

“Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena evidence vypůjčovateli.”

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie

ANALÝZA EXPRESE GENŮ ŽAHAVCE
TRIPEDALIA CYSTOPHORA

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE
CNIDARIAN *TRIPEDALIA CYSTOPHORA*

Veronika Gabanová

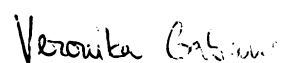


Praha 2008

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Zbyněk Kozmík, CSc.**

Prohlašuji, že práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce RNDr. Zbyňka Kozmíka, Csc.

V Praze dne 1. 9. 2008



Veronika Gabanová

Děkuji vedoucímu své diplomové práce RNDr. Zbyňkovi Kozmíkovi, CSc. za odborné a trpělivé vedení práce a také všem spolupracovníkům oddělení transkripční regulace, především Mgr. Kristýně Jonášové a Veronice Noskové, za rady a vytvoření příjemného prostředí k řešení diplomové práce. Děkuji RNDr. Čestmíru Vlčkovi, CSc. a Ing. Hynku Strnadovi za pomoc při sekvenování cDNA a odborné rady v bioinformatice.

Dále bych chtěla poděkovat všem mým blízkým a přátelům za pochopení a podporu během studií, především Mgr. Davidu Chládkovi.

Práce vznikla za finanční podpory grantu 1M6837805002 Centra pro aplikovanou genomiku v letech 2006 – 2007.

1. Abstrakt

Gene expression analysis of the cnidarian *Tripedalia cystophora*

In terms of understanding the evolution of metazoan genetic and developmental complexity, the *Cnidaria* are likely to be critically important, as this phylum is regarded as the sister group to the *Bilateria*. To obtain a broader perspective on patterns of gene evolution, we conducted a limited EST analysis on the jellyfish *Tripedalia cystophora* (class *Cubozoa*).

EST library was prepared from the planula larva stage RNA. From 342 characterized ESTs, 44% match human sequences much more strongly than they do to any *Drosophila* or *Caenorhabditis* sequence. Mentioned fact confirms gene conservation between *Cnidaria* and *Vertebrata*. More than 14% of the jellyfish EST with strong metazoan matches to the databases had clear human homologs but were not represented in the *Drosophila* or *Caenorhabditis* genomes. Gene loss has thus been much more extensive in these model invertebrate lineages. We have also determined the expression of several interesting genes using RNA *in situ* hybridization. We determined the expression of *like-glycosyltransferase*, *pirin* and *cyclin I*, genes that were lost in insects and nematodes but were conserved among jellyfish and vertebrates. The complexity of the *Tripedalia* genome is paradoxical, given that this organism contains apparently few tissue types.

Key words: *Cnidaria*, expressed sequence tag, gene set conservation, gene loss, evolution, expression

Analýza exprese genů žahavce *Tripedalia cystophora*

Tato práce je zaměřena na analýzu genů čtyřhranky *Tripedalia cystophora* (třída *Cubozoa*), zástupce mořských žahavců. Žahavci představují sesterskou skupinu *Bilateria* a jsou to právě tito bezobratlí, kteří ve svých genomech zachovali mnoho genů, které byly jinými liniemi živočichů ztraceny, ale které jsou zachovány v genomech obratlovců (*Vertebrata*).

EST knihovna byla připravena z RNA izolované z larev *Tripedalia cystophora*. Celkem se podařilo charakterizovat 342 EST. 44% z nich vykazovalo vyšší míru podobnosti k člověku než k octomilce či háďátku, což potvrdilo genovou konzervaci mezi medúzou a obratlovcí. U 14% EST s homologií k obratlovcům nebyla nalezena homologie k sekvencím octomilky či háďátka. Genová ztráta vedoucí k těmto vývojovým liniím musela být tedy rozsáhlá. Dále jsme pomocí metody RNA *in situ* hybridizace vizualizovali přítomnost právě těchto „ztracených“ genů a to *like - glycosyltransferase*, *cyclin I* a *pirin*. Komplexita genomu *Tripedalia cystophora* je paradoxní, pokud vezmeme v úvahu, že jejich tělo je tvořeno pouze několika typy tkání.

Klíčová slova: žahavec, sekvence s expresní adresou, konzervace genových sad, genová ztráta, evoluce, exprese

2. Obsah

1. Abstrakt.....	4
2. Obsah.....	6
3. Zkratky.....	8
4. Úvod.....	9
5. Přehled literatury.....	10
5.1. Význam žahavců pro studium evoluce genů.....	10
5.2. <i>Tripedalia cystophora</i> – modelový organizmus.....	14
5.2.1. Životní cyklus.....	14
5.2.2. Stádium larvy.....	15
5.2.3. Stádium medúzy.....	19
5.2.4. Rhopalium.....	20
5.3. Současný stav genomiky.....	24
5.4. Současný stav bioinformatiky.....	27
6. Materiál a metody.....	29
6.1. Materiál.....	29
6.2. Základní roztoky a média.....	30
6.3. Metody.....	31
6.3.1. Kultivace <i>Tripedalia cystophora</i>	31
6.3.2. Fixace larev a dospělců <i>Tripedalia cystophora</i>	31
6.3.3. Kultivace <i>Artemis salina</i>	32
6.3.4. Izolace RNA.....	32
6.3.5. Syntéza cDNA.....	33
6.3.6. Amplifikace cDNA metodou LD PCR.....	34
6.3.7. Purifikace PCR produktů.....	35
6.3.8. Restrikční štěpení.....	35
6.3.9. Defosforylace vektoru.....	36
6.3.10. Ligace plazmid – inzert.....	36
6.3.11. Transformace vektoru do buněk.....	37
6.3.12. Izolace plazmidové DNA – alkalická miniprep.....	37
6.3.13. Izolace plazmidové DNA – maxiprep.....	38
6.3.14. Izolace nukleových kyselin z agarózového gelu.....	39

6.3.15.	Stanovení koncentrace nukleových kyselin na spektrofotometru.....	40
6.3.16.	Gelová elektroforéza.....	40
6.3.17.	Příprava plazmidu pro syntézu próby na <i>in situ</i> hybridizaci.....	41
6.3.18.	Syntéza próby na RNA <i>in situ</i> hybridizaci.....	42
6.3.19.	RNA <i>in situ</i> hybridizace na celých jedincích.....	42
6.3.20.	Analýza EST.....	45
6.3.21.	Statistické zpracování výsledků.....	48
7.	Výsledky.....	49
7.1.	Příprava cDNA knihovny.....	49
7.2.	Analýza genů.....	51
7.3.	Studium exprese genů.....	64
8.	Diskuze.....	67
9.	Souhrn.....	71
10.	Seznam citované literatury.....	72

3. Zkratky

A.m. - *Acropora millepora*

AK – aminokyselina

C.e. - *Caenorhabditis elegans*

cDNA - komplementární DNA

CNS - centrální nervová soustava

D.m. - *Drosophila melanogaster*

dH₂O – destilovaná voda

DIG – dioxigenin

Dpp - decapentaplegic

EL – elongační faktor

EST - expressed sequence tag – část kódující sekvence genu

EtBr – ethidiumbromid

EtOH - ethanol

GO – genová ontologie

IPA – isopropanol

LD PCR – long distance PCR

P.c. - *Podocoryne carnea*

PFA - paraformaldehyd

T.c. - *Tripedalia cystophora*

TF - transkripční faktor

4. Úvod

Naše poznatky o evoluci genů mnohobuněčných živočichů jsou založeny jen na malém množství kompletních genomových sekvencí a rozsáhlých EST databází. Tyto databáze však reprezentují jen několik málo modelových organismů. Již z tohoto důvodu je nezbytné genomové i EST databáze neustále obohacovat o nová data, což bylo také jedním z cílů této diplomové práce.

Studie evoluce genů odhalily některé velkolepé konzervace genových sad a to především mezi octomilkou a obratlovci. Pokud se však jistý obratlovčí gen (tedy jeho homolog) v genomu tradičních modelových organismů nenalezl, byl obvykle (a často mylně) považován za „evoluční novinku“. V současnosti se stali důležitým modelem pro studium evoluce genů žahavci (*Cnidaria*). Žahavci představují vývojovou větev, která se od ostatních živočichů vydělila ještě před divergencí *Bilateria*. Jsou to právě tyto bezobratlí, u kterých bylo nalezeno mnoho homologů genů, které byly do té doby považovány za striktně obratlovčí geny. Nyní se zdá, že žahavčí geny mají často blíže genům obratlovců než bezobratlých. Díky žahavcům byly v poslední době učiněny úchvatné objevy, například u nich byly popsány *pax* geny (KOZMIK *et al.* 2003). Námi zvolený modelový organizmus *Tripedalia cystophora* je unikátním zástupcem mořských žahavců třídy *Cubozoa* (čtyřhranky). Pro naši laboratoř (RNDr. Zbyněk Kozmík, CSc., Oddělení transkripční regulace, UMG, AV ČR) slouží především ke studiu vývoje očí.

Cílem této práce bylo vytvořit EST knihovnu z larev *Tripedalia cystophora* a analyzovat jednotlivé geny. S úvahou o genové konzervaci žahavců a obratlovců porovnat míru podobnosti jednotlivých sekvencí genů *T.c.* s dostupnými sekvencemi vybraných modelových organismů včetně člověka. V souvislosti s genovými ztrátami u linií vedoucích k některým bezobratlým (KORTCHAK *et al.* 2003) určit procento a charakter genů, které jsou mezi *T.c.* a obratlovci konzervovány, ale chybí u octomilky a háďátka. Dalším pokusem jsme chtěli zjistit, zda jsou tyto geny v genomu *T.c.* pouze přítomny či zda jsou medúzou opravdu využívány, tedy alespoň v minimální míře transkribovány a to se smysluplným vzorem exprese. Dále jsme se pokusili popsat celkový charakter exprimovaných genů.

5. Přehled literatury

5.1 Význam žahavců pro studium evoluce genů

Představa o fylogenezi žahavců se v průběhu 20. století velice měnila. S příchodem nových molekulárních metod, především možnosti sekvenace DNA, došlo k reorganizaci fylogenetických vztahů jednolivých skupin i jejich zástupců. V současné době se žahavci dělí na třídy *Hydrozoa* (polypovci), *Cubozoa* (čtyřhranky), *Scyphozoa* (medúzy), *Anthozoa* (korálnatci) a nově i *Staurozoa* (kalichovky), dříve řazené k medúzovcům (MARQUES a COLLINS 2004). Na základě srovnání morfologických znaků a molekulárních poznatků, především díky přítomnosti kruhové mitochondriální DNA, se nyní *Anthozoa* pokládají za bazální skupinu kmene žahavců (BRIDGE *et al.* 1992, 1995). To potvrzuje i analýza sekvencí (3300 bp) 28S ribozomální DNA (rDNA) a 18S rDNA (COLLINS 2002, COLLINS *et al.* 2006). Naopak třída *Cubozoa*, mezi kterou patří i námi studovaná *Tripedalia cystophora*, se považuje za odvozenější skupinu a spolu s medúzovci jsou pravděpodobně sesterskými skupinami polypovců (COLLINS *et al.* 2006).

Žahavci jsou řazeni mezi Diblastika, organizmy, jejichž tělo je tvořeno tkáněmi ektodermálního a endodermálního původu. Přítomnost třetího zárodečného listu, mezodermu, pak tradičně charakterizuje vyšší živočichy, Triblastika. Tělní stavba žahavců je tedy velmi jednoduchá, často připomínající stádium gastruly. Dalším znakem oddělujícím žahavce od vyšších mnohobuněčných je pouze jedna osa souměrnosti (Radiata) místo dvou, vymežujících Bilateria. I přes jednoduchost tělní stavby však mají žahavci komplexní genom a čím více toho víme o jejich genové regulaci, tím více je zřejmé, že vykazují vysoký stupeň komplexity a překvapivé podobnosti s vyššími živočichy. Poslední roky jsou proto érou aktivního klonování evolučně konzervativních genů z různých druhů žahavců a dokonce i ještě primitivnějších kmenů hub (*Porifera*) (HOSHIYAMA *et al.* 1998) a vložkovců (*Placozoa*) (HADRYIS *et al.* 2005). Některé geny či skupiny genů se během vývoje živočichů ztratily (chybí u některých vývojových větví), celkově však organizmy sdílí překvapující množství genů (GALLIOT a SCHMID 2002, KORTSCHAK *et al.* 2003). Některé mají u primitivních a vyšších organismů podobnou funkci. Například místo exprese genu *snail* korálu *Acropora*

millepora je velice podobné jeho protějšku u octomilky či myši a tyto geny mají i podobnou funkci (HAYWARD *et al.* 2004). Naproti tomu některé geny mohou u různých organismů vykazovat různé funkce. Příkladem je gen *otx* hydromedúzky *Podocoryne carnea* a jeho homology u obratlovců (MÜLLER *et al.* 1999).

Předpoklady o evoluci lidského genomu a genomu obratlovců se dlouhou dobu zakládaly na porovnání genových sekvencí tradičních modelových organismů, jako je *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* či *Schizosaccharomyces pombe*. Mnoho genů obratlovců se u uvedených organismů nenalezlo, proto byly považovány za evoluční novinky. Až s pokrokem v sekvenování genomu žahavců (a jiných nižších živočichů) a především díky obsáhlým EST (Expressed Sequence Tag) knihovnám se zjistilo, že mnoho těchto genů (novinek) je u žahavců přítomno, jsou aktivní a mnohdy mají i velmi podobné funkce. Kortschak a kolektiv vytvořili rozsáhlou EST knihovnu korálu *Acropora millepora* (třída *Anthozoa*) (KORTSCHAK *et al.* 2003). Ze studie vyplynulo, že více než 10% EST *A.m.* s homologními sekvencemi u mnohobuněčných má velmi podobné lidské homology, ale není přítomno v genomech octomilky či háďátka. Jedná se především o transkripční faktory a komponenty metabolických drah dříve považované za obratlovčí novinky. Dalším srovnáním zjistili, že velké množství sekvencí s expresní adresou *A.m.* vykazuje větší stupeň homologie k jejich protějškům u člověka než u octomilky a háďátka. Genová ztráta u vývojových linií vedoucích k těmto modelovým organismům musela být tedy mnohem větší, než se dříve předpokládalo. Podobné výsledky jsou k dispozici i po porovnání genů *Nematostella vectensis* (SULLIVAN *et al.* 2006) či *Cyanea capillata* (YANG *et al.* 2003). Nedávno publikovaná práce Zimka a Webera dokonce ukazuje konzervaci pozice intronů homologu genu pro lamin B1 *Nematostella vectensis* v porovnání s lidským. Naproti tomu ukazují naprosto odlišnou organizaci homologů laminu B1 u octomilky či háďátka (ZIMEK a WEBER 2008).

Žahavci se stali důležitým modelem pro studium vzniku a evoluce mnoha genů. V současnosti se vědci například intenzivně zabývají otázkou vývoje mezodermu. I zde je genová konzervace od žahavců k obratlovcům zjevná. U vyšších živočichů je jen malá hranice mezi gastrulací a formováním mezodermu. Někteří autoři dokonce gastrulaci definují jako proces, při kterém je mezoderm formován. Genetický mechanismus gastrulace je nejasný, předpokládá se účast *brachyury* a *wnt*. U octomilky jsou klíčovými geny pro diferenciaci mezodermu *twist* a *snail*, u obratlovců pak jejich homology. Hlavním derivátem mezodermu je sval. Žahavci mezoderm postrádají,

mnoho medúz má však svalovinu strukturně i molekulárně podobnou příčně pruhovanému svalu. Tato svalovina vzniká z entokodonu, vrstvy buněk, separujících se z ekto- i endodermu během vývoje medúzy (SEIPEL a SCHMID 2006). V průběhu vývoje hydromedúzky *Podocoryne carnea* (vzniká proliferací a dediferenciací buněk polypa, pučením) dochází k expresi genu *twist* s HLH (helix - loop - helix) motivem v oblasti entokodonu, ještě před jeho diferenciací ve sval (SPRING *et al.* 2000). Myogeneze *P.c.* se účastní i mnoho jiných genů s HLH motivem, majících obdobnou funkci u vyšších organizmů. Původní role těchto genů byla pravděpodobně regulace proliferace, adheze a motility buněk, tedy procesy nezbytné pro život všech mnohobuněčných (TECHNAU a SCHOLZ 2003). Zdá se, že regulace diferenciaci mezodermu medúz na molekulární úrovni zrcadlí vznik mezodermu a jeho diferenciaci ve sval u vyšších živočichů. Alternativní interpretací je (za předpokladu, že medúza odpovídá původnímu tělnímu plánu žahavců), že formování entokodonu může představovat formu zpožděné gastrulace (SPRING *et al.* 2000). Dalo by se předpokládat, že molekulární mechanismy diferenciaci mezodermu používali již společní předchůdci žahavců a vyšších živočichů, *Urbilateria* (BALL *et al.* 2004). Tato otázka si však žádá další studie.

Jiným příkladem, kde žahavci hrají nezbytnou úlohu při studiu evoluce genů, je otázka vývoje dorzo - ventrální (DV) osy bilaterálních živočichů. Hlavním determinantem DV osy je u octomilky gen *dpp*, u obratlovců známý jako *Bmp4* (DPP/BMP4 je člen TGF- β nadrodiny). K vývoji nervové trubice může dojít pouze tehdy, když je tento *dpp/Bmp4* inhibován. Antagonistou proteinu DPP je Short gastrulation, který je exprimovaný ventrálně a řídí vývoj neuroektodermu. U obratlovců má podobnou funkci dorzálně exprimovaný *Chordin*. Neuroektoderm se zakládá podél DV osy za účasti těchto a mnoha jiných homeoboxových genů. Pomocí *in situ* hybridizace byla u morfologicky radiálně symetrického embrya *A.m.* identifikovaná bilaterální exprese genu blízce příbuzného *dpp/Bmp4* (HAYWARD *et al.* 2002). Dále byly nalezeny geny příbuzné homeoboxovým genům *vnd*, *ind* a *msh*, regulujícím u octomilky formování neuroektodermu (HAYWARD *et al.* 2001). Jeden z těchto genů, *cnos-2Am*, je během vývoje korálu transkribován v místech budoucích neuronů, podél oral - aboral (OA) osy. Jeho homolog u octomilky, *intermediate neuroblast defective* (*Gsh1/2* obratlovců), je transkribován v CNS podél DV osy. Je třeba dalších informací, ale již současné poznatky poukazují na podobnosti mezi formováním OA osy žahavců a DV osy vyšších mnohobuněčných (BALL *et al.* 2004).

Dlouhou dobu byli biologové přesvědčeni, že se různé typy očí vyvinuly nezávisle na sobě. Například velmi podobná stavba oka savců a hlavonožců byla uváděna jako učebnicová ukázka konvergentního vývoje, při němž se vyvinuly velmi podobné struktury očí nezávisle na sobě. Salwini-Plawen a Mayr porovnali morfologii jednotlivých typů očí, jejich embryonální původ, typy fotoreceptorů a další znaky a usoudili, že se oči musely vyvinout ne jednou, ale nejméně čtyřicetkrát (SALWINI-PLAWEN a MAYR 1977). Tato teorie (polyfyletický původ očí) byla zpochybněna až s nástupem molekulárních metod, především objevením *pax* genů. U obratlovců a octomilky je hlavním regulátorem vývoje oka *pax6* (HALDER *et al.* 1995), který byl dříve dokonce považovaný za tzv. *master control gene* očního vývoje (GEHRING a IKEO 1999). Nyní je však zřejmé, že je tento gen komplementován řadou jiných očí specifikujících genů a že vývoj oka je primárně spouštěn i zcela jinými mechanismy.

Připomeňme si, že *pax* geny kódují tkáňově specifické transkripční faktory, které charakterizuje přítomnost evolučně konzervované DNA vázající párové domény (PD). Dále mohou kódovat i druhou DNA vazebnou regulační doménu, homeodoménu, či oktapeptid. *Pax* geny nalezneme u širokého spektra živočichů, bez ohledu na jejich vývojový stupeň. Mají nezastupitelnou úlohu jak ve vývoji primitivních organizmů s absencí nervových buněk a sensorických orgánů (např. vložkovec *Trichoplax adhaerens*, HADRYŠ *et al.*, 2005) tak v ontogenezi mnohem složitějších živočichů. Osm *pax* genů bylo popsáno u octomilky (FRIGERIO *et al.* 1986), devět u savců (STAPLETON *et al.* 1993). *Pax* geny regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Účastní se vývoje orgánových soustav, především nervové soustavy (*pax6*), svalové soustavy (*pax7*), imunitního systému (*pax5*) a vývoje sensorických orgánů (*pax2*, *pax6*).

Homology *pax* genů byly izolovány ze zástupců téměř všech tříd žahavců (*Cladonema californicum* - Hydrozoa, *Chrysaora quinquecirrha* - Scyphozoa, *Acropora millepora* - Anthozoa, *T.c.* - Cubozoa; SUN *et al.* 1997, 2001, MILLER *et al.* 2000, KOZMIK *et al.* 2003), přímé homology *pax6* se však nenalezly (předpokládá se tedy, že k jejich diverzifikaci došlo až po oddělení vývojové linie žahavců). U námi studované čtyřhranky *T.c.* byl doposud nalezen jediný *pax* gen, který je označován jako *paxB* (KOZMIK *et al.* 2003). Odhalením kompletní struktury bylo zjištěno, že představuje funkční hybrid mezi *pax2* a *pax6* (PD a oktapeptid typu *pax2*, homeodoména typu *pax6*). Jak bylo dříve zmíněno, *pax2* a *pax6* jsou geny specifikující oči u obratlovců a *Tripedalia* má oči obratlovcům morfologicky velmi podobné. Vztah k vývoji sensorických orgánů naznačují i oblasti exprese tohoto genu, soustředující se do larvy,

čočky, retiny a gastrovaskulární dutiny rhopalia (KOZMIK *et al.* 2003). Pro srovnání, exprese *paxB* polypovce *Podocoryne carnea*, žahavce nedisponujícího zrakovými orgány, je soustředěna do ektodermu planuly a endodermu vyvíjející se medúzy. *PaxB* zde reguluje diferenciaci nervových buněk (GROGER *et al.* 2000). Monofyletickou teorii původu očí dále podporuje fakt, že všichni mnohobuněční sdílejí různé varianty jediného proteinu, opsinu (TERAKITA 2005).

5.2 *Tripedalia cystophora* – modelový organizmus

Tripedalia cystophora, čtyřhranka trojitá, je drobná medúzka patřící do třídy *Cubozoa*. Ty jako smostatnou třídu poprvé definoval (WERNER 1975). Od medúzovců je oddělil především díky rozdílům v životním cyklu (medúza čtyřhranek vzniká kompletní metamorfózou polypa, což je mezi žahavci naprosto unikátní) a v morfologii polypa (láčka polypa postrádá přepážky). K čtyřhrankám patří pouze jeden řád *Cubomedusae* a dvě čeledi *Carybdeidae* a *Chirodropidae*. *T.c.* patří do čeledi *Carybdeidae*. Jejím nejbližším příbuzným je *Tripedalia binata*.

T.c. jako první popsal roku 1897 americký vědec F. S. Conant. *T.c.* není typickým zástupcem čtyřhranek už jen pro méně znatelný čtyřhranný tvar těla. Jedná se o malou, přibližně 1,5 cm dorůstající a zcela neškodnou medúzku, živící se drobnými korýši. Nejvíce se jí daří v mangrovníkových porostech tropického či subtropického pásma, nalezena byla např. v okolí Puerto Rica a Jamajky (COATES 2003).

