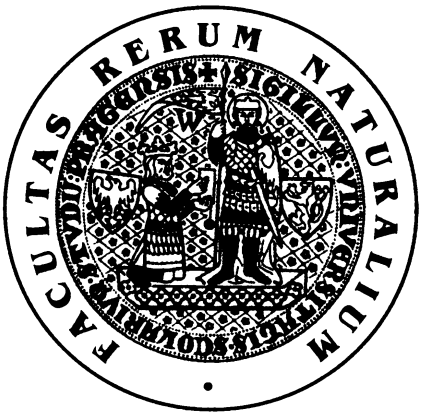
UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

FYZICKÉ MAPOVÁNÍ VAZEBNĚ NEIDENTIFIKOVANÝCH CLUSTERŮ GENŮ POMOCÍ FISH-TSA S VYUŽITÍM cDNA MARKERŮ U *X. TROPICALIS*

RENATA SLAVÍKOVÁ

PRAHA 2007

Vedoucí diplomové práce:
RNDr., Ing. Vladimír Krylov, PhD.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních pramenů a pod vedením vedoucího diplomové práce, RNDr., Ing. Vladimíra Krylova, PhD.

Praha, srpen 2007 Renata Slavíková.....

Za navrácení optimizmu a úsměvu na tvář ve chvílích skepse patří mé poděkování každému blízkému člověku z mého širokého okolí.

Jmenovitě bych ráda poděkovala své mamince a celé rodině za trvalou podporu a neotřesitelnou důvěru v mé studijní i jiné schopnosti.

Dále bych ráda poděkovala všem členům laboratoře Vývojové biologie a Imunologie za zázemí, které jsme zde ve svých diplomantských časech našla, a to jak po lidské, tak po odborné stránce. Zvláštní dík za bezmeznou trpělivost patří mému školiteli, RNDr., Ing. Vladimíru Krylovovi, PhD.

Abstrakt

Fyzické mapování vazebně neidentifikovaných clusterů genů pomocí FISH-TSA s využitím cDNA markerů u *X. tropicalis*.

Xenopus tropicalis patří z pohledu vývojové biologie mezi nejdůležitější modelové organizmy. Vnější oplození a embryonální vývoj stovek potomků z každého křížení umožňuje provést rozsáhlou genetickou analýzu. Nedávno byla vytvořena vazebná mapa založená na více než 1 500 SSR markerů. Deset vazebných skupin bylo přiřazeno k jednotlivým chromozómům. Šest zbývajících clusterů (A - F) představuje nepřipojené skupiny markerů bez příslušnosti k ustaveným vazebným skupinám. Fyzické mapování založené na chromozomální lokalizaci cDNA markerů specifických pro každý vazebný cluster vedlo k jejich přiřazení, a dovoluje tak dokončit vytvořenou vazebnou mapu.

Klíčová slova: *Xenopus laevis*; *Xenopus tropicalis*; mapování genomu; vazebný cluster; cDNA marker; chromozómové lokalizace; FISH; TSA; CARD

Abstract

Physical mapping of unidentified clusters through FISH-TSA with cDNA markers in *Xenopus tropicalis*

Xenopus tropicalis belongs to the most important model organisms from developmental biology point of view. Outer fecundation and embryonic development of hundreds of descendants during particular mating allows to perform extensive genetic analysis. Presently, linkage map based on over than 1.500 SSR markers has been constructed. Ten linkage groups were assigned to particular ten chromosomes. Six remaining clusters (A - F) represent unlinked marker groups without any participation to established LGs. Physical mapping based on the chromosomal localization of cDNA markers specific to the each linkage cluster leads to their assignment and allows to finish the construction of the linkage map.

Key words: *Xenopus laevis*; *Xenopus tropicalis*; genome mapping; linkage cluster; cDNA marker; chromosome localization; FISH ; TSA; CARD

OBSAH

1 ÚVOD 10

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE 12

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 13

3.1 MODELOVÉ ORGANIZMY 13

3.1.1 ROD *XENOPUS* 13

3.1.1.1 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ 13

3.1.1.2 PLOIDIE RODU *XENOPUS* 14

3.1.2 *XENOPUS LAEVIS* 14

3.1.2.1 PLOIDIE A GENOM 14

3.1.2.2 *XENOPUS LAEVIS* JAKO KLASICKÝ EXPERIMENTÁLNÍ MODEL 15

3.1.2.3 GENETIKA A CYTOGENETIKA *X. LAEVIS* 15

3.1.3 *XENOPUS TROPICALIS* 16

3.1.3.1 PLOIDIE A GENOM 16

3.1.3.2 *X. TROPICALIS* VS. *X. LAEVIS* 17

3.1.3.3 GENOMICKÉ A GENETICKÉ PROJEKTY 18

3.1.3.4 AKTUÁLNÍ ORGANIZACE GENOMU 18

3.1.3.5 CYTOGENETIKA *X. TROPICALIS* 18

3.2 METODY MAPOVÁNÍ GENOMU 19

3.2.1 VAZEBNÉ MAPOVÁNÍ 19

3.2.1.1 RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM 20

3.2.1.2 SSLP: SIMPLE SEQUENCE LENGHT POLYMORPHISM 21

3.2.1.2.1 MINISATELITY 21

3.2.1.2.2 MIKROSATELITY 22

3.2.1.3 SNP: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM 23

3.2.1.4 RAPD: RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA 24

3.2.1.5 AFLP: AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM 25

3.2.1.6 INTRONOVÉ POLYMORFIZMY 26
3.2.2 RH PANEL: PANEL RADIAČNÍCH HYBRIDŮ 26
3.2.3 FYZICKÉ MAPOVÁNÍ GENOMU 27
3.2.3.1 METODY LOKALIZACE DNA MARKERŮ DO CHROMOZÓMŮ 28
3.2.3.1.1 DNA ISH: DNA IN SITU HYBRIDISATION 28
3.2.3.1.2 FISH: FLUORESCENT IN SITU HYBRIDISATION 28
3.2.3.1.2.1 TYPY FISH SOND 29
3.2.3.1.2.2 ZNAČENÍ A VIZUALIZACE SONDY 29
3.2.3.1.2.3 FISH METODY ZALOŽENÉ NA AMPLIFIKACI CÍLOVÉ SEKVENCE 30
3.2.3.1.2.3.1 PRINS: PRIMED IN SITU HYBRIDISATION 30
3.2.3.1.2.3.2 IN SITU PCR 31
3.2.3.1.2.4 FISH METODY ZALOŽENÉ NA AMPLIFIKACI SIGNÁLU 32
3.2.3.1.2.4.1 CARD: CATALYZED REPORTER DEPOSITION 32

3.3 MAPOVÁNÍ GENOMU *X. LAEVIS* 33
3.3.1 MAPOVÁNÍ PROSTŘEDNICTVÍM HYPERPLOIDNÍCH HYBRIDŮ 33
3.3.2 GEN-CENTROMERICKÉ MAPOVÁNÍ 34
3.3.2.1 METODA GYNOGENEZE 34
3.3.3 VAZEBNÁ MAPA *X. LAEVIS* 35

3.4 MAPOVÁNÍ GENOMU *X. TROPICALIS* 36
3.4.1 VAZEBNÁ MAPA *X. TROPICALIS* ZALOŽENÁ NA AFLP MARKERECH 36
3.4.1.1 METODIKA KONSTRUKCE VAZEBNÉ MAPY 36
3.4.2 VAZEBNÁ MAPA *X. TROPICALIS* ZALOŽENÁ NA SSR MARKERECH 37
3.4.2.1 METODIKA KONSTRUKCE MAPY 37

4 MATERIÁL 39

4.1 ŽÁBY 39

4.2 BUNĚČNÁ KULTURA 39

4.3 BAKTERIE 39

4.4 ROZTOKY 39

4.5 PRIMERY 40

4.6 PŘÍSTROJE 41

5 METODY 42

5.1 VYHLEDÁNÍ VHODNÝCH cDNA MARKERŮ 42

5.2 PŘÍPRAVA ZNAČENÉ SONDY PRO FISH 42

5.2.1 IZOLACE RNA 44

5.2.2 MĚŘENÍ KONCENTRACE RNA, RESP. DNA 44

5.2.3 SYNTÉZA PRVNÍHO VLÁKNA cDNA (ANGL. FIRST STRAND) 44

5.2.4 RT AMPLIFIKACE DNA PODLE JEDNOVLÁKNOVÉ CDNA 45

5.2.5 ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM GELU 46

5.2.6 IZOLACE PCR AMPLIFIKÁTU PRO KLONOVÁNÍ 46

5.2.7 PŘÍPRAVA A AMPLIFIKACE DNA KONSTRUKTU 46

5.2.8 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA 47

5.2.9 RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PLAZMIDOVÉ DNA 47

5.2.10 AMPLIFIKACE cDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY NA FISH 48

5.2.11 KONTROLA A IZOLACE AMPLIFIKOVANÉ cDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY NA FISH 49

SONDY NA FISH 49

5.2.12 MĚŘENÍ KONCENTRACE cDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY NA FISH 49

5.2.13 PŘÍPRAVA A IZOLACE ZNAČENÉ SONDY PRO FISH 49

5.3 ZPRACOVÁNÍ BUNĚČNÉHO MATERIÁLU 50

5.3.1 KULTIVACE BUNĚČNÉ KULTURY *IN VITRO* 50

5.3.2 SYNCHRONIZACE BUNĚČNÉHO DĚLENÍ A SBĚR BUNĚK 50

5.3.3 ZPRACOVÁNÍ BUNĚK PRO NAKAPÁNÍ 50

5.3.4 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ 51

5.4 FISH 52

5.4.1 HYBRIDIZACE 52

5.4.2 PROMYTÍ 52
5.4.3 VIZUALIZACE SIGNÁLU 52

5.5 ANALÝZA A ZPRACOVÁNÍ OBRAZU 53

5.6 ANALÝZA ZÍSKANÝCH DAT 53

6 VÝSLEDKY 54

6.1 VYHLEDÁNÍ A PCR AMPLIFIKACE VHODNÝCH cDNA MARKERŮ 54

6.2 SYNTÉZA cDNA ZNAČENÉ SONDY 54

6.3 FISH-TSA 55

6.4 MĚŘENÍ RELATIVNÍ VZDÁLENOSTI SIGNÁLU OD CENTROMÉRY (RCD) 56

7 DISKUZE 64

8 ZÁVĚR 67

9 PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY 68

1 ÚVOD

Xenopus laevis je považován za klasický embryologický model, s jehož pomocí byla minulosti objasněna řada vývojových procesů na buněčné a molekulární úrovni. Duplikace genomu, ke které došlo v evoluci *X. laevis*, však bránila uplatnění tohoto modelového systému z pohledu molekulárně genetických přístupů.

Xenopus tropicalis sdílí většinu výhod *X. laevis*. Jeho diploidní genom s pouhými 20 chromozómy však ve srovnání s alotetraploidním *X. laevis* významně usnadňuje mnohogenerační genetické, genomické a transgenní přístupy. Tato skutečnost rozšiřuje spektrum možných experimentů na poli molekulárně genetické analýzy a staví *X. tropicalis* jednoznačně do popředí zájmu poslední doby.

Mnoho sekvencí mezi *X. laevis* a *X. tropicalis* je vysoce konzervovaných. Molekulární přístupy vyvinuté u *X. laevis*, jako metoda transgeneze, stejně jako nashromážděná data z EST a cDNA knihoven, RNA sondy nebo protilátky jsou tedy s výhodou využitelné i pro model *X. tropicalis*.

Současných znalostí o funkci různých genů ve vývoji bylo u druhu *Xenopus* dosaženo injekcí genových konstruktů (antisense mRNA, morfolino oligonukleotidy) do embrya v různém vývojovém stádiu. Největší přínos pro hlubší porozumění funkci jednotlivých genů během vývoje ovšem poskytují experimentální přístupy založené na ztrátě funkce genu. To umožňuje např. analýza nulových mutací daného genu. Alotetraploidie *X. laevis* však byla výraznou komplikací těchto experimentů.

Vytvoření vazebné mapy *X. tropicalis* spolu s probíhajícím sekvenačním projektem významně posune vpřed realizaci molekulárně

genetických přístupů a umožní plně rozvinout možnosti tohoto modelového organizmu z pohledu vývojově biologických procesů. *X. tropicalis* tak dosáhne stejného experimentálního potenciálu, jaký má v současnosti myší model.

Mapovaný genom umožní přiřadit nově objevené mutované geny ke známému lokusu sloužícímu jako marker a následně dohledat tento marker v BAC nebo podobných knihovnách. To značně usnadní identifikaci, klonování a sekvenaci mutovaných genů.

V současné době probíhá sekvenování genomu *X. tropicalis* a je již dostupná vazebná mapa, založená na vazbě více než 1500 markerů označovaných jako Simple Sequence Repeat (SSR). Bylo stanoveno deset vazebných skupin v souladu s deseti chromozómy haploidního genomu *X. tropicalis*. Tato vazebná mapa je v současnosti sjednocována s mapou fyzickou na základě ukotvení jednotlivých vazebných skupin k příslušným chromozómům metodou FISH-TSA. V rámci přípravy vazebné mapy se nepodařilo některé SSR markery přiřadit k jednotlivým vazebným skupinám. Jedná se o tzv. vazebné klastry A - F (dále jako angl. cluster). Cílem této diplomové práce bylo přiřadit metodou FISH-TSA tyto clustery k jednotlivým chromozómům.

Identifikace clusterů společně s vazebnými skupinami a jejich lokalizace do příslušných chromozómů umožní dokončení kontrukce vazebné mapy *X. tropicalis*.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo lokalizovat nezařazené vazebné clustery A - F do jednotlivých chromozómů *X. tropicalis* na základě fyzického mapování příslušných cDNA markerů. Strategie tohoto postupu byla následující:

1. Přiřadit jednotlivé SSR markery ležící v příslušných vazebných clusterech do scaffoldů na základě stávající vazebné mapy (http://tropmap biology.uh.edu/).

2. Ve zvolených scaffoldech (alespoň jeden na vazebný cluster) identifikovat známé geny s co možná nejširší mírou exprese pomocí genomové databáze Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html).

3. Na základě cDNA sekvence zvolených genů navrhnout příslušné specifické PCR primery a provést jejich RT -PCR amplifikaci.

4. Získané cDNA sekvence zaklonovat do vektoru pCR-XL-TOPO.

5. Z izolované plazmidové DNA provést reamplifikaci cDNA pro následnou přípravu dig-11-dUTP značených sond metodou náhodných primerů.

6. Metodou FISH-TSA lokalizovat jednotlivé cDNA do chromozómů *X. tropicalis* pomocí připravených značených sond.

7. Na základě poměru p a q ramen identifikovat příslušné signál nesoucí chromozómy.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 MODELOVÉ ORGANIZMY

Krátký životní cyklus, početné potomstvo, snadný a levný chov v laboratorních podmínkách, přístupnost manipulacím, uspořádání genomu a konzervace biologických mechanizmů v rámci evoluce jsou předpokladem, že organizmus bude zaveden jako modelový. V současnosti jsou nejvýznamnějšími modelovými organizmy mezi prokaryoty *Escherichia coli*. Mezi eukaryoty např. kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, rostlina *Arabidopsis thaliana*, v rámci bezobratlých háďátko *Caenorhabditis elegans* nebo octomilka (*Drosophila melanogaster*). Z obratlovců pak myš (*Mus musculus*), drápatka vodní (*Xenopus laevis*) nebo v poslední době upřednostňovaný *Xenopus tropicalis*.

Obojživelníci patří již dlouhou dobu k oblíbeným modelovým organizmům vývojové biologie, a to především na poli objasňování mechanizmů uplatňujících se v embryonálním vývoji obratlovců. Jejich přednostmi oproti jiným modelovým organizmům jsou vnější oplození, embryonální vývoj a poměrně velké zárodky, umožňující snadnou manipulaci a pozorování.

