

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Evoluce genového obsahu pohlavních chromosomů

Libor Mořkovský

školitel: RNDr. Radka Storchová, PhD.
Praha 2008

Abstrakt

Je známo, že se evoluce pohlavních chromosomů liší od evoluce autosomů, ale mechanismy, které ji řídí, doposud nebyly uspokojivě objasněny. Tato práce podává přehled dosavadních poznatků o vzniku, evoluci a charakteru pohlavních chromosomů. Po představení obecně uznávané hypotézy o vzniku pohlavních chromosomů z páru autosomů jsou diskutovány mechanismy, které dále řídí evoluci páru pohlavních chromosomů. Jednou z charakteristických vlastností pohlavních chromosomů je jejich nenáhodný genový obsah. Další část práce se věnuje charakterizaci genového obsahu pohlavních chromosomů konkrétních organismů a metodice jeho studia. Na předchozí teoretický podklad navazují výsledky studie využívající data získaná pomocí DNA čipů pro charakterizaci genového obsahu pohlavních chromosomů kura domácího (*Gallus gallus*). Data poukazují na to, že hlavní příčinou nenáhodného genového obsahu chromosomu Z by mohla být nepřítomnost kompenzace dávky genů u ptáků.

Klíčová slova

evoluce, pohlavní chromosomy, genový obsah, DNA čipy, Affymetrix

Abstract

The evolution of sex chromosomes differs from autosomal evolution, but mechanisms behind it haven't been complexly explained until now. This work is a review of present knowledge of the origin, evolution, differentiation and resulting character of sex chromosomes. After introduction of generally respected hypothesis stating that sex chromosomes evolved from an ancestral pair of autosomes, mechanisms responsible for further evolution of this pair are discussed. A characteristic feature of sex chromosomes is their nonrandom gene content. The next part of this work is devoted to characterization of sex chromosome gene content in respect to different species. A chapter describing methods of studying of gene content follows. This theoretical background is then used as a reasoning for a study using data obtained from DNA chips to characterize gene content of chicken (*Gallus gallus*). Apparently the main reason for nonrandom gene content of bird chromosome Z is the absence of gene dose compensation.

Keywords

evolution, sex chromosomes, gene content, DNA chips, Affymetrix

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce, Radce Storchové, za uvedení do problematiky evoluční genomiky, oboru nově vznikajícího díky technickému pokroku na poli sekvencování DNA a analýzy genové exprese, a také za pomoc při zpracování této bakalářské práce. Poděkovat bych chtěl také Jiřímu Plachému z Oddělení buněčné a virové genetiky ÚMG AV ČR za poskytnutí kuřat pro experiment, Robertu Ivánkovi (Microarray Core Facility ÚMG AV ČR) za zpracování DNA čipů a Petru Divinovi (Informační technologie ÚMG AV ČR) za poskytnutí serveru pro výpočty.

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1. Vznik a evoluce pohlavních chromosomů.	5
<i>Společné vlastnosti pohlavních chromosomů</i>	<i>5</i>
<i>Vznik pohlavních chromosomů</i>	<i>6</i>
<i>Evoluce pohlavních chromosomů.....</i>	<i>6</i>
<i>Důsledky vzniku pohlavních chromosomů.....</i>	<i>7</i>
1.2. Význam pohlavních chromosomů v evoluci	8
<i>Úloha pohlavních chromosomů ve speciaci</i>	<i>8</i>
<i>Úloha pohlavních chromosomů v pohlavním výběru</i>	<i>9</i>
<i>Úloha pohlavních chromosomů při vzniku lidských chorob.....</i>	<i>9</i>
1.3. Nenáhodný obsah genů na pohlavních chromosomech.....	10
<i>Párové pohlavní chromosomy</i>	<i>11</i>
<i>Nepárové pohlavní chromosomy</i>	<i>11</i>
1.4. Procesy ovlivňující evoluci genů na pohlavních chromosomech	12
<i>Degenerace nepárového pohlavního chromosomu</i>	<i>12</i>
<i>Konstantní selekce.....</i>	<i>12</i>
<i>Hemizygotní expozice.....</i>	<i>12</i>
<i>Kompenzace dávky genů</i>	<i>13</i>
<i>Meiotická inaktivace pohlavních chromosomů.....</i>	<i>13</i>
1.5. Metody studia genového obsahu pohlavních chromosomů	14
<i>EST.....</i>	<i>15</i>
<i>SAGE</i>	<i>16</i>
<i>MPSS.....</i>	<i>16</i>
<i>DNA čipy</i>	<i>16</i>
2. Cíle práce	18
3. Materiál a metody	19
<i>Pokusná zvířata, odběr tkání a izolace RNA.....</i>	<i>19</i>
<i>Hybridizace čipů.....</i>	<i>19</i>
<i>Analýza dat</i>	<i>19</i>
4. Výsledky	20
5. Závěr	21
6. Seznam použité literatury	22

1. Úvod

Pohlavní chromosomy jsou důležitou součástí genomu mnohých organismů. Hrají mimořádnou roli v několika významných evolučních procesech, jako je například speciace nebo pohlavní výběr. Abychom lépe porozuměli jejich přesné roli v evoluci, bylo by vhodné znát jejich genový obsah a také konkrétní evoluční mechanismy, které je utvářejí. Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o evoluci genového obsahu pohlavních chromosomů a mechanismech, které je ovlivňují.

1.1. Vznik a evoluce pohlavních chromosomů.

Jeden z možných způsobů genetického určení pohlaví u dvoudomých organismů je určení pohlaví v závislosti na karyotypu. Toto určení zajišťuje pár vzájemně morfologicky odlišných chromosomů, chromosomy pohlavní. Obě dvě varianty kombinací chromosomů a výsledného pohlaví přicházející v úvahu jsou v přírodě k nalezení – pokud heterogametický jedinec je samec a homogametická samice, pohlavní chromosomy nazýváme písmeny X a Y (samec XY, samice XX), v opačném případě nazýváme pohlavní chromosomy Z a W (samec ZZ, samice ZW). První ze způsobů (systém XY) využívají kromě savců například některé skupiny obojživelníků a plazů, většina řádů hmyzu a některé rostliny. Systém určení pohlaví ZW nalezneme např. u ptáků, hadů a motýlů. Existují i další, složitější, varianty určení pohlaví. Například u neotropických sladkovodních ryb se vyskytují systémy jako X_1X_2Y , XY_1Y_2 nebo ZW_1W_2 (de Almeida Toledo, 2001). Systém určení pohlaví se může dokonce lišit v rámci jednoho druhu. XY samice, u kterých je determinujícím faktorem pro určení pohlaví haplotyp chromosomu X nalezneme i mezi savci, například u lumíků (Bull, 1981). V čeledi ryb Poeciliidae jsou druhy, které využívají jak XY tak ZW systém (Volf, 2001).

Společné vlastnosti pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy se v průběhu evoluce vyvinuly původně z páru běžných autosomů (Muller, 1914; Ohno 1967), několikrát nezávisle na sobě (Bull, 1983). Všimáme-li si heteromorfie (tj. vzájemná morfologická odlišnost) savčích chromosomů X a Y, lze prohlásit, že heteromorfní pohlavní chromosomy se postupně vyvíjejí z pohlavních chromosomů homomorfních (takové chromosomy, které vypadají na pohled stejně, ale jeden z nich obsahuje gen určující pohlaví). Chromosomy ptakořitných vykazují menší míru heteromorfie než chromosomy vačnatců a vývoj se drží tohoto trendu i u placentálních savců (Lahn, 2001). Přes různorodost svého původu sdílejí pohlavní chromosomy mnohé společné vlastnosti, respektive jejich vývoj zjevně směřuje podobným směrem. Nepárové pohlavní chromosomy (tj. Y v XY systému a W v ZW systému; též heterogametické pohlavní chromosomy) jsou obvykle menší než běžné autosomy, význačně ochuzené co do genového obsahu, zato bohaté na repetitivní sekvence, které tvoří rozsáhlé bloky heterochromatinu. Většina genů na chromosomu Y hraje důležitou roli v samčí reprodukci. Genový obsah chromosomu W zatím nebyl charakterizován. Homogametické pohlavní chromosomy (chromosomy X a Z) se podobají spíše autosomům, jak morfologií, tak genovou hustotou. Podobnost ale není úplná, i tyto chromosomy mají nenáhodný genový obsah. Mezi funkcemi

genů nacházejících se na těchto chromosomech jsou často obohaceny funkční skupiny svázané s určením pohlaví a reprodukci.

Množství společných znaků u pohlavních chromosomů, které bezesporu vznikly nezávisle na sobě, indikuje, že na všechny pohlavní chromosomy podléhají podobným evolučním procesům. V dalším textu se je pokusím nastínit, postupně tak, jak působí na pár chromosomů od jeho vzniku.