5.2.1 Životní cyklus

T.c. je gonochorista s pohlavním dimorfismem. Samička bývá vždy o něco větší než sameček. Na první pohled ji poznáme podle mohutných žlutohnědých gonád umístěných po párech podél pomyslných hran zvonu. V období rozmnožování je navíc většina jejího těla vyplněna vajíčky a posléze vyvíjejícími se larvami. Sameček má gonády podstatně menší, nezasahují k okraji zvonu. Morfologické rozdíly nalezneme i ve tvaru chapadel. Oplodnění je vnitřní, samec předává samici sbalené spermie v podobě spermatoforu, embryo se vyvíjí v tělních dutinách samice. Nejprve vzniká malá nepohyblivá a nepigmentovaná larva, nazývaná planula, na jejímž posteriorním konci těla se později objevují jednoduché jednobuněčné oči (*ocelli*). Dospělá planula

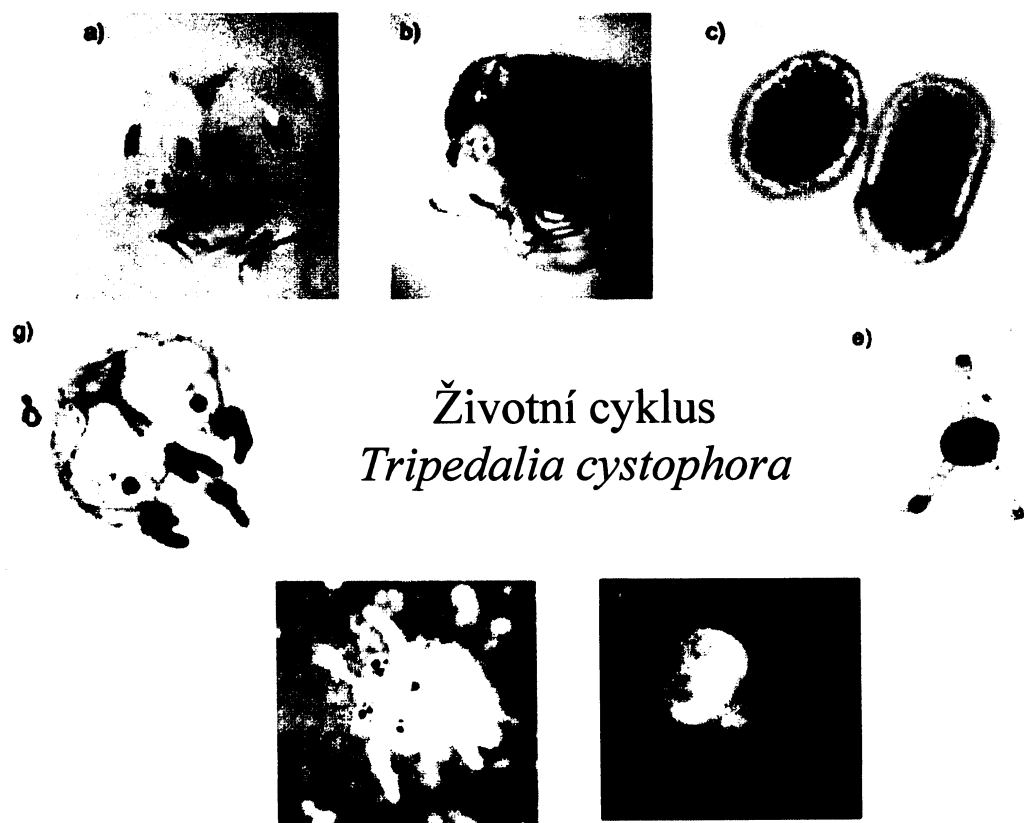
schopná samostatného pohybu je z těla samice uvolněna manumbriem (ústním otvorem), přisedá anteriorním pólem ke dnu a metamorfuje v polypa. Samice během vývoje larev nepřijímá potravu a po jejich vypuštění umírá (WERNER *et al.* 1971). Přisedlá larva prodělává sérii změn, při kterých *ocelli* migrují dovnitř těla a na volném konci (bývalý posteriorní konec larvy) pučí postupně několik chapadel. Vyvíjí se nožní terč, kterým je polyp ukotven ke dnu. V okolí terče je ektodermem vylučován nebuněčný obal, periderm. Polypové stadium představuje na rozdíl od stádia medúzy nepohlavní generaci. Noví polypi vznikají pučením při bázi těla mateřského jedince a jejich následným oddělením. Za vhodných podmínek polyp metamorfuje v medúzu. V tomto případě je možné na apikální části polypa pozorovat postupně se vytvářející čtyři laloky – tetraradiálně symetrickou strukturu. Na bázi zanikajících chapadel polypa vznikají čtyři rhopalia (struktury nesoucí zrakové orgány), mezi nimiž se formují budoucí ramena. Tato metamorfóza trvá přibližně deset dní. Nově metamorfovaná juvenilní medúzka (ephyra) má v průměru jen 1-2 mm. Od dospělé se liší délkou chapadel, která jsou kratší než je délka zvonu, chybí jí i nematocyty. Dospělá medúza produkuje vajíčka nebo spermie a celý cyklus se opakuje (STRAEHLER-POHL a JARMS 2005).

5.2.2 Stádium larvy

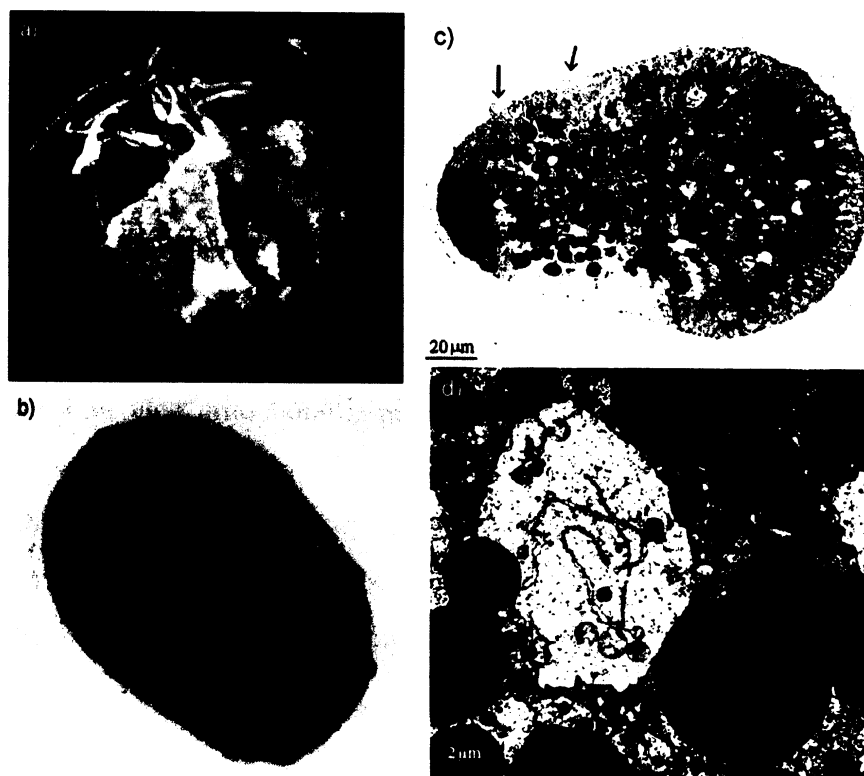
Vývoj larvy probíhá pod ochranou těla mateřského jedince. Oplodněné vajíčko se rýhuje a následným dělením vzniká zploštělá blastula. Jako u většiny žahavců následuje centrální oddělení horního a dolního ektodermu. Gastrulací se formuje druhý zárodečný list, endoderm (gastroderm). Postupně se vyvíjí jednoduchá larva hruškovitého tvaru (širší anteriorní část), která dorůstá do délky až 120 μm a šířky přibližně 80 μm . Volně plovoucí larva je z těla matky uvolněna manumbriem. Jejím cílem je najít vhodné stanoviště, kde přisedá a metamorfuje v polypa.

Povrch těla larvy tvoří jednovrstevný epitel tří typů buněk ektodermálního původu. Tyto buňky jsou okolo 2 μm široké a 12 μm dlouhé, na svém povrchu pokryty mikroklky. Vyznačují se velkým obsahem mitochondrií, lyzozomů a ribozomů, což poukazuje na jejich značnou metabolickou aktivitu. V největším množství jsou zde zastoupeny bičíkaté epitelové buňky. Mezi ně mohou být vmezeřeny menší nematocyty. Třetí typ nalezneme pouze v posteriorní části larvy. Jedná se o deset až patnáct fotoreceptivních buněk, zvaných *ocelli* (NORDSTRÖM *et al.* 2003).

Gastroderm tvoří dva morfologicky rozlišitelné typy buněk endodermálního původu. První typ je při použití TEM (Transmission Electron Microscopy) světlý, obsahuje mnoho ribozomů. Druhý typ je tmavý, jedná se o tzv. žloutkové buňky (yolk cells). Tyto žloutkové buňky obsahují až 4 μm velké elektrodenzní granule, které slouží jako energetická (tuková) zásobárna (NORDSTRÖM *et al.* 2003). Mezi ektodermem a entodermem nenalezneme mezogleu a na rozdíl od jiných larev žahavců, tyto postrádají i nervové buňky.



Obr. 1: Životní cyklus *Tripedalia cystophora*. (a) Samec, (b) samice, v jejímž těle je možné pozorovat vyvíjející se larvy, (c) larvy mající na svém posteriorním konci tmavé fotoreceptivní buňky, (d) vegetativní stádium polypa, (e) časný metamorfující polyp, (f) metamorfující polyp s jasně zřetelnou tetra radiálně symetrickou strukturou na apikálním konci, na fotografii vidíme tmavá rhopalia i vyvíjející se ramena medúzy, (g) juvenilní medúza.



Obr. 2: Larva *Tripedalia cystophora*. (a) Samice *T.c.* s larvami vyvíjejícími se v gastrálních kanálcích, (b) larva *T.c.* s dobře viditelnými fotoreceptory na posteriorní straně, (c) elektronmikroskopická fotografie poukazující na jednoduchou morfologii larvy, šipky znázorňují *ocelli*, (d) detail gastrodermu, (c) a (d) fotografie byly převzaty z (NORDSTRÖM *et al.* 2003).

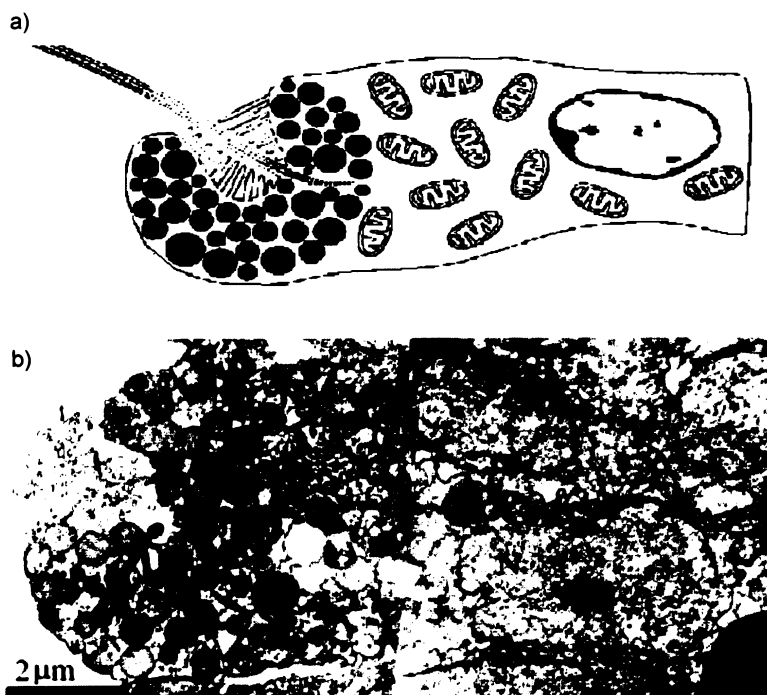
Ocellus

Na posteriorním konci larvy *T.c.* je rovnoměrně rozmístěno 10-15 světločivných buněk zvaných *ocelli*. Ty umožňují larvě nasměrovat její pohyb do oblastí s nižší intenzitou slunečního záření, kde přisedá a metamorfuje v polypa.

Každý *ocellus* je samostatný fotoreceptor, lišící se od ostatních epidermálních buněk nižším počtem ribozomů a velkým, lyzozomu podobným váčkem, který leží v blízkosti jádra. Charakteristický je vysoký obsah mitochondrií, poukazující na intenzivní metabolickou aktivitu těchto buněk (zdroj energie pro pohyby hlavního bičíku). Na konci fotoreceptoru komunikujícím s vnějším prostředím se nachází otevřená dutina o průměru 2 μm . Její stěny jsou vyplněny 3 μm silnou vrstvou pigmentových granulí, které tvoří pigmentový pohárek. Povrch dutiny je zvětšen mikroklyky, které představují místo vlastní fotorecepce. Takovéto uspořádání

fotoreceptoru se označuje jako rhabdomové a je typické pro bezobratlé živočichy. Bičík (*cilium*) vyčnívající z pigmentového pohárku ven má běžnou 9+2 strukturu mikrotubulů a je považován za hybný prvek buňky. Fotoreceptor je tedy schopen zachytit světlo a zároveň na něj reagovat pohybem bičíku, který tím žene larvu od zdroje záření (negativně fototaktická reakce), tedy ke dnu a do stinných oblastí. Jelikož larva *T.c.* postrádá nervové buňky a mezi fotoreptorem a okolními buňkami nebyly nalezeny mezibuněčné spoje, představují *ocelli* autonomní senzorio-motorické jednotky. Jelikož neobsahují více mitochondrií než jiné epidermální buňky, předpokládá se, že slouží spíše jako „kormidlo“ larvy (NORDSTRÖM *et al.* 2003).

Takto jednoduché fotoreceptory jsou v živočišné říši poměrně unikátní. Například *ocelli* larvy mnohoštětinatce *Platynereis dumerilii* jsou podobně primitivní, ale pigmentový pohárek tvoří samostatné pigmentové buňky (ARENDRT *et al.* 2002).



Obr. 3: Stavba fotoreceptoru *Tripedalia cystophora*. (a) Schématická kresba průřezu fotoreceptorem larvy *T.c.* s plně vyvinutým knidociliem, mikroklky a pigmentovým pohárkem. *Ocellus* obsahuje v blízkosti jádra velký lyzozomální váček a mnoho mitochondrií. (b) Elektronmikroskopická fotografie průřezu fotoreceptorem, šipka ukazuje na průřez bičíkem. Obrázky převzaty z (NORDSTRÖM *et al.* 2003).

5.2.4. Stádium medúzy

Zvon *T.c.* je spíše kulatý a především na základě vnitřní struktury (svalová struktura) jej můžeme rozdělit na čtyři kvadranty. Pomyslné rohy zvonu vymezují pedalia, bazální části chapadel. Pedalia jsou zploštělá, každé se dělí na tři lopatky. Z každé lopatky vyrůstá jedno nevětvené chapadlo, tedy tři chapadla v každém rohu zvonu. Na okraji zvonu mezi jednotlivými pedalií se nacházejí senzoričné dutiny s rhopalií. V dutině zvonu, při jeho bázi, nalezneme tenkou manumbriální stopku. Ta se postupně rozšiřuje v čtyři příústní laloky tvořící manumbrium (proboscit, orální otvor). Za manumbriem se nachází velká gastrovaskulární dutina (žaludek), z které do každého kvadrantu vybíhá šest hlavních kanálů. Ty se dále větví a zabíhají až do chapadel a rhopalií. Tento systém představuje gastrovaskulární soustavu. V gastrických váčcích a dutinkách samic dochází mimo jiné i k pozdějšímu vývoji embrya v larvy.

T.c. žije v nepřehledné spleti chůdovitých kořenů v přílivových zónách mangrovů (porosty stromů z rodu *Rhizophora*). Jedná se o velice produktivní ekosystém se spolehlivým zdrojem potravy. Paprsky světla dopadající na hladinu skrz koruny mangrovníků vytváří ve vodě světelné kužely. V nich se shromažďují drobní korýši (*Dioithona oculata*), kteří jsou potravou čtyřhranek. *T.c.* jsou spíše pasivními lovci. Pohybují se ve světelných kuželech a čekají, až se jim na chapadla zachytí dostatek kořisti. Vyznačují se pozitivní fototaxí. Během dne se pohybují při hladině ve vodní vrstvě široké do 10 cm (BUSKEY 2003).

Svalová soustava

Zvon *T.c.* je lemován téměř kontinuální vrstvou kruhových pruhovaných svalů, jejichž kontrakcí dochází k vypuzení vody ze zvonu. Tato svalovina je přerušena periradiálními pruhy hladkých svalů, dělicích muskulaturu medúzy na čtyři kvadranty a nervovým prstencem. Svalovina zvonu plynule přechází do velaria, které pomáhá zmenšit průměr zvonu a zlepšuje tak efektivitu vypuzování vody. Svalová vlákna velaria zabíhají do každé ze čtyř frenul, kde se radiálně stáčí o 90°. Některá vlákna pak spojují velarium se svalovinou zvonu, jiná zabíhají k bázi rhopalia. Předpokládá se, že tyto napomáhají jeho správné (radiální) orientaci. Nervová síť pod prstencem (velarium) je více denzní, vlákna zabíhají do frenuly bez přerušení. Předpokládá se,

že frenula se stahuje spolu s velariem a může způsobit jeho asymetrickou kontrakci, tedy i změnu směru pohybu. U hydromedúz plní tuto funkci radiální svaly plachetky (velum). Velarium čtyřhranek je penetrováno gastrovaskulárními kanálky. Periradiální pruhy hladkého svalstva vybíhají radiálně nad rhopalii do manumbriální stopky a příústních laloků. Účastní se stáčení okrajů zvonu a pedalií (spolu s tentakli) nahoru a do nitra zvonu při obranné reakci. Dále napomáhají k přenesení potravy z chapadla do manumbria. Muskulatura chapadel a pedalií je podélná, omezená na orální stranu pedalia. Svaly pedalií jsou spojeny s hladkou svalovinou, která vybíhá cirkulárně ze základů chapadel do zvonu (SATTERLIE *et al.* 2005).

5.2.5 Rhopaliium

Proudění vody způsobené přílivem, větrem či deštěm spolu s kořenovým systémem mangrovníků vytváří potencionálně nebezpečné prostředí pro život většiny medúz. *Tripedalie* jsou však výbornými plavci, schopnými několika kontrakcemi zvonu prudce změnit směr pohybu a rychle se tak vyhnout jakékoliv překážce. Registrovat okolí jim umožňuje sofistikovaný sensorický systém, který je pravděpodobně schopen zpracovat i pokročilejší vizuální vjemy (NILSSON *et al.* 2005).

Fotoreceptivní orgány čtyřhranek se nacházejí v útvarech zvaných rhopalia. Každé rhopaliium je uloženo v sensorické dutině a k okraji zvonu je přichyceno tenkou stopkou. Tou procházejí nervy spojující rhopaliium s nervovým prstencem a kanálek gastrovaskulární soustavy, který se v rhopaliu rozšiřuje a zajišťuje výživu jeho jednotlivých částí. Každé rhopaliium nese dvě komplexní oči s čočkou a čtyři *ocelli*, které jsou podle svého tvaru děleny na štěrbinovité (slit - shaped) a jamkovité (pit - shaped). Komplexní oči jsou pak na základě své polohy a dříve i velikosti děleny na malé horní a velké dolní oko. V každém rhopaliu se tedy nachází celkem šest různých očí a jelikož má medúza čtyři rhopalia, je to celkem dvacet čtyři očí na jedince. Navíc jednotlivé *ocelli* a oči s čočkou jsou morfologicky a funkčně odlišné orgány, které pravděpodobně organizmu umožňují zpracování vizuálního vjemu několika způsoby.

Kromě světločivných orgánů se v každém rhopaliu nachází anorganická konkréce (krystal, statolith). Ta je umístěna v jeho spodní části, přímo pod poměrně

velkou gastrovaskulární dutinou. Statocysta s uloženým statolithem zatěžuje rhopaliu a pomáhá tak jeho správné orientaci při pohybu medúzy.

Ocelli vznikají invaginací povrchového epitelu v místech, která jsou bohatě pigmentována. V místě invaginace je vylučován refraktující sekret, mající pravděpodobně i funkci v ochraně fotoreceptorů. *Ocelli* jsou uloženy po párech symetricky k mediální ose rhopalia (COATES 2006).

Komplexní oči jsou svou stavbou velice složité, morfologicky podobné očím obratlovců. Obsahují čočku, rohovku, sítnici, z čehož vyplývá i možnost podobně dokonalého zpracování obrazu. Horní oko je situováno proti průhlednému zvonu, dolní oko je orientováno dolů, kde shlíží jakoby pod medúzu. Komplexní oči jsou navzdory rozdílu ve velikosti morfologicky velmi podobné. U čtyřhranky *Carybdea marsupialis* má velké oko přibližně 350-400 μm , zatímco malé jen 250-300 μm . Průměr čočky *T.c.* je u horního oka 150 μm , u dolního 250 μm (NILSSON *et al.* 2005). Rohovka je tvořena plochými podlouhlými buňkami, které tvoří přímé pokračování epitelu rhopalia. Pod rohovkou se nachází buněčná čočka. Čočka je ektodermálního původu, heterogenní, bikonkávní, obklopena pouzdrém, který tvoří sekret buněk čočky. Majoritními proteiny jsou krystaliny. Čočka neumožňuje zaostření obrazu přímo na retinu, ale vždy za ní. Předpokládá se, že tak umožňuje medúze registrovat pouze velké (a tedy i nebezpečné) předměty, zatímco malé detaily (např. plankton) zůstávají skryty (NILSSON *et al.* 2005).

Tenká buněčná vrstva dělí čočku od sítnice. Retina je složena z bičíkatých fotoreceptorových buněk a pigmentových buněk odstiňujících přebytečné světlo. Pigmentový pás překrývá fotoreceptory, čímž tvoří clonu okolo čočky (duhovku). Dolní oko disponuje navíc mobilní duhovkou schopnou měnit průměr otvoru, kterým vstupuje světlo, z 150 μm na 100 μm za méně než jednu minutu (NILSSON *et al.* 2005).

Nervová soustava rhopalia

Nervovou soustavu (NS) čtyřhranek tvoří nervový prstenec, jemná síť nervů zvonu a nervstvo rhopalia. Nervový prstenec leží v epidermis při bázi zvonu. Jeho vnitřní část tvoří kontinuální provazec spojující báze chapadel v pedaliích s bázemi stopek rhopalií. Nad každým pedaliem se navíc nachází jedno pedaliové ganglium. Vnitřní provazec běží paralelně s vnějším. Při bázi rhopalia se odpojuje a pokračuje jako epidermální nerv středem stopky až do rhopalia, kde se napojuje na neurophil. Jemná

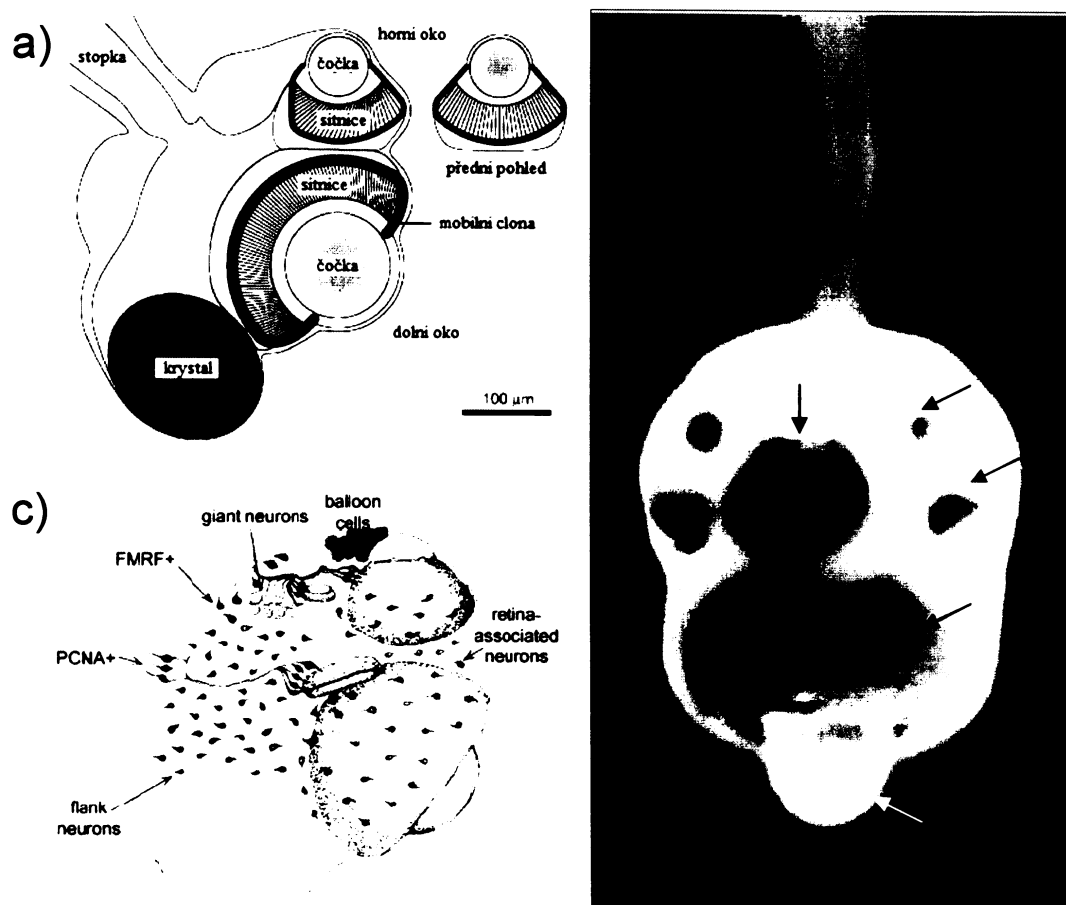
nervová síť zvonu je spojena s jeho svaly a velariem. FMRFamid pozitivní vlákna se táhnou podél periradiálních hladkých svalů a byla identifikována i v chapadlech (PARKEFELT *et al.* 2005).

Nervstvo rhopalií tvoří většinou část CNS, jejich odstraněním ztrácí medúza schopnost kontrakce velaria a tedy i plavání. Bylo zjištěno, že rhopalia jsou sídlem tzv. *pacemakerů* odpovědných za vzbuzení signálů vedoucích ke stahování svaloviny. *Tripedalia* žije v kořenových systémech mangrovníků, tedy v prostředí, které je plné nástrah a které je pro jiné medúzy nebezpečné. *Tripedalia* je však narozdíl od jiných medúz schopna rychle plavat a měnit směr pohybu v závislosti na okolních vizuálních podnětech. Předpokládá se, že vyspělý nervový systém rhopalia je schopen zpracovat a sjednotit vizuální vjemy a pomocí CNS pak zprostředkovat danou odpověď.

Rhopalium je ke zvonu přichyceno tenkou stopkou. Stopka je přibližně 200 μm dlouhá a směrem k jeho bázi se zužuje. Tvoří ji jedna vrstva epidermálních buněk, pod ní je tenká vrstva mezoglei. Středem stopky prochází epidermální nerv, který je přímým pokračováním vnitřního provazce nervového prstence. V rhopaliu se rozděluje na levou a pravou část a spojuje se s neurophilem. V epidermálním nervu byly nalezeny pouze krátké neurity. Stopkou dále prochází gastrovaskulární nerv s proprioreceptivní funkcí (mechanoreceptorová funkce) a kanálek gastrovaskulární soustavy (GARM *et al.* 2006).

