research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No.: 301/02/0408, 304/01/1125) and by the Ministry of Education of the Czech Republic (Grant No.: MSM11310000).

## References

- Bisbee CA, Baker MA, Wilson AC, Haji-Azimi I, Fischberg M (1977) Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science* **25**: 785–787.
- Castresana J (2002) Estimation of genetic distances from human and mouse introns. *Genome Biol* **3**: 1–7.
- Courtet M, Flajnik M, Du Pasquier L (2001) Major histocompatibility complex and immunoglobulin loci visualized by *in-situ* hybridization on *Xenopus* chromosomes. *Dev Comp Immunol* **25**: 149–157.
- Crollius HR, Jaillon O, Dasilva C *et al.* (2000) Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res* **10**: 939–949.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **21**: 1005–1016. <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>>.
- Evans BJ, Kelley DB, Tinsley RC, Melnick DJ, Cannatella DC (2004) A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Mol Phylogenet Evol* **33**: 197–213.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531–1545.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC (1997) Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. *Chromosoma* **106**: 44–52.
- Goward CR, Nicholls DJ (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci* **3**: 1883–1888.
- Graf JD, Kobel HR (1991) Genetics of *Xenopus laevis*. *Meth Cell Biol* **36**: 19–34.
- Hikosaka A, Kawahara A (2004) Lineage-specific tandem repeats riding on a transposable element of MITE in *Xenopus* evolution: a new mechanism for creating simple sequence repeats. *J Mol Evol* **59**: 738–746.
- Hughes MK, Hughes AL (1993) Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol Biol Evol* **10**: 1360–1369.
- Kingston RE, Gilman M (1994–1997) Single-step RNA isolation from cultured cells or tissues. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RF *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 4.2.1.
- Krylov V, Macha J, Tlapakova T, Takac M, Jonak J (2003) The c-SRC1 gene visualized by *in-situ* hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenet Genome Res* **103**: 169–172.
- Kubota S, Kuro-o M, Mizuno S, Kohno S (1993) Germ line-restricted, highly repeated DNA sequences and their chromosomal localization in a Japanese hagfish (*Eptatretus okinoseanus*). *Chromosoma* **102**: 163–173.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244–1245.
- Macha J, Tlapakova T, Krylov V, Kopsky V (2003) Xstir polymorphism and absence of sex linkage in *Xenopus laevis* ME2 gene. *Folia Biol (Praha)* **49**: 115–117.
- Matsuda M, Matsuda C, Hamaguchi S, Sakaizumi M (1998) Identification of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence *in-situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **82**: 257–262.
- McAlister-Henn L, Blaber M, Bradshaw RA, Nisco SJ (1987) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene encoding malate dehydrogenase. *Nucleic Acids Res* **25**: 4993.
- Muller WP (1974) The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis* (Daudin). *Chromosoma* **47**: 283–296.
- Muller WE, Bohm M, Grebenjuk VA, Skorokhod A, Muller IM, Gamulin V (2002) Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* **7**: 299–309.