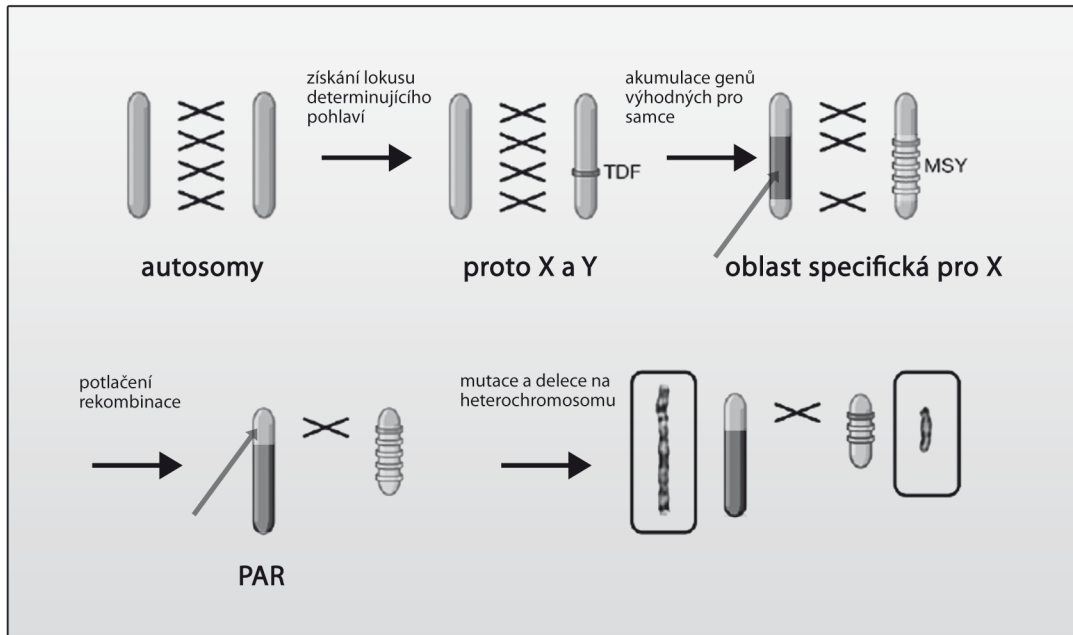
Vznik pohlavních chromosomů

Savčí pohlavní chromosomy se pravděpodobně vyvinuly z páru autosomů před přibližně třemi sty miliony let, záhy poté co se celá savčí linie oddělila od svých plazích předků (Lahn, 1999). Tehdy tyto chromosomy neměly žádný specifický genový obsah. Změnu na pohlavní chromosomy způsobila mutace genu *SOX3*, jednoho z členů kaskády určující pohlaví podle podmínek prostředí, na gen *SRY*, jehož přítomnost určuje samčí pohlaví (Stevanovic, 1993; Foster, 1994). Takto můžeme na *SRY* a *SOX3* pohlížet jako na dvě různé alely jednoho lokusu během raných stádií vývoje pohlavních chromosomů, kdy chromosom obsahující *SOX3* je vznikajícím chromosomem X, a chromosom obsahující *SRY* vznikajícím chromosomem Y.

Ptačí chromosomy Z a W nevykazují homologii s lidským X a Y, ale s chromosomem 9 (Marshall Graves, 2001). Tím pádem mutace v *SOX3* nemůže být důvodem diferenciaci pohlavních chromosomů u ptáků. Kandidátem je zde jiný gen z výše zmíněné kaskády, *DMRT1* (Nanda et al., 2000). Stojí za povšimnutí, že obě výše zmíněné skupiny jsou na rozdíl od svých předchůdců homeiotermní, takže tyto změny mohou být svázané i s tím, že teplota okolí pravděpodobně ztratila svůj kruciální význam pro vývoj jedince. Recentní popis průběhu meiosis u ptakopyska (Grutzner et al., 2004) vrhá nové světlo na problematiku vzniku pohlavních chromosomů u savců. Sada pohlavních chromosomů ptakopyska, sestávající z 5X a 5Y chromosomů, obsahuje jak chromosom obsahující geny typické pro savčí X, tak chromosom obsahující gen *DMRT1*, který leží na ptačím chromosomu Z, a je kandidátem na pohlaví určující gen u ptáků. Je vcelku nepravděpodobné, aby taková situace nastala náhodně, takže se nabízí hypotéza, že savčí XY systém převzal funkci po ancestrálním ZW systému přítomném u plazů a ptáků.

Evoluce pohlavních chromosomů

Pravděpodobně nejzjevnější evoluční proces je postupná degenerace nepárového pohlavního chromosomu. Ta je připisována na vrub absenci meiotické homologní rekombinace vedoucí k hromadění škodlivých mutací. Geny, jež v důsledku těchto škodlivých mutací přestaly být funkční, mohou být z genomu odstraněny delečními mutacemi. Dojde-li na nepárovém chromosomu k mutaci, která vede ke ztrátě funkce genu, může být postupně takový gen odstraněn delečními mutacemi. Ve vývojové linii vedoucí k člověku vznikaly vzájemně nerekombinující oblasti (tím pádem specifické pro jeden z chromosomů) postupně, po několika větších blocích (Lahn, 2001). Pro tuto hypotézu hovoří srovnání relativně konzervovaného pořadí genů na různých savčích chromosomech X, oproti různorodým uspořádáním genů na savčích chromosomech Y, což by mohlo být způsobeno několika souslednými inverzemi na chromosomu Y během evoluce.



Obr. 1.A **Proces diferenciacie X a Y z původního páru autosomů.** (upraveno podle Graves, 2006)

Takové inverze by porušily alignment a tím pádem i rekombinaci čím dál větších oblastí chromosomů. Posuzováno na základě divergencí mezi jednotlivými homology genů na X a na Y se zdá, že ve vývoji lidského chromosomu Y proběhly minimálně čtyři výrazné inverze — první přibližně před 300 miliony let, poslední před 30 miliony. Podle divergence mezi homology, SRY patří mezi první geny, které ztratily schopnost rekombinace (Lahn, 2001). Inverze byly pozorované i na pohlavních chromosomech jiných organismů, což naznačuje, že by mohlo jít o poměrně obecný mechanismus potlačení rekombinace mezi homogametickými a heterogametickými pohlavními chromosomy (Handley, 2004). Proč se fixovaly inverze vedoucí ke znemožnění rekombinace mezi pohlavními chromosomy není úplně jasné. Jednou z možností je genetický drift (díky malé efektivní velikosti populace pro Y — jedno Y připadá na 3 X a 4 autosomy), druhou je pozitivní selekce na některou z alel obsažených na inverzi — genetické svezení se.

Důsledky vzniku pohlavních chromosomů

Postupná diferenciacie pohlavních chromosomů, vede k tomu, že geny lokalizované na párovém chromosomu jsou v homogametickém pohlaví přítomny ve dvou kopiích, zatímco u pohlaví heterogametického jen v jedné kopii. Aby se pohlaví nelišila v celkové hladině exprese (což lze považovat za ancestrální stav, pokud pohlavní chromosomy pocházejí z autosomů), dochází k tzv. kompenzaci dávky genů. Může k ní docházet v somatických buňkách jak u organismů s heterogametickými samci, tak s heterogametickými samicemi. Různé druhy však využívají různé mechanismy k dosažení kompenzace. U savců dochází k inaktivaci jedné z kopií chromosomu X u samic (Lyon, 1961; Avner & Heard, 2001). U drosofilů dochází naopak ke zdvojnásobení exprese na chromosomu X u samců (Baker et al., 1994; Kelley, 2004). U *Caenorhabditis elegans* je u samic exprese genů na obou chromosomech X snížena (Meyer, 2000). U ptáků není mechanismus kompenzace dávky genů zatím dostatečně probádán, leč recentní výzkumy na kuru

domácím naznačují, že samci (homogametické pohlaví) mají dvakrát zvýšenou hladinu exprese genů na chromosomu Z ve srovnání se samicemi (heterogametické pohlaví) (Ellegren, 2007). To by znamenalo, že u ptáků není přítomná kompenzace dávky genů.

Dalším z mechanismů umlčujících celé chromosomy je meiotická inaktivace pohlavních chromosomů (meiotic sex chromosome inactivation, MSCI), ke které dochází v germinálních buňkách heterogametických samců. MSCI začíná během pachytene 1.meiotického dělení a přetrvává do značné míry až do konce spermatogeneze. Biologická role tohoto procesu není zatím úplně objasněna. Podle jedné hypotézy by MSCI mohla sloužit k umlčení genů na chromosomu X, které jinak inhibují spermatogenezi, např. genů způsobujících meiotický drive (Lifschytz and Lindsey, 1972; Tao et al., 2007). Na rozdíl od inaktivace chromosomu X v somatických buňkách může být jeho transkripční umlčení v meiose pouze nevyhnutelným důsledkem heterochromatinizace. Ta může sloužit například jako ochrana před pokusy o rekombinaci mezi nehomologními oblastmi pohlavních chromosomů a jejich následným poškozením (McKee and Handel, 1993). Práce z posledních let ukazují, že MSCI by mohla být jen speciálním případem širšího jevu nazývaného meiotické umlčení nespárované DNA, který pravděpodobně slouží jako ochrana před cizorodou DNA a nehomologními rekombinacemi (Turner, 2005). Pokud je tento mechanismus obecný, znamenalo by to, že MSCI je pouze logickým důsledkem diferenciacce pohlavních chromosomů.