Parkefelt a kolektiv zjistili, že některé neurony rhopalia jsou při specifických podmínkách barvení silně PCNA (proliferating cell nuclear antigen) imunoreaktivní, což jim umožnilo analyzovat jejich uspořádání poměrně detailně (PARKEFELT *et al.* 2005). Rhopalium obsahuje složitý nervový systém, jehož hlavní části jsou bilaterálně symetrické. Imunohistochemické barvení odhalilo šest párů jader v horní polovině, tři na každé straně, horizontálně propojených komisurami. Jádra jsou propojena i vertikálně, nejméně čtyřmi konektivami. Zadní část rhopalia obsahuje velkou populaci buněk (přibližně 2000), tvořících několik vrstev podél jeho stěny. Morfologie buněk naznačuje, že by se mohlo jednat o nediferenciované buňky (obsahují málo cytoplazmy a organel). Některé z nich (přibližně 20) jsou PCNA imunoreaktivní, prochází vrstvami buněk směrem do rhopalia a možná se účastní vedení sensorického signálu. Tuto vrstvu buněk lemují tzv. flank neurony. Některé jsou FMRFamid – pozitivní (10%) a ty se nachází hlavně u báze stopky, kde tvoří komisury spojující levou a pravou část rhopalia. Další buňky připomínající neurony obklopují retinu (retina-associated neurons) horního i dolního oka s čočkou a vyplňují prostor mezi jamkovitými

a štěrbinovitýma očima. Jejich nervová funkce však zatím nebyla prokázána. Mezi jamkovitýma očima a bází stopky se na každé straně nachází přibližně třicet obřích neuronů (giant neurons). Ty spojují jak PCNA - pozitivní, tak FMRFamid - pozitivní vlákna okolních neuronů. Za zmínku stojí i populace kulatých buněk (baloon cells) nacházející se za čočkou horního oka. Tyto buňky obsahují velké množství mitochondrií a elektrondenzních granulí. Neurophil vyplňuje celý prostor mezi epidermis a gastrodermis. Je tvořen jak unipolárními, tak bipolárními neurity (SKOGH *et al.* 2006).



Obr. 4: **Rhopalium *Tripedalia cystophora***. (a) Schématický obrázek průřezu rhopaliem. (b) Vypreparované rhopalium se stopkou, která jej spojuje se zvonem. Černá šipka ukazuje na malé horní oko, modrá na jamkovitý *ocellus* (pit eye), zelená na štěrbinovitý *ocellus* (slit eye), červená na velké dolní oko s čočkou. Na čočku velkého oka pak ukazuje bílá šipka. (c) Schématický průřez rhopaliem s naznačenou pozicí nervových a jiných buněk. (a) Převzato a upraveno z (NILLSON 2005). (c) Přejato z (PARKEFELT *et al.* 2005).

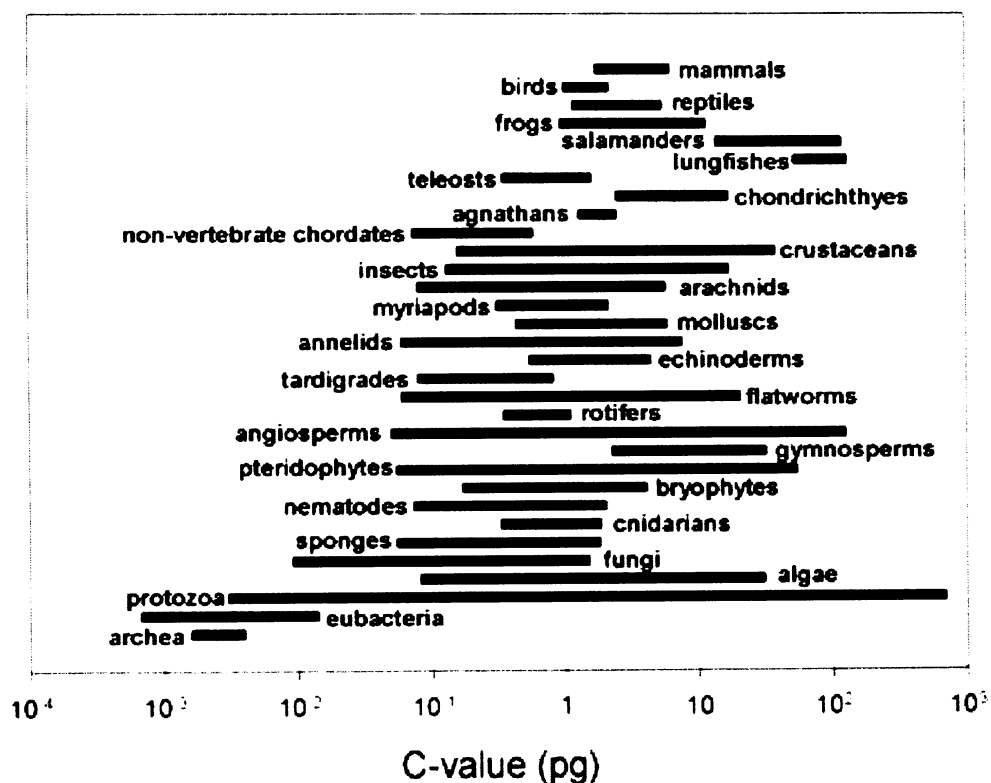
5.3 Současný stav genomiky

Genomika, jako samostatný obor, vznikla v 90. letech. Jejím úkolem je studium genomů jednotlivých organismů. Někdy se genomika dělí na tzv. strukturní genomiku (stanovení sledu nukleotidů genomu organismu), bioinformatiku (počítačové programy a databáze pomáhající analyzovat přečtenou dědičnou informaci) a funkční genomiku (sledování genové exprese, studium funkce genů).

Prvním genomem, u něhož se podařilo stanovit kompletní nukleotidovou sekvenci, byl genom bakteriofága *phiX174* (SANGER *et al.* 1977) sestávající z 5386 pb. K tomuto účelu byla vyvinuta metoda sekvenování +/-, která poprvé využila prodloužení primeru DNA – polymerázou a její specifické zakončení. Z této metody se vyvinula enzymová metoda sekvenování (Sangerovo sekvenování), která je dnes nejběžněji používanou metodou sekvenování DNA. Roku 1995 byl přečten první kompletní genom autonomního organismu, bakterie *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN *et al.*, 1995) čítající 1,38 Mbp. O rok později se podařilo sekvenovat genom prvního eukaryotického organismu, známé kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (12,1 Mbp; GOFFEAU *et al.* 1996). Současné metody sekvenování DNA jsou již na takové úrovni, že můžeme poměrně snadno a rychle stanovit nukleotidové sekvence celých genomů eukaryotických organismů. Mezi nejznámější modelové organismy, jejichž genom si můžeme „prohlédnout“ ve veřejných databázích, je např. *Caenorhabditis elegans* (97 Mbp; C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM 1998), *Drosophila melanogaster* (120 Mbp; ADAMS *et al.* 2000), *Mus musculus* (3300 Mbp; MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2002). Roku 1998 byl založen HGP (Human Genome Project), mezinárodní projekt s cílem sekvenace lidského genomu, který byl dokončen roku 2003. Genom člověka sestává přibližně z 3200 Mbp (MC PHERSON *et al.* 2001, VENTER *et al.* 2001). Prvním dokončeným projektem na žahavci byl genom *Nematostella vectensis* (475 Mb; PUTNAM *et al.* 2007).

V současnosti již známe kompletní nukleotidovou sekvenci genomů stovek organismů, většinou však jde o bakteriální genomy. Informace o genové výbavě především zástupců nižších živočichů jsou stále nepatrné.

Bakteriální genom je velký 0,6 – 10 Mbp, přičemž jeho velikost je přibližně úměrná počtu genů. Nejmenším známým je genom bakterie *Mycoplasma genitalium*, který je velký 580 kbp a je tvořen 480 geny kódujících proteiny, 3 rRNA geny a 37 tRNA geny (FRASER *et al.* 1995). Genomy eukaryot mají řádově $8,8 \times 10^6$ – $6,9 \times 10^{11}$ bp, přičemž jejich velikosti nejsou úměrné počtu genů (např. u člověka tvoří geny přibližně 1,5% jeho genomu). Nyní již známá skutečnost, že velikost genomu organismu není v korelaci s komplexitou organismu, se nazývá paradox hodnoty C. Hodnota C značí haploidní počet nukleotidů genomu a je udávána v pikogramech, přičemž $1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g} = 978 \text{ Mbp}$. Známým příkladem tohoto paradoxu je genom měňavky *Amoeba dubia*, který je 200 krát větší, než je genom člověka. U žahavců se hodnota C pohybuje v rozmezí 0,23 pg – 1,85 pg (GREGORY 2005).



Obr. 5: Velikost genomu živočichů. Schéma ukazuje C hodnoty jednotlivých skupin živočichů. Obrázek převzat z (GREGORY 2005).

EST knihovna

U vyšších živočichů, jejichž genom obsahuje velké množství nekódujících sekvencí, se s velkou úspěšností zakládají EST knihovny. EST (expressed sequence tag) jsou krátké sekvence (obvykle 200 – 800 nukleotidů) čtené náhodně z 5' nebo 3' konce cDNA získané reverzním přepisem mRNA. Každý EST je sekvenován pouze jednou, sekvence tedy může obsahovat jisté procento chyb. Kvalita EST sekvencí je obecně nízká blízko konců a zlepšuje se směrem ke středu sekvence. K záměně báze při sekvenování může docházet až v 5%. Další častou chybou je tzv. *stuttering* (opakování báze, konkrétně G a T; NAGARAJ *et al.* 2006). Kvalita EST je však kompenzována kvantitou dostupných EST sekvencí ve veřejných databázích. Soubor EST sekvencí získaných během experimentu pro jednu tkáň či soubor buněk se tedy nazývá EST knihovna a obsahuje pouze ty kódující sekvence, které jsou v dané buňce či tkáni v daný čas exprimovány.

V obvyklém protokolu dochází ke snížení četnosti nejhojnějších EST, tzv. normalizaci EST knihovny. Proto informace získaná z EST knihovny není kvantitativní, ale použitelná pouze k zjištění přítomnosti konkrétního transkriptu, případně k určení exonových oblastí genů. Pokud se normalizační krok vynechá, můžeme získat i přibližnou informaci o úrovni genové exprese. V tomto případě je třeba uspořádat jednotlivé EST do skupin (cluster) reprezentujících jednotlivé transkripty a následně sečíst sekvence náležící každé skupině. EST mohou být také uspořádány do tzv. kontigů – sekvencí, které v ideálním případě pokrývají celý transkript.

5.4. Současný stav bioinformatiky

S rostoucím množstvím sekvenovaných genomů či jejich úseků rostla i potřeba tato data ukládat takovým způsobem, aby byla přehledná a přístupná vědeckým pracovníkům z celého světa. Vznikl nový obor bioinformatika, tedy aplikace počítačové technologie na zpracování a analýzu biologických dat. Byly založeny nukleotidové databáze, které přijímají data získaná v genomových centrech nebo na odborných pracovištích a které spolu vzájemně spolupracují. Takovou nukleotidovou databází je například EMBL, primární evropská nukleotidová databáze se sídlem v Anglii (Evropský institut pro bioinformatiku, <http://www.ebi.ac.uk/embl>), databáze GENBANK se sídlem ve Spojených státech (Národní centrum pro biotechnologické informace, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) nebo DDBJ shromažďující data především z japonských výzkumů (Národní genetický institut, <http://www.cib.nig.ac.jp/DDBJ>). Tyto databáze jsou v současnosti již velmi rozsáhlé. Například databáze EMBL, která byla založena v roce 1980 jako první databanka na světě schraňující nukleotidové sekvence, obsahuje nyní již více než 4000 kompletně sekvenovaných genomů, včetně 52 genomů eukaryot (COCHRANE *et al.* 2007). Databáze SWISSPROT je anotovaná proteinová databáze, kterou spravuje Švýcarský institut pro bioinformatiku (SIB). Přístupná je na adrese <http://www.expasy.ch/sprotTH>.

BLAST

V současnosti je zřejmě nejrozšířenějším algoritmem k prohledávání velkých databází algoritmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; ALTSCHUL *et al.* 1990). Prakticky všechny veřejně přístupné databáze sekvencí dávají k dispozici server s programem BLAST, dostupný prostřednictvím webového rozhraní. Verze programu, provozovaná a nadále rozvíjená Národním centrem pro biotechnologické informace, NCBI BLAST, je nyní již standardním nástrojem k prohledávání velkých databází (ALTSCHUL *et al.* 1997). K jeho největším výhodám, patří rychlost a relativní nenáročnost programu. NCBI BLAST je opatřen přehledným grafickým rozhraním a obsáhlou dokumentací (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Rozhraní umožňuje jednoduchý výběr varianty programu vhodné pro konkrétní typ dotazu, databáze i omezení prohledávané databáze. Výstupy programu jsou obohaceny o grafickou

prezentaci znázorňující umístění podobných úseků v rámci nalezené databázové sekvence a námi zvolené sekvence. Výstupy ilustrují i míru podobnosti těchto sekvencí a to pomocí barevného kódování. Nalezené sekvence lze navíc přímo stáhnout z databáze prostřednictvím webových odkazů. Příslušné varianty programu jsou uvedeny v tabulce 1. Například program BLASTX námi zvolenou sekvencí nukleotidů (např. fragment cDNA) nejprve přeloží ve všech šesti čtecích rámcích, vzniklými aminokyselinovými sekvencemi pak prohledává proteinovou databázi. Přeložená varianta programu BLAST, TBLASTN, dokáže prohledávat proteinovým dotazem nukleotidovou databázi (opět nejprve přeloží AK sekvenci ve všech variantách a čtecích rámcích).

Tab. 1: Využití jednotlivých programů BLAST

Program	Dotaz	Databáze	Úroveň setkání	Použití
blastn	DNA	DNA	DNA	Hledání identických sekvencí DNA
blastp	protein	protein	protein	Hledání homologních proteinů
blastx	DNA	protein	protein	Hledání genů a homologních proteinů na nové DNA
tblastn	protein	DNA	protein	Hledání genů u necharakterizovaných DNA
tblastx	DNA	DNA	protein	Studium struktury genů

FASTA

FASTA 3 je sada programů zahrnujících algoritmy pro vyhledávání podobnosti v dostupných databázích sekvencí bez ohledu na to, zdali je dotazovaná sekvence DNA nebo protein. Program FASTA je o něco pomalejší než konkurenční BLAST, hodí se spíše k provozování na lokálních discích. FASTA s kompletním přístupem k primárním databázím je k dispozici například na serveru Evropského bioinformatického institutu (www.ebi.ac.uk/fasta33/).

6. Materiál a metody

6.1 Materiál

Přehled speciálních chemikálií s uvedením výrobců řazen abecedně.

Alkalická fosfatáza – calf intestine (New England BioLabs)

Anti – digoxigenin - AP Fab fragmenty (Roche)

DIG RNA Labeling Mix 10x (Roche)

DNáza bez RNáz (Roche)

Glutaraldehyd (25% v PBS) (Sigma)

Levamisol (Sigma)

Ligační pufr (New England BioLabs)

MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas)

NBT/BCIP roztok (Roche)

NiNTA agaróza (Qiagen)

Paraformaldehyd (Sigma)

Qiaex II (Qiagen)

QX1 pufr (Qiagen)

Paraformaldehyd (Sigma)

PE pufr (Qiagen)

Proteináza K (Roche)

RNA later (Ambion)

RNasin HRP (Takara)

Rnáza A (Epicenter)

Simply Blue SafeStain (Invitrogen)

SOC médium (Invitrogen)

Syntetická mořská sůl (Instant Ocean)

Tween 20 (Fluka)

T3, T7, SP6 RNA polymeráza (Roche)

T4 DNA ligáza (New England BioLabs)

Transkripční pufr 10x (Roche)

TRIZOL Reagent (Invitrogen)

2-log DNA Ladder (New England BioLabs)

Vajíčka Artemis salina (Brine shrimp eggs) – StarcArtemis (Inter Ryba)

6.2 Základní roztoky a média

Přehled roztoků nezbytných pro provedení práce řazen abecedně.

ASW (umělá mořská voda): mořská sůl Instant Ocean rozpuštěná v destilované vodě (pH 5,5 – 6,0) na konečnou hustotu 1,022g/cm³ při 27°C. Filtrována přes 0,22 μm filtr. Výsledné pH 8,1 – 8,3.

EB pufr: 10mM Tris-Cl, pH 8,5. Sterilizován.

LB agar: LB médium (pH 7,3), 2% agar. Sterilizován.

LB médium: 1% Bacto Trypton (Difco), 0,5% kvasničný extrakt (autolyzát, Difco), 0,5% NaCl. Sterilizován.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4. Sterilizován.

PBT: 0,1% Tween 20 v PBS.

4% PFA v PBS: 4% paraformaldehyd rozpuštěný v PBS při 60°C s několika kapkami 10 M NaOH.

TBE pufr: 10x zásobní roztok: dH₂O, 20 mM EDTA, 0,89 M kyselina boritá, 0,89 M Tris báze. 1x pracovní roztok: 10x TBE pufr 10x zředěný v dH₂O.

6.3. Metody

Následuje obecný popis technik a metodických postupů, které byly při řešení zadaného diplomového tématu použity.

6.3.1 Kultivace *Tripedalia cystophora*

Materiál: ASW (umělá mořská voda); skleněné Petriho misky; hustoměr; pH metr; pinzety; plastové nádoby pro práci s tkáňovými kulturami (především kultivační lahve)
Přístroje: stereolupa

Postup: Dospělci *T.c.* obou pohlaví byli naloveni v portorických mangrovech a dovezeni *in vivo* v kultivačních lahvích. Larvy uvolněné z oplodněných samic se staly základem pro stabilní kulturu polypů. Kultury polypů jsou kultivovány na skleněných Petriho miskách či v kultivačních lahvích v umělé mořské vodě (ASW) při teplotě 27°C. Krmení jsou čtyřikrát až pětkrát týdně naupliemi *Artemis salina*. Po každém krmení je opatrně měněna voda tak, aby nedošlo k odtržení polypů od dna kultivační nádoby. Frekvence krmení a teplota ovlivňují četnost metamorfózy polypa v medúzu. Před každým krmením lze polypy pozorovat a sbírat juvenilní medúzy. Pokud polypy kultivujeme několik týdnů při 23°C a krmíme jen jednou týdně, je třeba následující období zvýšit teplotu na 28°C a krmit nejméně pětkrát týdně.

6.3.2 Fixace larev a dospělců *Tripedalia cystophora*

Materiál: RNA later; 4% PFA v PBS

Postup: Celé medúzy či vypreparovaná rhopalia byly fixovány v 4% PFA v PBS jednu až tři hodiny nebo v něm přímo uloženy v 4°C. Larvy byly uloženy v RNA later pro konzervaci RNA (pro izolaci RNA a přípravu EST knihovny). Larvy v RNA later mohou být uchovány při pokojové teplotě po dobu nejméně 6 měsíců či skladovány dlouhodobě při -20°C a méně.

6.3.3 Kultivace *Artemis salina*

Materiál: vajíčka *Artemis salina* (Brine shrimps eggs); ASW (35 g/l, pH 8,1 – 8,4)

Přístroje: vzduchové čerpadlo (UniStar 2,5 W)

Postup: Do jednoho litru umělé mořské vody přidáme 1,5 – 2 g vajíček. Kultivujeme v oblych nádobách při stálém intenzivním osvětlení, teplotě 27 – 30°C a kontinuálním provzdušňováním, po dobu nejméně 22 hodin. Po nejlépe jednodenní kultivaci odpojíme vzduchové čerpadlo a necháme 15 minut stát, aby došlo k oddělení prázdných vaječných obalů, které stoupají k hladině. Vyvinuté nauplie se pohybují ve spodní třetině nádoby, naopak ještě plná vajíčka zůstávají u dna. Narůžovělé plovoucí nauplie lze snadno odsát a ihned přikapat do Petriho misek či kultivačních nádob s poly.

6.3.4 Izolace RNA

Pro konstrukci cDNA knihovny byly použity pigmentované larvy *T.c.*, stabilizované v činidle RNA later. RNA byla izolována metodou fázové separace navrženou Chromczynskim a Sacchim za použití TRIZOL činidla (CHOMCZYNSKI a SACCHI 1987). V průběhu celého pokusu je nutné pracovat s roztoky a v prostředí bez RNáz.

Materiál: TRIZOL činidlo; glykogen; chloroform; isopropanol; 80% ethanol; RNase free dH₂O (bez RNáz), larvy *T.c.* v RNA later

Přístroje: stolní mikrocetrifuga Eppendorf Centrifuge 5417C

Postup: 20 μ l larev bylo přeneseno z RNA later stabilizátoru do čisté zkumavky a homogenizováno v 400 μ l TRIZOL činidla za pomoci mechanického rozbití larev (objem vzorku by neměl překročit 10% objemu TRIZOL činidla). K suspenzi byl přidán glykogen (250 μ g/ml), vzorek byl centrifugován 5 minut při 12000 rpm. Supernatant byl 5 minut inkubován při pokojové teplotě, po této době k němu bylo přidáno 0.2 ml chloroformu na 1 ml TRIZOL činidla. Po řádném protřepání byl 15 minut centrifugován při 12000 rpm. Po centrifugaci je vzorek rozdělen na horní bezbarvou vodní fázi, interfázi a červenou organickou fázi. RNA se nachází výhradně ve vodní fázi, která by

měla představovat přibližně 60% objemu TRIZOL činidla použitého pro homogenizaci. Vodní fáze byla přenesena do nové zkumavky a RNA precipitována přidáním 0,5 ml isopropanolu na 1 ml TRIZOL činidla použitého pro homogenizaci. Vzorek byl inkubován 10 minut při pokojové teplotě a poté centrifugován 10 minut při 13500 rpm. K sedimentu RNA bylo přidáno 500 μ l 80% ethanolu. Po důkladném protřepání byl vzorek centrifugován 5 minut při 13500 rpm. Sediment RNA byl vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn v 100 μ l dH₂O zbavené RNáz. Pro další použití byla RNA skladována při teplotě -80°C. Celistvost RNA byla zkontrolována elektroforeticky na 1% agarózovém gelu při 100 V. Koncentrace a čistota RNA byly určeny měřením na spektrofotometru.

6.3.5 Syntéza cDNA

Syntéza cDNA byla provedena podle protokolu BD SMARTTM cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences, ZHU *et al.* 2001), který v první reakci využívá modifikovaných oligo(dT) primerů, nasedajících dle komplementarity bazí k poly(A) konci mRNA. Komplementární vlákno cDNA je syntetizováno enzymem reverzní transkriptáza. Po dosažení 5' konce mRNA reverzní transkriptázou, aktivita terminální transferázy přidá k 3' konci cDNA několik molekul deoxycytidinu. Tento úsek (polyC) je rozpoznáván BD SMARTTM A oligonukleotidem, který na něj nasedá a slouží jako templát k dosyntetizování 3' konce cDNA. Tím je zaručena transkripce kompletního vlákna mRNA. Jelikož použitý primer a oligonukleotid mají vzájemně komplementární úsek, pro následnou PCR již stačí použít jediný primer. V průběhu pokusu je třeba pracovat v prostředí a s roztoky bez RNáz.

Materiál (BD Biosciences): 12 μ M BD SMARTTM Oligonukleotid, 5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'; 12 μ M 3'BD SMART CDS Primer IIA, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎VN-3', (N = A, C, G, T; V = A, G, C); dNTP Mix (10 mM každého dNTP); 20 mM dithiothreitol (DTT); RNase free dH₂O; BD PowerScriptTM reverzní transkriptáza; 5x First-Strand pufr; RNA izolovaná podle předchozího protokolu

Postup: Do PCR mikrozkušavky bylo napipetováno v následujícím pořadí: 1,5 µl RNA vzorku, 1 µl 3'BD SMART CDS primeru IIA, 1 µl BD SMART™ IIA oligonukleotidu, 1,5 µl RNase free dH₂O. Obsah zkumavky byl opatrně promíchán a inkubován 2 minuty při 72°C. Poté byl vzorek rychle přesunut do ledové lázně a zde 2 minuty chlazen. Do mikrozkušavky bylo přidáno v následujícím pořadí: 2 µl 5x First-Strand pufru, 1 µl DTT, 1 µl dNTP, 1 µl BD PowerScript reverzní transkriptázy. Reakční směs byla řádně promíchána a 1 hodinu inkubována při 42°C, poté byla přenesena na led (dokončení syntézy prvního vlákna cDNA). Takto připravená cDNA (hybrid cDNA/RNA) může být skladována při -20°C až 3 měsíce.

6.3.6 Amplifikace cDNA metodou LD PCR

Materiál (BD Biosciences): 50x BD Advantage™ 2 polymeráza; 10x BD Advantage™ PCR pufr; 50x dNTP (10 mM každého dNTP); 12µM 5' PCR Primer IIA, 5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'; ddH₂O (pH 7,0); templát (hybrid cDNA/RNA připravený podle předchozího protokolu)

Přístroje: termálním cyklátor PTC – 200

Postup: LD PCR (long – distance PCR) reakce byla prováděna v objemu 100 µl, schéma pipetování reakční směsi bylo následující: 80 µl RNase free dH₂O, 10 µl BD Advantage™ PCR pufru, 2 µl dNTP, 2 µl PCR primeru IIA, 2 µl cDNA/RNA, 2 µl BD Advantage 2 polymerázy. Reakční směs byla řádně promíchána a vložena do termocykléru předehřátého na 95°C. Po počáteční denaturaci 2 minuty (95°C) byl spuštěn následující program: denaturace dsDNA 15 s 95°C, hybridizace primerů 30 s 65°C, extenze primerů 6 min 65 °C. Počet cyklů tohoto programu byl 15, 17, 19, 20 a 23. Po posledním kroku následovalo konečné ochlazení na 4°C. Amplifikační produkty byly analyzovány elektroforézou na 1% agarózových gelech při 100 V.