3.1.1 ROD *XENOPUS*

3.1.1.1 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ

Do rodu *Xenopus* řadíme tzv. drápkaté žáby. Toto označení pochází z anglického Clawed frogs. Systematicky jsou řazeny do čeledi *Pipide*a a podčeledi *Xenopodinae* (DE SA a HILLIS 1990, CANNATELLA a DE SA 1993).

3.1.1.2 PLOIDIE RODU *XENOPUS*

Rod *Xenopus* zahrnuje téměř 20 různých druhů, z nichž až na diploidní *X. tropicalis* jsou všechny polyploidního původu, pohybující se od tetraploidie (4N) až k dodecaploidii (12N) (GRAF a KOBEL 1991, CANNATELLA a DE SA 1993).

3.1.2 *XENOPUS LAEVIS*

3.1.2.1 PLOIDIE A GENOM

Jako první byl v rámci rodu studován druh *X. laevis* (TYMOWSKA a KOBEL 1972). Na základě morfologie karyotypu a tvorby bivalentů v meióze byl původně považován za diploidního, pozdější studie ukázaly, že během evoluce došlo k duplikaci genomu (BISBEE *et al.* 1977) a *X. laevis* je alotetraploid (GRAF a KOBEL 1991, CANNATELLA a DE SA 1993). Funkčně je však *X. laevis* již z větší části diploidizován a duplikované geny mají nezávislou dědičnost (GRAF 1989). Rovněž je známo několik desítek recesivních mutací projevujících se s frekvencí, kterou lze očekávat u diploidního organizmu (GRAF 1989). V neposlední řadě funkční diploidii potvrzuje fakt, že experimentálně vytvořená embrya s 18 chromozómy nejsou životaschopná (HAMILTON 1963).

Genom *X. laevis* je tvořen 36 chromozómy a je velký přibližně 3×10^9 bp (THIÉBAUD a FISCHBERG 1977). Většinu chromozómů lze uspořádat do kvartetu na základě jejich podobného replikačního profilu (SCHMIDT a STEINLEIN 1991), což svědčí pro tetraploidní genom. Během meiózy lze pozorovat 18 bivalentů, prvně identifikovaných na základě studia štětkovitých chromozómů (MULLER 1974). Bivalenty lze rozdělit do sedmi morfologicky odlišných skupin chromozómů (TYMOWSKA a KOBEL 1972). Rozlišení lze také provést na základě barvení heterochromatinových pruhů, tzv. replikačním

pruhováním, které využívá začlenění bromdeoxyuridinu během S fáze buněčného cyklu (SCHMIDT a STEINLEIN 1991).

3.1.2.2 *XENOPUS LAEVIS* JAKO KLASICKÝ EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

Xenopus laevis se do centra pozornosti dostal ve 30. letech minulého století, kdy bylo zjištěno, že lze u něj kdykoli během roku vyvolat ovulaci a páření pouhou injekcí lidského choriogonádotropního hormonu (BELLERBY 1934, SHAPIRO a ZWARENSTEIN 1934). Tento objev dal vzniknout prvnímu, snadnému testu gravidity u lidí, kdy byla takto testována moč potenciálně těhotných žen, obsahující hCG. Tento fakt způsobil rozšíření tohoto organizmu do velké části laboratoří po celém světě. V 50. letech se *Xenopus laevis* stal významným modelovým organizmem v rámci studia časného embryonálního vývoje a buněčné biologie. Na úrovni buněčných procesů přispěly studie na *Xenopus laevis* k objasnění mechanizmů replikace chromozómů, struktury chromatinu a jádra a molekulární podstaty kontroly buněčného cyklu, dynamiky cytoskeletu a signálních drah. Embryologické experimenty pak odhalily mechanizmy indukce, určení osudu buněk během zárodečného vývoje a morfogeneze, uspořádání tělního plánu obratlovců a rané organogeneze.

3.1.2.3 GENETIKA A CYTOGENETIKA *X. LAEVIS*

Ačkoli je *X. laevis* široce využíván jako modelový organizmus vývojové a molekulární biologie, jeho hlavní slabostí v současné době je velmi omezené spektrum možných molekulárně genetických přístupů.

SCHMIDT a STEINLEIN (1991) popsali metodu identifikace jednotlivých chromozómových párů na základě jejich značení BrdU/dT.

První chromozomální lokalizace u *X. laevis* byly provedeny metodou ISH na štětkovitých chromozómech. Jednalo se o některé repetitivní sekvence nebo genové skupiny (PARDUE *et al.* 1973, FOSTEL *et al.* 1984). Do dnešní doby ovšem neexistuje klasifikace štětkovitých chromozómů dovolující jejich přiřazení k mitotickým protějškům. COURTET *et al.* (2001) jako první lokalizovali fluorescenční in situ hybrizidací (FISH) v kombinaci s tyramidovou amplifikací signálu (TSA) repetitivní geny imunoglobulinů, MHCa (z angl. Major Histocompatibility Complex) a MHC1b lokusů do metafázních chromozómů. Autoři však byli schopni lokalizovat lokus pouze v případě, že byly přítomny alespoň tři přilehlé kopie daného genu.

Modifikací postupu popsaného v práci COURTET *et al.* (2001) byl prvně lokalizována jedinečná kódující sekvence v rámci *Anur* (KRYLOV *et al.* 2003). Jednalo se o gen C-SRC1, který byl identifikován na jednom z akrocentrických chromozómů skupiny G (dle klasifikace TYMOWSKA a KOBEL 1972). TLAPÁKOVÁ *et al.* (2005) prokázali, že tento přístup umožňuje rozlišit i sekvenčně velmi blízké lokusy. Metodou FISH v kombinaci s TSA a s použitím cDNA sond lokalizovali dva paralogní geny mitochondriální malát dehydrogenázy (MDH2A, resp. MDH2B). Kódující oblast obou genů vykazovala 95% shodu. MDH2A lokus byl identifikován na q3 (q rameno chromozómu 3), MDH2B lokus pak na q8 (q rameno chromozómu 8). Tyto výsledky byly podepřeny studií (SCHMIDT a STEINLEIN 1991), kde autoři popisují podobný profil replikačního pruhování obou chromozómových párů tvořících kvartet v rekonstruovaném tetraploidním genomu *X. laevis*

3.1.3 *XENOPUS TROPICALIS*

3.1.3.1 PLOIDIE A GENOM

Xenopus tropicalis je jediný diploidní druh rodu *Xenopus* (DE SA a HILLIS 1990, TYMOWSKA 1991). Metodou Southern blot byly srovnány úseky

DNA genomu *X. laevis* a *X. tropicalis*. *X. laevis* vykazoval ve většině případů přibližně dvojnásobný počet hybridizovaných fragmentů ve srovnání s *X. tropicalis* (JEFFREYS *et al.* 1980). Diploidie *X. tropicalis* a tetraploidie *X. laevis* byla dále podpořena studií (JEFFREYS *et al.* 1980) u lokusů pro globinové geny. V případě MHC komplexu se většina genů lokusu jevila jako diploidní jak u *X. tropicalis* tak u *X. laevis* (SALTER-CID *et al.* 1996). Na druhou stranu byly u *X. laevis* jednotlivé geny komplexu lokalizovány do různých vazebných skupin na různých chromozómech.

Velikost genomu *X. tropicalis* se pohybuje kolem 1,7 x 10^9 bp. Karyotyp se vyznačuje 20 mitotickými chromozómy rozpoznatelnými na základě poměru délky p a q ramen (TYMOWSKA 1973).

3.1.3.2 *X. TROPICALIS* VS. *X. LAEVIS*

Xenopus tropicalis sdílí většinu výhod s *X. laevis*. Jeho diploidní genom s pouhými 20 chromozómy však ve srovnání s alotetraploidním *X. laevis* významně usnadňuje mnohogenerační genetické, genomické a transgenní přístupy, čímž rozšiřuje spektrum možných experimentů na poli genetické analýzy a staví ho tak jednoznačně do popředí zájmu poslední doby.

Xenopus tropicalis je výrazně menší, což snižuje finanční i prostorové nároky na jeho chov. Oocyty a embrya jsou ještě dostatečně velká na to, aby umožňovala provádět mikromanipulační zásahy. Další předností je generační interval 4 - 6 měsíců místo 1 - 2 let u *X. laevis* (DUELLMAN a TRUEB 1986) a větší množství oocytů ve snůšce (1000 - 3000 vs. 200 - 500). Mnoho sekvencí mezi oběma druhy je vysoce konzervovaných a molekulární přístupy vyvinuté u *X. laevis*, stejně jako nashromážděná data z EST (exprimovaná sekvence, z angl. Expressed Sequence Tag) a cDNA (z angl. complementary DNA) knihoven (AMAYA *et al.* 1998), RNA sondy či protilátky (KHOKA *et al.* 2002) jsou s výhodou snadno využitelné i pro model *X. tropicalis*.

3.1.3.3 GENOMICKÉ A GENETICKÉ PROJEKTY

O opodstatněnosti snahy vytvořit z *X. tropicalis* nový modelový genetický systém svědčí značná podpora ze strany The National Institutes of Health (NIH) (http://www.nih.gov/)

V současné době běží řada projektů majících za cíl sekvenovat genom *X. tropicalis* (http://faculty.virginia.edu/xtropicalis/GenomeBACintro.html). Dále jsou generovány EST sekvence, BAC (z angl. Bacterial Arteficial Chromosome) a cDNA knihovny (KLEIN *et al.* 2002). K dispozici jsou inbrední linie IC (Ivory Coast) a N (Nigerian) kmenů, jejichž vzájemným křížením a analýzou potomstva vzniká vazebná mapa. Postup a aktuální vývoj genomického mapování *X. tropicalis* lze sledovat na webových stránkách http://tropmap.biology.uh.edu/. Pro konstrukci různých transgenních linií, jedné z BAC knihoven a také jako zdroj DNA pro sekvenační projekt genomu byli použiti jedinci nigerijského (N) kmene.

3.1.3.4 AKTUÁLNÍ ORGANIZACE GENOMU

Sekvence genomu *X. tropicalis* je podle nejnovější verze JGI 4.1 organizována do 19 501 scaffoldů (viz. kap. 3.2.3), poskytujících přibližně osminásobné pokrytí genomu. S postupem projektu sekvenace jsou data průběžně aktualizována (http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4 info.html).

3.1.3.5 CYTOGENETIKA *X. TROPICALIS*

Prvním mapovaným genem na chromozómech *X. tropicalis* byl gen MDH2 (mitochondriální malát-dehydrogenáza) (KRYLOV *et al.* 2007). Autoři identifikovali lokus v subcentromerické oblasti q ramene chromozómu 3. U *X. laevis* byly 2 paralogní geny MDH2 lokalizovány do chromozómů 3 a 8 (TLAPÁKOVÁ *et al.* 2005). Srovnání výsledků TLAPÁKOVÁ *et al.* (2005) a

KRYLOV *et al.* (2007) naznačuje společný evoluční původ identifikovaných chromozómů.

V současné době probíhají v rámci fyzického mapování genomu *X. tropicalis* lokalizace řady dalších genů.

3.2 METODY MAPOVÁNÍ GENOMU

3.2.1 VAZEBNÉ MAPOVÁNÍ

Vazebná mapa představuje relativní pozici jednotlivých genových lokusů nebo jiných DNA markerů na chromozómu. Tato pozice je stanovena na základě frekvence rekombinace mezi dvěma oblastmi DNA homologních chromozómů během meiózy a je udávána v centimorganech (cM). 1 cM je ekvivalentem 1 % frekvence rekombinace.

Pravděpodobnost, že dva geny podstoupí homologní rekombinaci, závisí na fyzické vzdálenosti obou sekvencí na chromozómu. Se stoupající vzdáleností dvou lokusů stoupá pravděpodobnost, že mezi nimi rekombinace proběhne a lokusy od sebe budou během meiózy odděleny.

Jako genetický marker může sloužit sekvence DNA, která je polymorfní a u jedinců náhodné populace se vyskytuje pokud možno v heterozygotním stavu.

Před objevením struktury DNA byly první genetické mapy konstruovány na základě pozorování fenotypově se projevujících genů. Schopnost biochemické detekce některých lokusů později rozšířila spektrum sledovaných fenotypů. To umožnilo vytvořit vazebné mapy u bakterií či kvasinek. U člověka byly sledovány alely určující krevní skupiny, varianty sérových proteinů nebo proteiny HLA systému (z angl. Human Leukocyte Antigens) (BROWN 2006).

Vazebné mapy založené výhradně na sledování genových lokusů by nebyly příliš podrobné. Kódující sekvence představují pouze menší část eukaryotického genomu a pouze určité geny se vyskytují v alelických formách. Mapy s vyšším rozlišením mohly být konstruovány po objevení DNA markerů. Jako DNA marker je označován heterozygotní lokus pro neutrální změnu v sekvenci DNA, který se nepojí s rozpoznatelným fenotypem.

Z obecného hlediska lze DNA markery charakterizovat jako dominantní, reps. kodominantní. Polymorfizmus dominantních markerů je detekován jako fragment konstantní délky, který u jedince buď je, nebo není amplifikován. Nelze tedy rozlišit, zda byl marker amplifikován z jedince homozygotního nebo heterozygotního. Dominantními markery jsou například polymorfizmy náhodně amplifikovaných DNA fragmentů (viz. kap. 3.2.1.4). Kodominantní markery jsou identifikovány jako segmenty různé délky amplifikované z téhož lokusu. Tento druh markerů umožňuje odlišit heterozygoty od homozygotů, a je tedy z pohledu analýzy segregace polymorfizmů výhodnější. Klasickým příkladem kodominantních markerů jsou délkové polymorfizmy restrikčních fragmentů (viz. kap. 3.2.1.1).

3.2.1.1 RFLP: RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM

Metoda RFLP (délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů) byla jako prostředek vazebné analýzy poprvé použita v roce 1974 (GRODZICKER *et al.*). Princip této techniky je následující: Vybrané restrikční enzymy rozpoznávají specifické sekvence v molekule DNA a katalyzují endonukleolytické štěpení v této oblasti. Výsledkem tohoto štěpení jsou fragmenty definované délky, jejichž rozdělení probíhá elektroforézou na agarózovém gelu. Následná hybridizace fragmentů kódujících specifické sekvence a identifikace délkového polymorfismu je provedena technikou Southern blot (SOUTHERN 1974).

Rozdíly v délce určitých restrikčních fragmentů mezi jednotlivci jsou obecně důsledkem ztráty nebo naopak vzniku nového restrikčního místa. K tomu může dojít záměnou jedné a více bazí v restrikčním místě, inzercí, resp. delecí, úseku DNA do oblasti fragmentu nebo v důsledku jiných lokálních přestaveb DNA (BOTSTEIN *et al.* 1980).

3.2.1.2 SSLP: SIMPLE SEQUENCE LENGHT POLYMORPHISM

SSLP (délkový polymorfizmus krátkých sekvencí) jsou DNA markery založené na variabilním počtu krátkých repetic. Oproti RFLP markerům mají jednu základní výhodu. RFLP se obvykle vyskytují jako dvě "alely", z nichž jedna je často frekvenčně podhodnocena (alela bez přítomnosti restrikčního místa). To snižuje pravděpodobnost výskytu heterozygotních jedinců, kteří jsou klíčoví pro analýzu rekombinace. V případě SSLP markerů je délkový polymorfizmus odhalen metodou PCR s následnou analýzou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Výsledkem jsou různě dlouhé amplifikáty, lišící se na základě variabilního počtu repetic v sekvenci (GRIFFITHS 2000).

V současné době se SSLP markery dělí podle délky repetice na dvě základní skupiny: tzv. minisatelity a mikrosatelity.