- Nanda I, Scharl M, Feichtinger W, Epplen JT, Schmid M (1992) Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* **101**: 301–310.
- Nanda I, Volff JN, Weis S et al. (2000) Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* **109**: 173–180.
- Nei M, Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**: 418–426.
- Odierna G, Aprea G, Capriglion T, Castellano S, Balletto E (2004) Evidence for chromosome and Pst I satellite DNA family evolutionary stasis in the *Bufo viridis* group (Amphibia, Anura). *Chromosome Res* **12**: 671–681.
- Owens G Jr, Wiley JE (2001) Cloning of the 18S rDNA gene, an internal transcribed spacer, and the 5' region of the 28S rDNA gene of Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Cytogenet Cell Genet* **92**: 111–115.
- Phillips RB, Reed KM (2000) Localization of repetitive DNAs to zebrafish (*Danio rerio*) chromosomes by fluorescence *in-situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res* **8**: 27–35.
- Phillips RB, Zimmerman A, Noakes MA et al. (2003) Physical and genetic mapping of the rainbow trout major histocompatibility regions: evidence for duplication of the class I region. *Immunogenetics* **55**: 561–569.
- Picariello O, Feliciello I, Bellinello R, Chinali G (2002) S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome* **45**: 63–70.
- Reed KM, Phillips RB (1995) Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma* **104**: 242–251.
- Schmid M, Steinlein C (1991) Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **101**: 123–132.
- Setoyama C, Joh T, Tsuzuki T, Shimada K (1988) Structural organization of the mouse cytosolic malate dehydrogenase gene: comparison with that of the mouse mitochondrial malate dehydrogenase gene. *J Mol Biol* **5**: 355–364.
- Sherman PA, Fyfe JA (1990) Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5119–5123.
- Stein J, Phillips RB, Devlin RH (2001) Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet Cell Genet* **92**: 108–110.
- Tymowska J, Fischberg M (1973) Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma* **44**: 335–342.
- Tymowska J, Kobel HR (1972) Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin), Pipidae. *Cytogenetics* **11**: 270–278.
- Wiley JE (2003) Replication banding and FISH analysis reveal the origin of the *Hyla femoralis* karyotype and XY/XX sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* **101**: 80–83.

**Localization of Mdh2 single copy gene on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA technique**

Vladimir Krylov, Tereza Tlapakova, Jaroslav Macha

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Physiology and Developmental Biology

Running title: Mdh2 on *Xenopus tropicalis* chromosomes

Corresponding author:

Dr. Vladimir Krylov, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Physiology and Developmental Biology, Vinicna 7, 128 43, Prague 2, Czech Republic.

Phone: +420-221951773, fax: +420-221951773; e-mail: vkrylov@natur.cuni.cz

**Abstract.** A single copy gene, mitochondrial malate dehydrogenase 2 (Mdh2), was localized on *Xenopus tropicalis* chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification step (FISH-TSA). The respective cDNA was cloned and sequenced. Labelled probe hybridized with subcentromeric region of long arms of homologous chromosomes 3. Results of comparison of the gene localization with previously mapped *X. laevis* paralogs strongly suggest common evolutionary origin of all three chromosomes. This is the first time that a single copy gene has been visualized on *X. tropicalis* chromosomes. FISH-TSA method gives a strong signal already with 1 kb labelled probe.

## 1. Introduction

*Xenopus tropicalis*, one of the leading organisms in the study of developmental processes, has recently been adopted for research in genetics and functional genomics. Its diploid genome, unlike that of allotetraploid *Xenopus laevis*, is suitable for sequencing. Reading of *X. tropicalis* genome has already been accomplished by DOE Joint Genome Institute. Sequences are organized in scaffolds and their size varies from 0,5 to 8 million of base pairs. There is a collection of genomic methods for *X. tropicalis*, including chemical and insertional mutagenesis, gynogenesis, and transgenic techniques. However, *X. tropicalis* cytogenetics is still in its infancy. The conventionally stained mitotic karyotype can be divided into 10 chromosome pairs by analyzing the p/q arms ratio (Tymowska, 1973). Localization of two paralogous Mdh2 genes in *X. laevis* was published previously (Tlapakova *et al.*, 2005). Here, we demonstrate the application of this method on *Xenopus tropicalis*. Selecting the orthologous gene (Mdh2) allows for comparison of chromosomal position of Mdh2 in both species with respect to the evolutionary duplication event. Knowledge of chromosomal positions of *X. tropicalis* genes can facilitate ordering of scaffolds and construction of linkage maps.



## 2. Material and methods

The design of primers for RT PCR was based on EST's of *X. tropicalis* with high similarity to *X. laevis* Mdh2 paralogs. Amplified DNA from liver RNA was cloned using TOPO TA and TOPO XL PCR cloning kits (Invitrogene). Sequencing was done by AGOWA (Berlin, Germany).