6.3.7 Purifikace PCR produktů

Materiál: fenol : chloroform : isoamylalkohol (25 : 24 : 1); isopropanol; NaCl; 80% ethanol; RNase free dH₂O; 10x pufr 1; cDNA připravená podle předchozího protokolu

Postup: cDNA byla extrahována směsí fenol : chloroform : isoamylalkohol v objemovém poměru 1:1. Vodní fáze byla přenesena do nové zkumavky a precipitována stejným množstvím isopropanolu s 10% objemu NaCl. Vzorek byl 10 minut centrifugován při 12000 rpm. Po odebrání supernatantu byl sediment cDNA promyt 80% ethanolem, vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn v 90 μ l H₂O a 10 μ l pufru 1.

6.3.8 Restrikční štěpení

Restrikční štěpení bylo využito pro úpravu PCR produktů, linearizaci vektorů pro ligaci a pro kontrolu inzertů ve vektoru. Pro tuto práci byly využity restrikční endonukleázy: BamHI, EcoRI, RsaI, SmaI (New England BioLabs), vždy byl použit pufr, doporučený výrobcem enzymu (pufr 1 – 4).

Materiál: restrikční enzym; 10x pufr doporučený výrobcem enzymu; štěpená DNA (cDNA, vektor); dH₂O; 100x BSA (10 mg/ml)

Postup: Pro 50 μ l restrikční reakci bylo připraveno: 1x BSA, 1x pufr, enzym nejméně 1U/1 μ g DNA, voda. DNA byla štěpena 1 hodinu při teplotě doporučené výrobcem enzymu. Při štěpení dvěma enzymy (v případě kontroly inzertů) byl použit pufr vyhovující oběma. V případě potřeby izolovat některý z fragmentů byl k restrikční reakci přidán nanášecí pufr pro agarózovou elektroforézu. Po separaci v gelu o vhodné koncentraci byl žádaný fragment izolován.

6.3.9 Defosforylace vektoru

Před izolací z gelu byly linearizované vektory defosforylovány, aby se zabránilo jejich samovolné ligaci bez inzertu. Byl použit bakteriální enzym alkalická fosfatáza, který nespecificky katalyzuje defosforylaci všech fosfátových monoesterů.

Materiál: plazmid (např. pBluescript II KS); alkalická fosfatáza CIP (calf intestine phosphatase, původem z telecího střeva) (10U/μl)

Postup: Po restrikcím štěpení byl k reakční směsi přidán 1 μl fosfatázy a směs byla inkubována dalších 30 minut při 25°C.

3.9.10 Ligace plazmid – inzert

Materiál: linearizovaný a defosforylovaný plazmid; inzert (připravený pro ligaci s daným plazmidem); 2x T4 DNA ligační pufr (pH 7,6); ddH₂O; T4 DNA ligáza (10U/μl)

Postup: Ligace inzertů cDNA do plazmidu (pBluescript II KS) byla provedena přesně podle protokolu Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs) pro tupé konce. Každá 20 μl reakce obsahovala 4 μl štěpené cDNA. Ligační směs byla ihned použita k transformaci kompetentních buněk nebo skladována při -20°C. V jiném případě byla připravena 20 μl ligační směs obsahující 1x T4 DNA ligační pufr, 1x T4 DNA ligázy, 10 – 100 ng plazmidové DNA a odpovídající množství vkládané DNA. Tato směs byla inkubována 1 – 4 hodiny při 16°C. Ke každé ligační směsi byla připravena jedna kontrolní bez inzertu.

3.9.11 Transformace vektoru do buněk

Materiál: bakteriální buňky *Escherichia coli* kmene *TOP10*; ligační směs (plazmid s vloženým inzertem); SOC médium; LB agarová plotna s příslušným antibiotikem (ampicilinem 100 µg/ml, kanamycin 25 µg/ml); sterilní roztírací očko

Postup: Kompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu (přibližně 10 – 15 min) a rozděleny do mikrozkušavek po 100 µl. Do každé mikrozkušavky byl přidán 1 µl standardní plazmidové miniprepace či 5 µl ligační směsi (10 ng – 1 µg DNA). Po 20 minutové inkubaci na ledu byly buňky ponořeny do lázně o teplotě 42°C po dobu 30 – 35 sekund (tepelný šok) a následně vráceny minimálně na 2 minuty zpět na led. Pro zvýšení výtěžnosti bylo k některým transformovaným buňkám (především plazmidy s velkými inzerty) přidáno 200 µl SOC média a směs byla 45 minut třepána při 37°C (220 rpm). Transformované buňky byly nanášeny na předem vysušené LB agarové plotny a pečlivě rozetřeny sterilním očkem. Plotny byly inkubovány dnem vzhůru přes noc při 37°C. Transformanty byly zpracovány či uloženy při 4°C.

3.9.12 Izolace plazmidové DNA – alkalická miniprepace

Materiál: TERIFIC médium (LB médium); antibiotikum; isopropanol; transformované kolonie buněk

Roztoky: pufr P1: 10 mM EDTA (pH 8,0), 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 50 mM glukóza, sterilizován; pufr P2: 0,2 M NaOH, 1% SDS; pufr P3: 3M octan draselný (pH 5,5), 11,5% kyselina octová, sterilizován; TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0); pufr TER: 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 mg RNáza A/ml TE; 80% ethanol

Přístroje: stolní mikrocentrifuga Eppendorf Centrifuge 5417C; třepačka na mikrozkušavky Eppendorf Thermomixer comfort

Postup: Do 2 ml TERIFIC média (či LB média) s příslušným antibiotikem (např. 100µg/ml ampicilinu) byla naočkována vždy jedna kolonie buněk z agarové plotny. Vzorek byl kultivován za stálého třepání přes noc při 37°C (200 rpm). Pokud

nebyly kultury ihned zpracovány, byly uchovány při 4°C. Narostlá kultura byla přelita do 2 ml zkumavky a 1 minutu centrifugována při nízkých otáčkách (6000 rpm). Po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v 300 µl roztoku P1. Po důkladném protřepání bylo přidáno 300 µl roztoku P2 (alkalická lýze), vzorek byl promíchán obratem. Po neutralizaci 300 µl roztoku P3 a centrifugaci (10 minut při 12500 rpm, 4°C) byl čirý supernatant přenesen do nové zkumavky a vysrážen 500 µl isopropanolu. Vzorek byl promíchán obratem a centrifugován 5 minut při 12500 rpm. Po centrifugaci byla pohledem zkontrolována přítomnost peletu. Sediment (po odstranění supernatantu) byl promyt 80% ethanolem, vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn za stálého třepání 1000 rpm při 37°C v 50 µl TER pufru. Pro další použití skladován při -80°C.

3.9.13 Izolace plazmidové DNA – maxiprep

Maxiprepací z 50 ml kultury byl izolován plazmid pro syntézu ribopróby. Ve srovnání s miniprepací dosáhneme vyšší čistoty i koncentrace vzorku.

Materiál: isopropanol; fenol; chloroform; ampicilin (100µg/ml); ddH₂O; 10 M LiCl; 80% EtOH; 96% EtOH; 5 M octan sodný (NaAc); LB médium

Roztoky: pufr P1: 10 mM EDTA (pH 8,0), 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), 50 mM glukóza, sterilizován; pufr P2: 0,2 M NaOH, 1% SDS; pufr P3: 3M octan draselný (pH 5,5), 11,5% kyselina octová, sterilizován; TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0); pufr TER: 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 mg RNáza A/ml TE; EB pufr

Přístroje: stolní mikrocentrifuga Eppendorf Microspin plus, centrifuga na 50 ml zkumavky Hettich Universal 32 R

Postup: Pokud není uvedeno jinak, probíhají jednotlivé kroky při pokojové teplotě. Jedinou kolonií buněk z agarové plotny bylo zaočkováno 50 ml LB média s odpovídajícím množstvím antibiotika. Vzorek byl kultivován za stálého třepání přes noc při 37°C (200 rpm). Narostlá kultura byla centrifugována v 50 ml kyvetě 15 minut při 4°C (3500 rpm), sediment resuspendován v 5 ml pufru P1 a dalších 5 minut inkubován na ledu. K vzorku bylo přidáno 10 ml pufru P2, po promíchání byl 3 minuty ponechán na ledu (během této doby ještě dvakrát promíchán). Po této době bylo přidáno

7,5 ml pufru P3, po opatrném promíchání byl vzorek dalších 10 minut inkubován na ledu (opět několikrát jemně promíchán). Po inkubaci byl vzorek 15 minut centrifugován při 4°C (3500 rpm). K odebranému supernatantu bylo přidáno 0,7 objemu isopropanolu, po důkladném protřepání byl 10 minut inkubován při pokojové teplotě. Vzorek byl 15 minut centrifugován při 4°C (3500 rpm), pelet resuspendován v 0,7 ml 80% EtOH a přenesen do nové mikrozkušavky. Mikrozkušavka se zbytky suspenze byla ještě vypláchnuta 0,5 ml 80% EtOH a obsah přidán do nové mikrozkušavky. Po centrifugaci 2 minuty (13000 rpm) byl pelet resuspendován v 350 µl TE pufru a 100 µl 10 M LiCl. Vzorek byl důkladně promíchán na vortexu a 10 minut inkubován při pokojové teplotě. Po centrifugaci 3 minuty (13000 rpm) byl supernatant přenesen do nové 1,5 ml zkumavky a objem doplněn do 600 µl pufrům TE. Vzorek byl extrahován v poměru 1:1 fenol:chloroformem (důkladné promíchání na vortexu). Po centrifugaci 5 minut (13000 rpm) bylo k odebrané vodní fázi přidáno 0,7 objemu isopropanolu. Vzorek byl protřepán a 10 minut inkubován při 20 °C. Po centrifugaci 5 minut (13000 rpm) byl pelet (po odebrání supernatantu) opláchnut v 0,5 ml 80% EtOH a usušen. Suchý pelet byl 30 – 45 minut resuspendován v 200 µl TER při 37°C. Po inkubaci bylo přidáno 160 µl TE, 40 µl 5 M NaAc a 400 µl směsi fenol:chloroform. Vzorek byl 30 sekund třepán a poté 2 – 3 minuty centrifugován (13000 rpm). K odebrané vodní fázi byl přidán 1 ml (2,5 objemu) 96% EtOH, po důkladném protřepání a inkubaci 10 minut při pokojové teplotě byl vzorek 5 minut centrifugován (13000 rpm). Pelet byl opláchnut 0,5 ml 80% EtOH a 30 minut sušen při 37°C. Suchý pelet byl rozpuštěn v 100 µl ddH₂O či EB pufru.

3.9.14 Izolace nukleových kyselin z agarózového gelu

Materiál (QIAGEN): suspenze QIAEX II; pufr QX1 obsahující indikátor pH; pufr PE; 3 M octan sodný (pH 5,0); 10 mM Tris-Cl (pH 8,5)

Postup: Požadovaný úsek byl z agarózového gelu vyříznut sterilním skalpelem a zvážen. Vždy k 100 mg gelu obsahujícího požadovanou DNA bylo přidáno 300 µl QX1 pufru. Ke vzorku bylo přidáno 20 – 30 µl resuspendovaného QIAEX II (vortex, 30 s). Suspenze byla inkubována 10 minut při 50°C. Během této doby byl vzorek každé 2 minuty protřepán. Při zvýšení pH nad 7,5 (změna barvy ze žluté na fialovou) byl

přidán octan sodný. pH nižší než 7,5 je nezbytné k navázání DNA na QIAEX II částice. Vzorek byl poté 30 sekund centrifugován, peleta byla promyta 500 μ l pufru QX1 a následně 500 μ l pufru PE. Sediment částic byl vysušen při pokojové teplotě, DNA byla vymyta 20 μ l 10 mM Tris-Cl (inkubace 5 minut při pokojové teplotě). Vzorek byl 30 sekund centrifugován, supernatant obsahující izolovanou nukleovou kyselinu byl přenesen do čisté zkumavky a pro další použití skladován při -80°C .

3.4.15 Stanovení koncentrace nukleových kyselin na spektrofotometru

Materiál: křemíkové kyvety (100 μ l), vzorek (DNA či RNA), dH_2O

Přístroje: spektrofotometr

Postup: Fotometrické stanovení koncentrace DNA je založeno na faktu, že nukleové kyseliny absorbují záření o vlnové délce 260 nm (maximum). Použitím spektrofotometru můžeme zjistit hodnotu absorbance při této vlnové délce a na jejím základě vypočítat koncentraci DNA ve vzorku. Hodnota absorbance 1 odpovídá přibližně 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA nebo ssRNA. Současně lze stanovit hodnotu absorbance při 280 nm (vlnová délka, při které dochází k maximální absorpci záření proteiny) a poměrem absorbancí A_{260}/A_{280} vyjádřit čistotu DNA. Hodnoty poměru čisté DNA nebo RNA se pohybují v rozmezí 1,8 - 2,0. DNA či RNA byla před měřením ředěna v poměru 1:50 dH_2O a 1:100. Čistá dH_2O byla použita jako blank. Z naměřených hodnot se podle zmíněného vzorce vypočítala koncentrace příslušné nukleové kyseliny (průměr jednotlivých ředění).

3.4.16 Gelová elektroforéza

Tato metoda byla využita ke kontrole přítomnosti, velikosti a integrity molekul RNA či DNA, případně k posouzení jejich čistoty. Dále také k dělení jednotlivých fragmentů DNA pro jejich následnou izolaci. Při manipulaci s ethidium bromidem je nutné pracovat v ochranných rukavicích (jedná se o silný karcinogen).

Materiál: agaróza; 1x TBE pufr; xx mg/ml ethidium bromid (EtBr); 5x nanášecí (vzorkový) pufr; marker molekulové hmotnosti (např. 2-log DNA Ladder/MassRuler™ DNA Ladder)

Přístroje: elektroforéza Amersham BioScience HE33 se zdrojem

Postup: Požadované množství agarózy bylo rozpuštěno v 60 ml TBE pufru zahříváním v mikrovlnné troubě. Po ochlazení (přibližně na 50°C) bylo přidáno 6 µl EtBr (pokud dojde k gelifikaci, lze gel novým ohřátím znovu rozpustit). Agaróza byla vylita do připravené formy s hřebínkem. Po ochlazení a gelifikaci agarózy byl hřebínek vyjmut z gelu a gel ponořen do elektroforetické vany s TBE puftrem (gel musí být ponořen). Vzorky RNA či DNA byly smíchány s nanášecím puftrem (1x) a do jamek gelu opatrně naneseny pipetou pod hladinou pufru, stejně jako doporučené množství markeru molekulové hmotnosti. Elektroforetická vana byla připojena ke stabilizovanému zdroji napětí. Po rozdělení byl gel vyjmut a vzorky vizualizovány pod UV lampou a vyfoceny.

3.4.17 Příprava plazmidu pro syntézu próby na *in situ* hybridizaci

Vektor byl linearizován štěpením enzymem, který zanechává 3' přesahující konce. Plazmid byl štěpen v bezprostřední blízkosti za transkribovaným inzertem. Toto štěpení je nutné k ukončení syntézy próby.

Materiál: plazmid s T3 a T7 promotorem (pCR4Blunt-TOPO) a inzertem pro syntézu próby (cDNA sekvence z knihovny *T.c.*); BSA (10 mg/ml); DEPC dH₂O; QIA prep spin kolonky; EB pufr bez RNáz (10 mM Tris – Cl, pH 7,4); restrikční enzym (NotI, PmeI)
Přístroje: inkubátor TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha)

Postup: Nejprve byla připravena 50 µl reakční směs obsahující 0,5 µl BSA, 20 µg plazmidu, 40 U restrikčního enzymu a zbytek objemu H₂O. Směs byla zamíchána, stočena a 1,5 hodiny inkubována při teplotě stanovené výrobcem enzymu. Štěpený plazmid byl přečištěn na QIA prep spin kolonce (dle návodu výrobce) a následně z kononky uvolněn 45 µl EB pufru. Pro odhad úspěšnosti štěpení (a ztrát) byly na agarózový gel naneseny vzorky plazmidu před a po štěpení a po přečištění.

Pro přípravu próby pro část *cyclin I* a *pirin* byl plazmid linearizován enzymem NotI a próba byla syntetizována z T3 promotoru. Pro přípravu próby pro část *like - glykosyltransferase* byl použit enzym PmeI, próba byla syntetizována z T7 promotoru.

3.4.18 Syntéza próby na RNA *in situ* hybridizaci

Materiál: přečištěný štěpený plazmid v EB pufru (připravený podle předchozího protokolu, 0,4 µg/µl); 10x transkripční pufr; RNasin HRP; DIG (digoxigenin labeled nucleotides); T3 a T7 RNA polymeráza (20U/µl); DNAáza I bez RNáz (10U/µl); 4M LiCl; EB pufr bez RNáz; 74% ethanol; 95% ethanol; dH₂O bez RNáz

Přístroje: stolní mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin plus; inkubátor TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha)

Postup: Nejprve byla připravena 10 µl standardní reakční směs: 1,5 µl plazmidu (0,6 µg), 1 µl transkripčního pufru, 0,3 µl RNAsinu HRP, 1µl DIG, 5,7 µl RNase free dH₂O, 0,6 µl RNA polymerázy. Směs byla jemně zamíchána, stočena a 2 hodiny inkubována při 37°C. Po přidání 1 µl DNázy I byla směs dalších 15 minut inkubována při 37°C. Po této době byla směs přečištěna přidáním 1,5 µl LiCl a 38 µl 95% ethanolu vychlazeného na -20°C, zamíchána a inkubována 30 minut při -80°C nebo přes noc při -20°C. Přesrážená RNA byla centrifugována 15 minut při 13000 rpm (4°C). Po odstranění supernatantu byl sediment promyt 100 µl 74% ethanolu vychlazeného na -20°C a centrifugován 5 minut při 13000 rpm (4°C). Po odstranění ethanolu byl sediment ihned rozpuštěn v 50 µl EB pufru, alikvotován po 10 µl a nejdéle 1 rok skladován při -80°C. Kontrola úspěšnosti syntézy a ztrát po přesrážení byla provedena elektroforeticky na 1% agarózovém gelu při 100 V.

3.4.19 RNA *in situ* hybridizace na celých jedincích

Metoda *in situ* hybridizace umožňuje detekovat přítomnost specifických sekvencí nukleových kyselin v tkáních (či celých jedincích) a s vysokou přesností stanovit jejich prostorovou lokalizaci. V našem případě nám tedy dává informaci o tom, kde je příslušný gen (mRNA) exprimován. Pro uskutečnění pokusu byla podle předchozího protokolu připravena sonda, která je komplementární k námi studované

mRNA. Sonda byla syntetizována z nukleotidů s příměsí značených (dioxygeninových). Po hybridizaci této sondy se vzorky vzniknou v místech, kde je gen exprimován, stabilní duplexy. Ty vizualizujeme inkubací vzorků s protilátkou rozeznávající modifikované nukleotidy. Tato protilátka je konjugovaná s enzymem (alkalickou fosfatázou). Po přidání substrátu katalyzuje jeho přeměnu v detekovatelný (barevný) produkt.

Pro *in situ* hybridizaci byly použity dospělé medúzy *T.c.* stabilizované v 4 % PFA v PBS. Před vlastním pokusem byly medúzy rozstříženy na shodné poloviny a sterilní jehlou propíchnuty na mnoha místech. Sníží se tak nespecifické zachytávání práb. Původní protokol byl připraven pro barvení myších embryí, s drobnými úpravami jej bylo možné aplikovat i na dospělé medúzy či vypreparovaná rhopalia. Došlo zejména k snížení hybridizační teploty a časů jednotlivých inkubací. Pokus trvá čtyři dny. Od prvního dne až do prvního post-hybridizačního oplachu je potřeba pracovat s roztoky a v prostředí bez RNáz. Pokud není uvedeno jinak, oplachem se rozumí 3 - 5 minut v daném roztoku při pokojové teplotě. Pro jednu až tři dospělé medúzy pracujeme s 5 ml promývacích roztoků.

Materiál:; Proteináza K 50U/ml; RNáza A (10 mg/ml); 30% H₂O₂; methanol; 25% glutaraldehyd; 10% SDS; DEPC dH₂O; 1M Tris – Cl (pH 7,5), 5M NaCl; levamisol – inhibitor endogenních fosfatáz; NBT BCIP; ovčí sérum; anti – dioxygenin - AP konjugovaná protilátka

Roztoky: prehybridizační pufr: 50% formamid, 5x SSC (pH 4,5), DEPC dH₂O, 5mM EDTA, 0,1% Tween 20, heparin (50 µg/ml); 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na₃citrát . 2H₂O (pH 4,5, upraveno HCl); hybridizační pufr: 50% formamid, 5x SSC, DEPC dH₂O, 0,1% Tween 20, 5mM EDTA, heparin (50 µg/ml), tRNA (50 µg/ml), lososí sperma (50 µg/ml); roztok I: 50% formamide, 4x SSC (pH 4,5), 1% SDS, DEPC dH₂O; roztok II: 0,5 M NaCl, 10 mM Tris – Cl (pH 7,5), DEPC dH₂O; roztok III: 50% formamid, 2x SSC (pH 4,5), DEPC dH₂O; TBST: 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris – Cl (pH 7,5), 0,1 % Tween 20, DEPC dH₂O; TBST s levamisolem: TBST, 2 mM levamisol; NTMT pufr: 100 mM NaCl, 100 mM Tris – Cl (pH 9,5), 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20, dH₂O; barvicí roztok: 10 µl NBT BCIP/0,5 ml NTMT pufru; PBT; 4% PFA v PBT; 6% H₂O₂ v MetOH; glycin v PBT (2 mg/ml); 1 mM EDTA v PBT

Postup: Den 1: Fixované tkáně (obvykle stabilně v 4% PFA v PBS či ASW) byly minimálně 2x promyty v PBT od paraformaldehydu (5 minut třepat) a 20 minut běleny v 6% H₂O₂ v MetOH při pokojové teplotě. Po bělení byly 3x opláchnuty v PBT a 15 minut permeabilizovány roztokem proteinázy K v PBT (1 µl proteináza K/ 1 ml PBT). Reakce byla zastavena dvěma oplachy glycinem v PBT (2 mg/ml) a následnými dvěma oplachy v čistém PBT. Tkáně byly 20 minut refixovány roztokem 0,2% glutaraldehydu a 4% PFA v PBS. Fixativum bylo odmyto dvěma oplachy PBT. Vzorky byly prehybridizovány s 2 ml hybridizačního pufru (předehřátého na 70°C) 60 – 90 minut při 70°C. Ribopróby (10 µl alikvóty po syntéze – cca. 1 µg) byly denaturovány ve 100 µl hybridizačního pufru 10 minut při 75 – 80°C. Od vzorků v prehybridizačním pufru byl odebrán 1 ml roztoku a nahrazen 0,9 ml předehřátého hybridizačního pufru a denaturovanou ribopróbou. Roztoky nesmí v průběhu manipulací zchladnout. Hybridizační směs byla inkubována přes noc při 70°C (pro celé medúzy zpravidla při 60°C nebo dokonce 55°C).

Den 2: Vzorky byly 2x opláchnuty 30 minut v roztoku I předehřátém na 70°C. následně byly opláchnuty 1x 10 minut v roztoku I/II (1:1) předehřátém na 70°C a 3x v roztoku II při pokojové teplotě. Pro odstranění volné a nespecificky vázané próby byl vzorek dvakrát inkubován 30 minut v roztoku RNáza A (100 µg/ml) v roztoku II při 37°C. Vzorky byly 2x opláchnuty 30 minut roztokem III při 65°C a 3x v TBST s levamisolem. Nespecifická vazba protilátek detekujících DIG značené nukleotidy byla blokována inkubací v 10% ovčím sérum v TBST 2 hodiny. Protilátka byla ředěna 1:1000 v TBST bez levamisolu a inkubována přes noc při 4°C.

Den 3: Vzorky byly opláchnuty 6x 1 hodinu v TBST, po posledním oplachu byly inkubovány v TBST přes noc při 4°C .

Den 4: Vzorky byly ekvilibrovány dvakrát 20 minut v NTMT pufru a barveny v minimálním objemu 0,5 ml barvicího roztoku 30 minut až přes noc (průběh barvení by kontrolován pod mikroskopem). Reakce byla zastavena několika oplachy 1 mM EDTA v PBT. Vzorky byly pro další použití uchovávány v 4% PFA v PBS při 4°C.

3.4.20 Analýza EST

Neznámé sekvence cDNA byly analyzovány prostřednictvím programu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) či FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/). Jako příklad zde uvedu program BLAST. Princip tohoto programu spočívá ve vyřazení „nevhodných“ sekvencí hned na začátku porovnávání, kdy se algoritmus snaží co nejrychleji lokalizovat podobné úseky sekvence bez mezer mezi sekvencí dotazu (námi zvolená sekvence) a sekvencemi databáze. Výstup programu obsahuje seznam sekvencí s nejlepšími HSP (high scoring pair) spolu s hodnotami pravděpodobnosti E (expected), které udávají pravděpodobnost výskytu stejné nebo lepší podobnosti s dotazem ve stejně velké databázi složené z náhodných sekvencí. HSP lze chápat jako úsek stejné délky dvou sekvencí se skóre, které už nelze zlepšit prodloužením. Následuje přiřazení nejlepších HSP a úhrnná statistika úlohy. V další části je uveden příklad výstupu porovnání podobnosti nukleotidové sekvence cDNA (knihovny larvy *Tripedalia cystophora*) s proteinovou databází programem BLASTX.