3.2.1.2.1 MINISATELITY

Ministelitní DNA je krátká nukleotidová sekvence o 100 bp, organizovaná do tandemových repetic. V rámci lidského genomu se ministelity nacházejí především v oblasti telomér (RAMEL 1997). Pro účely vazebného mapování jsou vhodnější netelomerické minisatelitní markery označované jako VNTR (z angl. Variation in the Number of Tandem Repeats): změny v počtu opakování tandemových repetic (NAKAMURA *et al.* 1987).

Základní sekvence těchto repetic pravděpodobně představuje tzv. horká místa rekombinace (angl. hot spots) (JEFFREYS *et al.* 1985b). Různé počty těchto repetic a z toho vyplývající vysoká alelická variabilita VNTR markerů zřejmě vzniká jako důsledek nerovnoměrného crossing-overu nebo sklouzáváním DNA během replikace (STRAND *et al.* 1993).

Jednotlivé alely VNTR markerů lze odlišit na základě jejich velikosti. Jaderná DNA je štěpena restrikční endonukleázou, která neštěpí repetitivní sekvenci. Vzniklé fragmenty jsou elektroforeticky separovány a analyzovány metodou Southern blot. Sonda v reakci detekuje repetitivní sekvence vzniklých restrikčních délkových polymorfizmů. Alternativně lze pro detekci těchto markerů použít PCR amplifikaci (JEFFREYS *et al.* 1991).

U člověka je délková variabilita každého VNTR lokusu tak vysoká, že výsledný profil vizualizovaných segmentů je jedinečný mezi různými jednotlivci a mezi maternálním a paternálním lokusem každého jednotlivce (JEFFREYS *et al.* 1985a). VNTR proto našly využití ve forenzní diagnostice a určování otcovství.

3.2.1.2.2 MIKROSATELITY

Mikrosatelity jsou alternativně označovány jako SSR (z angl. Simple Sequence Repeat): opakování jednoduché sekvence nebo STR (z angl. Simple Tandem Repeat): jednoduchá tandemová repetice. Základním motivem mikrosatelitní DNA jsou tandemově se opakující di- až tetranukleotidy, které jsou náhodně rozloženy v nekódující DNA sekvenci eukaryotického genomu. To je činí vhodnějšími pro účely vazebného mapování než minisatelity (RAMEL 1997).

Mikrosatelitní DNA lze nalézt buď prohledáváním databází s genomickými sekvencemi, nebo analýzou klonů dostupných knihoven. PCR

amplifikace každého SSR markeru vyžaduje vlastní pár specifických primerů. Templátem pro tyto primery jsou jedinečné sekvence nalezené v blízkosti jednotlivých SSR lokusů (WEBER a MAY 1989).

SSR markery byly nalezeny jak v lidském genomu (HAMADA a KAKUNAGA 1982), tak i u ostatních eukaryotických organizmů (McCOUCH *et al.* 1997). Množství mikrosatelitů v genomu se také liší mezi blízce příbuznými jedinci téhož druhu (McCOUCH *et al.* 1997). Srovnání jednotlivých mikrosatelitních repetic ukázalo rozdíly v četnosti jejich výskytu mezi obratlovci a rostlinami. Např. sekvence $d(AC/GT)_n$, hojná v genomu člověka, je jen zřídka pozorována v rostlinném genomu (LAGERCRANTZ *et al.* 1993).

Přesnost vazebné mapy je přímo úměrná jejímu pokrytí sledovanými markery. SSR polymorfizmy poskytují poměrně husté pokrytí eukaryotického genomu a mohou tedy být konstruovány relativně podrobné mapy založené výhradně na vazbě těchto markerů. DIB *et al.* (1996) vytvořili vazebnou mapu lidského genomu o 5264 SSR markerech. V současnosti je vytvořena vazebná mapa *X. tropicalis* s využitím SSR polymorfizmů (viz. kap. 3.4.2).

3.2.1.3 SNP: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

SNP (polymorfizmus založený na jednonukleotidové záměně) je nejčastější variací v sekvenci DNA. Většina SNP se nenachází v oblasti rozpoznávané restrikčními endonukleázami, a tudíž jsou technikou RFLP neodhalitelné. U člověka byl na základě srovnání sekvence jednotlivých párů homologních chromozómů stanoven výskyt jednoho SNP na každých 500 až 1000 bp (COOPER *et al.* 1985). Tyto polymorfizmy se nacházejí jak v promotorových a intronových oblastech tak i v rámci kódujících sekvencí (BROOKS 1999).

Jednonukleotidové záměny v sekvenci DNA mohou být nalezeny na základě hybridizačních experimentů. Běžná je detekce SNP markerů *in silico*, např. srovnáváním překrývajících se sekvencí mezi klony různých knihoven. Jinou možností je srovnání překrývajících se oblastí tzv. EST sekvencí (viz. kap. 3.2.2).

SNP, které nemění kódující aminokyselinu, jsou označovány jako synonymní a nejsou předmětem přirozené selekce. Nesynonymní záměny mohou působit na aktivitu promotoru, konformaci DNA nebo mRNA a přímo nebo nepřímo ovlivnit fenotypové projevy. Jejich genetická variabilita je jedním z faktorů spojených s náchylností k určitým chorobám (SHASTRY 2002).

Ve srovnání s SSLP markery jsou SNP pokládány za poměrně stabilní (SHASTRY 2002). To je spolu s jejich vysokou četností v genomu činí ideálními pro účely vazebného mapování. Za spolupráce několika institutů byla vytvořena mapa lidského genomu založená na vazbě 1,42 miliónu SNP markerů (SNP GROUP 2001).

3.2.1.4 RAPD: RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

Analýza RAPD (polymorfizmus náhodně amplifikovaných DNA fragmentů) (WILLIAMS *et al.* 1990) je založena na PCR amplifikaci DNA sekvencí za použití vždy jednoho náhodného primeru. Detekce polymorfizmů probíhá vizualizací fragmentů na agarózovém nebo akrylamidovém gelu. Nespornou výhodou této metody je, že nevyžaduje předchozí znalost sekvence DNA.

Polymorfizmus RAPD markerů vzniká na základě delece nebo naopak inzerce úseku DNA do oblasti nasednutí primeru. V důsledku inzerce buď vůbec nedojde k amplifikaci, nebo je pouze změněna délka amplifikovaného fragmentu. Většina RAPD markerů je nicméně dominantní a ne všechny

detekované polymorfizmy vznikají nutně jako výsledek dokonalého párování mezi primerem a DNA templátem. Záměna jednoho nukleotidu v sekvenci DNA tedy může, ale nemusí, mít za následek detekci polymorfizmu. Na druhou stranu autoři (WILLIAMS *et al.* 1990) uvádějí, že většina jednonukleotidových záměn v sekvenci primeru vedla ke změně profilu amplifikovaných segmentů DNA, a tudíž je možné identifikovat poměrně širokou škálu těchto markerů.

3.2.1.5 AFLP: AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

Jiným přístupem, jak nalézt polymorfizmy bez předchozí znalosti jejich nukleotidové sekvence, je technika AFLP (délkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentů). Detekce AFLP se provádí PCR amplifikací restrikčních fragmentů. Genomová DNA je nejprve štěpena některým z restrikčním enzymů. Dalším krokem je vazba oligonukleotidového adaptéru ke vzniklým restrikčním fragmentům. S jeho pomocí jsou tyto úseky selektivně amplifikovány metodou PCR a vzorek je následně elektroforeticky analyzován na denaturujícím polyakrylamidovém gelu. (VOS *et al.* 1995). Metoda je velmi citlivá a může být použita pro DNA jakéhokoli původu a komplexity. Nalezené polymorfizmy plní funkci markerů a lze je použít pro konstrukci vazebné mapy.

Cílem pro nasednutí primerů je sekvence adaptéru společně s restrikčním místem. Syntetizovány jsou pouze ty fragmenty, u nichž je přesahující oblast primeru komplementární k nukletiodům odpovídajícím sekvenci restrikčního místa. Množství amplifikovaných fragmentů lze kontrolovat regulací intenzity štěpení DNA vzácně štěpícím enzymem a také zvoleným množstvím selektivních bází v sekvenci primeru. Zpravidla je amplifikováno 50 - 100 restrikčních fragmentů v jedné reakci. Spolehlivost této metody je dána stringentními podmínkami pro nasednutí specifických primerů. (RIEDY *et al.* 1992).

3.2.1.6 INTRONOVÉ POLYMORFIZMY

Tento typ markerů v sobě zahrnuje všechny výše popsané skupiny. Intronové sekvence často nesou repetitivní sekvence nebo zbytky mobilních elementů (např. transpozónů). Ohraničení intronových polymorfizmů jedinečnými exonovými sekvencemi dává jistotu jejich specifické detekce metodou PCR. To je spolu s vysokou mírou variability činí užitečnými z pohledu vazebné analýzy (MÁCHA *et al.* 2003).

3.2.2 RH PANEL: PANEL RADIAČNÍCH HYBRIDŮ

Radiační hybrid je buňka, která kromě vlastní sady chromozómů nese také fragmenty chromozómů druhově odlišného jedince (McCARTHY 1996). Buňky pocházející z mapovaného druhu jsou vystaveny rentgenovým paprskům. Tím dojde k jejich usmrcení a naštěpení DNA. Během fúze takto inaktivovaných buněk s buňkami neozářenými (např. hlodavce) dochází k náhodnému vložení DNA fragmentů do chromozómů příjemce. Fúzi lze indukovat buď chemicky, působením polyetylenglykolu, nebo biologicky, vystavením buněk působení Sendai viru (McCARTHY 1996).

Selekce hybridních buněk obvykle probíhá kultivací s HAT (Hypoxantin-Aminopterin-Tymidin) médiem. Jedna linie buněk je HGPRT (hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferáza) deficientní a druhá linie je TK (tymidin-kináza) deficientní. Aminopterin v médiu blokuje *de novo* syntézu purinů a pyrimidinů. Pokud jsou ale v buňce funkční oba zmíněné enzymy, puriny a pyrimidiny mohou být syntetizovány alternativní dráhou za využití hypoxantinu a tymidinu (McCARTHY 1996). Takto jsou pozitivně selektovány pouze úspěšně fúzované buňky, které ve svých chromozómech nesou vloženou sadu náhodných DNA fragmentů mapovaného druhu. Sada těchto buněk pokrývající celý genom se nazývá panel radiačních hybridů (McCARTHY 1996).

U vzniklých hybridních linií jsou nejprve vyhledány různé molekulární markery mapovaného druhu. Následně je sledována frekvence, s jakou se markery objevují společně. Principiálně se jedná o stejný postup jako u klasické vazebné analýzy. Se stoupající vzdáleností dvou lokusů stoupá pravděpodobnost, že mezi nimi dojde působením rentgenového záření ke zlomu a lokusy se budou nacházet na odlišných fragmentech DNA.

Vložené fragmenty sledovaného druhu lze s výhodou mapovat pomocí tzv. STS (z angl. Sequence Tagged Site). STS je obecné označení pro úsek DNA o známé nukleotidové sekvenci, který je jedinečný v rámci sledovaného genomu nebo chromozómu. Přítomnost STS sekvencí ve fragmentech DNA může být na základě znalosti jejich nukleotidové sekvence jednoduše zjištěna metodou PCR nebo hybridizací.

Nejběžněji mapované STS jsou výše popsané SSLP nebo RAPD markery, případně tzv. EST sekvence. EST jsou získávány analýzou cDNA klonů a bývají dlouhé 100 až 600 bp (MARRA *et al.* 1998). Kompletní nebo částečné nukleotidové sekvence těchto cDNA klonů jsou běžně přístupné v internetových databázích (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).

3.2.3 FYZICKÉ MAPOVÁNÍ GENOMU

Rozlišení vazebných map je závislé na počtu sledovaných crossing-overů. Určitým omezením je také existence horkých míst rekombinace (JEFFREYS *et al.* 1985b), tedy míst, kde v meióze dochází přednostně k homologní rekombinaci. To do jisté míry omezuje přesnost těchto map. Při fyzickém mapování je naproti tomu analyzován přímo materiál genomu, což poskytuje přesnější informace o jeho uspořádání.

Fyzická mapa genomu představuje pozici genů nebo jiných markerů na příslušném chromozómu vyjádřenou počtem párů bazí mezi sledovanými

polymorfními lokusy. Fyzickým mapováním DNA markerů lze mapu rozšířit, popř. opravit nepřesnosti v pořadí markerů v rámci vazebné mapy.

Jedním z možných přístupů fyzického mapování je identifikace klonů genomových knihoven. Klony jsou souborem překrývajících se sekvencí, které více než jednou pokrývají genom daného organizmu. Charakterizace jednotlivých klonovaných inzertů umožňuje na základě nalezených překryvů jejich postupné složení do větších úseků označovaných jako kontingy. Složené kontingy pak na stejném principu tvoří delší úseky označované jako scaffoldy. Výsledný počet mapovaných segmentů by měl odpovídat počtu chromozómů sledovaného organizmu.

3.2.3.1 METODY LOKALIZACE DNA MARKERŮ DO CHROMOZÓMŮ

3.2.3.1.1 DNA ISH: DNA IN SITU HYBRIDISATION

Vyvinutí metody DNA in situ hybridizace (DNA ISH) (GALL a PARDUE 1969) se stalo mezníkem v přechodu od klasické cytogenetiky k éře cytogenetiky molekulární. Princip metody spočívá v hybridizaci značené sekvence DNA (sonda) ke komplementární sekvenci na chromozómu nebo v interfázním jádře. Podmínkou hybridizace sondy je jednovláknová struktura DNA. Denaturace DNA v chromozómu je dosaženo ošetřením preparátu roztokem formamidu, který snižuje teplotu tání DNA. Tento postup umožňuje zachovat morfologii chromozómu, která by jinak byla poškozena příliš vysokou teplotou nutnou k denaturaci DNA dvojšroubovice.

3.2.3.1.2 FISH: FLUORESCENT IN SITU HYBRIDISATION

První sondy používané v ISH experimentech byly značeny radioaktivně, nicméně tato metodika neposkytuje dostatečnou citlivost a rozlišení zároveň. Radioaktivně značené sondy byly v osmdesátých letech nahrazeny technikou

FISH, využívající fluorescenčně značené nukleotidy (LANGER-SAFER *et al.* 1982).

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) umožňuje nalézt konkrétní sekvenci přímo na chromozómu. Takto mohou být vizualizovány jak repetitivní, tak i jedinečné DNA sekvence. Limitní rozlišení metodou FISH je kolem 100 kb v interfázním jádře a několik megabází vzdálených sekvencí v mitotických nebo meiotických profázních chromozómech (JIANG a GILL 2006) .

3.2.3.1.2.1 TYPY FISH SOND

Jako sondy pro FISH analýzu mohou sloužit kosmidové, BAC, YAC (z angl. Yeast Arteficial Chromosome) nebo PAC (z angl. P1-derived Artificial Chromosome) klony, které bývají dlouhé několik desítek až stovek kb a mimo jiné obsahují sekvenci pro hledaný gen. Na druhou stranu přítomnost repetitivních sekvencí v takto vytvořených sondách zvyšuje riziko nespecifického signálu. Tento problém lze řešit inkubací sondy s neznačenou jadernou DNA studovaného organizmu, případně s frakcí DNA obohacenou o repetitivní sekvence (JIANG a GILL 2006).

3.2.3.1.2.2 ZNAČENÍ A VIZUALIZACE SONDY

Hybridizovanou sondu lze vizualizovat přímo, pokud byl během její syntézy použit nukleotid (11-dUTP, 11-deoxyuridintrifosfát) přímo konjugovaný s některým z fluorochromů jako FITC (fluoresceinizothiokyanát), tetrametylrodamin a jiné.. Tento přístup je dostatečný v případě lokalizace repetitivních, např. centromerických, sekvencí (SPEEL *et al.* 1999).