1.2. Význam pohlavních chromosomů v evoluci

Pohlavní chromosomy hrají mimořádnou roli v některých evolučně významných jevech jako je např. speciace, pohlavní výběr, ale také při vzniku mnoha lidských chorob.

Úloha pohlavních chromosomů ve speciaci

Ke speciaci dochází v důsledku vzniku reprodukčně izolačních mechanismů mezi zástupci nově vznikajících druhů. Prezygotická reprodukční izolace (např. odlišné způsoby páření), nebo postzygotická reprodukční izolace (neživotaschopnost nebo snížená plodnost hybridů) vede k tomu, že vzniknou dvě distinktní genetické jednotky, podléhající nezávislé evoluci.

Jedním z nejvíce studovaných reprodukčně izolačních mechanismů je právě snížená životaschopnost případně sterilita mezidruhových hybridů. Způsob vzniku hybridní sterility byl navržen nezávisle Dobzhanskym (Dobzhansky, 1937) a Mullerem (Muller, 1942). Podstata tohoto modelu je v zohlednění epistatických interakcí mezi zafixovanými alelami z oddělených populací.

Při uvažování o příčinách vzniku hybridní sterility je nezbytné si povšimnout dvou jevů (někdy zvaných jako „dvě pravidla speciace“). První z nich je popsán takzvaným Haldaneovým pravidlem. Haldane si již v roce 1922 všiml toho, že pokud je neživotaschopné nebo sterilní pouze jedno pohlaví, je to téměř vždy pohlaví heterogametické (Haldane, 1922). Druhým pravidlem je takzvaný velký efekt chromosomu X (large X effect). Při analýzách mezidruhových hybridů za pomoci zpětného křížení má substituce samotného chromosomu X chromosomem z druhého organismu výrazně větší efekt na fitness hybridu, než substituce podobného autosomu. Novější

práce ukazují, že chromosom X obsahuje větší hustotu genů způsobujících hybridní nekompatibilitu než autosomy (True et al., 1996; Tao et al., 2003; Masly and Presgraves, 2007).

Pohlavní chromosomy mohou hrát významnou roli při vzniku reprodukčních bariér ze dvou důvodů. Prvním důvodem je, že se v heterogametickém pohlaví se vyskytují pouze v jedné kopii. Díky tomu se mohou projevit recesivní nekompatibility, které jsou v heterozygotním stavu potlačeny. S touto takzvanou „teorií dominance“ přišel již H. J. Muller v roce 1942 (Muller, 1942), později se k ní ve své práci vrátil Orr (Orr, 1993). Pokud by tato teorie byla pravdivá, byly by i samičky homozygotní v X stejně neživotaschopné, jako samci. To se při pokusech na drosofilách potvrdilo (Orr, 1993; Wu & Davis, 1993). Tato teorie, aplikovatelná jak na XY organismy, tak na organismy s chromosomy ZW, podává možné vysvětlení nejen Haldaneova pravidla, ale také velkého efektu chromosomu X.

Druhým důvodem je, že geny lokalizované na chromosomu X podléhají rychlejší evoluci. Ta je způsobena snazší fixací recesivních mutací na tomto chromosomu, tzv. “fast-X” hypotéza. Na rozdíl od teorie dominance, která pracuje s recesivitou alel v mezidruhovém hybridu, tato teorie počítá s částečnou recesivitou alel na jejich běžném genetickém pozadí. Recesivní alely s benefičním efektem se totiž mohou snáze fixovat díky hemizygotní expozici v jednom pohlaví (Charlesworth et al., 1987). Experimentální průkaznost této teorie je poněkud kontroverzní. Některé experimenty hovoří pro (Torgerson & Singh, 2003; Counterman et al., 2004 ..etc), některé proti (Betancourt, 2002; Thornton, 2006).

Úloha pohlavních chromosomů v pohlavním výběru

Znaky uplatňující se v pohlavním výběru skýtají obvykle výhodu pouze pro jedno pohlaví, zatímco pro druhé mohou být neutrální nebo nevýhodné, např. pestrobarevnost samců oproti krycímu zbarvení samic. Geny podmiňující tyto vlastnosti můžeme považovat za sexuálně antagonistické. Pro takové geny je výhodné umístění na pohlavních chromosomech, ať z důvodu konstantní expozice nepárového chromosomu v jednom z pohlaví, nebo z důvodu hemizygotní expozice chromosomu párového. Proto se tyto geny mají tendenci hromadit na pohlavních chromosomech. To potvrzují např. experimenty na octomilkách (*Drosophila melanogaster*), ukazující, že chromosom X obsahuje mnoho genů podmiňujících znaky, které ovlivňují sexuálně antagonistickou fitness (Gibson et al., 2002).

Za častý a poměrně výrazný pohlavní dimorfismus u ptáků je pravděpodobně zodpovědná již zmíněná absence kompenzace dávky genů. Protože samci ptáků jsou homogametičtí, je v jejich buňkách transkribováno dvojnásobné množství mRNA příslušící ke genům lokalizovaným na chromosomu Z než u samic. To může přispívat k umocnění rozdílů mezi oběma pohlavími.

Úloha pohlavních chromosomů při vzniku lidských chorob

Významná frakce genetických chorob člověka je způsobena mutacemi nebo jinými abnormalitami spojenými s pohlavními chromosomy. Je to důsledkem přítomnosti pohlavních chromosomů v haploidním stavu u mužů, a také vyšší pravděpodobností přežití jedinců s aneuploidii zahrnující pohlavní chromosomy. Další choroby spojené s pohlavními chromosomy mohou vznikat díky

chybám při inaktivaci jednoho z chromosomů X u žen.

Aneuploidních karyotypů slčitelných se životem je celá řada, některé z nich ani nemají viditelné projevy, takže jsou diagnostikovatelné pouze určením karyotypu. Nevýrazné, popřípadě žádné, projevy mají karyotypy 47, XXX (zvaný také superžena) a 47, XYY (supermuž). Monosomie v X, 45, X0, nazývaná Turnerův syndrom, je z 98% letální v embryonálním stavu. V USA by měla být zodpovědná za 10% potratů (Bender, 2001). Z narozených žen trpí Turnerovým syndromem 1 z 2500. Klinické symptomy jsou poměrně závažné, zahrnují sterilitu, kardiovaskulární problémy, pozměněnou stavbu těla. Další z aneuploidií pohlavních chromosomů je 47, XXY — Klinefelterův syndrom. Jeho incidence je přibližně 1 z 500 narozených mužů. Postižení muži jsou téměř vždy sterilní, závažnost fyzických a mentálních problémů je různá. Byly zaznamenány i případy tetrasomie a pentasomie, jak u mužů, tak u žen (je známo 10 různých kombinací). Jsou ale poměrně vzácné (Linden, 1995).

Pouze málo poškozených alel chromosomu X se chová dominantně. Patří mezi ně alely způsobující vzácný aicardi syndrom a dědičnou hypofosfatémii. Pro recesivní alely slouží ženy jako přenašečky a choroby podmíněné těmito alelami postihují obvykle pouze muže. Více genů na chromosomu X je pravděpodobně zodpovědných za vznik mentální retardace u mužů, konkrétně například syndromu křehkého X, nebo Rettova syndromu spojeného též s autismem. Další významné choroby podmíněné recesivní alelou na chromosomu X jsou například muskulární dystrofie, hemofilie, barvoslepost (daltonismus), různé myopatie, hluchota, Fabryho choroba a v neposlední řadě androgenní alopecie (plešatost).

Chudý genový obsah chromosomu Y a také to, že většina funkčních genů na Y hraje nějakou úlohu ve spermatogenezi, příliš nenahrává vzniku dědičných genetických poruch na tomto chromosomu (poškození spermatogeneze znamená obvykle sterilitu, a tím pádem brání přenosu poruchy na další generaci). Za chorobný stav vázaný na Y můžeme považovat neplodnost způsobenou chybami ve spermatogenezi. Delečním mapováním byly nalezeny tři oblasti chromosomu Y zodpovědné za sterilitu a byly pojmenovány AZFa, b, c (azoospermia factor region). Delece v kterékoliv z nich vážně poškodí spermatogenezi, takže se předpokládá, že v těchto oblastech se vyskytují geny pro ni nezbytné.

1.3. Nenáhodný obsah genů na pohlavních chromosomech

Znalost sekvencí DNA v rozsahu pokrývajícím ze značné části genomy některých organismů a také existence softwarového vybavení umožňujícího tyto sekvence třídit, přiřazovat k nim různé vlastnosti, vzájemně je porovnávat a vyhledávat mezi nimi podle podobnosti, vedla k objevu další odlišnosti pohlavních chromosomů od autosomů. Touto odlišností je nenáhodný genový obsah. Vybereme-li sadu genů podle nějaké společné vlastnosti, např. podobné funkce nebo exprese v konkrétní tkáni, jsou tyto geny více méně náhodně rozloženy mezi autosomy (na chromosomy obsahující celkově větší množství genů případně víc genů z testované skupiny a naopak). To ale neplatí pro pohlavní chromosomy. Existují skupiny genů, které na nich mají signifikantně větší či naopak menší zastoupení než na autosomech. Následující text se zabývá podrobněji genovým obsahem různých párových a nepárových pohlavních chromosomů.