Localization of Mdh2 gene was carried out by means of normal adult frogs splenocytes. Animals were injected with 20 µg/g (w/w) of colchicine into their lymphatic sac 4 hours prior to decapitation. Spleen cells were hypotonized, fixed, and dropped onto microscopic slides as described in Courtet *et al.* (2001). After drying out, 15 min treatment with pepsin (50 µg/ml in 0,01N HCl at 37°C) was applied followed by post fixation with 2% paraformaldehyde (30 min at room temperature). Slides were stored in 70% ethanol at 4°C for about one month. cDNA for Mdh2 probe was obtained by RT-PCR from *X. tropicalis* liver RNA with the following primers: forward primer: 5' CGGCTCTGAGCTCGTG 3', reverse primer: 5' TTCTTGGAAGAATCACGGTGG 3'. Digoxigenin labelling of 1 mg of cDNA was done with DecaLabel DNA Labeling Kit (Fermentas) following manufacturer's instructions. Labelled probe was purified on a column of QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) in a final volume of 50 µl. FISH combined with tyramide amplification was described previously (Krylov *et al.*, 2003). Briefly, slides were equilibrated with PBS (136 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Endogenous peroxidase was inactivated by 30 min incubation in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After dehydrating in three baths of 70%, 90% and 100% methanol, chromosomes, and 2 µl of labelled probe were denatured in 50 µl of simplified hybridization mixture (50% deionised formamide, 300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0). For better preservation of the chromosomal structure, denaturation was performed for 5 min at 80°C instead of 95°C. Following that, hybridization was carried out at 37°C for 12-16 h. Slides were then washed three times for 5 min each in 50% formamide, 2 x SSC (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0) at

42°C, three times for 5 min each in 2 x SSC at room temperature and 5 min in TNT (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) at room temperature. Blocking of slides, followed by incubation with antibody diluted by 1:1000 (anti-digoxigenin-POD, Fab fragment, 150 U, Roche,) was carried out with TNB buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Blocking Reagent, Boehringer Mannheim, Germany) for 30 and 60 min. Slides were then three times washed in TNT buffer. Tyramide amplification step was done according to the instructions of the manufacturer (TSA Plus Fluorescence System kit with a fluorescein derivative, Perkin Elmer). Final triple washing in TNT was followed by mounting and counterstaining of slides.

Chromosome identification was done in accordance with Tymowska (1973) based on the relative length and p/q arms ratio.

### 3. Results

Coding sequence of *X. tropicalis* Mdh2 gene was cloned and sequenced. It was uploaded and published in the GenBank database under access number AY842260. In Fig. 1 enzyme sequence obtained by conceptual translation of *X. tropicalis* Mdh2 is aligned with *X. laevis* paralogous proteins, revealing 95% identity and 97% similarity without any gaps. Mitoprot program (Claros and Vincens, 1996) predicts protein export to mitochondria with 0.9918 probability and cleavage of signal sequence.

FISH-TSA experiments on splenocytes from adult frogs show localization of Mdh2 gene on the subcentromeric region of long arms of homologous chromosomes 3 (Fig. 2). Signal position was evaluated on 128 mitosis. 65% of those bore the specific signal. The remaining mitosis did not show any chromosome staining. Number of chromosomes in each mitosis corresponded to the euploid karyotype ( $2n = 20$ ).

#### 4. Discussion

Extensive similarity of *X. laevis* and *X. tropicalis* sequences, conservation of amino acid residues in the enzyme active site and presence of mitochondrial export signal indicate that Mdh2 encodes mitochondrial malate dehydrogenase 2. The evolutionary relationship of Mdh2 genes was discussed elsewhere (Tlapakova *et al.*, 2005). Until now, chromosomal localizations in genus *Xenopus* were restricted only to *X. laevis*. Courtet *et al.* (2001) described the first mapping of selected MHC and Ig genes into *Xenopus* chromosomes. Their technique was able to detect loci when at least three adjacent copies of the gene were present. The use of one-layer method of tyramide amplification allowed the detection of c-src gene (Krylov *et al.*, 2003) and made it possible to differentiate between two paralogous Mdh2 genes in the same species (Tlapakova *et al.*, 2005). Signal positions of *X. laevis* and *X. tropicalis* Mdh2 genes and morphology of the respective chromosomes are very similar. In an analysis of *X. laevis* tetraploid genome (Schmidt and Steinlein, 1991) chromosomes 3 and 8 form quartet, which together with localization experiment on *X. tropicalis*, indicates common origin of all three chromosomes.