Vyšší citlivosti detekce signálu lze dosáhnout nepřímou vizualizací sondy, kdy značený nukleotid slouží jako hapten pro reakci s příslušnou protilátkou konjugovanou s fluorochromem. Mezi nejpoužívanější hapteny

patří biotin či dogoxigenin, popř některá z fluorescenčních sloučenin. Ani tento přístup však často není dostatečný k identifikaci signálu v případě použití krátkých sond (1 - 3 kb) (JIANG a GILL 2006).

3.2.3.1.2.3 FISH METODY ZALOŽENÉ NA AMPLIFIKACI CÍLOVÉ SEKVENCE

Další zvýšení citlivosti detekce signálu na buněčném či tkáňovém preparátu lze dosáhnout postupy, které kombinují amplifikaci cílové sekvence metodou PCR a následnou detekci daného amplifikátu technikou ISH.

3.2.3.1.2.3.1 PRINS: PRIMED IN SITU HYBRIDISATION

Technika PRINS (KOCH *et al.* 1989) spočívá v nasednutí jednoho neznačeného DNA primeru ke komplementární cílové sekvenci, následované in situ elongací katalyzovanou termostabilní DNA polymerázou. Během reakce dochází k začlenění značeného nukleotidu. Vizualizace je provedena stejně jako u klasické FISH buď přímo, nebo nepřímo.

Metoda PRINS se uplatnila především v lokalizaci repetitivních sekvencí chromozómů, jako jsou například telomerické tandemově uspořádané repetice $(TTAGGG)_n$, vykazující vysokou konzervaci v evoluci (KREJCI a KOCH 1999). GOSDEN *et al.* (1991) použili Alu specifické primery v PRINS reakci ke značení lidských chromozómů. Alu repetice se v genomu nacházejí přibližně ve 300 až 900 tisících kopií, nerovnoměrně rozložených v tzv. Alu lokusech. Právě přítomnost těchto repetic tvoří základ pro R (reverzní) pruhování lidských chromozómů (MANUELIDIS a WARD 1984). KOCH *et al.* (1989) pro rozlišení některých lidských chromozómů použili techniku PRINS na základě amplifikace α-satelitní DNA. Její základní jednotkou je 171 bp dlouhá sekvence nacházející se v centromerických oblastech chromozómů všech primátů.

V několika případech našla PRINS metodika uplatnění i v lokalizaci jedinečných sekvencí. CINTI *et al.* (1993) tímto způsobem identifikovali lidský srážecí faktor IX. KADANDALE *et al.* (2000) lokalizovali lokusy genů SRY a SOX3 do lidských X a Y chromozómů.

3.2.3.1.2.3.2 IN SITU PCR

Princip metody in situ PCR (HAASE *et al.* 1990) je obdobný technice PRINS s tím rozdílem, že v reakci jsou přítomny dva proti sobě orientované primery. Přímo v buňce nebo na tkáňovém řezu katalyzuje termostabilní DNA polymeráza amplifikaci specifické genové sekvence na detekovatelnou úroveň. Na druhou stranu některé práce (SIBONY *et al.* 1995, SPERRY *et al.* 1996, SPEEL *et al.* 1999) tento princip zpochybňují, protože stejných výsledků dosáhli i pouhým opakovaným zahříváním vzorku bez přítomnosti termostabilní DNA polymerázy.

Z pohledu lokalizačních experimentů se in situ PCR ukázala být vhodná pro detekci repetitivních telomerických sekvencí stejně jako jedinečných sekvencí (HARRER *et al.* 2001). Modifikací in situ PCR lze na základě reverzní transkripce ve vzorku detekovat také molekuly mRNA. Metoda je označována jako in situ RT-PCR (NUOVO 1992).

I přes poměrnou náročnost celé procedury našly techniky in situ PCR a in situ RT-PCR široké uplatnění především na diagnostické úrovni v řadě oborů, jako jsou např. genetika, imunologie nebo virologie. Tyto metody umožňují jadernou nebo cytoplazmatickou detekci i velmi malého množství virově specifických DNA, reps. RNA molekul (GIBELLINI *et al.* 1997, HOYLAND *et al.*, 2003), a tedy ranou diagnostiku řady onemocnění.

3.2.3.1.2.4 FISH METODY ZALOŽENÉ NA AMPLIFIKACI SIGNÁLU

3.2.3.1.2.4.1 CARD: CATALYZED REPORTER DEPOSITION

FISH metody založené na amplifikaci cílové sekvence jsou provázeny řadou praktických problémů. Příkladem je nízká úroveň amplifikace nebo nevyhnutelná difúze amplifikátu z místa syntézy během denaturace preparátu. Poměrně vysoká pravěpodobnost vzniku možných artefaktů ztěžuje reprodukovatelnost a kvantifikaci získaných výsledků (SPEEL *et al.* 1999). Významným krokem vpřed v tomto směru byla práce BOBROW *et al.* (1989), kteří zavedli metodu označovanou jako CARD: katalyzovaná depozice reportérových molekul.

Princip metody spočívá v depozici velkého množství haptenizovaných molekul tyramidu v důsledku enzymatické aktivity křenové peroxidázy. Tyramid je sloučenina fenolové povahy. V případě, že je přítomný ve vysokých koncentracích, křenová peroxidáza katalyzuje jeho dimerizaci přes tvorbu volných radikálů (ZAITSU a OHKURA 1980). Přítomnost tyramidu v nízkých koncentracích omezuje pravděpodobnost dimerizace. Vzniklé vysoce reaktivní meziprodukty se ochotně vážou k okolním molekulám bohatým na elektrony, jako je například tyrozin.

Nespornou výhodou metody CARD během ISH experimentů je, že k amplifikaci signálu dochází až po hybridizaci sondy a promývání preparátu. Tento postup zajišťuje specifitu hybridizace sondy. Na druhou stranu je třeba počítat s faktem, že dochází k amplifikaci jak specifického, tak nespecifického signálu.

Oproti standardní FISH zvyšuje tento amplifikační krok citlivost reakce 100 - 1000 krát (Speel et al. 1999). Nejjednodušším přístupem, jak vizualizovat nukleové kyseliny in situ, je využití sond, které jsou značeny křenovou peroxidázou a mohou být detekovány přímo CARD amplifikací

signálu (SCHMIDT *et al.* 1997). Jako nejúčinnější se ovšem jeví nepřímé značení sondy biotinem nebo digoxigeninem. Detekce pak probíhá streptavidinem nebo antidigoxigeninovou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Následuje vizualizace signálu pomocí CARD. Tento přístup několikanásobné amplifikace lze s výhodou použít pro detekci krátkých cDNA sond (SPEEL *et al.* 1999).

Metoda CARD byla původně vyvinuta pro analýzu imunoblotů a ELISA (z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) vzorků (BOBROW *et al.* 1989). Významný pokrok představuje práce RAAP *et al.* (1995), kteří zavedli fluorescenčně značený tyramid. Kromě klasické lokalizace repetitivních a jediněčných DNA sekvencí lze v případě použití různě značených sond lokalizovat až tři různé DNA sekvence současně na jednom preparátu (SPEEL *et al.* 1997).

3.3 MAPOVÁNÍ GENOMU *X. LAEVIS*

3.3.1 MAPOVÁNÍ PROSTŘEDNICTVÍM HYPERPLOIDNÍCH HYBRIDŮ

Chromozómové mapování pomocí hyperploidních hybridů je obdobné technice produkce buněčných hybridů u savců. Využívá možnosti vytvořit žábu, která nese kromě své diploidní sady chromozómů také jeden nebo více chromozómů pocházejících z jiného živočišného druhu (KOBEL a DU PASQUIER 1979). U *Xenopa* je poměrně snadné připravit alotriploidní jedince buď zpětným křížením samic mezidruhových hybridů nebo zabráněním vyloučení druhého pólového tělíska u oocytů oplozených spermiemi jiného druhu, např. *X. gilli* (MŰLLER *et al.* 1978). Takto vytvořené alotriploidní samice v dospělosti zpravidla produkují aneupliodní gamety, které kromě poloviční sady vlastních chromozómů nesou náhodný chromozóm z *X. gilli*. Po oplození těchto gamet spermiemi *X. laevis* lze získat hyperdiploidní potomstvo, jehož vlastní diplodní genom je doplněn některým z chromozómů *X. gilli*. Přibližně 1 - 3 % takových jedinců se dožije

dospělosti. Tento postup byl použit pro mapování imunologických markerů u *X. gilli* (DU PASQUIER a KOBEL 1979). Vzhledem k malému počtu sledovaných markerů však nebyla možná lokalizace nalezených lokusů do vazebných skupin.

3.3.2 GEN-CENTROMERICKÉ MAPOVÁNÍ

Mapování analýzou uniparentálních embryí umožňuje sledovat recesivní mutace vyskytující se u přirozené populace zkoumaného druhu již u jedinců druhé generace (F1, filiální generace 1) (KROTOSKI *et al.* 1985). U diploidních gynogenetických jedinců lze analýzou heterozygotních znaků pocházejících od matky získat informace o mapové vzdálenosti mezi odpovídajícími lokusy a jejich centroméram. Vzdálenost je stanovena na základě rekombinační četnosti.

COLOMBELLI *et al.* (1984) takto mapovali geny podílející se na regulaci nebo určení pohlaví *X. laevis*. THIÉBAUD *et al.* (1984) a REINSCHMIDT *et al.* (1985) gen-centromerickým mapováním charakterizovali několik lokusů *X. laevis*, zahrnujících geny podílející se na vzniku některých vývojových defektů, některé izoenzymy, krevní proteiny a geny MHC lokusu.

3.3.2.1 METODA GYNOGENEZE

TOMPKINS *et al.* (1978) popsali metodu produkce diploidního gynogenetického potomstva pro *X. laevis*. Tento systém se ukázal být vhodný pro snadné mapování recesivních mutací i u dalších modelových organizmů, včetně *X. tropicalis* (NORAMLY a ZIMMERMAN 2005).

Základním předpokladem produkce gynogenetických diploidních embryí, tj. embryí nesoucích pouze maternální genom, je oplození oocytu UV

ozářenou spermií. UV záření zničí DNA spermií, které jsou ovšem stále schopné zahájit oplození a následný vývoj embrya. Diploidizaci gynogenetických embryí lze u obojživelníků zajistit buď tepelným šokem (KAWAHARA 1978) nebo působením vysokého tlaku. Obě techniky mají za cíl zabránit vyloučení druhého pólového tělíska, které posléze fúzuje s genetickým materiálem vlastního oocytu.

3.3.3 VAZEBNÁ MAPA *X. LAEVIS*

GRAF a KOBEL (1991) vytvořili vazebnou mapu genomu *X. laevis* založenou na elektroforetické pohyblivosti izoenzymů. Zpětným křížením několikanásobně heterozygotních individuí vytvořených křížením několika poddruhů *X. laevis* a následnou analýzou dědičnosti 35 izoenzymatických markerů a lokusu pro pigment bylo stanoveno deset vazebných skupin.

Autoři analyzovali segregaci některých z duplikovaných lokusů zpětným křížením. U žádného z nich nebyla prokázána vazba, nicméně lokus pro ALB-1 (albumin) vykazoval blízkou vazbu s lokusem pro ADH-2 (alkohol-dehydrogenáza) ve vazebné skupině 1 stejně jako ALB-2 a ADH-1 ve vazebné skupině 2. Tento výsledek naznačuje, že celá vazebná skupina ALB–ADH byla v evoluci duplikována v souladu s teorií o duplikaci genomu *X. laevis* (BISBEE *et al.* 1977).

Při srovnání s vazebnou mapou lidského genomu (McKUSICK 1987) pět vazebných skupin z deseti vykazovalo podobnost s lidskými syntenními skupinami. Stejně tak srovnání s vazebnou mapou blízce příbuzných rodů jako je rod *Rana* (WRIGHT *et al.* 1983) ukazuje podobné vazebné vztahy, a tedy zřejmou konzervaci těchto vazeb v evoluci.

Graf také udává vazbu lokusů pro SOD-1 (superoxid-dismutáza), GPD-1 (glukóza-fosfát-izomeráza) a ME2 (dekarboxylující malát-dehydrogenáza, z

angl. Malic Enzyme) v sedmé vazebné skupině s pohlavím. Vazba ME2 na pohlaví byla nicméně vyvrácena studií MÁCHA *et al.* (2003), kde jako vazebný marker sloužil délkový intronový polymorfizmus studovaného genu .

3.4 MAPOVÁNÍ GENOMU *X. TROPICALIS*

3.4.1 VAZEBNÁ MAPA *X. TROPICALIS* ZALOŽENÁ NA AFLP MARKERECH

V současnosti jsou k dispozici dvě inbrední linie *X. tropicalis*, jedna původem z Nigérie (N) a druhá z Ivory Coast (IC), oba kmeny jsou výsledkem práce laboratoře R. M Graingera z univerzity ve Virginii, USA. Vedle těchto kmenů jsou dostupné také divoké populace *X. tropicalis* neznámého původu, označené A - G, rovněž v chovu R. M. Graingera. Při konstrukci dvou prvních předběžných vazebných map *X. tropicalis* KOCHAN *et al.* (2003) křížili jedince inbredního kmene N a jedince populace A.

3.4.1.1 METODIKA KONSTRUKCE VAZEBNÉ MAPY

Pro mapování genetických markerů je výhodné využít divoké populace jedinců, protože u ní lze ve srovnání s inbredními liniemi očekávat vysoký výskyt polymorfizmů v genomu.

Vzájemným křížením jedinců A populace identifikovali KOCHAN *et al.* (2003) metodou AFLP (viz. kap. 3.2.1.5) (VOS *et al.* 1995) za použití šesti primerů 80 markerů. Z nich 71 vykazovalo při zpětném křížení poměr segregace homozygot:heterozygot 1:1. Jako tzv. kotvící lokusy byly ustaveny geny pro izoenzymy IDH1 (izocitrát-dehydrogenáza) a ME2. AFLP markery vykazující vazbu s těmito lokusy byly označeny jako vazebné skupiny LG I a LG II (angl. Linkage Group). Zbylé AFLP markery tvoří vazebné skupiny označené jako U 1 až U 17, kde "U" představuje skupiny markerů nezakotvených (angl. Unanchored) genovým lokusem.

Vzájemným křížením jedinců inbrední linie N kmene bylo dále nalezeno 9 AFLP markerů, které tvoří zbylé vazebné skupiny U 18 až U 20. Vzdálenost mezi jednotlivými markery je udána v centimorganech (cM).

3.4.2 VAZEBNÁ MAPA *X. TROPICALIS* ZALOŽENÁ NA SSR MARKERECH

Za spolupráce laboratoří University of Houston a Baylor College of Medicine byla vytvořena vazebná mapa *X. tropicalis* (http://tropmap.biology.uh.edu/).

Tato vazebná mapa je založena na vazbě více než 1500 SSR markerů, které byly programem JoinMap 3.0 (VAN OS *et al.* 2006) rozděleny do deseti vazebných skupin s pracovním označením LG 1 - LG 10. Dalších 74 markerů bylo umístěno do šesti vazebných clusterů A - F. které nebylo možné vazebně propojit s žádnou z deseti vazebných skupin.

3.4.2.1 METODIKA KONSTRUKCE MAPY

V prvním kroku byly v sekvenci genomu *X. tropicalis* (http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html) nalezeny jedinečné SSR markery a navrženy specifické PCR (z angl. Polymerase Chain Reaction) primery amplifikující tyto repetice. Dvojice primerů, které amplifikovaly pouze jediný fragment, byly následně analyzovány z pohledu polymorfie u rodičovských jedinců (inbrední linie N a IC kmenů *Xenopus tropicalis*). Pro analýzu byli použiti vždy dva nepříbuzní jedinci z každé linie. Generaci P1 tvořili samci N kmene a samice IC kmene. Pro nalezené polymorfní SSR markery byly syntetizovány fluorescenční primery. S jejich pomocí byla technikou multiplex PCR provedena kapilární analýza amplifikovaných fragmentů. Získaná data pak byla zpracována programem MAPMARKER (LANDER *et al.* 1987).