Zkrácený výstup programu BLASTX:

BLASTX 2.2.18+

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 6R7FBUFU014

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
6,668,918 sequences; 2,285,936,709 total letters

Taxonomy reports

Query=

Length=498

způsob zápisu $3e-57 = 3 \times 10^{-48}$

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

...část výstupu vystřížena...

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
<u>ref XP_001636098.1 </u> predicted protein...	<u>223</u>	3e-57	G
<u>ref XP_001231648.1 </u> PREDICTED: exportin 1 (CRM...	<u>219</u>	7e-56	UG
<u>ref XP_001375031.1 </u> PREDICTED: similar to...	<u>218</u>	2e-55	UG
<u>ref XP_001921337.1 </u> PREDICTED: similar to CRM1...	<u>218</u>	2e-55	G
<u>ref XP_001919797.1 </u> PREDICTED: similar to CRM1...	<u>218</u>	2e-55	

...část výstupu vystřížena...

ref|XP_001636098.1| **G** predicted protein [Nematostella vectensis]
gb|EDO44035.1| **G** predicted protein [Nematostella vectensis]
Length=1076

GENE ID: 5515995 NEMVEDRAFT vlg182854 | predicted protein [Nematostella vectensis] (10 or fewer PubMed links)

Score = 223 bits (569), Expect = 3e-57
Identities = 113/166 (68%), Positives = 136/166 (81%), Gaps = 3/166 (1%)
Frame = -1

frakce identických pozic

čtecí rámec

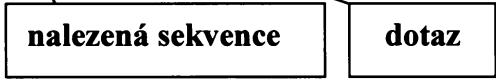
```

Query  498  VLDSIVWAFKHTMRNVADIALDILHGLLMNIQQHPEAAQSFYQTYTYITILQHILSVVTD  319
          VLDSIVWAFKHTMRNVAD L IL+ LL N++ EA+QSFYQTYTYITI+QH+LSVVTD
Sbjct  877  VLDSIVWAFKHTMRNVADTGLHILYSLKNMEAE-EASQSFYQTYTYITIVQHVLSVVTD  935

Query  318  SHTAGLTKHATILAHMFTQVENNAISTPLFDQMQRNPNMNNELYIKEYTAALLKQAYPH  139
          SHTAGLT HATILAHMF+ E+ I+ PLF+ + + + N+ YI+EY A +L+QA+PH
Sbjct  936  SHTAGLTMHATILAHMFSLAESGKITQPLFNSSEAQYAS--NQAYIQEYIANVLRQAFPH  993

Query  138  LQHAQIKVVFVQGLFDLNDISAFKEHLRDFLVQIKEFQGEDCVDLY  1
          LQ AQIK+ VQGLF+L+ DISAFKEHLRDFLVQIKE++ ED DLY
Sbjct  994  LQQAQIKITVQGLFNLNQDISAFKEHLRDFLVQIKEYSRSEDSTDLY  1039

```

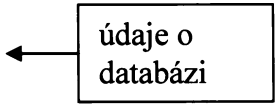


...část výstupu vystřižena...

```

Database: All non-redundant GenBank CDS
translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding
environmental samples from WGS projects
  Posted date: Jul 1, 2008  5:56 PM
  Number of letters in database: -2,009,030,583
  Number of sequences in database:  6,668,918

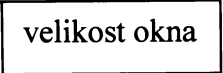
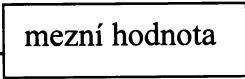
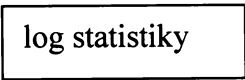
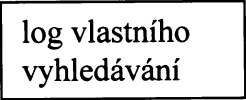
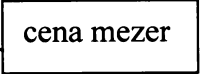
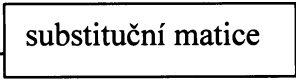
```



```

Lambda      K      H
  0.318     0.134   0.401
Gapped
Lambda      K      H
  0.267     0.0410  0.140
Matrix: BLOSUM62
Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1
Number of Sequences: 6668918
Number of Hits to DB: 208039841
Number of extensions: 4692076
Number of successful extensions: 11391
Number of sequences better than 10: 18
Number of HSP's better than 10 without gapping: 0
Number of HSP's gapped: 11369
Number of HSP's successfully gapped: 19
Length of query: 498
Length of database: 2285936709
Length adjustment: 124
Effective length of query: 374
Effective length of database: 1458990877
Effective search space: 61277616834
Effective search space used: 61277616834
T: 12
A: 40
X1: 16 (7.3 bits)
X2: 38 (14.6 bits)
X3: 64 (24.7 bits)
S1: 41 (20.4 bits)
S2: 73 (32.7 bits)

```



3.4.21 Statistické zpracování výsledků

Výsledné hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2000. V tabulkách a grafech jsou výsledné hodnoty uváděny jako aritmetický průměr.

7. Výsledky

Následuje přehled výsledků dosažených při konstrukci cDNA knihovny, analýza genů a exprese *pirin*, *like-glykosyltransferase* a *cyclin I* v rámci *Tripedalia cystophora*, které budou diskutovány v následující kapitole.

7.1 Příprava cDNA knihovny

Knihovna byla připravena z pigmentovaných larev *T.c.* nalovených v průběhu léta 2005 a fixovaných v RNA later stabilizátoru.

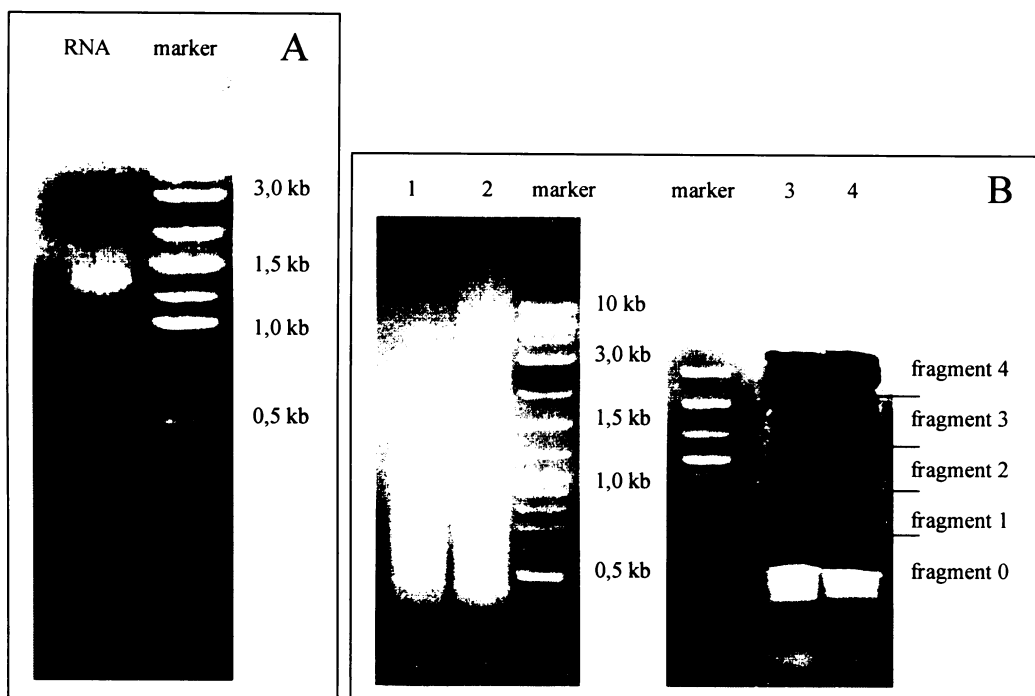
Izolace RNA, syntéza a amplifikace cDNA

RNA byla izolována metodou využívající jednofázový roztok fenolu a guanidin isothiocyánátu, TRIZOL, který během homogenizace buněk zachovává integritu RNA. Podle výše uvedeného postupu se podařilo izolovat 100 μ l RNA, jejíž koncentrace byla stanovena spektrofotometrickým měřením při 260 nm a činila 0,44 μ g/ μ l. Poměr A_{260}/A_{280} pro posouzení čistoty byl 1,65. Celistvost RNA byla zkontrolována na 1% gelu při 100V (Obr. 6 A).

cDNA byla syntetizována podle protokolu BD SMARTTM cDNA Library Construction Kit. LD PCR byla provedena s různým počtem cyklů, přičemž kvalita produktů byla kontrolována elektroforézou. Produkty PCR reakcí při použití 16, 18, 20 a 21 cyklů se zdály být pro následující práci nejvhodnější, proto byly smíchány.

Příprava cDNA inzertů

Získaná cDNA byla přečištěna fenol/chloroform/isoamylalkoholovou extrakcí a štěpena enzymem RsaI. Enzym RsaI hydrolyzuje fosfodiesterové vazby obou řetězců cDNA za tvorby restrikčních fragmentů s tupými konci. Cílovou sekvencí RsaI je 5'GT^VAC3' a 3'CA^VTG5' na komplementárním vlákně. Produkty štěpení byly nanесeny na 1,5% agarózový gel a rozděleny elektroforézou. Gel byl podle velikosti fragmentů rozdělen na pět částí: 0 = 0,5 kb – 0,6 kb, 1 = 0,6 kb – 0,8 kb, 2 = 0,8 kb – 1,0 kb, 3 = 1,0 kb – 1,5 kb, 4 = 1,5 kb – 2,5 kb (Obr. 6 B). Fragmenty cDNA byly z gelu zpětně izolovány podle QIAEX II Agarose Gel Extraction protokolu a označeny jako RsaIcDNA (0 – 4).

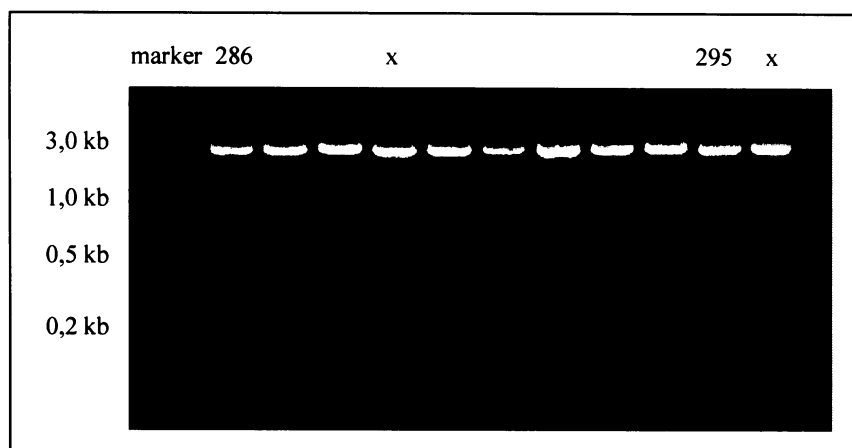


Obr. 6: **Izolace RNA a příprava cDNA.** (A) RNA izolovaná z larev *T.c.* Na 1% agarózový gel bylo nanášeno 5 μ l RNA, tedy přibližně 2,2 μ g. (B) Levá fotografie: (1) cDNA po štěpení enzymem *Rsa*I, (2) Produkty PCR cyklů (cDNA) 16, 18, 20 a 21, přečištěné, před štěpením. Pravá fotografie: 50 μ l štěpené cDNA bylo nanášeno na 1,5% agarózový gel, po rozdělení elektroforézou byl gel rozdělen na 5 částí podle velikosti jednotlivých fragmentů.

Příprava klonů

Plazmid pBluescript II KS byl linearizován enzymem *Sma*I (za tvorby tupých konců) a defosforylován alkalickou fosfatázou, aby se zabránilo jeho recirkularizaci. Inzerty *Rsa*IcDNA (0 – 4) byly do takto připraveného vektoru vloženy prostřednictvím T4 DNA ligázy. Plazmidy s inzerty byly do kompetentních buněk *Escherichia coli* přeneseny pomocí tepelného šoku. Transformované buňky byly kultivovány přes noc na LB agarových plotnách s příslušným selekčním agens. Následující den byly vypíchnuty jednotlivé kolonie, které byly dále kultivovány. Plazmidy byly zpětně izolovány metodou alkalické miniprepace, přečištěny a rozpuštěny v TER roztoku. Kontrola přítomnosti izolovaného plazmidu, vloženého inzertu, velikosti a integrity inzertu byla provedena elektroforeticky na 1% agarózovém gelu při 90 V (Obr. 7). Plazmidy byly štěpeny enzymy *Bam*HI a *Eco*RI, jejichž cílová místa se nacházejí v těsném sousedství restrikčního místa pro enzym *Sma*I.

Celkem bylo izolováno téměř 3000 klonů, z nichž přibližně 70% obsahovalo plazmid s vloženým inzertem a bylo následně sekvenováno. K největším chybám během pokusu došlo neúspěšnou ligací inzertu (a to především fragmentů velkých velikostí, tedy fragmentů RsaIcDNA 4) a plazmidu.



Obr. 7: **Plazmid s vyštěpeným inzertem cDNA.** Fotografie zobrazuje plazmidy štěpené enzymy BamHI a EcoRI a inzerty cDNA (286 – 295) různých velikostí, (x) značí plazmidy bez inzertu.

7.2 Analýza genů

Sekvence byla provedena servisním pracovištěm RNDr. Čestmíra Vlčka, Ph.D. (oddělení genomiky a bioinformatiky, UMG, Akademie věd České republiky). Celkem se podařilo získat 1187 sekvencí (většinou o délce 400 – 700 nukleotidů), které byly dále analyzovány programem FASTA a také programem BLAST.

Jednotlivé EST byly porovnány s genomy člověka (*Homo sapiens*), kopinatce (*Branchiostoma floridae*), ježovky (*Strongylocentrotus purpuratus*), octomilky (*Drosophila melanogaster*), háďátka (*Caenorhabditis elegans*) a sasanky (*Nematostella vectensis*). U 533 sekvencí byla nalezena homologie k alespoň jednomu z těchto modelových organismů. Z těchto sekvencí byly k 342 z nich stanoveny jednoznačné ortology, které byly seřazeny do tabulky sestupně dle míry homologie k *Homo sapiens*. 212 sekvencí bylo jedinečných, zbylých 110 bylo seřazeno do 40 skupin. Z každé skupiny pak byl v tabulce ponechán zástupce s nejvyšší podobností k člověku (Tab. 2). 86 EST vykazovalo homologii k člověku, ale homology u jednoho či více ze zvolených modelových organismů chyběly. Tyto EST jsou uvedeny v samostatné tabulce (Tab. 3)

Tab. 2: **Konzervace genů *Tripedalia cystophora***. Tabulka prezentuje EST *T.c.*, ke kterým byl nalezen homolog u všech testovaných organismů (pro zjednodušení v tabulce jen člověk, octomilka, háďátka a medúza). V prvním sloupci je název EST, v druhém název homologického proteinu, ve třetím název genu. Další sloupce uvádí míru podobnosti (tzv. *e-value*) k jednotlivým modelovým organismům (např. $1,20E-73 = 1,20 \times 10^{-73}$). (hs) *Homo sapiens*, (dm) *Drosophila melanogaster*, (ce) *Caenorhabditis elegans*, (nv) *Nematostella vectensis*.

SID	Description	Gene	hs	dm	ce	nn
TC0404R	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta	PPP1CB	1,20E-73	2,10E-74	3,20E-73	9,70E-70
TC0292R	eukaryotic translation initiation factor 2,	EIF2S3	1,40E-73	6,50E-72	4,80E-65	6,00E-73
TCA1150R	aldehyde dehydrogenase 6A1 precursor	ALDH6A1	2,50E-66	2,50E-60	1,00E-64	2,60E-65
TC1604R	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	GLUL	2,80E-66	3,40E-71	2,00E-74	3,00E-72
TC1565R	proteasome alpha 6 subunit	PSMA6	2,20E-62	3,70E-47	7,00E-38	1,20E-58
TCA1086R	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha	EEF1A2	5,30E-61	4,50E-61	4,70E-62	3,20E-57
TC0355R	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	HSPA8	2,40E-60	6,00E-63	1,40E-60	4,10E-58
TC1567R	alpha isoform of regulatory subunit A, protein	PPP2R1A	2,80E-59	1,10E-52	3,80E-40	1,40E-57
TC0562R	karyopherin alpha 3	KPNA3	1,40E-57	3,20E-57	2,70E-53	4,90E-55
TC0340R	calnexin precursor	CANX	1,10E-56	4,90E-44	8,00E-39	4,00E-57
TC0399R	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	NDUFS2	1,20E-56	2,70E-55	2,00E-49	1,60E-57
TC0745R	esterase D/formylglutathione hydrolase	ESD	2,90E-56	4,50E-45	8,80E-36	2,60E-56
TC0938R	glucose phosphate isomerase	GPI	4,50E-56	7,00E-52	4,70E-51	7,80E-58
TC0694R	catalase	CAT	6,30E-56	5,30E-58	3,50E-55	1,20E-09
TC0272R	ribosomal protein L3	RPL3	2,70E-55	4,30E-61	2,90E-53	3,60E-56
TC0059R	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1	ATP5A1	2,50E-52	4,70E-53	8,80E-54	6,20E-54
TC0892R	ribosomal protein L10	RPL10	6,00E-52	1,50E-54	1,30E-48	2,90E-52
TC0396R	beta actin	ACTB	1,40E-51	4,10E-53	3,70E-53	9,70E-52
TCA1138R	protein arginine N-methyltransferase 4	HRMT1L4	3,60E-51	3,80E-50	8,50E-42	1,40E-49
TCA1062R	Ras-related GTP binding B short isoform	RRAGB	4,00E-51	1,70E-42	2,10E-30	5,40E-48
TC1139R	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	IDH1	8,30E-51	8,80E-48	1,70E-49	1,00E-49
TC0759R	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,	PFKFB4	9,10E-51	8,70E-49	1,60E-46	4,00E-51
TC1538R	spermidine synthase	SRM	1,40E-50	8,00E-43	1,10E-42	1,00E-55
TC0439R	ras homolog gene family, member A	RHOA	4,60E-50	1,80E-50	2,70E-51	2,40E-49
TCA1054R	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	7,70E-50	1,20E-51	9,10E-23	2,60E-45
TC1617R	WD repeat domain 23 isoform 2	WDR23	2,60E-48	1,10E-19	6,60E-30	6,30E-46
TC0323R	ras-related nuclear protein	RAN	2,70E-48	3,00E-49	4,30E-48	1,20E-47
TC0728R	succinate dehydrogenase complex, subunit A,	SDHA	2,90E-48	2,50E-49	1,20E-47	6,70E-51
TC0068R	ribosomal protein L8	RPL8	5,80E-48	1,50E-54	8,60E-48	1,60E-52
TC0249R	Na+/K+ -ATPase alpha 3 subunit	ATP1A3	8,20E-48	3,30E-50	1,20E-46	1,10E-38
TC0007R	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	CAMK1D	1,10E-47	2,20E-41	6,10E-41	2,30E-56
TCA1154R	FK506 binding protein 12-rapamycin associated	FRAP1	1,30E-47	1,80E-46	2,20E-40	6,20E-53
TC1921U	ribosomal protein L4	RPL4	7,80E-47	9,50E-44	5,30E-43	1,20E-55
TC0874R	peroxisomal enoyl-coenzyme A hydratase-like	ECH1	1,80E-45	4,40E-42	1,40E-35	1,60E-48
TC0366R	solute carrier family 25 member 3 isoform b	SLC25A3	3,00E-45	3,40E-46	2,10E-45	1,80E-54
TC1504R	proteasome 26S non-ATPase subunit 8	PSMD8	3,20E-45	7,70E-33	8,20E-24	1,60E-42
TC0287R	inosine monophosphate dehydrogenase 1 isoform b	IMPDH1	1,40E-43	7,10E-34	1,40E-25	5,50E-39
TC0023R	actin related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3	1,10E-42	5,40E-38	2,20E-32	2,60E-48
TC0536R	TBC1 domain family, member 22A	TBC1D22A	2,20E-42	1,20E-37	3,60E-37	2,80E-41
TC0202R	ribosomal protein L23	RPL23	4,30E-42	2,30E-45	5,50E-42	5,40E-42
TC0040R	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	DDX4	6,80E-42	6,00E-42	3,90E-35	4,80E-55
TC0608R	ribosomal protein S15a	RPS15A	1,20E-41	6,60E-40	7,40E-37	1,20E-40
TCA1074R	heat shock 90kDa protein 1, alpha isoform 2	HSPA	3,90E-40	5,80E-39	4,00E-38	1,60E-39
TC0744R	phosphatidylinositol glycan, class K precursor	PIGK	6,00E-40	6,20E-37	1,50E-28	4,90E-40
TC0369R	H2A histone family, member V isoform 1	H2AFV	1,70E-39	6,20E-40	1,40E-36	6,70E-41
TC0375R	ribosomal protein S5	RPS5	2,30E-39	4,10E-36	3,30E-36	1,50E-41
TC0613R	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	2,50E-39	5,10E-32	9,50E-10	1,30E-37
TC1591R	electron transfer flavoprotein, alpha	ETFA	1,40E-38	2,50E-40	4,60E-37	3,10E-44
TC1658R	calmodulin 2	CALM2	9,80E-38	2,90E-38	1,20E-39	5,90E-38
TC0082R	mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase	PCK2	1,10E-37	1,80E-34	7,80E-40	3,50E-38
TC0599R	ribosomal protein L13	RPL13	1,50E-37	2,30E-35	1,20E-34	2,70E-44
TC0446R	GALNAC-T11	GALNT11	2,30E-37	5,30E-38	6,40E-38	2,70E-47
TC0118R	hydroxyacyl dehydrogenase, subunit A	HADHA	5,60E-37	7,80E-39	8,30E-30	2,40E-46
TC1655R	sulfide dehydrogenase like	SQRDL	7,60E-37	2,00E-27	4,90E-23	7,40E-42