Sequencing of *X. tropicalis* genome produced many readings ordered in scaffolds. Localization of genes by FISH-TSA technique allows matching scaffolds to a particular chromosome and permits control of scaffold contiguity. DOE Joint Genome Institute database survey revealed that Mdh2 gene is positioned in scaffold 72. Data concerning chromosomal position of various genes in *X. laevis* and *X. tropicalis* could also be used in the evolutionary studies of syntenic groups with respect to genome duplication event in amphibians and contribute to the research of gene families shaping in higher vertebrates.

## Acknowledgements

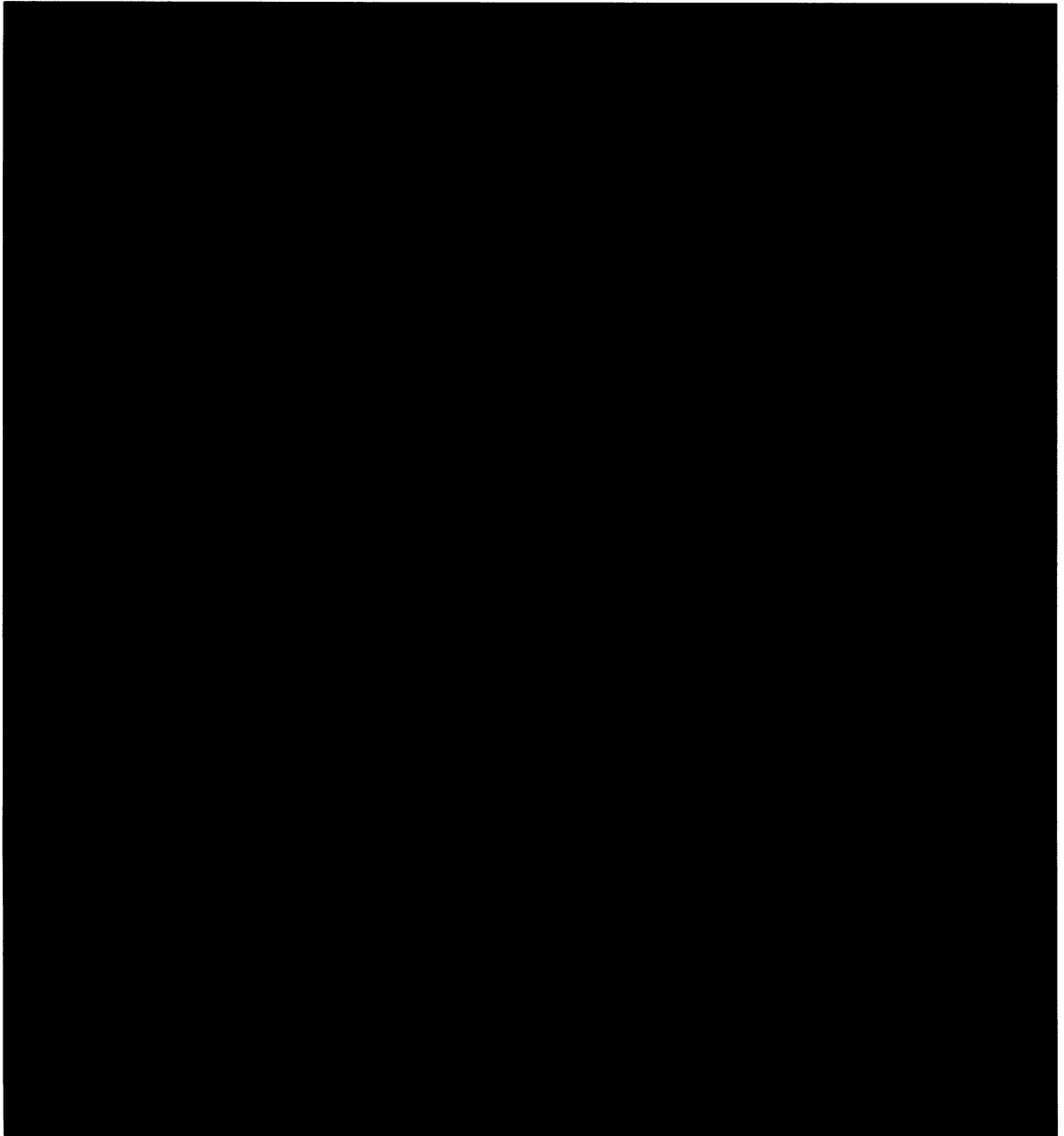
This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No.: 304/01/1125) and by the Ministry of Education of the Czech Republic (Grant No.: MSM113100003).