Nalezené SSR markery byly klasifikovány do několika skupin. Markery označené jako di-, tri- a tetranuleotidové repetice jsou tvořeny jednou a více nepřerušenými tandemovými repeticemi. Každý tandem přitom obsahuje nejméně pět di-, tri- nebo tetranukleotidových repetic v amplifikované sekvenci. Markery označené jako smíšené nesou dvě nebo více tandemových repetitivních jednotek různého typu (např. di- a trinukleotidové). Ostatní markery zahrnují rozprostřené jednonukleotidové záměny, příp. dlouhé (6 - 20 nukleotidů), přerušené, nedokonalé nebo nespecifikované repetice.

Posledním krokem celého projektu je potvrzení vytvořené vazebné mapy fyzickým mapováním jednotlivých vazebných skupin a clusterů do příslušných chromozómů *X. tropicalis* metodou FISH.

V současné době se v laboratoři vývojové biologie PřFUK podařilo na základě fyzického mapování cDNA markerů přiřadit všech 10 vazebných skupin k jednotlivým chromozómům *X. tropicalis* (výsledky připravené do publikace) (viz. Tab. 1).

Tab. 1: Přiřazení jednotlivých vazebných skupin (LG 1 – LG 10) k chromozómům *X. tropicalis*.

LG 1	LG 2	LG 3	LG 4	LG 5	LG 6	LG 7	LG 8	LG 9	LG 10
Chr.1	Chr.8	Chr.6	Chr.5	Chr.10	Chr.2	Chr.3	Chr.9	Chr.4	Chr.7

4 MATERIÁL

4.1 ŽÁBY

X. tropicalis, kmen Ivory Coast, chov PřF UK.

4.2 BUNĚČNÁ KULTURA

Pro přípravu chromozomálních preparátů jsme použili buněčnou kulturu odvozenou z varlat *X. tropicalis*.

4.3 BAKTERIE

Pro amplifikaci plazmidů jsme použili chemokompetentní bakterie *E. coli* kmene TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

4.4 ROZTOKY

Pokud není v protokolu uvedeno jinak, byly roztoky používány 1x koncentrované. Použitá H_2O byla vždy destilovaná.

- RNA izolační pufr: 7,2 M guainidin HCl; 0,3 M KAc, pH 4,8; 15 µl 1 M DTT; 42,8 µl sarcosylu
- TE (Tris-EDTA): 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA NaOH
- 5x konc. TBE (Tris-borát-EDTA): 200 mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H_3BO_3, pH 8,0
- PBS: 25 ml 1 M KH_2PO_4; 4 g HCl; 500 ml H_2O, pH 7,4
- Prehypotonizační roztok: 0,1 M KCl; 5 mM HEPES; 1 mM EGTA, pH 7,3
- 20x konc. SSC (solný roztok citrátu sodného): 150 mM NaCl; 15 mM citrát sodný

- 10x konc. TNT (Tris-NaCl-Tween 20): 0,1 M Tris–HCl ; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20, pH 7,5
- TNB (TNT blokující pufr): 0,1 M Tris-HCl ; 0,15 M NaCl, pH 7,5; 0,5% Blocking Reagent (Boehringer, Mannheim, Germany)
- Etidiumbromid: 1 mg/1 ml H_2O
- BFM (bromfenolová modř): 50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM
- Krystalviolet': 2 mg/1 ml H_2O
- Krytalviolet' pufr: 30% glycerol; 20 mM EDTA; 100 μg/ml krystalvioleti
- Mowiol DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol): 6 g glycerolu; 2,4 g Mowiol 4.88 (Sigma, St. Louis, USA); 6 ml H_2O; 12 ml 0,2 M Tris-HCl; 0,5 μg/ml DAPI (Sigma, St. Louis, USA)

4.5 PRIMERY

Viz. Tab. 2.

Tab. 2 Seznam použitých PCR primerů pro amplifikaci cDNA markerů.

Cluster	cDNA marker	Přední/zadní primer (orientace 5´→ 3´)
A	TRAM2	GCTCTTCAGCCAGGAGTTTG/ TTCACAACTCCGTTTTCGTG
B	MAP2K4	CTTCCAACCCCAGTAACAGC/ TCTGCTCCAGGATCTTACCC
	SRC	AATCTCGCACAGAGACGGACT/ GAATCTACCATACAGCGCAGCCT
C	RYBP	TTATGGGCGACAAGAAGAGC/ TCGTCATTGACAACAGACAGG
	PPP4R2	GATGATTTCCGCTCTTCTGC/ TGGCCTCTTCACTGTTTTCC
	PTPRG	CAGCTGGAGGCGTTCTATTC/ CGGCCTCTGCTACTTTATCG
D	ZNF142	TAAAGGGGATGTGGAGAACG/ CGTGGTTATGAAGGGCTTGT
	SMARCAL1	CCGGAAAGCGTTAATGTGAT/ CAGGCCTCCAGTAACAGAGC
E	MEF2D	ATGGGGATGACTCGATTGAC/ CGCATGCGTTTTACAGATTG
	UBQLN4	GGAGACACACTGAACCAGCA/ GGAACCAAGGTTGGATAGCA
F	CHD3	ACGAGGGCAAGAGTGAGAAA/ ACACTTGGTTCCCTCCTCCT

4.6 PŘÍSTROJE

- CO_2 inkubátor Sanyo MCP-18AIC (UV) (Sanyo electric, Japan)
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)
- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical, Japan)
- Inverzní mikroskop Olympus IX 71 (Olympus Optical, Japan)
- Elektroforetický zdroj Consort E122 (Consort, Belgian)
- Vyhřívaná plotýnka Vezas VD – 1n (Vezas, Hradec Králové, ČR)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1, (Ika Works, Wilmington, USA)
- Vodní lázeň Techne FTE 10DE (Techne, Cambridge, England)
- Termocyklér Techne FTGRAD FD (Techne, Cambridge, England)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Spektrofotometr Shimadzu UV–1601 (Shimadzu Corporation, Japan)
- UV Transiluminátor TS-20E, 254 nm (UVP, ČR)
- CCD (z angl. Charge Coupled Device) černobílá kamera SPT-M320CE (Sony Corporation, China)
- Programy pro zpracování a analýzu obrazu DIPS a ACC (SOFO, Brno,ČR)

5 METODY

5.1 VYHLEDÁNÍ VHODNÝCH cDNA MARKERŮ

Na základě stávající vazebné mapy (http://tropmap.biology.uh.edu/map.html) jsme k jednotlivým SSR markerům nalezli příslušné scaffoldy. V nich jsme za pomocí genomové databáze Ensembl (http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html) vyhledali vhodné geny pro následnou přípravu FISH cDNA sondy (viz. Obr. 1). Pro účely PCR amplifikace jsme v programu Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) na základě cDNA sekvencí navrhli primery s optimální teplotou annealingu 60°C.

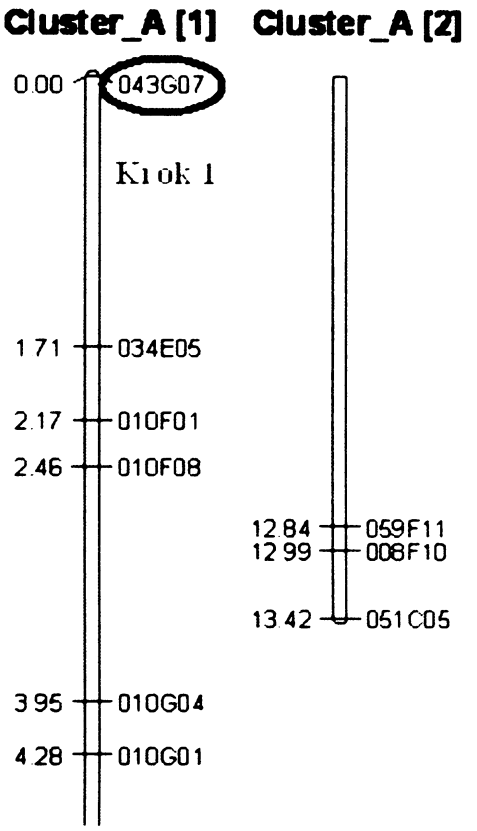
Obr. 1: Příklad postupu vyhledání vhodného cDNA markeru (TRAM2) pro fyzické mapování genomu *X. tropicalis* na základě dostupné vazebné mapy.

Krok 1: Vyhledání vhodného SSR markeru v rámci clusteru A.

Krok 2: Identifikace scaffoldu (JGI 4.1) pro SSR marker zvolený v kroku 1.

Krok 3: Vyhledání vhodného cDNA markeru ve scaffoldu nalezeném v kroku 2 v databázi Ensembl.

Krok 1



Krok 2

Information about the marker

Date: 2005-07-01

Marker ID: 00.201203 043G07

Scaffold ID v 2.0: 1203, 347601, 347848

Scaffold ID v 4.1: 63 Krok 2

Primer Sequence Forward: TAGCCATTCAGCCATAGCAC

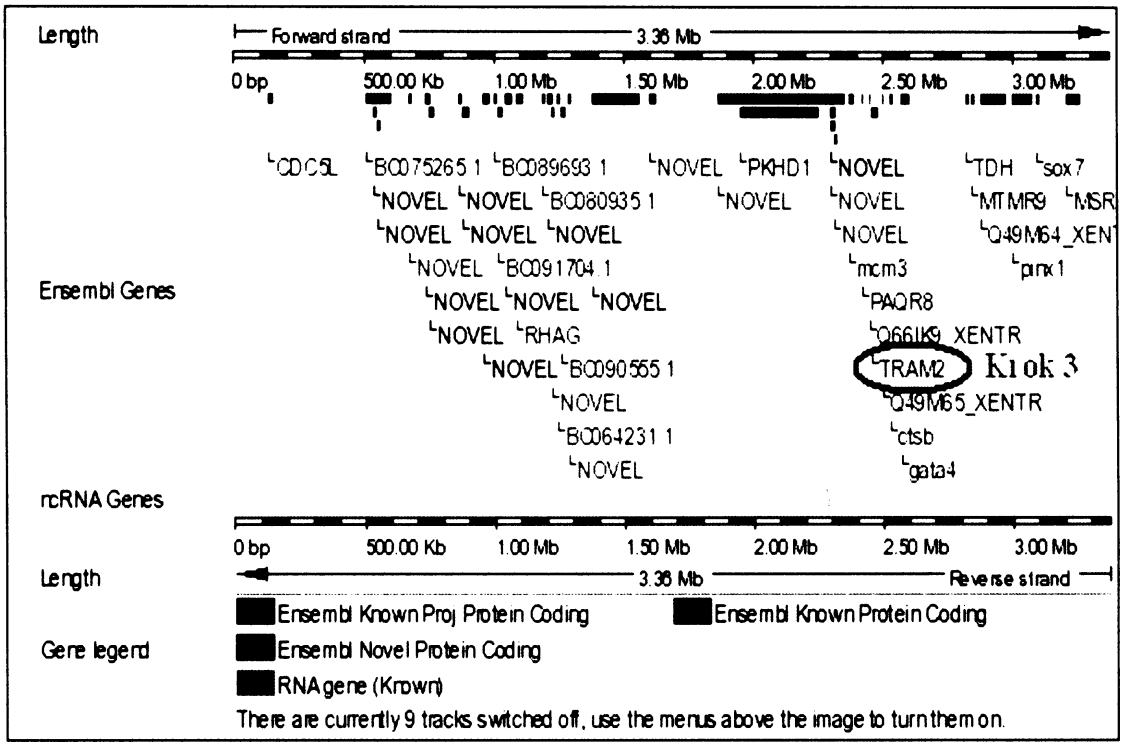
Primer Sequence Reverse: CACAAACAGGCATTTTACCC

Expected Size: 391

Amplification Sequence:

TAGCCATTCAGCCATAGCACTATATTCTATGTACTGTATCTATC
TATCTGCCTATNTATCTATCTATCTATCNATCTATCTATCTATCT
ATCTATCTATCTGCCTATNTATCTATCTATCTGTCTATCNATCTA
TCTATCTATCTATCTATCTATCTNTCTGCCTATNTATCTATCTATC
TGCCTATNTATCTATCTATCTATCNATCTATCTATCAATCTGTCT
ATCNATCTATCTATCTATCTATCTATCNATCTATCAATCTAACT
ATCTATCTAACTATCTATCNATCTATTGTGAGCAATACAAGGA
ATACAAACACTGTTTGGTGTATTTTTCACCATTGTTAAAAGTG
GCATAATGTTAGCACCGGGTAAAATGCCTGTTTGTG

Krok 3



5.2 PŘÍPRAVA ZNAČENÉ SONDY PRO FISH

5.2.1 IZOLACE RNA

Jaterní tkáň z *X. tropicalis* jsme homogenizovali ve 3 ml RNA izolačního pufru. Směs jsme centrifugovali 10 min, 14 000 ot./min. K supernatantu jsme přidali 1 ml směsi fenol/chloroform (1:1), po promíchání směs centrifugovali 5 min při 14 000 ot./min. Vodní fázi jsme jsme oddělili, opět promíchali s 1 ml směsi fenol/chloroform a centrifugovali 5 min při 14 000 ot./min. Celý proces jsme ještě 2x opakovali. RNA jsme precipitovali 2,5 objemem čistého etanolu a vzorek centrifugovali 30 min, 14 000 ot./min při 4°C. Vysráženou RNA jsme 4x promyli 70% etanolem, centrifugovali 15 min, 14 000 ot./min a rozpustili v DEPC H_2O.

5.2.2 MĚŘENÍ KONCENTRACE RNA, RESP. DNA

Stanovení koncentrace RNA, resp. DNA, jsme provedli spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm. Vzorek jsme 100x ředili v 600 µl TE , resp. H_2O.
RNA: A (260 nm) = 1...c(ssRNA) = 44 µg/ml,
DNA: A (260 nm) = 1...c(dsDNA) = 50 µg/ml.
(ssRNA: jednovláknová RNA, z angl. single strand RNA
ds DNA: dvouvláknová DNA, z angl. double strand DNA).

5.2.3 SYNTÉZA PRVNÍHO VLÁKNA cDNA (ANGL. FIRST STRAND)

Pro syntézu jsme použili RevertAid H minus First strand cDNA Sythesis Kit (Fermentas, Vilnius, Litva; # K1632). Jako primer sloužil oligo$(dT)_{18}$, jako templát pak celková RNA z jater *X. tropicalis*.

5.2.4 RT AMPLIFIKACE DNA PODLE JEDNOVLÁKNOVÉ cDNA

Metodou RT-PCR (z angl. Reverse Transcriptase PCR) jsme v termocykléru namnožili specifické úseky DNA. Jako templát sloužil produkt z výše popsané reakce.

PCR reakční směs:

- 5 μl 10x PCR pufru (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 3 μl 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 2 μl předního primeru (Ft) (Sigma, St. Louis, USA; resp. Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 2 μl zadního primer (Rt) (Sigma, St. Louis, USA; resp. Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 1 μl 2 mM dNTP mix (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 1 μl first strand (jednovláknová) cDNA (játra *X. tropicalis*)
- 1 μl Taq DNA polymerázy 5 U/μl (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 35 μl H_2O

Reakční směs jsme centrifugovali a překryli parafínovým olejem.