TC0356R	ribosomal protein S15	RPS15	2,60E-36	9,20E-40	2,20E-33	1,00E-38
TC0103R	adaptor-related protein complex 1 beta 1 subunit	APIB1	5,10E-36	1,70E-41	3,20E-30	3,10E-45
TC0462R	Huntingtin interacting protein E	HYPE	6,00E-36	7,60E-34	1,20E-27	1,50E-35
TC1098R	brain creatine kinase	CKB	8,90E-36	1,50E-69	2,60E-59	2,50E-40
TC1978R	hypothetical protein LOC79654	HECTD3	2,50E-35	9,10E-11	1,10E-08	2,60E-34
TC0602R	carnitine/acylcarnitine translocase	SLC25A20	3,30E-34	2,50E-33	1,80E-29	6,40E-38
TC0279R	chapsyn-110	DLG2	6,20E-34	3,90E-16	2,70E-13	6,10E-37
TC0917R	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alpha 2 subunit proprotein	ATP1A2	1,20E-33	1,20E-36	2,80E-30	7,80E-34
TC0601R	ribosomal protein P0	RPLP0	1,90E-33	8,50E-37	2,30E-38	3,70E-36
TC0364R	ribosomal protein S3	RPS3	2,20E-33	8,10E-29	5,40E-30	4,40E-32
TC0130R	RAE1 (RNA export 1, S.pombe) homolog	RAE1	5,10E-33	1,90E-29	1,40E-18	6,90E-33
TC1625R	sorting nexin associated golgi protein 1	SNAG1	5,40E-33	1,80E-23	8,20E-28	1,00E-38
TC0048R	proteasome alpha 7 subunit isoform 1	PSMA7	7,80E-33	4,60E-28	2,00E-18	5,20E-33
TC0921R	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	NDUFV2	1,10E-32	1,40E-26	1,80E-28	2,60E-24
TC0387R	CSE1 chromosome segregation 1-like protein	CSE1L	1,20E-32	6,30E-27	2,60E-11	1,70E-33
TCA1038R	MEGF11 protein	MEGF11	1,40E-32	1,00E-27	8,20E-33	3,00E-25
TC1973U	zinc finger protein 596	ZNF596	3,60E-32	5,10E-25	2,50E-20	2,20E-32
TC0490R	protein disulfide isomerase-associated 3	PDIA3	3,80E-32	2,20E-37	1,10E-31	8,60E-37
TC0229R	hypothetical protein LOC146845	wdr16	9,60E-32	2,00E-16	2,10E-05	2,40E-33
TC0178R	ribosomal protein L23a	RPL23A	9,80E-32	5,80E-27	3,50E-22	4,60E-31
TC0974R	minichromosome maintenance protein 3 associated	MCM3AP	1,60E-31	6,10E-30	1,50E-23	6,50E-31
TC0887R	dual specificity phosphatase 22	DUSP22	2,70E-31	9,10E-28	1,30E-11	3,50E-27
TC0423R	RAN binding protein 5	RANBP5	4,20E-31	2,70E-25	1,20E-07	5,20E-29
TCA1077R	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 50/57kDa, V1	ATP6V1H	5,80E-31	6,10E-32	3,50E-28	3,60E-29
TC0099R	microtubule-associated protein 1 light chain 3	MAP1LC3C	1,40E-30	1,10E-13	3,90E-20	2,50E-36
TCA1061R	pleckstrin homology domain containing, family A	PLEKHA3	9,40E-30	9,30E-11	1,80E-05	1,50E-38
TC1908R	ATP-binding cassette sub-family B member 1	ABCB1	4,70E-29	6,40E-30	1,10E-29	3,70E-31
TC1886R	tumor rejection antigen (gp96) 1	TRA1	1,70E-28	1,30E-29	6,40E-30	1,80E-32
TC1600R	Apg3p	APG3L	2,00E-28	1,20E-17	6,90E-18	3,70E-23
TC0955R	degenerative spermatocyte homolog 1, lipid	DEGS1	2,30E-28	2,50E-31	2,30E-24	8,30E-29
TC0101R	ribophorin I precursor	RPN1	1,30E-27	5,80E-15	3,10E-15	9,80E-29
TC0391R	ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	1,30E-27	1,00E-19	9,70E-28	1,30E-38
TC1527R	LIM domain only 6	LMO6	3,70E-27	4,10E-29	4,10E-34	6,30E-38
TC1975U	B5 receptor	hfl-B5	4,20E-27	3,10E-28	4,80E-15	1,30E-30
TC0609R	ribosomal protein S4, X-linked X isoform	RPS4X	6,60E-27	1,90E-26	1,00E-24	3,90E-27
TC0293R	aconitase 1	ACO1	2,40E-26	1,30E-28	4,70E-26	6,80E-29
TC0760R	RAB35, member RAS oncogene family	RAB35	4,00E-26	4,30E-22	6,00E-19	5,10E-23
TC0797R	MYG1 protein	C12orf10	5,10E-26	3,20E-12	1,40E-23	7,30E-28
TCA1051R	glutamate dehydrogenase 1	GLUD1	5,90E-26	7,60E-22	1,10E-22	3,80E-28
TCA1075R	S-adenosylmethionine decarboxylase 1 precursor	AMD1	8,10E-26	6,50E-20	6,90E-17	5,90E-31
TC1175R	thioredoxin family Trp26	C1orf128	9,00E-26	7,10E-28	1,50E-21	6,60E-29
TC0811R	trans-prenyltransferase	TPRT	1,40E-25	5,00E-24	1,40E-16	9,70E-25
TC0450R	phosphoglucomutase 3	PGM3	5,90E-25	9,50E-21	2,30E-12	5,30E-24
TC0585R	WD repeat-containing protein 1 isoform 2	WDR1	1,30E-24	4,30E-20	1,50E-16	2,20E-25
TC0703R	tissue specific transplantation antigen P35B	TSTA3	1,40E-24	4,80E-17	4,70E-22	7,70E-21
TC1606R	prickle-like 1	PRICKLE1	1,40E-24	1,80E-25	1,00E-30	2,80E-36
TC1674R	rabphilin 3A-like (without C2 domains)	RPH3AL	1,80E-24	6,90E-20	5,50E-19	6,10E-22
TC0333R	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein	UQCRC2	2,40E-24	5,40E-13	1,50E-12	3,40E-25
TCA1019R	tetraspanin 14	TSPAN14	8,50E-24	1,60E-24	1,10E-18	5,10E-29
TC0619R	superoxide dismutase 1, soluble	SOD1	1,20E-22	1,30E-26	6,80E-27	2,80E-30
TC0384R	ubiquitin-like protein ubi and ribosomal	FAU	1,70E-22	7,70E-21	4,30E-19	6,10E-27
TC0132R	ribosomal protein L9	RPL9	3,30E-22	5,30E-22	2,60E-21	5,60E-25
TC1663R	fast skeletal myosin alkali light chain 1	MYL1	6,10E-22	6,70E-23	2,60E-22	3,20E-24
TC0520R	translocase of inner mitochondrial membrane 17	TIMM17A	1,10E-21	4,80E-18	8,90E-17	6,80E-29
TC0593R	DNA polymerase delta interacting protein 2	POLDIP2	1,20E-21	5,10E-22	4,30E-07	9,10E-25
TCA1034R	TNF receptor-associated factor 3 isoform 2	TRAF3	1,90E-21	1,90E-18	5,90E-20	1,50E-56
TC0624R	cell division cycle 20	CDC20	3,00E-21	2,10E-14	4,50E-07	5,50E-26
TCA1097R	CD151 antigen	CD151	4,80E-21	1,60E-15	5,50E-09	4,40E-32
TC0467R	ribosomal protein S20	RPS20	6,10E-21	1,30E-20	1,40E-19	3,00E-21
TC0374R	ras homolog gene family, member B	RHOB	1,30E-20	1,00E-18	5,20E-21	3,40E-24
TC0050R	prolylcarboxypeptidase isoform 1 preproprotein	PRCP	1,90E-20	2,60E-12	1,80E-15	3,30E-19
TC0062R	ornithine decarboxylase 1	ODC1	2,10E-20	2,80E-16	1,20E-15	1,40E-26
TC0737R	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation	DYRK2	2,20E-20	5,80E-14	2,00E-13	2,50E-15
TC1143R	fibulin 1 isoform A precursor	FBLN1	2,50E-19	2,00E-15	3,20E-16	4,80E-17
TC1726R	proteasome activator subunit 3 isoform 1	PSME3	4,20E-19	9,20E-15	1,90E-15	2,60E-14
TC1985R	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	MYH10	5,00E-19	4,20E-20	1,70E-18	4,60E-17

TC1212R	adhesion regulating molecule 1 precursor	ADRM1	2,50E-18	4,30E-11	1,60E-08	1,90E-17
TC1643R	carboxyl ester lipase precursor	CEL	5,00E-18	6,60E-24	1,70E-18	1,70E-18
TC1082R	glutamate receptor, metabotropic 4	GRM4	1,20E-17	1,10E-14	3,00E-11	1,00E-15
TC0888R	casein kinase II alpha 1 subunit isoform b	CSNK2A1	1,70E-17	5,40E-16	7,30E-19	1,10E-18
TC0752R	eukaryotic translation initiation factor 3,	EIF3S8	3,50E-17	5,50E-16	1,10E-11	4,60E-20
TC0390R	von Hippel-Lindau binding protein 1	VBPI	4,70E-17	4,00E-16	4,20E-09	1,60E-15
TC0757R	macrophage receptor with collagenous structure	MARCO	1,30E-16	3,90E-14	2,60E-21	8,90E-19
TC0610R	Sec61 beta subunit	SEC61B	2,80E-16	5,70E-17	8,80E-14	1,30E-17
TC0638R	cholinergic receptor, nicotinic, alpha	CHRNA4	2,80E-16	1,50E-17	9,40E-15	4,50E-18
TC0688R	Kruppel-like factor 15	KLF15	4,70E-16	2,60E-16	2,60E-18	5,70E-20
TC0159R	H1 histone family, member 0	H1F0	3,00E-15	2,00E-08	1,80E-14	1,10E-23
TC0032R	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	DDX5	3,30E-15	1,00E-15	1,70E-15	1,40E-18
TC1131R	caltractin	CETN2	5,00E-15	5,10E-13	2,30E-05	2,60E-17
TC0702R	tolloid-like 1	TLL1	7,20E-15	2,00E-16	3,00E-22	4,60E-21
TCA1156R	tumor susceptibility gene 101	TSG101	1,70E-14	1,40E-09	2,10E-13	1,10E-12
TC0700R	putative NFkB activating protein 373 isoform 1	C1orf139	2,60E-14	1,70E-17	4,30E-08	3,60E-17
TC0550R	poly A binding protein, cytoplasmic 4	PABPC4	2,90E-14	1,00E-15	1,10E-17	9,50E-18
TC0297R	tropomyosin 4	TPM4	3,00E-14	5,90E-13	6,70E-14	1,50E-19
TC0465R	PHD finger protein 10 isoform b	PHF10	5,90E-14	1,20E-07	4,90E-06	3,50E-15
TC1577R	NADPH cytochrome B5 oxidoreductase	CYB5R4	8,80E-14	7,00E-07	4,50E-06	3,80E-11
TCA1056R	general transcription factor IIB	GTF2B	1,20E-13	7,30E-12	3,80E-11	2,30E-10
TC0456R	endomembrane protein emp70 precursor isolog	SMBP	2,70E-13	2,10E-14	1,00E-12	8,80E-14
TC0766R	tropomyosin 1 alpha chain isoform 2	TPM1	5,90E-13	1,80E-14	2,80E-14	3,20E-19
TC0922R	synaptotagmin IX	SYT9	7,90E-13	3,30E-11	4,40E-10	1,00E-16
TC0641R	D-aspartate oxidase isoform b	DDO	1,30E-12	4,00E-14	4,20E-11	3,90E-14
TC0813R	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain	CHCHD2	1,40E-12	2,80E-12	1,40E-12	2,50E-19
TC0406R	collectin sub-family member 12 isoform II	COLEC12	2,50E-12	3,00E-11	2,90E-16	6,50E-14
TC0504R	folylpolyglutamate synthase isoform b	FPGS	7,20E-12	1,50E-06	2,40E-07	4,70E-10
TC1578R	sorcin isoform b	SRI	7,30E-12	3,50E-12	5,70E-08	2,40E-15
TCA1117R	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	DNAJA3	1,60E-11	1,70E-12	1,60E-10	1,60E-13
TC0339R	ankyrin 1 isoform 2	ANK1	3,10E-11	2,50E-10	4,10E-13	8,60E-07
TC0373R	phosphatidic acid phosphatase type 2B	PPAP2B	6,10E-11	1,60E-08	1,90E-08	1,30E-13
TC1879R	fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	1,80E-10	7,30E-11	3,30E-08	8,10E-12
TC1226R	hypothetical protein LOC57003	GK001	2,00E-10	2,20E-10	3,40E-11	3,10E-11
TC1854R	CCAAT/enhancer binding protein gamma	CEBPG	3,20E-10	5,70E-05	8,00E-05	3,30E-10
TC0319R	myosin IB	MYO1B	4,40E-10	4,10E-09	4,30E-05	5,60E-07
TC0378R	natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase	NPR1	4,70E-10	1,70E-10	1,40E-09	3,00E-21
TC0872R	cytochrome P450, family 1, subfamily B,	CYP1B1	1,30E-09	7,70E-06	6,60E-07	8,40E-10
TC0751R	acetylcholinesterase collagen-like tail subunit	COLQ	1,70E-09	2,10E-09	4,40E-13	1,40E-09
TC0978R	inner membrane protein, mitochondrial	IMMT	2,10E-09	1,80E-07	6,50E-09	2,50E-10
TC0037R	tropomyosin 3	TPM3	8,80E-09	2,30E-08	4,00E-07	2,40E-10
TC0418R	aldehyde oxidase 1	AOX1	1,10E-08	2,40E-08	4,30E-05	1,30E-16
TC0948R	nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	1,70E-08	9,40E-06	2,00E-05	2,20E-26
TC0070R	carbonic anhydrase XIV precursor	CA14	4,90E-08	2,70E-08	3,10E-07	2,70E-06
TC0720R	TPR domain, ankyrin-repeat and	TANC	6,00E-08	1,60E-08	4,50E-07	1,10E-05
TC1644R	developing brain homeobox 2	DBX2	7,20E-08	3,40E-08	5,70E-07	1,20E-09
TC0991R	ADP-ribosylation factor-like 3	ARL3	7,60E-08	6,50E-05	9,60E-06	1,80E-06
TC0172R	homeo box B2	HOXB2	3,90E-07	2,40E-08	1,80E-07	8,60E-08
TCA1027R	collagen, type XI, alpha 2 isoform 3	COL11A2	3,90E-07	6,50E-07	2,00E-08	2,20E-09
TC1524R	cytochrome P450, family 4, subfamily B,	CYP4B1	4,80E-07	2,40E-05	3,50E-05	3,90E-08
TC1861R	creatine kinase, mitochondrial 1A precursor	CKMT1A	4,80E-07	1,10E-19	6,40E-13	3,40E-08
TC1229R	hypothetical protein LOC758	C22orf1	5,10E-07	3,20E-06	8,10E-05	4,90E-06
TC0682R	cystathionine-beta-synthase	CBS	6,90E-07	3,50E-05	9,50E-06	5,20E-09
TCA1006R	alpha 2 type VI collagen isoform 2C2a precursor	COL6A2	4,30E-06	3,20E-06	1,70E-07	7,60E-10
TC1189R	ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho	RAC3	7,00E-06	2,10E-06	5,40E-05	1,20E-05
TC1739R	tubulin alpha 6	TUBA6	1,10E-05	2,80E-06	1,20E-05	8,40E-07
TC0041R	CDA02 protein	eIF2A	3,10E-12	1,80E-05	1,80E-08	9,30E-24
TC0419R	dentin sialophosphoprotein preproprotein	DSPP	1,80E-06	8,30E-07	1,80E-06	2,40E-07
TC0326R	nuclear transcription factor Y, alpha isoform 2	NFYA	5,60E-16	7,80E-11	9,70E-08	2,50E-17
TC0820R	SEC14-like 3	SEC14L3	1,20E-17	1,30E-11	1,60E-11	6,40E-21
TC0781R	hypothetical protein LOC84553	C6orf168	4,60E-22	4,30E-12	1,40E-14	7,00E-29
TCA1127R	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	3,40E-40	6,10E-38	5,30E-39	1,40E-40
TC0213R	exportin 1	XPO1	9,90E-37	1,50E-34	3,30E-22	4,70E-36
TC0746R	tripeptidyl peptidase II	TPP2	3,90E-43	1,30E-18	3,50E-32	5,60E-44
TC0336R	family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	9,00E-45	4,40E-46	9,40E-30	1,50E-46
TC0080R	cytochrome c-1	CYC1	3,30E-52	4,70E-53	1,80E-43	3,50E-27

Tab. 3: **Ztracené geny.** Tabulka prezentuje EST *T.c.*, u kterých se minimálně k jednomu modelovému organismu nenalezl jednoznačný homolog. EST jsou seřazeny podle míry podobnosti ke člověku sestupně. V prvním sloupci je název EST *T.c.*, v druhém název homologického proteinu, ve třetím název genu. Další sloupce uvádí míru podobnosti k jednotlivým modelovým organismům. (hs) *Homo sapiens*, (bf) *Branchiostoma floridae*, (sp) *Strongylocentrotus purpuratus*, (dm) *Drosophila melanogaster*, (ce) *Caenorhabditis elegans*, (nv) *Nematostella vectensis*.

SID	Description	Gene	hs	bf	sp	dm	ce	nm
TC1155R	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	RRM2	1,10E-59		2,00E-57	4,80E-56	3,10E-52	1,10E-57
TC0573R	ATP-binding cassette, sub-family E, member 1	ABCE1	8,70E-49		2,40E-50	6,20E-47	3,20E-43	9,30E-30
TCA1102R	actin related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	5,60E-48	1,70E-47		2,00E-47	1,70E-43	3,30E-49
TC0772R	clathrin heavy chain 1	CLTC	6,40E-48	1,60E-52		6,50E-49	3,50E-47	4,80E-51
TC0398R	Bardet-Biedl syndrome 7 protein isoform b	BBS7	2,20E-43	2,00E-42	1,10E-40		1,70E-15	2,10E-09
TCA1045R	phosphogluconate dehydrogenase	PGD	1,40E-39	1,10E-42		1,50E-37	2,70E-38	9,40E-45
TC0747R	glutamyl-tRNA synthetase	QARS	3,90E-39	1,10E-39		2,00E-36	1,60E-32	5,20E-42
TC0108R	hypothetical protein LOC159686	C10orf80	1,30E-35		1,80E-39			1,70E-29
TC0386R	nucleoside-diphosphate kinase 7 isoform b	NME7	1,30E-34	1,20E-35	4,90E-36	2,60E-22		2,30E-37
TC0268R	damage-specific DNA binding protein 2 (48kD)	DDB2	2,40E-34	1,10E-30	1,10E-06			
TC1702R	adenylate kinase 7	AK7	9,90E-31	7,40E-43	2,00E-45			2,00E-43
TC0956R	translocase of outer mitochondrial membrane 70	TOMM70A	4,60E-28	1,50E-29	2,70E-31	5,20E-22		6,30E-33
TC0727R	hypothetical protein LOC399671	MGC48595	2,80E-27	1,10E-33	9,60E-37			2,60E-35
TC1943R	cofactor required for Sp1 transcriptional	CRSP3	2,50E-26	3,40E-12	7,60E-26	4,60E-22		4,30E-16
TC1013R	betaine-homocysteine methyltransferase	BHMT	2,60E-26	7,80E-25	4,60E-21			4,90E-25
TCA1113R	H2A histone family, member Y isoform 3	H2AFY	4,20E-26	1,00E-25	1,40E-26			6,50E-24
TC1588R	testis expressed gene 261	TEX261	2,80E-24	2,50E-24	4,20E-24	3,90E-18		3,10E-23
TC0930R	ankyrin repeat domain protein 5	ANKRD5	2,90E-24	3,90E-06	6,90E-20	2,00E-05		6,10E-32
TC0591R	RAD51-like 1 isoform 2	RAD51L1	2,40E-23		1,30E-10	2,10E-06		1,60E-11
TC1534R	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing	NAPE-PLD	2,60E-23		3,50E-26		7,50E-10	8,50E-18
TC0142R	tripeptidyl-peptidase 1 precursor	TPPI	3,50E-23	2,00E-27				9,10E-31
TC1867R	sperm tail protein SHIPPO1	ODF3	3,10E-22	2,00E-29	3,60E-31	2,70E-06		8,00E-31
TCA1020R	threonyl-tRNA synthetase	TARS	3,80E-21	7,00E-22		4,40E-21	6,10E-23	6,50E-24
TC1607R	hypothetical protein LOC91147	MGC26979	7,40E-21	4,70E-19	5,40E-22			2,90E-21
TC0295R	pirin	PIR	8,80E-19		2,00E-20			6,50E-34
TC1942R	calbindin 2 isoform 20k	CALB2	9,80E-19	2,60E-12	1,30E-19			3,40E-19
TC1531R	EF-hand domain (C-terminal) containing 2	EFHC2	1,20E-18	1,40E-22	5,50E-30	1,70E-07		4,80E-29
TC1583R	like-glycosyltransferase	LARGE	3,20E-18		7,00E-30			5,80E-13
TC0914R	signal recognition particle 72kDa	SRP72	6,20E-18	2,30E-19		3,10E-10		1,50E-19
TC1190R	tubulin, gamma complex associated protein 6	TUBGCP6	1,50E-17	5,80E-19	2,40E-21	1,90E-06		4,70E-25
TC0003R	coagulation factor XIII A1 subunit precursor	F13A1	6,10E-17	2,00E-20	2,80E-17	4,60E-14		1,10E-17
TC0239R	hypothetical protein LOC84260	MGC10854	1,20E-16	7,20E-19	2,10E-16	3,50E-06		7,50E-26
TC1039R	Niemann-Pick disease, type C1	NPC1	1,40E-16	1,60E-17	2,10E-15	1,10E-15		3,30E-14
TC1620R	glycogen phosphorylase	PYGM	4,60E-16	1,20E-14		1,10E-14	8,70E-15	4,70E-13

TC1149R	armadillo repeat-containing protein	ARMC1	1,90E-15	1,20E-15	9,60E-15	8,40E-24
TC0312R	nucleoporin 107kDa	NUP107	5,40E-15	2,90E-23	3,70E-19	1,50E-26
TC0794R	splicing factor YT521-B	YT521	1,30E-14	5,60E-15	5,40E-17	2,80E-18
TC0393R	tumor protein, translationally-controlled 1	TPT1	1,40E-14	5,80E-20	7,60E-08	2,40E-06
TC0114R	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 6	SMAD6	1,70E-14	1,20E-17	8,10E-17	5,80E-14
TC0348R	THAP domain containing 9	THAP9	2,80E-14		3,20E-12	
TC0407R	NYD-SPI4 protein	NYD-SPI4	3,70E-14	1,90E-20	3,80E-24	5,50E-23
TC0607R	copine 7 isoform a	CPNE7	3,90E-13	3,90E-37	1,20E-43	1,20E-41
TC0432R	phospholipase A2, group VII	PLA2G7	1,40E-11	3,40E-13	7,30E-06	2,30E-06
TC0428R	general transcription factor IIIC, polypeptide	GTF3C5	1,50E-11	1,30E-09		1,10E-08
TC0260R	outer dense fiber of sperm tails 2 isoform 1	ODF2	2,80E-11		1,70E-11	6,00E-14
TC1176R	cofactor required for Sp1 transcriptional	CRSP2	8,20E-11	1,90E-14	1,10E-08	
TC1865R	oxidored-nitro domain-containing protein isoform	C1orf102	1,00E-10	7,20E-11	1,10E-10	3,80E-14
TC0764R	cyclinI	CCNI	1,10E-10		5,00E-16	1,40E-06
TC0212R	solute carrier family 43, member 3	SLC43A3	7,70E-10	1,20E-13	2,60E-08	
TC0932R	flavin containing monooxygenase 3 isoform 1	FMO3	9,00E-10	2,50E-09	1,20E-07	1,00E-05
TCA1073R	amine oxidase (flavin containing) domain 1	AOF1	1,40E-09	2,60E-27	5,00E-27	6,20E-29
TC0674R	ankyrin repeat domain 12	ANKRD12	1,50E-09		1,40E-07	9,00E-12
TCA1028R	zinc finger protein 9	ZNF9	2,40E-09		3,90E-11	3,40E-10
TC0388R	death-associated protein	DAP	2,50E-09	2,70E-12	3,80E-09	1,20E-09
TC1144R	transloklin	PIG8	3,10E-09	3,80E-15	9,40E-15	2,80E-16
TC1095R	hypothetical protein LOC493911	PHOSPHO2	3,30E-09	3,80E-08		3,10E-08
TC1723R	SDS3 protein	SDS3	1,10E-08	2,80E-18		1,70E-20
TC1581R	ring finger protein 123	RNF123	1,40E-08		3,20E-07	6,50E-11
TC1916U	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein	CD2BP2	1,80E-08	2,50E-13	5,50E-08	4,00E-11
TC2000R	glucosamine-fructose-6-phosphate	GFPT1	2,30E-08	3,30E-09		1,90E-05
TCA1128R	transmembrane channel-like 7	TMC7	6,40E-08	4,30E-18	1,30E-16	4,60E-06
TC1672R	integrin-linked kinase-associated protein	ILKAP	6,50E-08	1,50E-05	3,90E-06	8,70E-16
TC1635R	Smcx homolog, X chromosome	SMCX	8,20E-08		6,00E-07	8,40E-06
TC0659R	hypothetical protein LOC54903	FLJ20345	1,80E-07	4,50E-11	2,10E-08	1,30E-10
TC0871R	WW domain-containing oxidoreductase isoform 2	WVOX	2,10E-07		9,00E-07	8,30E-12
TCA1114R	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5	DNAJC5	2,10E-07	1,50E-11		1,80E-05
TCA1082R	suppressor of potassium transport defect 3	SKD3	3,40E-07	2,00E-05		5,40E-13
TC0163R	cofilin 2	CFL2	5,50E-07	1,60E-05		4,70E-05
TCA1089R	ferredoxin reductase isoform 1 precursor	FDXR	9,80E-07	1,40E-08	1,70E-07	3,20E-07

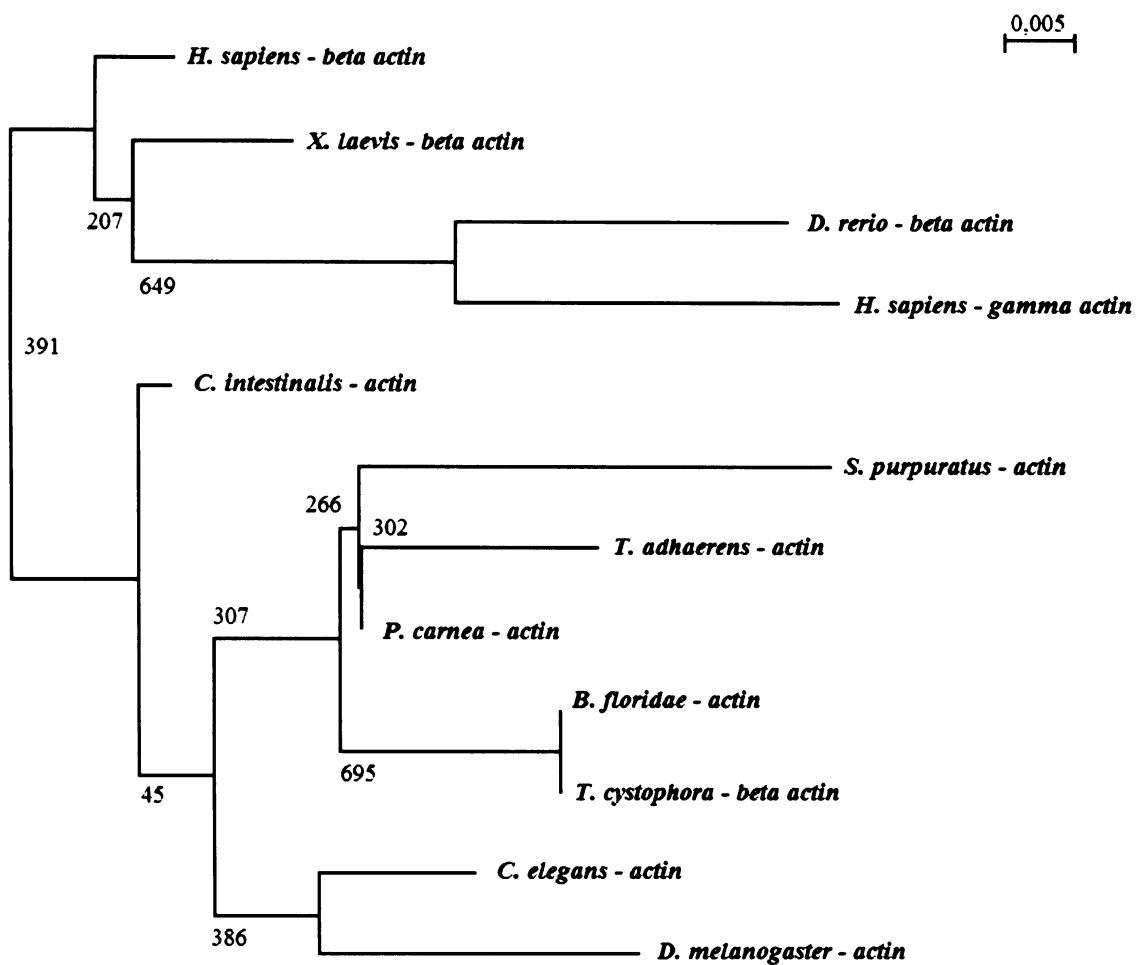
TC1208R	peroxisomal biogenesis factor 19	PEX19	1,90E-06	7,10E-07		2,10E-05
TC0758R	translocase of inner mitochondrial membrane 23	TIMM23	2,70E-06			1,40E-16
TC0693R	guanine nucleotide exchange factor p532	HERC1	3,30E-06	5,30E-06		2,10E-09
TC0880R	RNA binding motif protein 25	RBM25	3,30E-06			
TC1183R	glutamyl-prolyl tRNA synthetase	EPRS	9,10E-06	1,70E-06	8,30E-05	2,80E-05
TC0351R	zinc finger, MYM domain containing 1	ZMYM1	1,20E-05		7,10E-07	7,40E-05
TCA1144R	WD repeat domain 41	WDR41	1,20E-05		1,10E-14	4,20E-19
TC0008R	ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like	ILVBL	1,30E-05	2,70E-05	2,30E-07	3,20E-09
TC1197R	mitochondrial ribosomal protein S24	MRPS24	1,30E-05	1,00E-06	1,60E-08	3,80E-09
TC0915R	fast skeletal muscle troponin C	TNNC2	2,30E-05	5,20E-06	4,40E-05	9,70E-21
TCA1081R	chloride intracellular channel 4	CLIC4	2,50E-05		2,20E-13	1,50E-05
TC1237R	GTP cyclohydrolase I feedback regulatory	GCHFR	2,70E-05	8,20E-05		6,00E-06
TC1911R	hypothetical protein LOC112942	MGC15407	3,70E-05	1,70E-08	2,50E-12	1,90E-13
TC1653R	resistin	RETN	4,20E-05			
TC1856R	RAS and EF hand domain containing	RASEF	5,00E-05	1,90E-06	3,70E-13	9,40E-14
TC1090R	vacuolar protein sorting 13C protein isoform 1B	VPS13C	7,50E-05	5,80E-07	2,80E-07	2,30E-11
TCA1119R	syntaxin 1A (brain)	STX1A	9,10E-05	1,40E-06		

Konzervace genů mezi žahavci a obratlovci

Z tabulek 2 a 3 jasně vyplývá, že některé geny *T.c.* jsou v rámci živočišné říše dobře konzervované. EST s nejvyšší mírou podobnosti k člověku je PPP1CB, gen kódující katalytickou podjednotku β serin/threonin specifické fosfatázy. Tento enzym se účastní mnoha buněčných procesů včetně buněčného dělení, metabolismu glykogenu, svalové kontrakce či syntézy proteinů (např. CEULEMANS a BOLLEN 2004).