Párové pohlavní chromosomy

Párové pohlavní chromosomy se velikostí, počtem i hustotou genů podobají autosomům, což by mohlo nasvědčovat hypotéze o jejich autosomálním původu. Řada studií však dokládá, že oproti autosomům jsou tyto chromosomy obohaceny nebo naopak ochuzeny o geny z konkrétních funkčních skupin, případně s preferenční expresí v některých tkáních. Analýza funkcí genů, které byly zmapovány na lidský chromosom X, ukázala, že tento chromosom je obohacen o geny, které souvisejí s určením pohlaví nebo rozmnožováním (Saifi & Chandra, 1999), o geny exprimované preferenčně v mozku (Zechner et al., 2001), prostatě (Lercher et al., 2003) a svalech (Bortoluzzi et al., 1998). U myši bylo zjištěno, že chromosom X je obohacen o geny s preferenční expresí ve vaječnicích, placentě a somatických buňkách varlete a ve spermatogenních buňkách během mitotické fáze meiosis (Wang et al., 2001; Khil et al., 2004; Divina et al., 2005). Geny exprimované v dalších fázích meiosis jsou na chromosomu X naopak zastoupeny výrazně méně (Khil et al., 2004; Divina et al., 2005). U drosophily je chromosom X ochuzen o geny s preferenční expresí v samcích (Parisi et al., 2003), u *Caenorhabditis elegans* o geny exprimované v germinálních buňkách (Reinke et al., 2004). Kuřecí chromosom Z (homozygotní v samcích) je ochuzen o geny specificky exprimované ve vaječnicích a obohacen o geny exprimované v mozku samců (Storchova and Divina., 2006).

Nepárové pohlavní chromosomy

Dlouhé heterochromationvé repetitivní sekvence nacházející se na degenerovaných pohlavních chromosomech ztěžují zpětné skládání osekvenovaných kousků *in silicio* — takže postup v sekvencování heterochromosomů je výrazně pomalejší, než u ostatních chromosomů. Z heterochromosomů je nejlépe zmapovaný lidský chromosom Y. Sestává z pseudoautosomálních oblastí (PAR, pseudoautosomal region) umístěných na obou koncích, které jsou homologní s chromosomem X a zabírají přibližně 5% velikosti chromosomu, a z nerekombinující části specifické pro samce (NRY, non-recombining region of the Y).

Geny obsažené v PAR podléhají rekombinaci, takže mohou volně putovat mezi oběma pohlavími. Zatím bylo do PAR přiřazeno asi deset genů, z nichž většina je na krátkém ramínku chromosomu Y. Z NRY oblasti je asi polovina euchromatin, zbytek je heterochromatinová část velkého ramínka. Doposud bylo identifikováno 21 genů nebo genových rodin, které podle jejich homologie ke genům na chromosomu X a podle jejich expresních profilů můžeme přiřadit do tří tříd. Geny zařazené v první třídě jsou na chromosomu přítomny v jedné kopii, jsou exprimované v různých tkáních a mají podobně fungující homology na X. Geny ve druhé třídě se na chromosomu nachází ve více kopiích, nemají X homology a exprimovány jsou pouze ve varleti. Důvod přítomnosti většího počtu kopií těchto genů je pravděpodobně jejich účast na genové konverzi, která by mohla sloužit jako náhrada za ztracenou schopnost rekombinace. Třída třetí je spíše sběrnou pro geny, které nesplňují kritéria tříd předchozích. Patří do ní například gen SRY, nacházející se na chromosomu pouze v jedné kopii, exprimovaný během embryonálního vývoje a v dospělém varleti, mající aktivní homolog SOX3 na chromosomu X (Lahn, 2001).

Chromosom Y u šimpanze obsahuje ještě více nefunkčních genů než u člověka. Myší chromo-

som Y obsahuje několik genů spojených se spermatogenezí. Chromosom drosophily je poměrně malý, téměř celý heterochromatinizovaný. Je na něm známo zatím 9 aktivních genů (Carvalho, 2001). Euchromatin představuje pouze přibližně 20% kuřecího chromosomu W (Itoh et al., 2001; Mizuno et al., 2002). Je v něm predikováno 20 genů, z čehož 8 bylo identifikováno (Yamada, 2004).

Z předchozího souhrnu je patrné, že i přes nesporné podobnosti ve vývoji pohlavních chromosomů má působení evolučních mechanismů rozdílné výsledky u různých organismů. Přestože existuje několik teorií vysvětlujících vývoj a nenáhodný genový obsah pohlavních chromosomů, žádná z nich se nezdá být schopná objasnit způsob jejich vzniku v celé šíři.

1.4. Procesy ovlivňující evoluci genů na pohlavních chromosomech

Bylo navrženo několik mechanismů a selekčních tlaků, které by mohly být příčinou charakteristického genového obsahu pohlavních chromosomů.

Degenerace nepárového pohlavního chromosomu

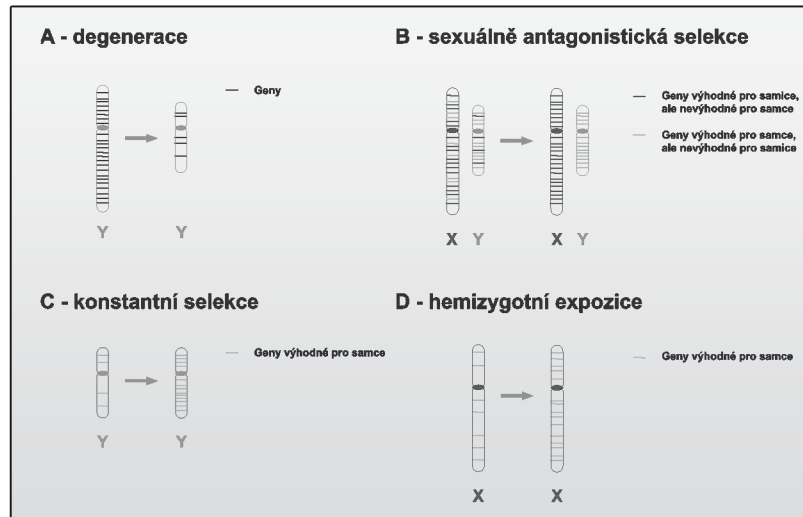
Prvním z nich je postupná degenerace chromosomu Y (případně W) v důsledku potlačení meiotické rekombinace a s ní spojené hromadění škodlivých mutací ve funkčních genech. Pokud je gen mutací změněn na nefunkční pseudogen, je pravděpodobné, že bude odstraněn delecí. Nemožnost rekombinace také usnadňuje hromadění retrovirových elementů a transpozonů.

Konstantní selekce

Dalším z evolučních faktorů je konstantní selekce. Podléhají jí především geny na nepárových pohlavních chromosomech, které se vyskytují po celý čas pouze v jednom pohlaví. Neměnné podmínky vedou k fixaci genů výhodných právě pro toto pohlaví, které mohou být pro druhé pohlaví neutrální, nebo dokonce škodlivé — tzv. sexuálně antagonistické geny. Jako příklad mohou posloužit například geny podmiňující pohlavní dimorfismus. Geny ovlivňující spermatogenezi nebo přímo kompetici spermií u XY organismů budou konstantní selekcí ovlivněny nejvíce, zvláště u polyandrických organismů. Proto není překvapující, že geny na Y mají převážně tyto funkce. Konstantní selekce do jisté míry ovlivňuje i chromosomy X a Z, protože tráví více času v homogametickém pohlaví (v populaci kde je vyrovnaný počet samců a samic jsou párové pohlavní chromosomy rozděleny v poměru 2:1).

Hemizygotní expozice

Příčinou akumulace genů výhodných pro samce na chromosomu X je jeho hemizygotní expozice v samcích (analogicky pro chromosom Z a samice). Dovolí projevit se recesivní alele, která je výhodná pouze pro samce, zatímco v samicích je maskována svojí recesivitou. Taková alela se bude v populaci šířit, dokud její frekvence bude dostatečně nízká, aby příliš často nevznikaly homozygotní samice (u nichž se projeví škodlivost alely). Možnost udržet se tímto způsobem v populaci zvyšuje sexuálně antagonistickým alelám šanci na vznik další mutace, která např. omezí expresi genu pouze na žádoucí pohlaví. Pokud první z mutací dává svému nositeli výraznou výhodu oproti ostatním, je tato dvojice mutací na nejlepší cestě k fixaci. Pokud ale k fixaci dojde před vznikem kompenzující mutace, například díky genetickému driftu, hemizygotní expo-



Obr. 1.B **Mechanismy ovlivňující genový obsah pohlavních chromosomů.** (upraveno podle Vallender, 2004)

zice ztrácí své výhody (konkrétně dominantní alely které by maskovaly tu nevýhodnou) (Rice, 1984).