Teplotní schéma PCR reakce:

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
Denaturace	94°C	1 min	35
Nasednutí primerů	60°C	2 min	
Syntéza	72°C	2 min	
Závěrečná syntéza	72°C	5 min	1

5.2.5 ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM GELU

DNA (PCR amplifikáty, restrikční fragmenty, sonda) jsme separovali na 1% agarózovém gelu. Pro kontrolní elektroforézy jsme do gelu přidali etidiumbromid v koncentraci 1 μg/1 ml gelu, ke vzorkům pak 1/3 objemu bromfenolové modři (BFM). Jako velikostní DNA marker jsme pužili Gene Ruler DNA Ladder mix (Fermentas, Vilnius, Litva). Do izolačních gelů jsme přidali krystalviolet' v koncentraci 1,6 μg/1 ml gelu, ke vzorkům pak krystalviolet'ový pufr.

Elektroforéza probíhala v TBE pod stálým napětím 70 V. Vzorky jsme analyzovali na UV transiluminátoru při vlnové délce 254 nm a snímali CCD černobílou kamerou.

5.2.6 IZOLACE PCR AMPLIFIKÁTU PRO KLONOVÁNÍ

Fragmenty žádané velikosti jsme skalpelem vyřízli z agarózového gelu. K izolaci jsme použili Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, USA; Catalog NO.: D4002). DNA jsme extrahovali do 8 μl H_2O

5.2.7 PŘÍPRAVA A AMPLIFIKACE DNA KONSTRUKTU

Přečištěný PCR produkt jsme vložili do plazmidu pCR-XL-TOPO, který je součástí TOPO XL PCR Cloning Kitu (Invitrogen, Karlsbad, Germany; Part. no. 45–0008). Plazmidy s vloženým DNA fragmentem jsme amplifikovali v chemokompetentních bakteriích *E. coli* kmene TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Schéma klonování:

2 µl přečištěného amplifikátu jsme smíchali s 0,5 µl pCR XL–TOPO vektoru, inkubovali 5 min při 25°C. Poté jsme přidali 0,5 µl 6x TOPO STOP Solution, vzorek centrifugovali a uložili do ledu, kde jsme ho po přidání 25 µl bakterií 30 min inkubovali. Následoval 30 sekundový teplotní šok při teplotě 42°C a uložení do ledu na 2 min. K bakteriím jsme přidali 200 µl SOC media (Invitrogen, Carlsbad, USA). Po dobu 1 hodiny jsme bakterie za stálého třepání inkubovali v horizontální poloze při 37°C. Buňky jsme vyseli na agarové plotny s kanamycinovým antibiotikem (1 µl/ml agaru) a inkubovali přes noc v termostatu při 37°C. Vybrané kolonie jsme přečárkovali opět na agarové plotny s kanamycinovým antibiotikem a kultivovali přes noc v termostatu při 37°C.

5.2.8 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA

Z narostlých klonů jsme izolovali plazmidovou DNA kitem Nucleospin Plasmid (Macherey–Nagel, Düren, Germany; Cat. No. 740588.250)
a extrahovali ji do 50 µl H_2O.

5.2.9 RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PLAZMIDOVÉ DNA

Detekci přítomnosti PCR amplifikátu v plazmidu jsme u vybraných klonů ověřili restrikční analýzou pomocí restriktázy EcoRI dle následujícího postupu: Smíchali jsme 5 µl vzorku; 1 µl EcoRI restriktázy: 10U/µl, (Fermentas, Vilnius, Litva); 2 µl EcoRI pufru: 10x, s obsahem BSA (Fermentas, Vilnius, Litva); 12 µl H_2O. Reakční směs jsme inkubovali 1 hodinu při 37°C. Velikost vyštěpeného fragmentu jsme kontrolovali na 1% agarózovém gelu s etidiumbromidem

5.2.10 AMPLIFIKACE cDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY NA FISH

PCR reakční směs:

- 5 µl 10x PCR pufru (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 3 µl 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 2 µl předního primeru (Ft) (Sigma, St. Louis, USA; resp.Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 2 µl zadního primeru (Rt) (Sigma, St. Louis, USA; resp. Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 1 µl 2 mM dNTP mix (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 1 µl DNA z klonu
- 0,5 µl Taq DNA polymerázy 5 U/µl (Fermentas, Vilnius, Litva)
- 35,5 µl H_2O

Reakční směs jsme převrstvili parafínovým olejem.

Teplotní schéma PCR reakce:

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
Iniciální denaturace	94°C	1 min	1
Denaturace	94°C	30 s	30
Nasednutí primerů	60°C	2 min	
Syntéza	72°C	2 min	
Závěrečná syntéza	72°C	5 min.	1

5.2.11 KONTROLA A IZOLACE AMPLIFIKOVANÉ cDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY NA FISH

Velikost amplifikované cDNA jsme kontrolovali na agarózovém gelu s etidiumbromidem a následně žádaný fragment separovali na gelu s krystalvioletí.

Přečištění DNA fragmentu z agarózového gelu jsme provedli pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (Qiagen, Hilden, Germany; Cat. No. 28706). cDNA jsme extrahovali do 30 µl H_2O.

5.2.12 MĚŘENÍ KONCENTRACE cDNA PRO PŘÍPRAVU SONDY NA FISH

Viz. kap. 5.2.2.

5.2.13 PŘÍPRAVA A IZOLACE ZNAČENÉ SONDY PRO FISH

Sondu jsme značili DecaLabel DNA Labeling Kitem (Fermentas, Vilnius, Litva; #K0622) dle schématu: 1 µg cDNA; 10 µl náhodného (angl. random) primeru v 5x konc. reakčním pufru; doplněno H_2O do objemu 42 µl. Vzorek jsme inkubovali 10 min ve vroucí vodě, zchladili na ledu a krátce centrifugovali. Dále jsme ke směsi přidali 5 µl Non–radioactive Labeling Mix; 1,75 µl 1mM Digoxigenin-11-UTP (Roche, Mannheim, Germany); 1 µl Klenow fragmentu 5U/µl. Vzorek jsme krátce centrifugovali a inkubovali 20 hod při 30°C ve vodní lázni.

Sondu jsme z roztoku přečistili QIAquick Gel Extraction Kitem (Qiagen, Hilden, Germany; Cat. No. 28706) a extrahovali do 50 µl H_2O.

5.3 ZPRACOVÁNÍ BUNĚČNÉHO MATERIÁLU

5.3.1 KULTIVACE BUNĚČNÉ KULTURY *IN VITRO*

Buňky jsme pěstovali v kultivačních lahvích s 20 ml 2/3 media RPMI (Sigma, St. Louis, USA) a L 15 Leibowitz (Sigma, St. Louis, USA) v poměru 1:1 při teplotě 28°C a 6% koncentraci CO_2. Buněčnou kulturu jsme 2x týdně pasážovali dle standardních postupů.

5.3.2 SYNCHRONIZACE BUNĚČNÉHO DĚLENÍ A SBĚR BUNĚK

Dělení buněčné kultury jsme zastavili specificky v mitotické fázi buněčného cyklu přidáním roztoku kolchicinu (výsledná koncentrace = 0,2 μg/ml média) Buňky jsme takto kultivovali 4 hodiny v CO_2 inkubátoru. Poté jsme kultivační médium z buněk slili a k buňkám přidali 5 ml roztoku 10x ředěného roztoku trypsin/EDTA v 2/3 PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Kulturu jsme kontrolovali pod inverzním mikroskopem. Po uvolnění vazby buněk k podkladu, cca 7 min, jsme účinek trypsinu zastavili 1 ml 5x konc. FCS (telecí fetální sérum, z angl. Fetal Calf Serum) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) *á* kultivační láhev.

5.3.3 ZPRACOVÁNÍ BUNĚK PRO NAKAPÁNÍ

Sebrané buňky jsme centrifugovali 10 min při 900 ot./min. Odebrali jsme supernatant, sediment promyli 10 ml 2/3 PBS a centrifugovali 10 min při 900 ot./min. Po odebrání supernatantu jsme k sedimentu přidali 2 ml prehypotonizačního roztoku, resuspendovali buňky a po stěnách pomalu přidali 3,26 ml H_2O. Zkumavku jsme promíchali jejím opatrným převracením a inkubovali 20 min při pokojové teplotě (dále jen jako RT, z angl. Room Temperature). Suspenzi jsme prefixovali přidáním 1 ml fixáže: metanol:kys. octové v poměru 3:1, převracením zkumavky promíchali a inkubovali 15 min, RT. Následovala centrifugace 10 min, 900 ot./min. Supernatant jsme odebrali

a přidali 5 ml čerstvé fixáže. Obsah zkumavky jsme rozmíchali probubláním, inkubovali 10 min při RT a následně centrifugovali 10 min, 900 ot./min. Celý cyklus promývání jsme opakovali ještě 2x, vždy s čerstvou fixáží. Poté jsme odebrali supernatant do objemu potřebného pro nakapání.

5.3.4 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ

Buněčnou suspenzi jsme nakapali z výšky 1 metru na odmaštěná skla. Preparáty jsme následně inkubovali na vyhřívané plotýnce při 37°C. Těsně před úplným vyschnutím fixáže jsme preparáty ponořili na 2 s v kyvetě s 50 ml 50% kys. octové. Tento krok se ukázal jako významný z pohledu odstranění zbytků cytoplazmy. Preparáty jsme nechali doschnout na plotýnce. Dostatečné zastoupení mitóz jsme kontrolovali obarvením jednoho preparátu 5% Giemsou po dobu 8 min. Mitózy jsme prohlédli pod světelným mikroskopem. Po zaschnutí jsme zbylé preparáty ošetřili pepsinem (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 5 min při 37°C. Výsledná koncentrace pepsinu byla 50 μg/1 ml předehřátého roztoku 0,01 M HCl; 3 mM KAc, pH=4,6. Působení pepsinu jsme zastavili vložením preparátů do kyvety s PBS.

Během všech promývání v Petriho misce jsme preparáty vždy třepali na třepačce, objem promývacího roztoku byl cca 100 ml. Inkubace probíhaly v kyvetě o objemu 50, resp. 80 ml, dle počtu preparátů.

Preparáty jsme promyli v PBS v Petriho misce a postfixovali 30 min při RT ve 2% paraformaldehydu rozpuštěném v PBS, pH 7,3. Následně jsme preparáty promyli 3x 5 min v PBS, inkubovali v 1% H_2O_2 v PBS pro inaktivaci endogenních peroxidáz a promyli 3x 5 min v PBS. Skla jsme opláchli H_2O, dehydratovali ve stoupající řadě metanolu (70%, 90%, 100%) vždy 3 min za stálého třepání a nechali uschnout na vzduchu.

5.4 FISH

5.4.1 HYBRIDIZACE

Po uschnutí jsme na preparáty aplikovali *á* 50 µl hybridizační směsi pro FISH: 25,0 µl deionizovaného formamidu (Sigma, St. Louis, USA); 2,0 µl sondy; 5,0 µl 20x SSC; 18,0 µl H_2O, a přikryli krycím sklem (24x50 mm). Následovala denaturace v termocykléru (vyhřívaná destička) 5 min při 70°C a inkubace přes noc v termostatu při 37°C, 12 - 16 hod, ve vlhké komůrce se 30 ml 50% formamidu.

5.4.2 PROMYTÍ

Druhý den jsme vyjmuli preparáty z vlhké komůrky a odmyli nespecificky navázanou sondu inkubací ve 45 ml roztoku 50% formamidu v 2x SSC, pH 7, 5 min při 42°C. Proces jsme dvakrát opakovali, vždy s novým promývacím roztokem. Preparáty jsme dále promyli 3x 5 min v 2x SSC při RT a 1x 5 min v TNT při RT, vše v Petriho misce.

5.4.3 VIZUALIZACE SIGNÁLU

Na skla jsme aplikovali 1 ml TNB a inkubovali je ve vlhké komůrce. Po 30 min jsme TNB slili, na skla aplikovali 1 ml antidigoxigeninové protilátky konjugované s peroxidázou (Anti-digoxigenin-POD Fab fragmenty, Roche, Germany) ředěné 1000x v TNB a centrifugované 5 min při 14 000 ot./min. Preparáty jsme takto inkubovali 60 min při RT. Protilátku jsme pak slili, skla 3x opláchli v TNT a promyli v Petriho misce 3x 5 min v TNT při RT.

Pro amplifikaci signálu jsme použili TSA–Plus Tetramethylrhodamine System (PerkinElmer LAS Boston, USA; Catalog NO: NEL742) dle následujícího schématu: Na skla jsme aplikovali *á* 100 µl TSA s

tetrametylrodaminem 1:50 (0,33 µl 0,3% H_2O_2 v 1x Plus Amplification Diluent; 2 µl tyramidu; 88 µl 1x Plus Amplification Diluent *á* sklo) překryli krycím sklem a inkubovali 10 min ve tmě při RT. Preparáty jsme po odplavení krycích skel 3x opláchli pasterkou TNT. Následně jsme je promyli 3x 5 min v Petriho misce s TNT, opláchli H_2O a nakonec promyli 3 min v H_2O. Preparáty jsme ve tmě nechali uschnout, montovali do mowiol/DAPI *á* 50 µl a uložili do lednice při 4°C.

5.5 ANALÝZA A ZPRACOVÁNÍ OBRAZU

Preparáty jsme pozorovali pod fluorescenčním mikroskopem. Obrazy mitóz a FISH signálů jsme snímali CCD černobílou kamerou. Pro zpracování a analýzu obrazu jsme použili software DIPS a ACC.

5.6 ANALÝZA ZÍSKANÝCH DAT

Hodnotili jsme pouze metafázní chromozómy vykazující specifický signál na obou chromatidách, a to nejméně z 5 nezávislých mitóz. Chromozómy jsme identifikovali na základě p/q indexu (poměr délky ramen p a q daného chromozómu). Pozici FISH-TSA signálu jsme určovali měřením jeho relativní vzdálenosti od centroméry (RCD, z angl. Relative Centromere Distance). Z jednotlivých měření RCD jsme pro každý signál počítali aritmetický průměr, směrodatnou odchylku a konfidenci na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.
Pro dvojice cDNA markerů (cluster C a E) pocházející ze stejného scaffoldu jsme na základě t-testu zjišťovali, zda jsou tyto dvojice mapovány do stejného místa (RCD) na příslušném chromozómu. Data jsme zpracovali v programu Microsoft Excel.

6 VÝSLEDKY

6.1 VYHLEDÁNÍ A PCR AMPLIFIKACE VHODNÝCH cDNA MARKERŮ

Na základě vazebné mapy *X. tropicalis* jsme k vybraným SSR markerům přiřadili příslušné scaffoldy. Upřednostňovali jsme markery lokalizované do dlouhých scaffoldů (nízké pořadové číslo), u nichž je vyšší podíl kódujících sekvencí. Vzhledem k lokálním nepřesnostem ve vytvořené mapě byla další podmínkou přítomnost nejméně dvou po sobě jdoucích SSR markerů mapovaných do stejného scaffoldu. Tato podmínka nebyla splněna pouze pro marker 045B08 v clusteru B.

V sekvenci scaffoldu jsme zvolili kódující sekvence, které sloužily jako cDNA markery. Snahou bylo nalézt geny s co nejširší mírou exprese, abychom zvýšili pravděpodobnost PCR detekce příslušné cDNA. Přehled použitých cDNA markerů a jejich základní charakteristiku shrnuje Tab. 4.

Pomocí programu Primer 3 jsme navrhli primery pro PCR amplifikaci zvolených cDNA markerů. Úspěšnost amplifikace specifického fragmentu těmito primery byla zhruba 50 %. Ve dvou případech (cluster C, gen PTPRG a cluster D, gen SMARCAL1) jsme po neúspěšné detekci prvním párem navržených primerů navrhli pár jiný, který již danou cDNA amplifikoval. Pro jeden z úspěšně amplifikovaných cDNA markerů v clusteru F (GEMIN5) jsme syntetizovali sondu, která vykazovala specifický signál na chromozómu 10, nicméně v centromerické oblasti.