Konzervace faktorů proteosyntézy, stejně jako ribozomálních proteinů či tRNA, je známá (GANOZA *et al.* 2002). Proto není divu, že druhým EST v naší tabulce (tedy EST s druhou nejvyšší podobností k člověku v knihovně) je *eukaryotic translation initiation factor2*, který katalyzuje první krok iniciace syntézy proteinů. Naopak nejčastějším EST je *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha*, jehož funkcí je umístit aminoacyl-tRNA do akceptorového místa ribozomu. Mezi EST s velkou podobností patří také *eukaryotic translation elongation factor 2*, katalyzující translokaci ribozomu za využití energie z hydrolyzy GTP. Knihovna dále obsahuje celkem šestnáct homologů ribozomálních proteinů, z nichž devět je součástí velké (60S) podjednotky, šest malé (40S) podjednotky cytoplazmatického ribozomu a jeden tvoří součást malé podjednotky mitochondriálního ribozomu. Nalezneme zde také tři různé aminoacyl-tRNA syntetázy, enzymy z třídy ligáz, které katalyzují tvorbu kovalentní vazby mezi AK a tRNA.

Dalšími vysoce konzervovanými geny jsou ty, které kódují komponenty cytoskeletu a některé proteiny s ním asociované. Konzervaci genů *T.c.* napříč živočišnou říší jsme se pokusili ukázat právě na strukturní složce cytoskeletu, globulárním proteinu aktinu (Obr. 8). Aktin je jedna z nejhojnějších intracelulárních bílkovin všech eukaryotických buněk, jejíž aminokyselinové sekvence jsou u různých živočišných druhů obvykle z 90% identické. Gen pro aktin z naší knihovny kóduje jednu z šesti možných izoform aktinu, beta aktin (ACTB). Dalšími EST, jejichž funkce je spojena s cytoskeletem, jsou např. *actin related 2/3 complex subunit 2 a 3*. Tyto geny kódují vždy jednu ze sedmi podjednotek (p34 a p21) lidského Arp2/3 proteinového komplexu, zapojeného do regulace polymerace aktinu (WELCH *et al.* 1997). *Caltractin* je Ca^{2+} vázající protein tvořící strukturní komponentu centrozomu (LEE a HUANG 1993). V souvislosti s cytoskeletem nesmíme opomenout ani *tubulin beta 6*, člena rodiny tubulinů, a *tubulin gamma complex associated protein 6*, složku komplexu odpovědného za nukleaci mikrotubulů v centrozomu.



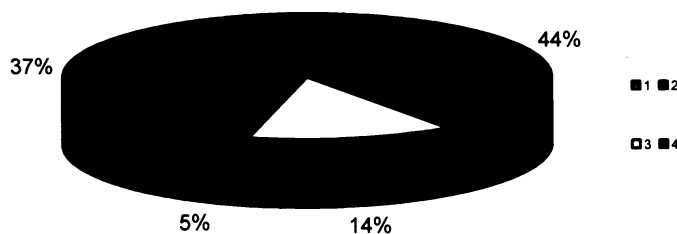
Obr. 8: **Konzervace aktinu.** Fylogenetický strom znázorňuje konzervaci aktinu v živočišné říši (bootstrap 1000).

Genové ztráty

Jak je patrné z tabulky 3, naše knihovna obsahuje i jisté procento genů (32% EST), které se zdají být *T.c.* využívané, ale pro které u některých modelových organismů nebyl jejich homolog nalezen. Nejvíce těchto genových ztrát nalzáme u háďátka, nejméně u sasanky (Tab. 4). Ztráta genů či přesněji genových sad u octomilky a háďátka již byla popsána (např. HUGES a FRIEDMAN 2004). K vyjádření celkového poměru výskytu homologů mezi čtyřhrankou, člověkem, octomilkou a háďátkem, byla srovnána míra jejich podobnosti. Jako geny, které mají blíže člověku, byly považovány ty, které mají rozdíl hodnot podobnosti $\geq 10^3$ atd. Navíc z výsledků vyplynulo, že celých 14% *T.c.* EST nemá svého homologa u octomilky ani háďátka (Obr. 9).

Tab. 4: Tabulka ukazuje procento chybějících homologů z celkového počtu 272 EST u jednotlivých modelových organismů. (bf) *Branchiostoma floridae*, (sp) *Strongylocentrotus purpuratus*, (dm) *Drosophila melanogaster*, (ce) *Caenorhabditis elegans*, (nv) *Nematostella vectensis*.

bf	sp	dm	ce	nv
6,50%	9,00%	16,00%	23,00%	4,00%

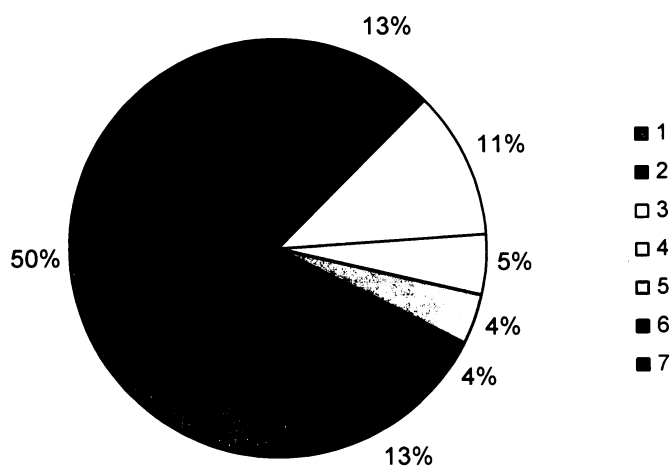


Obr. 9.: Konzervace genů *Tripedalia cystophora*. Graf ukazuje míru podobnosti *T.c.* EST k octomilce, háďátku a člověku. Střední stupeň podobnosti (1), vyšší podobnost k člověku (2), výskyt homologů pouze u člověka (3), blíže k octomilce či háďátku (4).

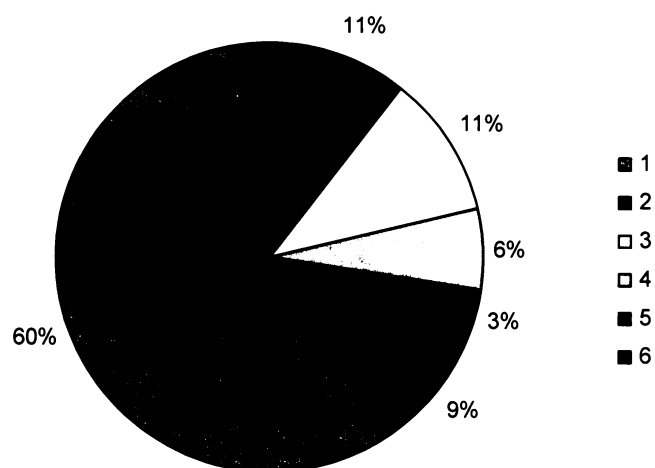
Analýza EST

Jednotlivé EST sekvence byly porovnány proti databázi UniProt (Swiss-Prot – ručně anotováno, TrEMBL – automaticky anotováno; <http://www.uniprot.org/>). K 411 z nich byly nalezeny homology ($E \leq 10^{-10}$) a přiřazeny genové ontologie (GO). Ze získaných dat byly na základě lokalizace daného proteinu v buňce (325 GO) a buněčného procesu (1378 GO) sestaveny grafy. Z výsledků vyplynulo, že celá polovina z celkového počtu EST je lokalizována v cytoplazmě buňky, o druhé až čtvrté místo se pak téměř rovnocenně dělí plazmatická membrána, mitochondrie a jádro (Obr. 10). Pokud jsme EST rozdělili podle funkce, většina z nich je odpovědná za metabolické procesy (Obr. 11). Funkce proteinů byly dohledány na webových stránkách The Gene Ontology (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>).

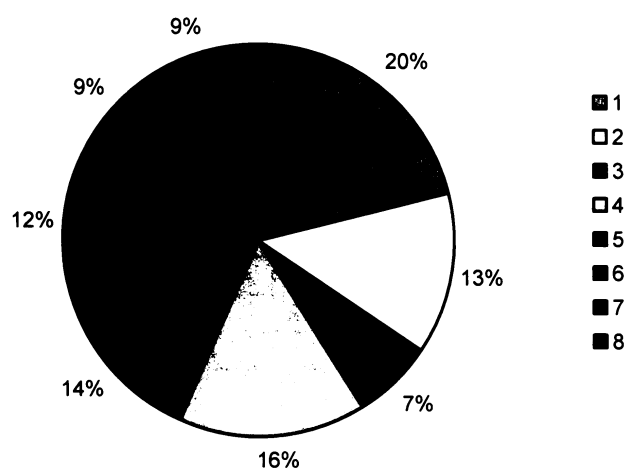
Jednotlivé EST sekvence byly porovnány s databází UniProt (<http://www.uniprot.org/>). K 530 z nich byl nalezen jednoznačný homolog ($E \leq 10^{-4}$) a k 208 s nejvyšší mírou podobnosti přiřazena genová ontologie. Ze získaných dat (115 GO) byl na základě funkce daného proteinu v buňce sestaven graf. Z výsledků vyplynulo téměř rovnoměrné rozdělení funkcí EST v buňce (Obr. 12).



Obr. 10: Výskyt EST v rámci buňky. Cytoplazma (1), plazmatická membrána (2), jádro (3), endoplazmatické retikulum či Golgiho aparát (4), cytoskelet (5), mitochondrie (6), jiné (7).



Obr. 11: **Rozdělení EST podle buněčného procesu.** Metabolismus (1), transport (2), regulace buněčných procesů (3), zprostředkování buněčné odpovědi (4), vývojové procesy (5), jiné (6).



Obr. 12: **Funkce EST produktů v buňce.** Vazba nukleových kyselin (1), vazba nukleotidů (2), vazba proteinů (3), jiná vazba (4), hydrolázy (5), transferázy (6), jiná katalytická funkce (7), jiné (8).

7.3 Studium exprese genů

Cílem této části diplomové práce bylo pomocí metody RNA *in situ* hybridizace vizualizovat přítomnost vybraných zajímavých genů a to právě těch, které jsou mezi žahavci a obratlovci konzervovány, zatímco u octomilky či háďátka nebyly jejich homology nalezeny. Charakterizována byla exprese (na úrovni mRNA) *T.c. like-glycosyltransferase*, *T.c cyclin I* a *T.c pirin* (Tab. 5). Jako kontrola funkčnosti RNA *in situ* hybridizace byla použita ověřená ribopróba syntetizovaná pro J1A krystalin (majoritní protein čočky *T.c.*). Jako jedna z negativních kontrol bylo použito stejné barvení bez próby.

K hybridizaci byla použita vypreparovaná a fixovaná rhopalia z dospělých jedinců *Tripedalia cystophora*, nalovených v průběhu léta 2005.. Někteří jedinci byli dále přivezeni živí a z larev uvolněných ze samic se podařilo založit stabilní kultury polypů. Za optimálních podmínek polypi metamorfují v medúzu. Juvenilní medúzy byly odebírány a (celé či pouze vypreparovaná rhopalia) fixovány pro pozdější využití, v našem případě opět pro *in situ* hybridizace.

SID	Description	Gene	hs	mm	ce	dm
TC0764R	like-glycosyltransferase	LARGE	1,10E-20	4,60E-21		
TC0295R	pirin	PIR	8,80E-19	4,60E-19		
TC1583R	cyclin I	CCNI	1,20E-14	2,10E-14		

Tab. 5: Vybrané geny z EST knihovny z larev *T.c.*, které byly použity pro *in situ* hybridizaci. Z tabulky je patrná značná konzervace těchto genů mezi *T.c.* a obratlovci. Homology u octomilky či háďátka se nenalezly. (hs) *Homo sapiens*. (mm) *Mus musculus*. (dr) *Danio rerio*. (ce) *Caenorhabditis elegans*. (dm) *Drosophila melanogaster*.

Like-glycosyltransferase

Prvním z vybraných genů byl *T.c. like-glycosyltransferase*. Cílem pokusu bylo potvrdit, že je nejen přítomný v genomu *T.c.*, ale že je také skutečně transkribován, a to se specifickým vzorem exprese. Dalším úkolem bylo zjistit, zda místo exprese tohoto genu (mRNA) případně odpovídá specializované funkci jeho produktu.

Výše popsanou metodou RNA *in situ* hybridizace na celých jedincích byla skutečně vizualizovaná přítomnost *like-glycosyltransferase* v tkáních rhopalia. Jednalo se o dno gastrovaskulární dutiny, kde se nacházejí buňky endodermálního původu s mikrokly, a o čočku horního i dolního oka. Případná funkce tohoto proteinu v epitelu gastrovaskulární dutiny bude diskutována v následující kapitole.

Cyclin I

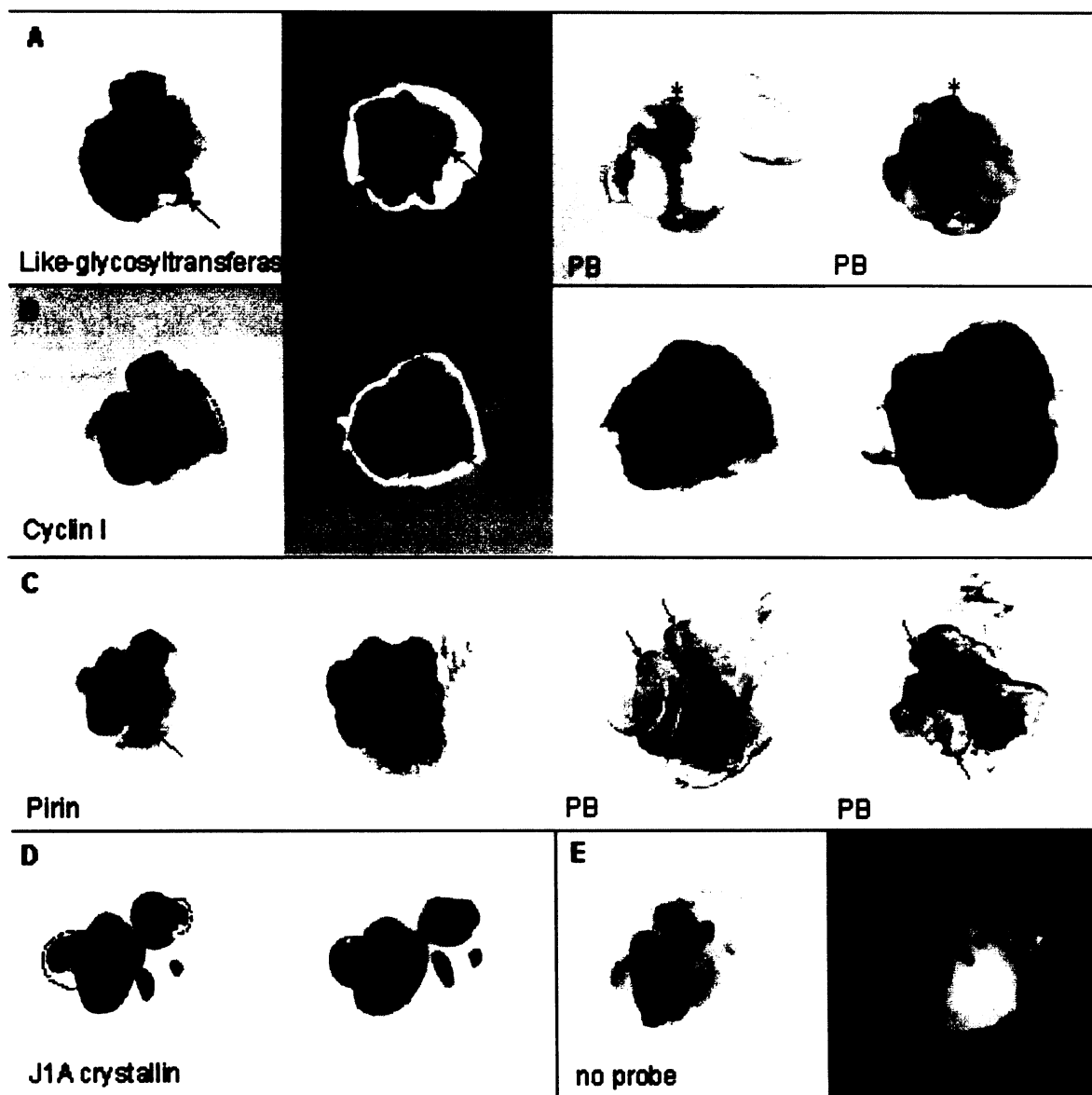
Jedním z vybraných genů byl i *T.c. cyclin I*. Cykliny jsou obecně známé především díky svému významu při regulaci buněčného cyklu a to prostřednictvím interakce s cyklin dependentními kinázami (CDK) a následné fosforylace cílových proteinů. Jejich hladina obvykle osciluje v závislosti na fázi buněčného cyklu. Cílem pokusu bylo opět dokázat, že je tento gen v genomu *T.c.* nejen přítomen, ale je i využíván, tedy alespoň v minimální míře exprimován (mRNA). Dalším úkolem bylo charakterizovat místo exprese a zjistit možnou funkci translatovaného proteinu v dané tkáni.

Cyclin I je v rámci rhopalia exprimován v posteriorní oblasti, kde se mimo jiné nacházejí nediferenciované (zásobní) buňky. To by mohlo mít souvislost s neobvyklou funkcí tohoto proteinu, jak bude zmíněno v Diskusi.

Pirin

Třetím genem, jehož expresi jsme se snažili v rámci rhopalia prokázat, byl *T.c. pirin*. Pirin je podle současných poznatků mezi savci, rostlinami, houbami a dokonce prokaryotickými organizmy silně konzervovaný jaderný protein (WENDLER *et al.* 1997). Hovoří se o mnoha jeho vlastnostech, ale přesná biologická funkce zatím není známa. Cílem bylo tedy popsat místo exprese *pirin* a pomocí dostupné literatury určit jeho možnou funkci v dané tkáni.

Pirin je v rhopaliu opravdu exprimován (mRNA) a to v epitelu očního pohárku poblíž okraje čočky horního i dolního oka.



Obr. 13: RNA *in situ* hybridizace na rhopaliích *Tripedalia cystophora* pro vybrané geny. Červená šipka případně přerušovaná čára vyznačují zásadní či hůře pozorovatelná místa exprese. Červená hvězdička značí místa nespecifického barvení. PB – po odstranění pigmentu. Následuje popis lokalizace mRNA. (A) *Like-glycosyltransferase*: dno statolithové dutiny, čočky horního i dolního oka. (B) *Cyclin I*: posteriorní část rhopalia. (C) *Pirin*: okraje očních pohárků, gastrovaskulární dutina. (D) *J1A crystallin*: pozitivní kontrola. (E) Negativní kontrola – bez próby.

8. Diskuze

Konzervace genových sad

Mezi jednotlivými geny napříč živočišnou říší existuje větší či menší podobnost podle toho, jak se postupně jeden z druhého vyvíjely a divergovaly. Geny tak vytvářejí přirozené skupiny vzájemně si příbuzných genů nazývané genové rodiny (blízká příbuznost) či nadrodiny (vzdálená příbuznost). Některé geny jsou v rámci živočišné říše vysoce konzervované, jiné naopak některé organizmy zcela přestaly využívat.

V současnosti jsou významným modelem pro studium evoluce mnohobuněčných živočichů žahavci, neboť na molekulární úrovni odrážejí základní vývojové procesy sdílené většinou bilaterií. Žahavci využívají evolučně konzervované geny kódující funkční domény, transkripční faktory, proteiny pro apoptózu, extracelulární signalizaci, atd. Konzervace genové výbavy mezi žahavci a vyššími živočichy, především obratlovci, je zjevná. Jedním z cílů této práce bylo vytvořit EST knihovnu z larev čtyřhranky *Tripedalia cystophora*, analyzovat jednotlivé geny a určit míru jejich podobnosti k vybraným modelovým organizmům. *Tripedalia cystophora* je unikátním zástupcem žahavců, pro naši laboratoř slouží především ke studiu vývoje očí.

Z vytvořené cDNA knihovny se podařilo charakterizovat 342 EST. Podobně jako v publikovaných studiích na *Acropora millepora* či *Nematostella vectensis* (KORTSCHAK *et al.* 2003, PUTNAM *et al.* 2007) jsme našli mnoho genů, které jsou mezi *T.c.* a obratlovci zachovány, 44% z nich dokonce vykazuje vyšší míru podobnosti k člověku než k octomilce či háďátku. Naopak pouhých 5% EST má k těmto bezobratlým blíže (viz. Obr. 8). Tyto výsledky potvrzují trend větší příbuznosti žahavčích a obratlovčích sekvencí (než mezi octomilkou či háďátkem), který byl již dříve popsán (HAYWARD *et al.* 2002, SPRING *et al.* 2002).

Mezi EST vykazujícími nejvyšší hodnotu podobnosti se všemi vybranými modelovými organizmy patří především ty, které jsou homologické s tzv. provozními geny. To není překvapením, neboť tyto geny, zajišťují bazální metabolismus buňky a jsou napříč živočišnou říší obecně vysoce konzervované. Mnoho z těchto homologů, námi charakterizovaných jako provozní geny, bylo podobně izolováno i z jiných žahavců, například medúzy *Cyanea capillata* (YANG *et al.* 2003). Mezi jejich produkty

patří proteiny tepelného šoku, cytoskeletární a membránové proteiny, histony, proteiny účastníci se syntézy nukleových kyselin, proteosyntézy a mnoho dalších. Čím je podobnost mezi sekvencemi nižší, tím častěji nalézáme geny kódující proteiny s více specializovanou funkcí.