Hemizygotní expozice ovlivňuje evoluci sexuálně antagonistických recesivních alel. Sexuálně antagonistické dominantní alely podléhají konstantní selekci, takže na párovém pohlavním chromosomu vzniká „střet zájmů“ těchto mechanismů. Hemizygotní expozice preferuje recesivní alely výhodné pro jedno pohlaví, konstantní selekce dominantní alely výhodné pro pohlaví druhé. Experimentální data nám v rozhodování, který z mechanismů převládá, příliš nepomohou. Znalost sekvence DNA neumožňuje určit, zda je alela recesivní, nebo dominantní, takže tato vlastnost zůstává zatím pouze v teoriích. Z experimentů ale víme že chromosom X je u drosofily ochuzen o geny s preferenční expresí v samcích, zatímco u myši je o tuto skupinu genů naopak obohacen. Jako vysvětlení se nabízí rozdílné mechanismy kompenzace dávky genů.

Kompenzace dávky genů

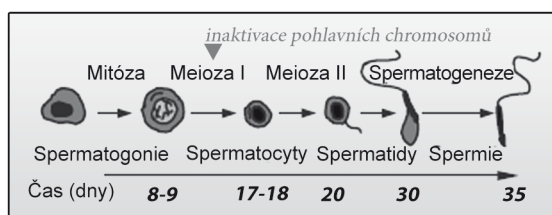
Byly navrženy dva mechanismy, jak by kompenzace genové dávky u drosofily (zdvojnásobená hladina exprese na chromosomu X u samců) mohla ovlivňovat genové složení pohlavních chromosomů. První předpokládá, že kompenzace pracuje gen po genu. Nově vzniklý gen na chromosomu X by byl znevýhodněn sníženou expresí v samcích, dokud by se nevyvinul kompenzační mechanismus. Bylo ale prokázáno, že kompenzace je zajišťována pro velké oblasti chromosomu najednou (Swanson, 2001). Druhá hypotéza předpokládá, že u samců je obtížnější dosáhnout zvýšení exprese genu lokalizovaného na chromosomu X pomocí epigenetických modifikací, protože ty jsou již vyčerpané na kompenzaci genové dávky. Nedávno popsána hyperaktivace chromosomu X u savců zpochybňuje i tuto teorii.

Meiotická inaktivace pohlavních chromosomů

Výzkum genové exprese v průběhu meiosis u myši ukázal, že geny exprimované v raných (mitotických) fázích jsou na chromosomu X obohaceny, zatímco geny exprimované později se na chromosomu X vůbec nenachází. Protože savčí chromosom X je v průběhu meiosis inaktivován, geny které jsou potřeba později v průběhu meiotického dělení by se na něm příliš neuplatnily.

Housekeeping genes, které jsou lokalizovány na chromosomu X a jsou nezbytné pro spermatogenezi mají proto v rámci genomu paralogy na autosomech (McCarrey and Thomas, 1987). U drosofily a *Caenorhabditis elegans* probíhá inaktivace pohlavních chromosomů ještě dříve během meiosis, takže se na jejich párových pohlavních chromosomech téměř nevyskytují geny s funkcí při spermatogenezi.

Na otázku jaký je původ genů nacházejících se díky výše zmíněným mechanismům na pohlavních chromosomech existují tři možné odpovědi. Mohou to být geny které tam přicestovaly z jiných míst genomu (z různých autosomů). To je s ohledem na to, že obsah bloků ze kterých je sestaven chromosom X se od oddělení linií člověka a kuřete příliš nezměnil, vcelku nepravděpodobné. Další možnost je, že původně neutrální geny získaly nové funkce právě díky pohlavně



Obr. 1.C **Meiotická inaktivace pohlavních chromosomů.** (upraveno podle Khil, 2004)

specifické selekci. Třetí alternativou je, že pro vznik pohlavních chromosomů byl „vybrán“ pár adekvátně vybavených autosomů. Mezi těmito hypotézami by bylo možné rozhodnout za pomoci srovnání funkcí autosomálních homologů savčích genů chromosomu X u vačnatců a u ptáků (Graves, 2006).

1.5. Metody studia genového obsahu pohlavních chromosomů

Pro studium genového obsahu určitého chromosomu je nezbytné mít k dispozici sekvence konkrétních genů přiřazených k danému chromosomu, a také metadata dále popisující daný gen, tzv. anotace. Anotované sekvence genomů jsou výsledkem rozsáhlých sekvenačních projektů. Po izolaci celkové DNA z cílového organismu je naštěpená DNA zaklonována do vhodného vektoru (BAC, fosmidy, atd.), v něm pomnožena a následně sekvencována. Dále následuje zpracování sekvencí *in silicio* — sestavení delších úseků na základě překryvů v osekvcovaných fragmentech. Tento sekvenační protokol, nazývaný také “shotgun” metoda (analogie je ve velkém množství malých kousků najednou), umožnil v poslední době získat poměrně velký počet celogenomových sekvencí (duben 2008, 459 eukaryotických projektů — 23 kompletních, 206 v sestavování a 230 v sekvenační fázi, z toho 432 využívá shotgun metodu; Entrez Genome).

Anotacemi můžou být například záznamy v Gene Ontology databázi (GO; databáze třídící geny do funkčních skupin a nadskupin podle předpokládané funkce proteinů z nich vznikajících), dále přiřazení k jiným známým genům podle sekvenční homologie (v rámci jednoho genomu, nebo i mezi genomy), nebo také expresní profil daného genu, vztažený na různé tkáně, různá stáří nebo pohlaví testovaného subjektu. GO struktura je samozřejmě do jisté míry svázána právě s expresními profily.

Protože existuje mnoho různých metod analýzy genové exprese, je důležité mít přehled o jejich technické a případně i finanční náročnosti, pokud potřebujeme nějakou z nich vybrat pro náš experiment, a také představu o tom jak konkrétně fungují, abychom mohli zhodnotit jak by mohly ovlivnit kvalitu našich, případně veřejně dostupných dat. Tyto metody zaznamenaly v posledních letech značný pokrok. Bylo navrženo několik metod umožňujících analyzovat expresní profily genů na úrovni celého transkriptomu, tj. zjistit najednou koncentrace všech mRNA transkribovaných v buňce v čase jejího zpracování. Množství dat, které tyto metody produkují, vyžaduje následné počítačové zpracování a statistické vyhodnocení. Výsledná data jsou obvykle zveřejňována v databázích k tomu určených. Existují dva metodické přístupy ke globální analýze genové exprese. První skupina metod je založena na sekvencování fragmentů cDNA (kvůli nízké stabilitě RNA je prvním krokem u většiny protokolů přepis z mRNA do cDNA — complementary DNA) z jednotlivých transkriptů. Je to z principu otevřený systém, což znamená, že s jeho pomocí lze analyzovat doposud neznámé transkripty a potažmo i libovolné organismy, u nichž je osekvencovaný genom. Druhá skupina metod využívá hybridizace cDNA k próbám (krátkým úsekům DNA) přichyceným na pevném podkladu takzvaného DNA čipu, a následné vizualizace za pomoci fluorescenčního značení. Hybridizační metody jsou převážně uzavřené, tj. hotové čipy lze použít pouze k detekci těch transkriptů, pro které byly navrženy. Zlepšující se možnosti miniaturizace a zpracování velkého množství dat nabízí v blízké budoucnosti možnost realizace univerzálního čipu — ten by, buď díky přítomnosti všech možných kombinací oligonukleotidu dané délky, nebo díky statistickému vyhodnocení nepřesně párujících prób, byl systémem v podstatě otevřeným, závislým pouze na znalosti genomu zkoumaného organismu, stejně jako sekvenční metody (Royce, 2007). Dále následuje podrobnější popis některých významných metod.

EST

Základní informaci o genové expresi v konkrétní tkáni umožňují získat expresní sekvenční tagy (EST, expressed sequence tags). EST jsou krátké sekvence (200 – 800 nukleotidů) sekvencované náhodně z 5' nebo 3' konce cDNA získané reverzním přepisem mRNA. Každý EST je sekvencován pouze jednou, takže sekvence může obsahovat velké množství chyb, což je ale kompenzováno velkým množstvím dostupných EST sekvencí ve veřejných databázích. Nejvýznamnější z EST databází je jeden z projektů amerického NCBI (National Center for Biotechnology Information) pojmenovaný dbEST. V současné době (duben 2008) obsahuje přes 51 miliónů EST z 1527 různých organismů. Sekvence získané v jednom experimentu pro jednu tkáň se souhrnně nazývají knihovna EST. Kvalita EST sekvencí je obecně nízká blízko konců a zlepšuje se směrem ke středu sekvence. K záměně baze při sekvencování může docházet až v 5%, další častou chybou je tzv. stuttering (opakování baze, konkrétně G a T) (Nagaraj, 2006). V obvyklém protokolu je zařazena normalizace EST knihovny, což znamená snížení četnosti nejhojnějších EST tagů. Proto informace získaná z EST není kvantitativní, ale použitelná pouze k zjištění přítomnosti konkrétního transkriptu, případně k určení exonových oblastí genů. Při vynechání normalizačního kroku můžeme získat zevrubnou informaci o úrovni genové exprese, když uspořádáme tagy do clusterů reprezentujících jednotlivé transkripty (sekvence EST není unikátní pro každý

tanskript), a následně sečteme tagy náležící každému clusteru. EST jsou také sestavovány do contigů — sekvencí, které by měly pokrývat celý transkript.