6.2 SYNTÉZA cDNA ZNAČENÉ SONDY

Amplifikovanou cDNA jsme klonovali do vektoru pCR-XL-TOPO. Dva až tři vybrané klony jsme namnožili, izolovanou cDNA štěpili restrikční endonukleázou a kontrolovali velikost fragmentu na agrózovém gelu. V

případě pozitivního výsledku jsme cDNA z jednoho klonu reamplifikovali a použili jako templát pro syntézu značené cDNA sondy metodou náhodných primerů. Jako značicí nukleotid byl zvolen digoxigenin-11-dUTP.

6.3 FISH-TSA

Vzhledem k velikosti cDNA sond, která se pohybovala v rozmezí 1 až 1,8 kb, jsme provedli detekci fluorescenční in situ hybridizací (FISH) spojenou s tyramidovou amplifikací signálu (TSA).

Signál jsme vizualizovali aplikací anti-digoxigeninové protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a následnou reakcí peroxidázy s tyramidem konjugovaným s tetrametylrodaminem. Metafázní chromozómy jsme značili DAPI.

Takto značené chromozómy a specifický tetrametylrodaminový signál jednotlivých cDNA markerů jsme snímali CCD černobílou kamerou v programu DIPS. Obrázky jsme složili a dále analyzovali v programu v programu ACC.

Výsledkem byla identifikace jednotlivých cDNA markerů a tím i vazebných clusterů a jejich lokalizace do příslušných chromozómů *X. tropicalis* (viz. Obr. 2, Tab. 4). Chromozómy jsme rozlišili podle poměru p a q ramene.

Na základě předběžných výsledků, které budou součástí připravované publikace, jsme jednotlivé clustery v souladu s jejich příslušností k chromozómu přiřadili k jednotlivým vazebným skupinám (viz. Tab. 3).

6.4 MĚŘENÍ RELATIVNÍ VZDÁLENOSTI SIGNÁLU OD CENTROMÉRY (RCD)

Pro každý cDNA marker jsme hodnotili pouze chromozómy vykazující specifický signál na obou chromatidách, a to alespoň u 5 mitóz. Pozici signálu na chromozómu jsme identifikovali jako jeho relativní vzdálenost od centroméry (RCD) za pomoci programu na analýzu obrazu ACC.

Vzhledem k artefaktům, jako je např. překroucení chromozómu na preparátu, se signál na obou chromatidách může jevit v odlišné vzdálenosti od centroméry. Proto jsme vždy měřili délku ramen obou chromatid nesoucích signál a vzdálenost obou signálů od centroméry. RCD pro každý hodnocený chromozóm je aritmetickým průměrem poměrů každého z obou signálů vůči každé z obou chromatid

Dále jsme pro každý cDNA marker z hodnot RCD každého jednotlivého měření spočítali aritmetický průměr a tento výsledek představuje výslednou RCD pozici cDNA markeru na chromozómu. Pro tuto RCD jsme spočítali směrodatnou odchylku, opakovatelnost měření jsme potvrdili výpočtem konfidence na hladině $\alpha = 0,05$.

Hodnoty RCD jednotlivých měření, výsledná RCD s příslušnými směrodatnými odchylkami a konfidencí pro jednotlivé cDNA markery jsou shrnuty v Tab. 5 - 10 (clustery A - F).

Pro clustery C, resp. cluster E, jsme navrhli vždy dva cDNA markery pocházející ze stejného scaffoldu. V clusteru C se jednalo o geny RYBP a PPP4R2, fyzicky od sebe vzdálené 275 244 bp. V případě clusteru E to byly geny MEF2D a UBQLN4. Jejich fyzická vzdálenost je 236 968 bp. Pomocí t-testu jsme zjišťovali, zda jsou tyto dvojice mapovány do stejného místa (RCD) na příslušném chromozómu (nulová hypotéza).

Výsledná hodnota t-testu pro cluster C je 0,4977. Tabulková kritická hodnota pro hladinu pravděpodobnosti p = 0,05 a 10 stupňů volnosti je 2,228. Výsledná hodnota t-testu pro cluster E je 1,919. Tabulková kritická hodnota pro hladinu pravděpodobnosti p = 0,05 a 12 stupňů volnosti je 2,179. Výsledné hodnoty t-testu pro cDNA markery jsou menší než příslušná kritická hodnota a lze tedy říci, že rozdíly v pozici signálů v rámci každé z dvojic cDNA markerů jsou statisticky nevýznamné.

Tab. 3: Přiřazení vazebných clusterů A - F k jednotlivým vazebným skupinám (LG) na základě jejich příslušnosti k chromozómům *X. tropicalis*

Cluster A	Cluster B	Cluster C	Cluster D	Cluster E	Cluster F
Chr.4	Chr.7	Chr.3	Chr.6	Chr.10	Chr.9
LG 9	LG 10	LG 7	LG 3	LG 5	LG 8

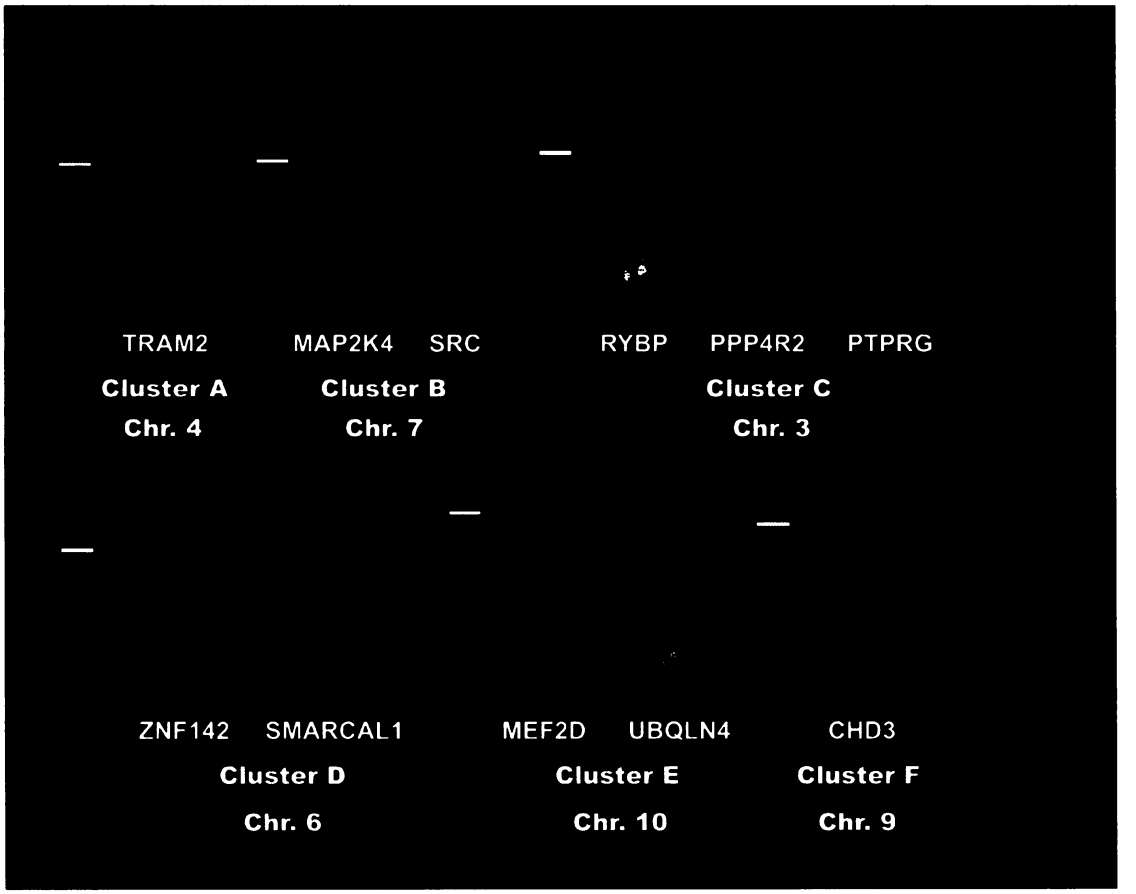
Tab. 4: Charakterizace cDNA markerů a jejich chromozomální lokalizace na základě relativní pozice FISH-TSA signálu od centroméry (RCD)

Každý cDNA marker je charakterizován vazebnou pozicí SSR markeru v cM v rámci clusteru, číslem scaffoldu (JGI 4.1), ve kterém byl identifikován, a relativní vzdáleností FISH-TSA signálu od centroméry příslušného chromozómu (RCD). Uvedena je i velikost cDNA templátu v párech bazí (bp) pro přípravu sondy.

Cluster	cDNA marker	cM	SSR marker	Scaffold JGI 4.1	Velikost amplifikátu (bp)	RCD
A	TRAM2	0,00	043G07	63	1035	4q 0,88
B	MAP2K4	8,18	045B08	178	1281	7q 1,00
	SRC	12,49	045G10	38	1800	7q 0,68
C	RYBP	2,82	029A09	404	1003	3q 0,87
	PPP4R2	2,82	029A09	404	1000	3q 0,90
	PTPRG	15,59	049G10	126	1075	3q 0,96
D	ZNF142	0,00	019D10	77	1232	6q 0,98
	SMARCAL1	11,9	039G10	893	1208	6q 1,00
E	MEF2D	15,05	015D01	427	1165	10q 0,90
	UBQLN4	15,50	015C11	427	1269	10q 0,93
F	CHD3	6,03	045C01	675	1260	9q 1,00

Obr. 2: Přiřazení vazebných clusterů A - F k jednotlivým chromozómům *X. tropicalis* na základě fyzického mapování cDNA markerů metodou FISH-TSA.

Modře jsou zobrazeny metafázní chromozómy *X. tropicalis* obarvené DAPI, červeně FISH-TSA signál příslušného cDNA markeru. Bílá úsečka představuje pozici centroméry. (Chr.= chromozóm).



Tab. 5: Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro cluster A.

Cluster A				
cDNA marker	**RCD**	**Průměrná RCD**	**Směrodatná odchylka**	**Konfidence α=0,05**
TRAM2	0,90 0,89 0,90 0,88 0,89 0,83	0,88	0,0241	0,0193

Tab. 6: Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro cluster B.

Cluster B				
cDNA marker	**RCD**	**Průměrná RCD**	**Směrodatná odchylka**	**Konfidence α=0,05**
MAP2K4	1 1 1 1 1 1 1	1	0,0000	0,0000
SRC	0,86 0,54 0,76 0,65 0,57	0,68	0,1194	0,1047

Tab. 7: Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro cluster C.

Cluster C				
cDNA marker	**RCD**	**Průměrná RCD**	**Směrodatná odchylka**	**Konfidence α=0,05**
RYBP	0,87 0,88 0,87 0,90 0,86 0,81	0,87	0,0275	0,0220
PPP4R2	0,87 0,91 0,93 0,93 0,87 0,91	0,90	0,0249	0,0200
PTPRG	0,94 1 0,95 0,97 0,94 0,96 0,95	0,96	0,0196	0,0145

Tab. 8: Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro cluster D.

Cluster D				
cDNA marker	**RCD**	**Průměrná RCD**	**Směrodatná odchylka**	**Konfidence α=0,05**
ZNF142	1 0,86 1 1 1 1	0,98	0,0522	0,0417
SMARCAL1	1 1 1 1 1 1	1	0,0000	0,0000

Tab. 9: Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro cluster E.

Cluster E				
cDNA marker	**RCD**	**Průměrná RCD**	**Směrodatná odchylka**	**Konfidence α=0,05**
MEF2D	0,87 0,90 0,95 0,84 0,90 0,94 0,92 0,91	0,90	0,0335	0,0232
UBQLN4	0,94 0,93 0,91 0,92 0,92 0,95	0,93	0,0134	0,0108

Tab. 10: Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro cluster F.

Cluster F				
cDNA marker	**RCD**	**Průměrná RCD**	**Směrodatná odchylka**	**Konfidence α=0,05**
CHD3	1 1 1 1 1 1	1	0,0000	0,0000

7 DISKUZE

Xenopus tropicalis představuje v současné době jeden z nejvýznamnějších modelových organizmů z pohledu vývojově biologických procesů. Jeho největší přínos lze spatřovat ve studiu regulace buněčného cyklu, signálních drah a určení tělního plánu. Ve srovnání s modely vyšších organizmů (např. myš) zde však scházejí genetická a cytogenetická data. Vazebná mapa *X. tropicalis*, vytvořená ve spolupráci oddělení biologie a biochemie University of Houston a Baylor College of Medicine, USA, umožní tuto mezeru vyplnit. Mapu *X. tropicalis* představuje deset vazebných skupin. Ve spolupráci s laboratoří vývojové biologie PřFUK, kde tato diplomová práce vznikla, se podařilo na základě fyzického mapování cDNA markerů přiřadit tyto vazebné skupiny k jednotlivým chromozómům *X. tropicalis*.

Kromě výše zmíněných vazebných skupin zde existují ještě nezařazené skupiny SSR makrerů, které byly pracovně nazvány jako clustery A - F. Příčinou vzniku těchto clusterů jsou pozice příslušných markerů v blízkosti teloméry, kdy je v důsledku vysoké pravděpodobnosti crossing-overu obtížné rozhodnout, zda je marker ještě součástí studované vazebné skupiny či nikoli. Výsledky této diplomové práce tuto skutečnost potvrzují s tím, že hodnoty relativních vzdáleností FISH signálů mapujících příslušné clustery vzhledem k centroméře se pohybovaly od 0,68 do 1, kde hodnota 1 představuje koncovou pozici signálu na příslušném p či q rameni.

Jisté problémy s přesností pořadí jednotlivých SSR markerů v rámci vazebné mapy se projevily při mapování cDNA markeru GEMIN5 (scaffold 24), který byl zařazen do clusteru F. Provedená FISH-TSA analýza ukázala centromerickou pozici signálu na chromozómu č. 9, náležejícího do vazebné skupiny LG8. Výsledky získané v rámci mapování vazebných skupin do chromozómů ukázaly na stejnou cetromerickou pozici dalšího cDNA markeru (PHF15, scaffold 177) ze stejné LG. Příslušný SSR marker byl mapován do

pozice 50,29 cM. Prohledáním blízkého okolí tohoto markeru jsme v pozici 50,93 cM opětovně nalezli inkriminovaný scaffold 24. Tento scaffold se ve vazebné skupině opakoval dvakrát, zatímco v clusteru F se vyskytoval izolovaně. Tento fakt, dále podpořen stejnou (centromerickou) pozicí signálu cDNA markeru PHF15 z blízkého scaffoldu 177, potvrdil novou pozici GEMIN5 v oblasti centroméry vazebné skupiny LG8.

Z obecného pohledu přesnost vazebné mapy stoupá s počtem sledovaných potomků polymorfních rodičů. χ^2 test na hladině významnosti 0,01 ukazuje, že pro 1 000 jedinců jsou odchylky nižší než +/- 2 cM statisticky nevýznamné. Vzhledem k tomu, že vazebná mapa *X. tropicalis* byla vytvořena na základě sledování průměrně 500 jedinců, lze očekávat, že chyba mapování bude vyšší. Analyzovat vysoké počty potomků lze poměrně snadno, pokud jsou sledovány fenotypové markery, jako bylo běžnou praxí u Drosofily. V případě mapování DNA markerů však představují vyšší počty jedinců neúměrnou časovou a finanční zátěž.

U fyzického mapování odpadá problém nutnosti vysokého počtu sledovaných jedinců. Při použití cDNA markerů navíc nehrozí výskyt chyb v důsledku přítomnosti repetitivních sekvencí v mapované oblasti. Z předcházejících odstavců je patrný význam fyzického mapování pro další upřesnění poloh jednotlivých vazebných markerů.