Genová ztráta u vývojových linií vedoucích k octomilce a háďátku

V předchozí kapitole bylo uvedeno, že žahavčí geny mají často blíže genům obratlovců než bezobratlých. Celogenomová hledání proti EST knihovně z larev *T.c.* dokonce odhalila mnoho genů (14% EST z knihovny), které jsou mezi čtyřhrankami a obratlovci zachovány, ale u octomilky a háďátka chybí. K podobnému závěru došli ve své studii i Kortchak a kolektiv (KORTCHAK *et al.* 2003). Absence *T.c.* homologů u těchto modelových organismů by mohla odrážet sekundární genovou ztrátu u linií vedoucích k příslušným bezobratlým. V některých případech tyto EST nevykazovaly homologii ani k žádnému jinému vybranému modelovému organismu. Například gen *Tripeptidyl-peptidase I* byl prozatím popsán jen u savců, homolog nalezen u žahavce *Nematostella vectensis*. Tento gen kóduje lysozomální serin proteázu odštěpující tripeptidy z volného aminového konce malých polypeptidů. *In vitro* štěpí některé hormony, kolagen, atd. Disfunkce je spojována s dětskou ceroidní lipofuscinózou, neurologickým degenerativním onemocněním charakteristickým zvýšeným usazováním lipidů v tkáních (GOLABEK *et al.* 2003, GOLABEK a KIDA 2006). Tento gen byl dříve považován za obratlovčí evoluční „novinku“ a nyní tedy popsán také u čtyřhranky. Obecně tyto „ztracené“ geny nemůžeme zařadit do jediné funkční skupiny, převážně však kódují metabolické a strukturní proteiny.

Zatím máme k dispozici jen limitovaná množství dat, která však poukazují na to, že žahavčí geny mohou odrážet intron/exon strukturu genů společného předka všech mnohobuněčných, *Urbilateria* (např. SCHMITT a BROWER 2001). Blízká příbuznost mezi sekvencemi *T.c.* a člověka naznačuje, že linie vedoucí k žahavcům a obratlovcům divergovaly již v časném prekambriu (CONWAY MORRIS 2000). Rozsáhlé genové ztráty (40 genů nevykazujících homologii k octomilce i háďátku z celkového počtu 342 EST) napovídají, že velká část „genů specifických pro obratlovce“ musela být přítomna již u *Urbilateria*. Genové ztráty u octomilky jsou vysvětlovány 2 – 3 krát rychlejší evolucí hmyzu vůči obratlovcům (hmyz je v současné době druhově nejbohatší třídou

organizmů). Rozdíly v sekvencích proteinů hmyzu jsou také zřetelně větší než u obratlovců (WYDER *et al.* 2007). A genové ztráty u háďátka jsou způsobené ještě čtyřikrát rychlejší evoluční reorganizací genomu hlístic než hmyzu (COGHLAN a WOLFE 2002).

***In situ* hybridizace**

V závěru této práce byla charakterizována exprese tří genů, které byly mezi *T.c.* a obratlovcem zachovány, ale ztraceny v liniích vedoucích k octomilce či háďátku.

Like – glycosyltransferase

Homology lidského proteinu *like – glycosyltransferase* se zdají být v rhopaliu exprimovány v oblasti gastrovaskulární dutiny a dna statolithové dutiny (statocysty). V prvním zmíněném se nacházejí buňky endodermálního původu, mající funkci vstřebávat a trávit potravu. Glykosyltransferázy obecně katalyzují přenos sacharidové jednotky z aktivovaného sacharidu - donoru na sacharidové i nesacharidové akceptory. Ve většině případů je donorem fosfoglukonukleosid, akceptorem pak hydroxylová skupina jiného sacharidu, případně lipidu nebo jiné složky glykokonjugátů. Podle klasifikace založené na sekvenční podobnosti se glykosyltransferázy dělí na velké množství rodin, což odráží různorodost molekul, které mohou být využity jako akceptory. Glykosyltransferázy jsou integrální membránové proteiny lokalizované v membráně Golgiho aparátu (BRETON *et al.* 2006).

Námi studovaný gen, *like-glycosyltransferase* (LARGE), kóduje lidskou glykosyltransferázu, která se mimo jiné účastní glykosylace α – dystroglykanu. Mutace tohoto genu způsobuje MDC1D, novou formu kongenitální svalové dystrofie provázenou těžkou mentální retardací (dochází k hypoglykosylaci α – dystroglykanu doprovázené ztrátou schopnosti vázet ligand, např. laminin) (LONGMAN *et al.* 2003). Podobný fenotyp (myodystrofii) způsobuje mutace tohoto genu i u myši (GREWAL *et al.* 2001). Homology LARGE byly nalezeny u mnoha obratlovců (viz. např. GREWAL *et al.* 2005). Pomocí *in situ* hybridizace byla popsána exprese tohoto genu u myši, kde je soustředěna do srdce, CNS, mozku, kosterních svalů, žaludku či pankreatu (PEYRARD *et al.* 1999).

Cyclin I

Homolog *cyclin I* je exprimován v oblasti zásoby nediferencovaných buněk rhopalia. To by mohlo být velmi smysluplné, pokud by se tento cyklin, jako komponenta CDK, podílel právě na udržení buněk v nediferencovaném stavu. Bohužel lidský ani myší cyklin I nejsou ještě dostatečně dobře charakterizovány. Cyklin I člověka byl popsán roku 1995 jako nový člen rodiny cyklinů s charakteristickou PEST sekvencí a N - koncovým boxem (CDK vázající doména). Aminokyselinovou sekvencí je nejvíce podobný cyklinům G1 a G2 (NAKAMURA *et al.* 1995). Na rozdíl od ostatních cyklinů je však exprimován konstantně během buněčného cyklu (JENSEN *et al.* 2000). Jeho funkce tedy nemusí přímo spočívat v regulaci proliferace buněk. Současné poznatky svědčí o jeho roli v angiogenezi nádorů (LANDBERG *et al.* 2005), zastavení růstu (LIU *et al.* 2007) a prevenci apoptózy zprostředkované stabilizací p21 (GRIFFIN *et al.* 2006). Cyklin I je nejčastěji exprimován v postmitotických tkáních a na základě dostupných údajů by se dalo předpokládat, že u nediferencovaných buněk rhopalia brání vstupu těchto buněk do proliferativního stádia.

Pirin

Homolog *pirin* je v rhopaliu exprimován v epitelu očního pohárku okolo horního a doního oka s čočkou a v gastrovaskulární dutině. Pirin je Fe^{2+} vázající protein, což poukazuje na jeho možnou enzymatickou aktivitu, především v oxidoredukčních reakcích (PANG *et al.* 2004). Dále váže jaderný faktor NFI, který stabilizuje prereplikační komplex vazbou na DNA – polymerázu a stimuluje RNA – polymerázu II. Pirin interaguje s Bcl3 – p50 komplexem a zvyšuje jeho aktivitu (Bcl3 inhibuje aktivitu transkripčního faktoru NF κ B). Hovoří se i o jeho možné DNA reparační aktivitě (WENDLER *et al.* 1997). U bakterie *Escherichia coli* byl nalezen homolog lidského pirinu, YhhW, s 2,3 –dioxygenázovou aktivitou (degraduje antioxidant quercetin za současného uvolnění CO) (ADAMS a JIA 2005). Homolog lidského pirinu bakterie *Serratia marcescens* se váže na E1 podjednotku pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDH) a inhibuje jeho aktivitu. PDH katalyzuje oxidační dekarboxylaci pyruvátu a následnou acetylaci koenzymu A, je tedy zásadní pro metabolismus téměř každé buňky. U bakterií se předpokládá, že zvýšená exprese pirinu potlačuje funkci PHD a tedy podporuje anaerobní dráhu zdroje energie.

9. Souhrn

V rámci diplomové práce:

- byla vytvořena cDNA knihovna larvy žahavce *Tripedalia cystophora*, podařilo se charakterizovat 342 EST
- byl potvrzen trend genové konzervace mezi žahavci a obratlovci
- bylo nalezeno mnoho genů, které jsou mezi *T.c.* a člověkem konzervované, ale jejichž homology se nenalezly u octomilky či háďátka, což poukazuje na rozsáhlou genovou ztrátu u linií vedoucích k těmto bezobratlým
- bylo prokázáno, že geny, které jsou mezi žahavci a obratlovci konzervované a přesto byly ztraceny v jiných vývojových liniích, jsou u *Tripedalia cystophora* stále využívány, přinejmenším exprimované, pomocí *in situ* hybridizace byla potvrzena exprese *like-glykosyltransferase*, *pirin* a *cyclin I*

10. Seznam citované literatury

1. Adams, M.A., Jia, Z. (2005): Structural and biochemical evidence for an enzymatic quinone redox cycle in *Escherichia coli*: identification of a novel quinol monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 280:8358–8363.
2. Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M. Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C. (2000): The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*: 2185.
3. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): "Basic local alignment search tool". *J Mol Biol* 215(3): 403–410.
4. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
5. Arendt, D., Tessmar, K., de Campos-Baptista, M.I., Dorresteijn, A. and Wittbrodt, J. (2002): Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development* 129, 1143–1154.
6. Ball, E.E., Hayeard, D.C., Saint, R. and Miller, D.J. (2004): A simple plan – the origins of developmental mechanisms. *Nat Rev Genet* 5(8):567-77.
7. Breton, C., Snajdrová, L., Jeanneau C., Koca J., Imberty, A. (2006): Structures and mechanisms of glycosyltransferases *Glycobiology* 16: 29R-37R.

8. Bridge, D., Cunningham, C.W., DeSalle, R., Buss, L.W. (1995): Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol.* Jul;12(4):679-89.
9. Bridge, D., Cunningham, C.W., Schierwater, B., DeSalle, R., Buss, L.W. (1992): Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8750–8753.
10. Buskey, E.J. (2003): Behavioral adaptations of the cubozoan medusa *Tripedalia cystophora* for feeding on copepod (*Dioithona oculata*) swarms. *Mar. Biol.* 142:225-232.
11. C. elegans Sequencing Consortium. (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science.*; 282:2012–2018.
12. Ceulemans, H., Bolleen, M. (2004): Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. 84(1):1-39.
13. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): "Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction." *Analytical Biochemistry* 162, 156.
14. Coates, M.M. (2003): Visual Ecology and Functional Morphology of Cubozoa (Cnidaria). *Integr. Comp. Biol.*, 43:542–548.
15. Coates, M.M., Garm, A., Theobald, J.C., Thompson, S.H., Nilsson, D.E. (2006): The spectral sensitivity of the lens eyes of a box jellyfish, *Tripedalia cystophora* (Conant). *J Exp Biol.*209(Pt 19):3758-65.
16. Cochrane, G., Akhtar, R., Aldebert, P., Althorpe, N., Baldwin, A., Bates, K., Bhattacharyya, S., Bonfield, J., Bower, L., Browne, P., Castro, M., Cox, T., Demiralp, F., Eberhardt, R., Faruque, N., Hoad, G., Jang, M., Kulikova, T., Labarga, A., Leinonen, R., Leonard, S., Lin, Q., Lopez, R., Lorenc, D., McWilliam, H., Mukherjee, G., Nardone, F., Plaister, S., Robinson, S., Sobhany, S., Vaughan, R., Wu, D., Zhu, W., Apweiler, R., Hubbard, T., Birney, E. (2008): Priorities for nucleotide trace, sequence and annotation data capture at the Ensembl Trace Archive and the EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D5-12.
17. Coghlan, A., Wolfe, K.H. (2002): Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Res.* 12(6):857-67.
18. Collins, A.G. (2002): Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J. Evol. Biol.* 15:418–432.
19. Collins, A.G., Schuchert, P., Marques, A.C., Jankowski, T., Medina, M., Schierwater, B. (2006): Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst. Biol.* 55(1):97–115.
20. Conway Morris, S. (2000): The Cambrian "explosion": slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(9):4426-9.
21. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269(5223):496-512.

22. Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchmann, J.L., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, R., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchinson, C.A., III & Venter, J.C. (1995): The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 397±403.
23. Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S., Noll, M. (1986): Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell* 47, 735±746.
24. Galliot, B., Schmid, V. (2002): Cnidarians as a Model System for Understanding Evolution and Regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 39-48.
25. Ganoza, M.C., Kiel, M.C., Aoki, H. (2002): Evolutionary conservation of reactions in translation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):460-85.
26. Garm, A., Ekström, P., Boudek, M., Nilsson, D.E. (2006): Rhopalia are integrated parts of the central nervous system in box jellyfish. *Cell Tissue Res.* 325:333–343.
27. Gehring, W.J., Ikeo, K. (1999): Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.*;15(9):371-7.
28. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996): Life with 6000 genes. *Science.* 274(5287):546, 563-7.
29. Golabek, A.A., Kida, E. (2006): Tripeptidyl-peptidase I in health and disease. *Biol Chem.*387(8):1091-9.
30. Golabek, A.A., Kida, E., Walus, M., Wujek, P., Mehta, P., Wisniewski, K.E. (2003): Biosynthesis, glycosylation, and enzymatic processing in vivo of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem.* 278(9):7135-45.
31. Gregory, T.R. (2005). Animal Genome Size Database. <http://www.genomsize.com>.
32. Grewal, P.K., Holzfeind, P.J., Bittner, R.E. and Hewitt, J.E. (2001): Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of α -dystroglycan in the myodystrophy mouse. *Nat. Genet.*, 28, 151–154.
33. Grewal, P.K., McLaughlan, J.M., Moore, C.J., Browning, C.A. and Hewitt, J.E. (2005): Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. *Glycobiology* 15 (10), 912-923.
34. Griffin, S.V., Olivier, J.P., Pippin, J.W., Roberts, J.M., Shankland, S.J. (2006): Cyclin I protects podocytes from apoptosis. *J Biol Chem.*; 281(38):28048-57.
35. Groger, H., Callaerts, P., Gehring, W.J. and Schmid, V. (2000): Characterization and expression analysis of an ancestor-type Pax gene in the hydrozoan jellyfish *Podocoryne carnea*. *Mech Dev* 94: 157-69.

36. Hadrys, T., DeSalle, R., Sagasser, S., Fischer, N. and Schierwater, B. (2005): The *Trichoplax PaxB* gene: a putative proto-PaxA/B/C gene predating the origin of nerve and sensory cells. *Mol Biol Evol.* Jul;22(7):1569-78.
37. Halder, G., Callaerts, P., Gehring, W.J. (1995): New perspectives on eye evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 5(5):602-9.
38. Hayward, D.C., Catmull, J., Reece-Hoyes, J.S., Berghammer, H., Dodd, H., Hann, S.J., Miller, D.J., Ball, E.E. (2001): Gene structure and larval expression of *cnox-2Am* from the coral *Acropora millepora*. *Dev Genes Evol.* 211 (1):10-9 11277400.
39. Hayward, D.C., Miller, D.J., Ball, E.E. (2004): Snail expression during embryonic development of the coral *Acropora*: blurring the diploblast/triploblast divide? *Dev Genes Evol.* 214(5):257-60.
40. Hayward, D.C., Samuel, G., Pontynen, P.C., Catmull, J., Saint, R., Miller, D.J., Ball, E.E. (2002): Localized expression of a *dpp/BMP2/4* ortholog in a coral embryo. *Proc Natl Acad Sci*; 99(12):8106-11.
41. Hoshiyama, D., Suga, H., Iwabe, N., Koyanagi, M., Nikoh, N., Kuma, K., Matsuda, F., Honjo, T., Miyata, T. (1998): Sponge Pax cDNA related to Pax-2/5/8 and ancient gene duplications in the Pax family. *J Mol.Evol.*; Dec;47(6):640-8.
42. Hughes, A.L., Friedman, R. (2004): Differential loss of ancestral gene families as a source of genomic divergence in animals. *Proc Biol Sci.* 271 Suppl 3:S107-9.
43. Jensen, M.R., Audolfsson, T., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S. (2000): In vivo expression and genomic organization of the mouse cyclin I gene (*Ccni*). *Gene*; 256(1-2):59-67.
44. Kortschak, R.D., Samuel, G., Saint, R., Miller, D.J. (2003): EST Analysis of the Cnidarian *Acropora millepora* Reveals Extensive Gene Loss and Rapid Sequence Divergence in the Model Invertebrates. *Current Biology*;13:2190-2195.
45. Kozmik, Z., Daube, M., Frei, E., Norman, B., Kos, L., Dishaw, L.J., Noll, M. and Piatigorsky, J. (2003): Role of Pax genes in eye evolution. A cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions. *Dev Cell* 5: 773-85.
46. Landberg, G., Nilsson, K., Jirström, K., Rydén, L., Kitching, R., Burger, A.M., Seth, A. (2005): Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression. *Breast Cancer Res Treat* 89(3) 313-316.
47. Lee, V.D., Huang, B. (1993): Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(23):11039-43.
48. Liu, Y., Tang, M.K., Cai, D.Q., Li, M., Wong, W.M., Chow, P.H., Lee, K.K. (2007): Cyclin I and p53 are differentially expressed during the terminal differentiation of the postnatal mouse heart. *Proteomics.* 7(1):23-32.
49. Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N., Feng, L., Saran, R.K., Voit, T., Merlini, L. and others. (2003): Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 2853–2861.

50. Marques, A. C. and A. G. Collins. (2004): Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invert. Biol.* 123:23–42.
51. McPherson, J.D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R.H., Chinwalla, A., Wallis, J., Sekhon, M., Wylie, K., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Fulton, R. Kucaba, T.A., Wagner-McPherson, C., Barbazuk, W.B., Gregory, S.G., Humphray, S.J., French, L., Evans, R.S., Bethel, G., Whittaker, A., Holden, J.L., McCann, O.T., Dunham, A., Soderlund, C., Scott, C.E., Bentley, D.R., Schuler, G., Chen, H.C., Jang, W., Green, E.D., Idol, J.R., Maduro, V.V., Montgomery, K.T., Lee, E., Miller, A., Emerling, S., Kucherlapati, Gibbs, R., Scherer, S., Gorrell, J.H., Sodergren, E., Clerc-Blankenburg, K., Tabor, P., Naylor, S., Garcia, D., de Jong, P.J., Catanese, J.J., Nowak, N., Osoegawa, K., Qin, S., Rowen, L., Madan, A., Dors, M., Hood, L., Trask, B., Friedman, C., Massa, H., Cheung, V.G., Kirsch, I.R., Reid, T., Yonescu, R., Weissenbach, J., Bruls, T., Heilig, R., Branscomb, E., Olsen, A., Doggett, N., Cheng, J.F., Hawkins, T., Myers, R.M., Shang, J., Ramirez, L., Schmutz, J. Velasquez, O., Dixon, K., Stone, N.E., Cox, D.R., Haussler, D., Kent, W.J., Furey, T., Rogic, S., Kennedy, S., Jones, S., Rosenthal, A., Wen, G., Schilhabel, M., Gloeckner, G., Nyakatura, G., Siebert, R., Schlegelberger, B., Korenberg, J., Chen, X.N., Fujiyama, A., Hattori, M., Toyoda, A., Yada, T., Park, H.S., Sakaki, Y., Shimizu, N., Asakawa, S., Kawasaki K, Sasaki T, Shintani A, Shimizu A, Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Ramser J, Seranski, P., Hoff, C., Poustka, A., Reinhardt, R., Lehrach, H. (2001): International Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome. *409(6822):816-8.*
52. Miller, D.J., Hayward, D.C., Reece-Hoyes, J.S., Scholten, I., Catmull, J., Gehring, W.J., Callaerts, P., Larsen, J.E., Ball, E.E. (2000): Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. *PNAS* Apr 25;97(9):4475-80.
53. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, .L, Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigó, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawaiv, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S.,

- Singe, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J.P., Von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C., Lande, r E.S. (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420(6915):520-62.
54. Muller, P., Yanze, N., Schmid, V., Spring, J. (1999): The homeobox gene *Otx* of the jellyfish *Podocoryne carnea*: Role of a head gene in striated muscle and evolution. *Developmental Biology*, 216 (2), pp. 582-594.
55. Nagaraj, S.H., Gasser, R.B., Ranganathan, S.A. (2007): Hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Brief Bioinform.* (1):6-21.
56. Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y.F., Ayusawa, D., Oishi, M., Mori, N. (1995): Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res.* 221(2):534-42.
57. Nilsson, D., Gislén, L., Diates, M.M., Skogh, Ch., Garm, A. (2005): Advanced optics in a jellyfish eye. *Nature*. 435(7039):201-5.
58. Nordström, K.M., Wallén, R., Seymour, J., Nilsson, D. (2003): A simple visual system without neurons in jellyfish larva. *Proc Biol Sci.* 70(1531):2349-54.
59. Pang, H., Bartlam, M., Zeng, Q., Miyatake, H., Hisano, T., Miki, K., Wong, L.L., Gao, G.F., Rao, Z. (2004): Crystal structure of human pirin: an iron-binding nuclear protein and transcription cofactor. *J Biol Chem.* 279(2):1491-8.
60. Parkefelt, L., Skogh, C., Nilsson, D.E., Ekström, P. (2005): Bilateral symmetric organization of neural elements in the visual system of a coelenterate, *Tripedalia cystophora* (Cubozoa). *J Comp Neurol.* 492(3):251-62.
61. Peyrard, M., Seroussi, E., Sandberg-Nordqvist, A.C., Xie, Y.G., Han, F.Y., Fransson, I., Collins, J., Dunham, I., Kost-Alimova, M., Imreh, S., Dumanski, J.P. (1999): The human *LARGE* gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(2):598-603.
62. Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V.V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I.V., Lucas, S.M., Steele, R.E., Finnerty, J.R., Technau, U., Martindale, M.Q., Rokhsar, D.S. (2007): Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*. 317(5834):86-94.
63. Salvini-Plawen, L.V., Mayr, E. (1977): On the evolution of eyes and photoreceptors. In: Hecht, M.K., Stere, W.C., Wallace, B. (Eds.), *Evolutionary Biology*, Vol. 10. Plenum, New York, pp. 207e263.
64. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M. (1977): Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.

65. Satterlie, R.A., Thomas, K.S., Gray, G.C. (2005): Muscle Organization of the Cubozoan Jellyfish *Tripedalia cystophora* Conant 1897. *Biol. Bull.* 209: 154-163.
66. Schmitt, D.M., Brower, D.L. (2001): Intron dynamics and the evolution of integrin beta-subunit genes: maintenance of an ancestral gene structure in the coral, *Acropora millepora*. *J Mol Evol.* 53(6):703-10.
67. Seipel, K. and Schmid, V. (2006): Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 589-599.
68. Skogh, C., Garm, A., Nilsson, D.E., Ekström, P. (2006): Bilaterally symmetrical rhopalial nervous system of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Journal of Morphology.* 267(12):1391-405.
69. Spring, J., Yanze, N., Jösch, C., Middel, A.M., Winninger, B., Schmid, V. (2002): Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: a connection to the mesoderm of bilateria. *Dev Biol.* 244(2):372-84.
70. Spring, J., Yanze, N., Middel, A.M., Stierwald, M., Groger, H., Schmid, V. (2000): The mesoderm specification factor Twist in the life cycle of jellyfish. *Developmental Biology*, 228 (2), pp. 363-375.
71. Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z., and Busslinger, M. (1993): Chromosomal localization of seven *PAX* genes and cloning of a novel family member, *PAX-9*. *Nature Genet.* 3, 292-298.
72. Straehler-Pohl, I., Jarms, G. (2005): Life cycle of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa, Carybdeidae) reveals metamorphosis to be modified strobilation. *Marine Biology. Genes Dev.* May 1;11(9):1122-31.
73. Sullivan, J.C., Ryan, J.F., Watson, J.A., Webb, J., Mullikin, J.C., Rokhsar, D., Finnerty, J.R. (2006): StellaBase: the *Nematostella vectensis* Genomics Database. *Nucleic Acids Res.*34(Database issue):D495-9.
74. Sun, H., Dickinson, D.P., Costello, J., Li, W.H. (2001): Isolation of *Cladonema Pax-B* genes and studies of the DNA-binding properties of cnidarian Pax paired domains. *Mol Biol Evol.*18(10):1905-18.
75. Sun, H., Rodin, A., Zhou Y., Dickinson, D.P., Harper, D.E., Hewett-Emmett, D. and Li, W.H. (1997): Evolution of paired domains: Isolation and sequencing of jellyfish and hydra *Pax* genes related to *Pax-5* and *Pax-6*. *Natl. Acad. Sci. USA* 94:5156–5161.
76. Technau, U. and Scholz, C.B. (2003): Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 531-539.
77. Terakita, A. (2005): The opsins. *Genome Biology*; 6(3):213.
78. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C.,

Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, .L, Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, .J, Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X. (2001): The sequence of the human genome. *Science*; 292(5523):1838.

79. Welch, M.D., DePace, A.H., Verma, S., Iwamatsu, A., Mitchison, T.J. (1997): The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *138(2):375-84.*
80. Wendler, W.M., Kremmer, E., Förster, R., Winnacker, E.L. (1997): Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. *J Biol Chem.;272(13):8482-9.*
81. Werner, B. (1975): Bau und lebensgeschichte des polypen von *Tripedalia cystophora* (Cubozoa, class. nov., Carybdeidae) und seine bedeutung fur die evolution der Cnidaria. *Helgoländerwiss. Meeresunters 27:461–504.*
82. Werner, B., Cutress, Ch. and Studenbaker, J.P. (1971): Life Cycle of *Tripedalia cystophora* Conant (Cubomedusae). *Nature 232, 582-583.*
83. Wyder, S., Kriventseva, E.V., Schröder, R., Kadowaki, T., Zdobnov, E.M. (2007): Quantification of ortholog losses in insects and vertebrates. *Genome Biol. 8(11):R242.*
84. Yang, Y., Cun, S., Xie, X., Lin, J., Wei, J., Yang, W., Mou, C., Yu, C., Ye, L., Lu, Y., Fu, Z., Xu, A. (2003): EST analysis of gene expression in the tentacle of *Cyanea capillata*. *FEBS Lett. 538(1-3):183-91.*

85. Zhu, Y.Y., Machleder, E.M., Chenchik, A., Li, R. and Siebert, P.M. (2001): Reverse transcriptase template switching: A SMARTTM approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* 30:892–897.
86. Zimek, A., Weber, K. (2008): In contrast to the nematode and fruit fly all 9 intron positions of the sea anemone lamin gene are conserved in human lamin genes. *Eur J Cell Biol.*; 87(5):305-9.