SAGE

Metoda SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) umožňuje i kvantitativní vyhodnocení výsledků. Pracuje s krátkými charakteristickými úseky DNA o délce 10–17 nukleotidů, tzv. tagy, které jsou za pomoci restričních enzymů odštěpovány v přesně definovaných místech z cDNA. Tagy jsou posléze ligovány do kontaktmerů a sekvencovány. V následujícím počítačovém zpracování jsou tagy „vystříhány“ podle charakteristických sekvencí na koncích, roztrženy podle typů tagů a spočítány. Takovýto soubor dat pro jednu tkáň představuje knihovnu SAGE. Knihovny vytvořené v různých laboratořích lze mezi sebou srovnávat za podmínky, že byly vytvořeny použitím stejných restričních enzymů. Pro identifikaci jednotlivých tagů je obvykle využívána databáze SAGEmap. Ta přiřazuje jednotlivé tagy podle jejich sekvence k transkriptům definovaným v databázi UniGene. Data získaná pomocí SAGE jsou také veřejně dostupná v internetových databázích, jmenovitě například GEO (Gene Expression Omnibus). K rozšíření metody SAGE přispěl také pro akademický výzkum volně dostupný podrobný protokol (<http://www.sagenet.org>). Volná dostupnost protokolu také umožnila vznik různých vylepšení tohoto protokolu — patří mezi ně SAGE–Lite, který zařazuje ještě PCR amplifikaci cDNA, microSAGE umožňující využití řádově menšího množství vstupní RNA díky fixaci celé procedury k pevnému podkladu, LongSAGE a SuperSAGE prodlužující délku tagu až na 26 nukleotidů kvůli zvýšení specifity a v neposlední řadě DeepSAGE využívající inovativní, velmi rychlou, technologii sekvencování — pyrosequencing — firmy 454 Life Sciences (přehled v Patino et al., 2002).

MPSS

MPSS (Massively parallel signature sequencing) je podobně jako SAGE založeno na sekvenování tagů z jednotlivých mRNA transkriptů. Fragmenty cDNA jsou připravovány navázané k drobným kuličkám, které jsou při sekvencování uspořádány v jedné vrstvě. Tagy o délce 17 nukleotidů jsou sekvencovány za pomoci fluorescenčně značených adaptérů, přičemž obraz celé vrstvy je v každém kroku zaznamenán a následně je z jednotlivých fluorescenčních signálů sestavena sekvence (Reinartz et al., 2002). Hene se spolupracovníky (Hene et al., 2007) porovnával expresní profily lidských T-lymfocytů sestavené pomocí MPSS a LongSAGE. Výsledky vypovídají o výrazně vyšší chybovosti a nižší citlivosti metody MPSS.

DNA čipy

Hybridizační čipy jsou vyráběny celou škálou postupů, od tečkování drobnou jehlou na skleněný podklad, přes fotolitografické techniky, tisk na obdobě inkoustové tiskárny, až po postupy elektrochemické. Čipy lze využít dvěma různými způsoby - buď jako jednonálové, nebo jako dvoukanálové, s tím že čipy s nižší hustotou (tečkované, tištěné) bývají využívány převážně jako dvoukanálové. To znamená, že jeden čip je hybridizován zároveň s cDNA ze dvou vzorků, které chceme porovnat (např. zdravá proti rakovinné tkáni), kde každý ze nich je označen jinou fluorescenční barvou (často používaná je kombinace zelené Cy3 a červené Cy5). Data z takovýchto

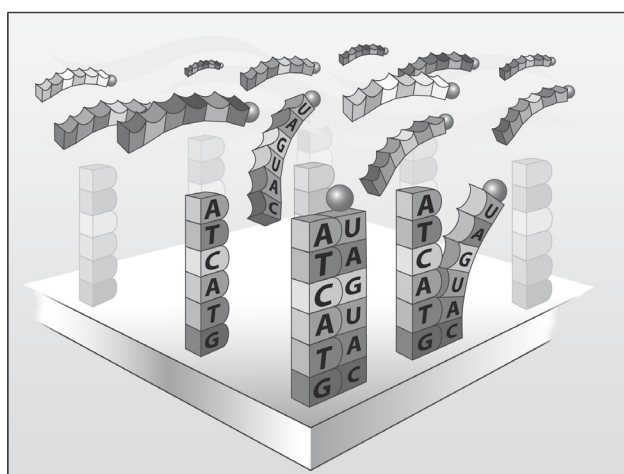
čipů mohou být použita pro relativní srovnání úrovně fluorescence jednotlivých signálů z konkrétního místa a následná identifikace genů se zvýšenou nebo sníženou expresí.

Jednokanálové čipy mají naopak vypovídat o absolutní hodnotě exprese. Jsou obvykle zpracovávány za standardizovaných podmínek ve specializovaných servisních laboratořích, a po kvantilové normalizaci (vycházející z předpokladu, že celkové množství mRNA se příliš nemění), případně po normalizaci podle hodnot tzv. „spike-in“ kontrolních prób (do experimentu je přidána RNA známé sekvence v několika přesných koncentracích) by měly být mezi sebou srovnatelné i výsledky z různých laboratoří.

Kvůli velkému počtu možných transkriptů je pro analýzu na úrovni celého transkriptomu nezbytné použít čipy s velkou hustotou prvků, jako například Affymetrix „GeneChip“, Applied Microarrays „CodeLink“, nebo Eppendorf „DualChip & Silverquant“. Výhodou těchto jednokanálových systémů je i již zmiňovaná srovnatelnost mezi různými experimenty, takže lze snadno vlastní experimentální data rozšířit o volně dostupná data z jiných experimentů (k dispozici např. v databázi Gene Expression Omnibus). Pro porovnání úrovně exprese několika vytipovaných genů je naopak výhodnější dvoukanálový systém — pro jedno srovnání stačí jeden čip, který může obsahovat próby pouze pro tyto vytipované transkripty.

Pro rozhodnutí mezi některou z variant

SAGE a hybridizačními technikami je potřeba zvážit několik faktorů — rozsah plánované studie, počet vzorků, množství materiálu na jeden vzorek a případně např. dostupnost automatizovaného sekvenátoru. Porovnání dvou knihoven SAGE vyžaduje přibližně 1.5 milionu osekvenovaných nukleotidů, což ve většině dnešních laboratoří už není problém. Velké množství vzorků najednou může být naopak s výhodou zpracováno pomocí hybridizačních čipů. Pro tyto čipy je potřeba 50–500 ng mRNA, zatímco SAGE knihovny byly úspěšně vytvořeny ze 100 tisíc buněk (Datson et al., 1999). Nevýhodou metody SAGE je výrazně větší časová náročnost na realizaci jednoho experimentu.



Obr. 1.D Hybridizace značených cRNA k próbám na čipu Affymetrix. (převzato z Affymetrix.com)

2. Cíle práce

Z předchozích studií je známo, že chromosom Z u kura domácího je obohacen o geny s preferenční expresí v samcích a zároveň ochuzen o geny s preferenční expresí v samicích tkáních (Storchova and Divina, 2006). Dále bylo prokázáno, že u většiny genů lokalizovaných na chromosomu Z chybí kompenzace genové dávky, takže u samců (homogametického pohlaví) jsou tyto geny exprimovány ve dvojnásobné míře (Itoh et al., 2007; Ellegren et al., 2007). Cílem mojí práce je zjistit, zda absence kompenzace genové dávky je hlavní příčinou nenáhodného genového obsahu chromosomu Z, případně zda jsou za tento jev zodpovědné i jiné evoluční tlaky. Pokud by hlavním selekčním faktorem byla chybící kompenzace dávky genů, byl by chromosom Z obohacen převážně o geny s dvojnásobnou expresí v samcích oproti samicím. Pokud jsou na chromosomu Z nenáhodně zastoupené i geny s většími expresními rozdíly, na evoluci chromosomu Z pravděpodobně působí i jiné selekční tlaky.

3. Materiál a metody

Pokusná zvířata, odběr tkání a izolace RNA

Tkáně pro izolaci RNA byly získány z 16–týdenních kuřat CB kongenní linie odvozené od bílé leghornky (kur domácí, *Gallus gallus* f. *domestica*). Ptáci byli chováni ve zvěřinci Koleč (ÚMG Akademie Věd České republiky). Se zvířaty bylo zacházeno v souladu se zákonem č. 264/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Kuřata byla zabita dekapitací, germinální tkáně (varlata nebo vaječníky) rychle vyjmuty z těla a v plastové zkumavce se šroubovacím uzávěrem zamrzena v tekutém dusíku, posléze přechovávána v chladícím boxu -80 °C. Po rozmrazení a homogenizaci byla vyizolována celková RNA za pomoci reagentie TRIzol LS (Invitrogen), dle návodu výrobce. Koncentrace RNA byla změřena při 260 nm na nástroji NanoDrop (NanoDrop Technologies), integrita zkontrolována na bioanalyzátoru Agilent 2100 — RNA Lab-On-a-Chip (Agilent Technologies).