## References

- Claros MG, Vincens P: Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779-786 (1996).  
<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>
- Courtet M, Flajnik M, Du Pasquier L: Major histocompatibility complex and immunoglobulin loci visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus* chromosomes. *Dev Comp Immunol* 25:149-157 (2001).
- Krylov V, Macha J, Tlapakova T, Takac M, Jonak J: The c-SRC1 gene visualized by *in situ* hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 103:169-172 (2003).
- Schmid M, Steinlein C: Chromosome banding in *Amphibia*. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* 101:123-132 (1991).
- Tlapakova T, Krylov V, Macha J: Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. *Chromosome Res* 13:699-706 (2005).
- Tymowska J: Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* Gray, *Pipidae*. *Cytogenet Cell Genet* 12: 297-304 (1973).

	10	20	30	40	50	60
<i>X. tropicalis</i>	MFSRIARPAS	HGLIRGLSTT	AQANARVAVL	GASGGIGOPL	SLLLKNSPLI	SNLTYDIAH
<i>X. laevis a</i>	.....A	.....	.....T..	.....	.....	...A...
<i>X. laevis b</i>	.....A	.....	.....	.....	.....	...A...
	70	80	90	100	110	120
<i>X. tropicalis</i>	TPGVAADLSH	IETRAKVTGY	LGAEQLPESL	KGADVVPVPA	GVPKPGMTR	DDLEFTNASI
<i>X. laevis a</i>	.....	.....	.....S	.....	.....	...N....
<i>X. laevis b</i>	.....	.....	.....	.....	.....	...N....
	130	140	150	160	170	180
<i>X. tropicalis</i>	VATLTEACAK	HCPEAMICII	SNPVNSTIPI	TSEVEFKKHGV	YNPNHIFGVT	TLDIVRANTF
<i>X. laevis a</i>	.....D....	.....	.....	.....	...R....	...N....
<i>X. laevis b</i>	.....	.....A	.....	.....	...R....	...N....
	190	200	210	220	230	240
<i>X. tropicalis</i>	VVELKGLDPA	RVNVPVVGGH	AGKTIIPPLIS	QSTPKVEFPQ	DQLEALIPRI	QDAGTEVVKA
<i>X. laevis a</i>	.....	.....I..	.....	.....	...V..G..	..E.....
<i>X. laevis b</i>	.....	.....I..	.....	.....	...AV..G..	..E.....
	250	260	270	280	290	300
<i>X. tropicalis</i>	KAGAGSATLS	MAYAGARFVF	SLLDAMNGKE	GVIECSFVRS	EETESPYFST	PLLLGKNGIE
<i>X. laevis a</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>X. laevis b</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	310	320	330			
<i>X. tropicalis</i>	KNLGLGKLT	A FEEKLVSEAM	GELKASIKKG	EDFIKSRK		
<i>X. laevis a</i>	.....	Y.....	A...G.....	.E.....		
<i>X. laevis b</i>	.....	Y....I....	A...G.....	.E...N..		

Fig. 1 Amino acid sequence homology of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenases. White characters on black background mark amino acid residues from the enzyme active centre.



**Fig. 2** Localization of Mdh2 gene on *Xenopus tropicalis* chromosomes.