V rámci přiřazení vazebných clusterů k chromozómům *X. tropicalis* jsme pro dva z nich (Cluster C a E) navrhli po dvou cDNA markerech umístěných vždy ve stejném scaffoldu. Cílem bylo ověřit, zda budou zmíněné dvojice metodou FISH-TSA mapovány do stejných lokusů na příslušných chromozómech. Na základě statistického vyhodnocení byly výsledné hodnoty t-testu pro obě dvojice menší než příslušná tabulková kritická hodnota. Lze tedy říci, že rozdíly v pozici signálů v rámci každé z dvojic cDNA markerů jsou statisticky nevýznamné, a tudíž se na chromozómu nacházejí na stejném místě.

Výsledky této diplomové práce jasně ukazují, že fyzické mapování s využitím cDNA markerů představuje vhodnou altermativu k mapování vazebnému, především z pohledu identifikace jinak nezařaditelných markerových clusterů.

8 ZÁVĚR

1. Na základě stávající vazebné mapy *X. tropicalis* (http://tropmap.biology.uh.edu/) jsme ve zvolených scaffoldech pomocí programu Ensembl identifikovali známé geny s co možná nejširší mírou exprese.

2. S využitím klonované cDNA sekvence zvolených genů jsme metodou náhodných primerů připravili Dig-11-dUTP značené sondy.

3. Na základě fyzického mapování příslušných cDNA markerů metodou FISH–TSA jsme lokalizovali nezařazené vazebné clustery A - F do jednotlivých chromozómů *X. tropicalis*.

4. Předběžné výsledky týkající se identifikace vazebných skupin s chromozómy*X. tropicalis* (publikace v přípravě) zároveň umožnily propojení všech šesti vazebných clusterů s příslušnými LG.

9 PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

1. Amaya, E., Offield, M.F., Grainger, R.M. (1998): Frog genetics: Xenopus tropicalis jumps into the future. Trends. Genet. 14: 253-255.
2. Bellerby, C.W. (1934): A rapid test for the diagnosis of pregnancy. Nature 133: 494–495.
3. Bisbee, C.A., Baker, M.A., Wilson, A.C., Haji-Azimi, I., Fischberg, M. (1977): Albumin phylogeny for clawed frogs (Xenopus). Science 195: 785-787.
4. Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J., Litt, G.J. (1989): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol. Methods. 125: 279-285.
5. Botstein, D., White, R.L, Skolnick, M., Davis, RW. (1980): Construction of agenetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
6. Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. Gene. 234: 177-186.
7. Brown, T.A. (2006): Genomes. Garland Science Publishing, Oxford, Third Edition.
8. Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. (1991): DNAamplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9: 553-557.
9. Cannatella, D.C., de Sa, R.O. (1993): Xenopus laevis as a model organism. Syst. Biol. 42: 476-507.
10. Cinti, C., Santi, S., Maraldi, N.M. (1993): Localization of single copy gene by PRINS technique. Nucleic Acids Res. 21: 5799-5800.
11. Cooper, D.N., Smith, B.A., Cooke, H.J., Niemann, S., Schmidtke, J., (1985): An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. Hum. Genet. 69: 201-205.
12. Coullin, P., Roy, L., Pellestor, F., Candelier, J.J., Bed-Hom, B., Guillier-Gencik, Z., Bernheim, A. (2002): PRINS, the other in situ DNA labelling method useful in cellular biology. Am. J. Med. Genet. 107: 127-135.

13. Courtet, M., Flajnik, M., Du Pasquier, L. (2001): Major histocompatibility complex and immunoglobulin loci visualized by in situ hybridization on Xenopus chromosomes. Dev. Comp. Immunol. 25: 149-157.
14. Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., Weissenbach, J. (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5, 264 microsatellites. Nature. 380: 152-154.
15. DOE Joint Genome Institute. Dostupné na http://www.jgi.doe.gov/genomes/index.html
16. Duellman, W.E., Trueb, L. (1986): Biology of Amphibians, McGraw-Hill Book Co., New York.
17. Ensembl Genome Browser. Dostupné na http://www.ensembl.org/index.html
18. Fostel, J., Narayanswami, S., Hamkalo, B., Clarkson, S.G., Pardue, M.L. (1984): Chromosomal location of a major tRNA gene cluster of Xenopus laevis. Chromosoma. 90: 254-260.
19. Gall, J.G., Pardue, M.L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 63: 378-383.
20. Genetic map of Xenopus tropicalis. Dostupné na http://tropmap.biology.uh.edu/map.html
21. Gibellini, D.E., Re, M.C., Furlini, G., La Placa, M. (1997): Flow cytometry analysis of an in situ PCR for the detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) proviral DNA. Methods. Mol. Biol. 71: 113-122.
22. Gosden, J., Hanratty, D., Starling, J., Fantes, J., Mitchell, A., Porteous, D. (1991): Oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization. Cytogenet. Cell Genet. 57: 100-104.
23. Graf, J.D. (1989): Genetic mapping in Xenopus laevis: eight linkage groups established. Genetics 123: 389-398.

24. Graf, J.D., Kobel, H.R. (1991): Genetics of Xenopus laevis. Meth. Cell Biol. 36: 19-34.
25. Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart W.M. (2000): An Introduction to Genetic Analysis. Seventh Edition, W. H. FREEMAN, New York
26. Grodzicker, T., Anderson, C., Sambrook, J., Mathews, M.B. (1977): The physical locations of structural genes in adenovirus DNA. Virology. 80:111-126.
27. de Haas, R.R., Verwoerd, N.P., van der Corput, M.P., van Gijlswijk, R.P., Siitari, H., Tanke, H.J. (1996): The use of peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide in combination with time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. J. Histochem. Cytochem. 44: 1091-1099.
28. Haase, A.T., Retzel, E.F., Staskus, K.A. (1990): Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87: 4971-4975.
29. Hamada, H., Kakunaga, T., (1982): Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. Nature 298: 396-398.
30. Hamilton, L. (1963): An experimental analysis of the development of the haploid syndrome in embryos of Xenopus laevis. J. Embryol. Exptl. Morphol. 11: 267.
31. Harrer, T., Schwinger, E., Mennicke, K. (2001): A new technique for cyclic in situ amplification and a case report about amplification of a single copy gene sequence in human metaphase chromosomes through PCR-PRINS. Hum. Mutat. 17: 131-140.
32. Hoyland, J.A., Dixon, J.A., Berry, J.L., Davies, M., Selby, P.L., Mee, A.P. (2003): A comparison of in situ hybridisation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for the detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease. J. Virol. Methods. 109: 253-259.

33. Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F., Semeonoff, R. (1985a): Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature 317: 818-819.

34. Jeffreys, A.J., MacLeod, A., Tamaki, K., Neil, D.L., Monckton, D.G. (1991): Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. Nature 354: 204-209.

35. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985b): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314: 67-73.

36. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Wood, D., Simons, J.P., Kay, R.M., Williams J.G. (1980): Linkage of adult alpha-and beta-globin genes in *X. laevis* and gene duplication by tetraploidization. Cell 21: 555-564.

37. Jiang, J., Gillm B.S. (2006): Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. Genome 49: 1057-1068.

38. Kadandale, J.S., Tunca, Y., Tharapel, A.T. (2000): Chromosomal localization of single copy genes SRY and SOX3 by primed in situ labelling (PRINS). Microb. Comp. Genomics 5: 71-74.

39. Kawahara, H. (1978): Production of triploid and gynogenetic diploid Xenopus by cold treatment. Dev. Growth. Differ. 20: 227–236.

40. Khoka, M., Chung, C., Bustamante, E.L., Gaw, L., Trott K., Yeh J., Taverner, N., Amaya, E., Smith J.C., Papalopulu, N., Zorn, A., Harland, R.M., Grammer, T.C. (2002): Techniques and probes for the study of Xenopus tropicalis development. Dev. Dyn. 225: 422–433.

41. Klein, S.L., Strausberg, R.L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S.W., Richardson, P. (2002): Genetic and genomic tools for Xenopus research: The NIH Xenopus initiative, Dev. Dyn. 225: 384–391.

42. Kobel, H.R., Du Pasquier, L. (1979): Hyperdiploid species hybrids for gene mapping in Xenopus. Nature 279: 157-158.

43. Koch, J.E., Kølvraa, S., Petersen, K.B., Gregersen, N., Bolund, L. (1989): Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. Chromosoma 98: 259-265.

44. Kochan, K.J., Wright, D.A., Schroeder, L.J., Shen, J., Morizot, D.C. (2003): Genetic linkage maps of the West African clawed frog Xenopus tropicalis. Dev. Dyn. 226: 99-102.
45. Krejci, K., Koch., J. (1999): An in situ study of variant telomeric repeats in human chromosomes. Genomics 58: 202-206.
46. Krotoski, D.M., Reinschmidt, D.C., Tompkins, R. (1985): Developmental mutants isolated from wild-caught Xenopus laevis by gynogenesis and inbreeding. J. Exp. Zool. 233: 443-449.
47. Krylov, V., Macha, J., Tlapakova, T., Takac, M., Jonak, J. (2003): The c-SRC1 gene visualized by in situ hybridization on Xenopus laevis chromosomes. Cytogenet. Genome Res. 103: 169-172.
48. Krylov, V., Tlapakova, T., Macha, J. (2007): Localization of the single copy gene Mdh2 on Xenopus tropicalis chromosomes by FISH-TSA. Cytogenet Genome Res. 116: 110-112.
49. Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Res. 21: 1111-1115.
50. Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. (1987): Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181.
51. Langer-Safer, P.R., Levine, M., Ward, D.C. (1982): Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 79: 4381-4385.
52. Macha, J., Tlapakova, T., Krylov, V., Kopsky, V. (2003): Xstir polymorphism and absence of sex linkage in Xenopus laevis ME2 gene. Folia Biol. 49: 115-117.
53. Manuelidis, L., Ward, D.C. (1984): Chromosomal and nuclear distribution of the HindIII 1.9-kb human DNA repeat segment. Chromosoma 91: 28-38.

54. Marra, M.A., Hillier, L., Waterston, R.H. (1998): Expressed sequence tags - ESTablishing bridges between genomes. Trends Genet. 14: 4-7.
55. McCarthy, L. (1996): Whole genome radiation hybrid mapping. Trends Genet. 12: 491-493.
56. McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T., Blair, M. (1997): Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol. 35: 89-99.
57. McKusick, V.A. (1986): The gene map of Homo sapiens: status and prospectus. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51:15-27.
58. Muller, W.P. (1974): The lapmbrush chromosomes of Xenopus laevis (Daudin). Chromosoma 47: 283-296.
59. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
60. Müller, W.P., Thiébaud, C.H., Ricard, L., Fischberg, M. (1978): The induction of triploidy by pressure in Xenopus laevis. Rev. Suisse Zool. 85: 20-26.
61. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science 235: 1616-1622.
62. NCBI GenBank. Dostupné na http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
63. Noramly, S., Zimmerman, L., Cox, A., Aloise, R., Fisher, M., Grainger, R.M. (2005): A gynogenetic screen to isolate naturally occurring recessive mutations in Xenopus tropicalis. Mechanisms of Development 122: 273–287.
64. Nuovo, G.J., Gorgone, G.A., MacConnell, P., Margiotta, M., Gorevic, P.D. (1992): In situ localization of PCR-amplified human and viral cDNAs. PCR Methods Appl. 2: 117-123.

65. Pardue, M.L., Brown, D.D., Birnstiel, M.L. (1973): Location of the genes for 5S ribosomal RNA in Xenopus laevis. Chromosoma. 42: 191-203.
66. Poddighe, P.J., Bulten, J., Kerstens, H.M., Robben, J.C., Melchers, W.J., Hanselaar, A.G. (1996): Human papilloma virus detection by in situ hybridisation signal amplification based on biotinylated tyramine deposition. Clin. Mol. Pathol. 49: 340-344.
67. Primer 3. Dostupné na http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
68. Raap, A.K., van de Corput, M.P., Vervenne, R.A., van Gijlswijk, R.P., Tanke, H.J., Wiegant, J. (1995): Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. Hum. Mol. Genet. 4: 529-534.
69. Ramel, C. (1997): Mini- and microsatellites. Environ. Health. Perspect. 105: 781-789.
70. Reinschmidt, D., Friedman, J., Hauth, J., Ratner, E., Cohen, M., Miller, M., (1985): Gene-centromere mapping in Xenopus laevis. J. Hered. 76: 345–347.
71. Riedy, M.F., Hamilton, W.J., Aquadro, C.F. (1992): Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. Nucleic Acids Res. 20: 918.
72. de Sa, R.O., Hillis, D.M. (1990): Phylogenetic relationships of the pipid frogs Xenopus and Silurana: an integration of ribosomal DNA and morphology. Mol. Biol. Evol. 7: 365-376.
73. Salter-Cid, L., Du Pasquier, L., Flajnik, M. (1996): RING3 is linked to the Xenopus major histocompatibility complex. Immunogenetics 44: 397-399.
74. Schmid, M., Steinlein, C. (1991): Chromosome banding in Amphibia. Chromosoma 101: 123-132.
75. Schmidt, B.F., Chao, J., Zhu, Z., DeBiasio, R.L., Fisher, G. (1997): Signal amplification in the detection of single-copy DNA and RNA by enzyme-catalyzed deposition (CARD) of the novel fluorescent reporter substrate Cy3.29-tyramide. J. Histochem. Cytochem. 45: 365-373.

76. Shapiro, H.A., Zwarenstein, H. (1934): A rapid test for pregnancy on Xenopus laevis. Nature 133: 762.

77. Shastry, B.S. (2002): SNP alleles in human disease and evolution. J. Hum. Genet. 47: 561-566.

78. Sibony, M., Commo, F., Callard, P., Gasc, J.M. (1995): Enhancement of mRNA in situ hybridization signal by microwave heating. Lab Invest. 73: 586-591.

79. SNP Group (The International SNP Map Working Group 2001) (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409: 928-933.

80. Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

81. Speel, E.J., Hopman, A.H., Komminoth, P. (1999): Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play card(s). J. Histochem. Cytochem. 47: 281-288.

82. Speel, E.J., Ramaekers, F.C., Hopman, A.H. (1997): Sensitive multicolor fluorescence in situ hybridization using catalyzed reporter deposition (CARD) amplification. J. Histochem. Cytochem. 45: 1439-1446.

83. Sperry, A., Jin, L., Lloyd, R.V. (1996): Microwave treatment enhances detection of RNA and DNA by in situ hybridization. Diagn Mol Pathol. 5: 291-296.

84. Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., Petes, T.D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature 365: 274-276.

85. The National Institutes of Health. Dostupné na http://www.nih.gov/

86. Thiébaud, C.H., Colombelli, B., Muller, W.P. (1984): Diploid gynogenesis in Xenopus laevis and the localization with respect to the centromere of the gene for periodic albinism ap. J. Embryol. Exp. Morphol. 83: 33-42.

87. Thiébaud, C.H., Fischberg, M. (1977): DNA content in the genus. Xenopus. Chromosoma 59: 253-257.

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

89. Tompkins, R. (1978): Triploid and gynogynetic diploid Xenopus laevis. J. Exp. Zool. 203: 251–256.

90. Tymowska, J. (1973): Karyotype analysis of Xenopus tropicalis Gray, Pipidae. Cytogenet Cell Genet. 12: 297-304.

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

92. Van Os, H., Stam, P., Visser, R.G., Van Eck, H.J. (2006): RECORD: a novel method for ordering loci on a genetic linkage map. Theor. Appl. Genet. 112: 389.

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

94. Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44: 388-396.

95. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A, Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

96. Wright, D.A., Richards, C.M., Frost, J.S., Camoz, A.M., Kunz, B.J. (1983): Genetic mapping in amphibians. Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res. 10: 287-311.

97. Xenopus tropicalis genome project. Dostupné na http://faculty. virginia.edu/xtropicalis/GenomeBACintro.htm

98. Zaitsu, K., Ohkura, Y. (1980): New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. Anal. Biochem. 109: 109-113.