Hybridizace čipů

Příprava fragmentované fluorescenčně značené cRNA a její hybridizace na Affymetrix GeneChips byla provedena podle standardizovaného protokolu v Servisní laboratoři funkční genomiky a bioinformatiky ÚMG AV ČR. Celkem byly v experimentu použity 4 čipy. Pro kompenzaci variance mezi jedinci byly pro vytvoření jednoho vzorku zkombinovány izoláty ze čtyř zvířat. Dva z čipů byly hybridizovány s kombinovanými vzorky z varlat, druhé dva čipy byly hybridizovány se vzorky z vaječnicků.

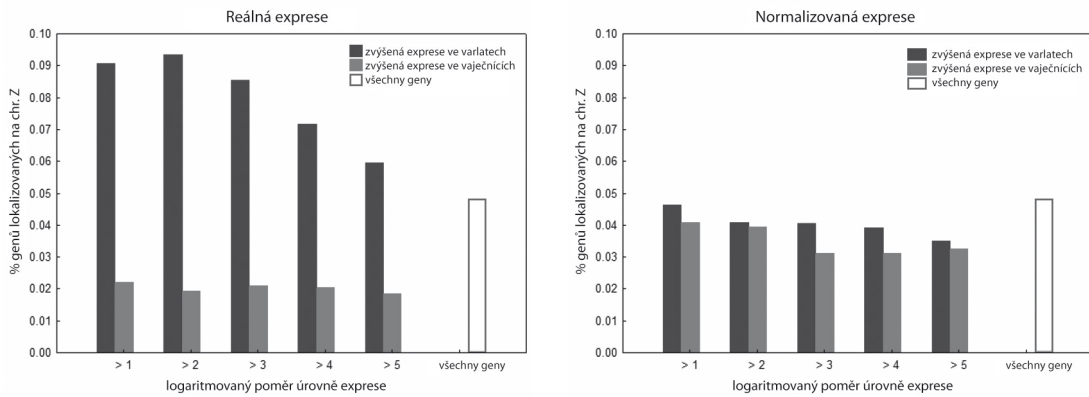
Analýza dat

Analýza získaných dat byla provedena v balíku BioConductor, nadstavbě statistického programu R. Pro anotaci čipů bylo použito alternativní přiřazení jednotlivých prób na čipu transkriptům (cdf), „ggchickengensg“ (Dai et al., 2005), vytvořené alignmentem prób k aktuálnímu genomu kura domácího, tak jak je publikovaný v databázi Ensembl (sestavení WASHUC2, květen 2006). Data byla normalizována metodou gcRMA (Irizarry et al., 2003). Pro porovnání úrovní exprese byl využit balík Limma (Smyth, 2005). Z porovnání byly vyřazeny geny s absolutní úrovní průměrné exprese menší než 100 a geny označené metodou MAS5 jako nepřítomné, nebo okrajově přítomné. Přiřazení transkriptů k jednotlivým chromosomům bylo provedeno pomocí komponenty BioMart, též na základě databáze Ensembl (sestavení WASHUC2, květen 2006).

4. Výsledky

Nalezli jsme 5373 genů signifikantně exprimovaných v ovarii a 5413 genů exprimovaných ve varlatech. Mezi exprimovanými geny mělo 2399 signifikantně vyšší expresi ve varlatech při srovnání proti vaječnicům, 2658 signifikantně vyšší expresi ve vaječnicích (srovnáno s varlaty). Dále jsme testovali, zda geny s preferenční expresí v některé z tkání mají nenáhodné umístění v genomu s ohledem na chromosom Z. Zjistili jsme, že chromosom Z je obohacen o geny s vyšší expresí v samcích. Toto obohacení je signifikantní jak u genů s dvojnásobným rozdílem v expresi, tak u genů s rozdílem větším. Naopak geny s vyšší expresí v samicích jsou na chromosomu Z zastoupeny v menší míře, než by odpovídalo náhodnému rozložení genomu.

Pokud data normalizujeme na počet chromosomů Z, tj. hodnoty exprese genů lokalizovaných na chromosomu Z u vzorků z varlat vydělíme dvěma, oba rozdíly zmizí.



Obr. 4.A Procento zastoupení genů s preferenční expresí ve varlatech a ve vaječnicích na chromosomu Z, rozděleno podle poměru úrovně exprese v jednotlivých pohlavích. (experimentální data)

5. Závěr

U kura domácího je pravděpodobně nejdůležitější mechanismus, zodpovědný za „maskulinizaci“ a „defeminizaci“ pohlavního chromosomu Z, epigenetického charakteru. Konkrétně je to nepřítomnost kompenzace dávky genů, a to ze dvou důvodů. Za prvé u všech genů lokalizovaných na Z způsobuje dvojnásobnou expresi v samcích oproti samicím, za druhé usnadňuje vznik genů s většími expresními rozdíly mezi samci a samicemi.

Vzhledem k tomu, že ostatní organismy zkoumané v tomto směru kompenzací genové dávky mají, evoluční tlaky způsobující nenáhodný genový obsah pohlavních chromosomů u těchto organismů budou pravděpodobně odlišné od těch u kuřete. U savců hraje zajisté nezanedbatelnou roli další epigenetický faktor — inaktivace pohlavních chromosomů během meiosis. U drosofily je charakter genového obsahu párového pohlavního chromosomu odlišný od savčího, což může znamenat, že mechanismy ovlivňující genový obsah se liší alespoň v míře významnosti od těch savčích.

6. Seznam použité literatury

- AVNER P, HEARD E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001 Jan; **2(1)**:59-67.
- BAKER BS, GORMAN M, MARÍN I. Dosage compensation in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 1994; **28**:491-521.
- BENDER BG, LINDEN MG, HARMON RJ. Life adaptation in 35 adults with sex chromosome abnormalities. *Genet Med.* 2001 May-Jun; **3(3)**:187-91.
- BETANCOURT AJ, PRESGRAVES DC, SWANSON WJ. A test for faster X evolution in *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 2002 Oct; **19(10)**:1816-9.
- BORTOLUZZI S, RAMPOLDI L, SIMIONATI B, ZIMBELLO R, BARBON A, D'ALESSI F, TISO N, PALLAVICINI A, TOPPO S, CANNATA N, VALLE G, LANFRANCHI G, DANIELI GA. A comprehensive, high-resolution genomic transcript map of human skeletal muscle. *Genome Res.* 1998 Aug; **8(8)**:817-25.
- BULL JJ, BULMER MG. The evolution of XY females in mammals. *Heredity.* 1981 Dec; **47(Pt 3)**:347-65.
- BULL JJ. Evolution of Sex Determining Mechanisms. 1983; Benjamin Cummings, Menlo Park, California.
- CARVALHO AB, DOBO BA, VIBRANOVSKI MD, CLARK AG. Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 6; **98(23)**:13225-30.
- COUNTERMAN BA, ORTÍZ-BARRIENTOS D, NOOR MA. Using comparative genomic data to test for fast-X evolution. *Evolution Int J Org Evolution.* 2004 Mar; **58(3)**:656-60.
- DAI M, WANG P, BOYD AD, KOSTOV G, ATHEY B, JONES EG, BUNNEY WE, MYERS RM, SPEED TP, AKIL H, WATSON SJ, MENG F. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res.* 2005 Nov 10; **33(20)**:e175.
- DATSON NA, VAN DER PERK-DE JONG J, VAN DEN BERG MP, DE KLOET ER, VREUGDENHIL E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res.* 1999 Mar 1; **27(5)**:1300-7.
- DE ALMEIDA TOLEDO LF, FORESTI F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica.* 2001; **111(1-3)**:91-100.
- DIVINA P, VLCEK C, STRNAD P, PACES V, FOREJT J. Global transcriptome analysis of the C57BL/6J mouse testis by SAGE: evidence for nonrandom gene order. *BMC Genomics.* 2005 Mar 5; **6(1)**:29.
- DOBZHANSKY T. Genetics and the origin of species. 1937; Columbia University Press, New York.
- ELLEGREN H, HULTIN-ROSENBERG L, BRUNSTRÖM B, DENCKER L, KULTIMA K, SCHOLZ B. Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes. *BMC Biol.* 2007 Sep 20; **5**:40.
- FOSTER JW, GRAVES JA. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 1; **91(5)**:1927-31.
- GIBSON JR, CHIPPINDALE AK, RICE WR. The X chromosome is a hot spot for sexually antagonistic fitness variation. *Proc Biol Sci.* 2002 Mar 7; **269(1490)**:499-505.
- GRAVES JA, KOINA E, SANKOVIC N. How the gene content of human sex chromosomes evolved. *Curr Opin Genet Dev.* 2006 Jun; **16(3)**:219-24.
- GRAVES JA. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell.* 2006 Mar 10; **124(5)**:901-14.
- GRÜTZNER F, RENS W, TSEND-AYUSH E, EL-MOGHARBEL N, O'BRIEN PC, JONES RC, FERGUSON-SMITH MA, MARSHALL GRAVES JA. In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature.* 2004 Dec 16; **432(7019)**:913-7.
- HALDANE JBS. Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *J Genet.* 1922; **12**: 101-109.
- HANDLEY LJ, CEPLITIS H, ELLEGREN H. Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *Genetics.* 2004 May; **167(1)**:367-76.
- HENE L, SREENU VB, VUONG MT, ABIDI SH, SUTTON JK, ROWLAND-JONES SL, DAVIS SJ, EVANS EJ. Deep analysis of cellular transcriptomes - LongSAGE versus classic MPSS. *BMC Genomics.* 2007 Sep 24; **8**:333.
- CHARLESWORTH B, COYNE JA, BARTON NH. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Amer. Natur.* 1987; **130**: 113-146.
- IRIZARRY RA, HOBBS B, COLLIN F, BEAZER-BARCLAY YD, ANTONELLIS KJ, SCHERF U, SPEED TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003 Apr; **4(2)**:249-64.
- ITOY Y, HORI T, SAITOH H, MIZUNO S. Chicken spindlin genes on W and Z chromosomes: transcriptional expression of both genes and dynamic behavior of spindlin in interphase and mitotic cells. *Chromosome Res.* 2001; **9(4)**:283-99.
- ITOY Y, MELAMED E, YANG X, KAMPF K, WANG S, YEHYA N, VAN NAS A, REPLOGLE K, BAND MR, CLAYTON DF, SCHADT EE, LUSIS AJ, ARNOLD AP. Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *J Biol.* 2007; **6(1)**:2.
- KELLEY RL. Path to equality strewn with roX. *Dev Biol.* 2004 May 1; **269(1)**:18-25.
- KHIL PP, SMIRNOVA NA, ROMANIENKO PJ, CAMERINI-OTERO RD. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 2004 Jun; **36(6)**:642-6.

- KHIL PP, SMIRNOVA NA, ROMANIENKO PJ, CAMERINI-OTERO RD.** The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 2004 Jun; **36(6)**:642-6.
- LAHN BT, PAGE DC.** Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science.* 1999 Oct 29; **286(5441)**:964-7.
- LAHN BT, PEARSON NM, JEGALIAN K.** The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet.* 2001 Mar; **2(3)**:207-16.
- LERCHER MJ, URRUTIA AO, HURST LD.** Evidence that the human X chromosome is enriched for male-specific but not female-specific genes. *Mol Biol Evol.* 2003 Jul; **20(7)**:1113-6.
- LIFSCHYTZ E, LINDSLEY DL.** The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis (Drosophila-allorecycling-chromosome evolution-male sterility-dosage compensation). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jan; **69(1)**:182-6.
- LINDEN MG, BENDER BG, ROBINSON A.** Sex chromosome tetrasomy and pentasomy. *Pediatrics.* 1995 Oct; **96(4 Pt 1)**:672-82.
- LYON MF.** Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961 Apr 22; **190**:372-3.
- MARSHALL GRAVES JA, SHETTY S.** Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool.* 2001 Sep 15; **290(5)**:449-62.
- MASLY JP, PRESGRAVES DC.** High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 2007 Sep; **5(9)**:e243.
- MCCARREY JR, THOMAS K.** Human testis-specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene. *Nature.* 1987 Apr 2-8; **326(6112)**:501-5.
- MCKEE BD, HANDEL MA.** Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma.* 1993 Jan; **102(2)**:71-80.
- MEYER BJ.** Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet.* 2000 Jun; **16(6)**:247-53.
- MIZUNO S, KUNITA R, NAKABAYASHI O, KURODA Y, ARAI N, HARATA M, OGAWA A, ITOH Y, TERANISHI M, HORI T.** Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation. *Cytogenet Genome Res.* 2002; **99(1-4)**:236-44.
- MULLER HJ, PONTECORVO G.** Recessive genes causing interspecific sterility and other disharmonies between *Drosophila melanogaster* and simulans. *Genetics.* 1942; **27**: 157.
- MULLER HJ.** A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* 1914; **17**: 325-336.
- NAGARAJ SH, GASSER RB, RANGANATHAN S.** Ahitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Brief Bioinform.* 2007 Jan; **8(1)**:6-21.
- NANDA I, ZEND-AJUSCH E, SHAN Z, GRÜTZNER F, SCHARTL M, BURT DW, KOEHLER M, FOWLER VM, GOODWIN G, SCHNEIDER WJ, MIZUNO S, DECHANT G, HAAF T, SCHMID M.** Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; **89(1-2)**:67-78.
- OHNO S.** Sex Chromosomes and Sex Linked Genes. 1967; Springer, Berlin.
- ORR HA.** Haldane's rule has multiple genetic causes. *Nature.* 1993 Feb 11; **361(6412)**:532-3.
- PARISI M, NUTTALL R, NAIMAN D, BOUFFARD G, MALLEY J, ANDREWS J, EASTMAN S, OLIVER B.** Paucity of genes on the *Drosophila* X chromosome showing male-biased expression. *Science.* 2003 Jan 31; **299(5607)**:697-700.
- PATINO WD, MIAN OY, HWANG PM.** Serial analysis of gene expression: technical considerations and applications to cardiovascular biology. *Circ Res.* 2002 Oct 4; **91(7)**:565-9.
- REINARTZ J, BRUYNS E, LIN JZ, BURCHAM T, BRENNER S, BOWEN B, KRAMER M, WOYCHIK R.** Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2002 Feb; **1(1)**:95-104.
- REINKE V, GIL IS, WARD S, KAZMER K.** Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Development.* 2004 Jan; **131(2)**:311-23.
- REINKE V.** Sex and the genome. *Nat Genet.* 2004 Jun; **36(6)**:548-9.
- RICE WR.** Sex-chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution.* 1984; **38**:735-742
- ROYCE TE, ROZOWSKY JS, GERSTEIN MB.** Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic Acids Res.* 2007; **35(15)**:e99.
- SAIFI GM, CHANDRA HS.** An apparent excess of sex- and reproduction-related genes on the human X chromosome. *Proc Biol Sci.* 1999 Jan 22; **266(1415)**:203-9.
- SMYTH GK, MICHAUD J, SCOTT HS.** Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics.* 2005 May 1; **21(9)**:2067-75.
- STEVANOVIĆ M, LOVELL-BADGE R, COLLIGNON J, GOODFELLOW PN.** SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet.* 1993 Dec; **2(12)**:2013-8.
- STORCHOVÁ R, DIVINA P.** Nonrandom representation of sex-biased genes on chicken Z chromosome. *J Mol Evol.* 2006 Nov; **63(5)**:676-81.

- SWANSON WJ, CLARK AG, WALDRIP-DAIL HM, WOLFNER MF, AQUADRO CF.** Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; **98**:7375–7379.
- TAO Y, HARTL DL.** Genetic dissection of hybrid incompatibilities between *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. III. *Heterogeneous accumulation of hybrid incompatibilities, degree of dominance, and implications for Haldane's rule*. *Evolution Int J Org Evolution*. 2003 Nov; **57**(11):2580-98.
- THORNTON K, BACHTROG D, ANDOLFATTO P.** X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: no evidence for faster-X protein evolution. *Genome Res*. 2006 Apr; **16**(4):498-504.
- TORGERSON DG, SINGH RS.** Sex-linked mammalian sperm proteins evolve faster than autosomal ones. *Mol Biol Evol*. 2003 Oct; **20**(10):1705-9.
- TRUE JR, WEIR BS, LAURIE CC.** A genome-wide survey of hybrid incompatibility factors by the introgression of marked segments of *Drosophila mauritiana* chromosomes into *Drosophila simulans*. *Genetics*. 1996 Mar; **142**(3):819-37.
- TURNER JM, MAHADEVAIAH SK, FERNANDEZ-CAPETILLO O, NUSSENZWEIG A, XU X, DENG CX, BURGOYNE PS.** Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet*. 2005 Jan; **37**(1):41-7.
- VALLENDER EJ, LAHN BT.** How mammalian sex chromosomes acquired their peculiar gene content. *Bioessays*. 2004 Feb; **26**(2):159-69.
- VOLFF JN, SCHARTL M.** Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica*. 2001; **111**(1-3):101-10.
- WANG PJ, MCCARREY JR, YANG F, PAGE DC.** An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet*. 2001 Apr; **27**(4):422-6.
- WU CI, DAVIS AW.** Evolution of postmating reproductive isolation: The composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am Nat*. 1993; **142**:187–212.
- YAMADA D, KOYAMA Y, KOMATSUBARA M, URABE M, MORI M, HASHIMOTO Y, NII R, KOBAYASHI M, NAKAMOTO A, OGIHARA J, KATO J, MIZUNO S.** Comprehensive search for chicken W chromosome-linked genes expressed in early female embryos from the female-minus-male subtracted cDNA macroarray. *Chromosome Res*. 2004; **12**(7):741-54.
- ZECHNER U, WILDA M, KEHRER-SAWATZKI H, VOGEL W, FUNDELE R, HAMEISTER H.** A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends Genet*. 2001 Dec; **17**(12):697-701.