

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Katedra genetiky



**Využití BAC klonů při studiu pohlavního
chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella*
(Lepidoptera: Tortricidae)**

Magisterská práce

2009

Martina Dalíková

Vedoucí práce: Prof. RNDr. František Marec, CSc.

Dalíková M., 2009: Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) [BAC clones as a tool for the study of codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) W chromosome. Mgr. Thesis, in Czech]. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. Pp. 30.

Annotation:

In the present study, the W sex-chromosome of the codling moth was studied by means of fluorescence in situ hybridization (FISH) with probes prepared from bacterial artificial chromosome (BAC), which were isolated from the codling moth BAC library. The BAC library was screened for clones derived from both the W and Z sex chromosomes using three sets of molecular markers of codling moth sex chromosomes. A total of 54 BAC clones have been obtained. In this work, only 3 W-derived BAC clones and 1 Z-derived BAC clone were further characterized by BAC-FISH mapping on chromosome preparations of pachytene oocytes; the other BAC clones have been retained for next studies. Whereas the Z-BAC probe provided a discrete hybridization signal on the Z chromosome, and surprisingly on the W chromosome, the W-BAC probes showed multiple hybridization signals distributed on the whole W chromosome, suggesting that they are mainly composed of repetitive sequences, which occur in multiple clusters on the W chromosome. The specific pattern of W-BAC hybridization signals along with the discrete signal of the Z-BAC enabled us to discriminate left/right orientation of both the W and Z chromosomes and examine specificity of W-Z pairing during meiotic prophase I.

Finanční podpora:

Práce byla financována z grantů Grantové agentury ČR, reg. č. 206/06/1860 (do r. 2008 včetně) a 523/09/2106 (v r. 2009).

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji magisterskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2009

.....
Martina Dalíková

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli za přijetí do laboratoře, zadání zajímavého tématu a ochotu vždy se mi věnovat. Dále bych chtěla poděkovat Magdě Vítkové, Jindře Šíchové, Petru Nguyenovi a Ivě Fukové za cenné rady a vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Mé díky patří i naší paní laborantce, Marii Korchové, za svědomitou péči o chov obalečů jablečných.

Ráda bych také poděkovala Sašovi a všem mým kamarádům za podporu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé mé rodině, která mi umožnila studovat a po celou dobu ve mně neztrácela důvěru.

1. Úvod.....	1
1.1. Pohlavní chromosomy	1
1.1.1. Mechanismy degenerace chromosomů W a Y	1
1.1.2. Genová konverze na Y chromosomu člověka	2
1.2. Pohlavní chromosomy motýlů.....	3
1.2.1. Pohlavní chromosomy obaleče jablečného <i>Cydia pomonella</i>	5
1.3. Bakteriální umělé chromosomy	5
2. Cíle práce.....	7
3. Materiál a metody.....	8
3.1. Hmyz	8
3.2. Prohledávání BAC knihovny obaleče jablečného <i>C. pomonella</i>	8
3.2.1. Příprava sond podle W-specifických sekvencí.....	8
3.2.2. Vlastní prohledávání BAC knihovny	9
3.2.3. Odečítání výsledků	9
3.3. Izolace BAC DNA.....	10
3.4. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	11
3.4.1. Příprava chromosomálních preparátů.....	11
3.4.2. Značení sondy.....	11
3.4.3. Izolace genomové DNA pro výrobu samčího kompetitora	11
3.4.4. Vlastní provedení fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	12
3.5. Prodloužení CpW5 sekvence pomocí inverzní PCR	13
3.5.1. Southernova hybridizace	13
3.5.2. Inverzní PCR	14
3.5.3. Klonování a sekvenování fragmentů z inverzní PCR.....	14
4. Výsledky.....	16
4.1. Selektce klonů z genomové knihovny obaleče jablečného.....	16
4.2. Mapování BAC klonů	17
4.3. Studium párování pohlavních chromosomů obaleče jablečného	17
4.4. Prodloužení CpW5 sekvence pomocí inverzní PCR	18
5. Diskuse	19
5.1. Selektce BAC klonů pomocí molekulárních markerů pohlavních chromosomů	19
5.2. BAC klony odvozené z chromosomu W	19
5.2. Lokalizace vyselektovaných klonů.....	19
5.3. Hybridizace DNA amplifikované pomocí polymerázy Φ 29	20
5.4. Párování pohlavních chromosomů WZ.....	21
6. Souhrn	23
7. Literatura	24

1. Úvod

1.1. Pohlavní chromosomy

Většina mnohobuněčných organismů rozmnožujících se sexuálně má oddělená pohlaví. Dráha, která vede k vývoji jedince určitého pohlaví, může být spuštěna buď faktory prostředí, nebo genetickým signálem, takovýto gen je pak obvykle lokalizován na pohlavních chromosomech.

Existují dva základní systémy pohlavních chromosomů, a to XX/XY s heterogametickými samci a WZ/ZZ s heterogametickými samicemi. Od obou systémů pohlavních chromosomů existují různé početní varianty včetně systému, kde chybí heteromorfní chromosom Y nebo W. Takovým extrémistou, co se počtu pohlavních chromosomů týče, je bezpochyby ptakopysk *Ornithorhynchus anatinus*, který má pět párů pohlavních chromosomů. Dalším takovým příkladem může být termit *Incisstermes schwarzi*, u nějž pohlavní chromosomy (8 párů) tvoří polovinu všech jeho chromosomů (Charlesworth a Charlesworth 2005).

Pohlavní chromosomy vznikly v evoluci několikrát nezávisle v různých skupinách organismů. Předpokládá se, že se vyvinuly z páru autosomů, na němž se objevila alela determinující pohlaví. Důležitým momentem v evoluci pohlavních chromosomů byla restrikce rekombinace v okolí genu determinujícího pohlaví. Postupně se na chromosomech hromadily geny výhodné pro jedno pohlaví a nevýhodné pro to druhé a docházelo k rozšiřování nerekombinujícího úseku, protože bylo výhodné, aby takovéto geny byly ve vazbě s genem determinujícím pohlaví. Restrikce rekombinace ve svém důsledku vedla k degeneraci a genetické erozi chromosomů W a Y. Ty většinou obsahují pouze málo aktivních genů, velké množství nahromaděných repetitivních sekvencí, často jsou heteromorfní a z velké části tvořené heterochromatinem (Lucchesi 1999, Charlesworth a Charlesworth 2005).

1.1.1. Mechanismy degenerace chromosomů W a Y

Absence rekombinace v části nebo na celém heteromorfním chromosomu vede k akumulaci mutací. Vzhledem k tomu, že alely genů z původních autosomů se na chromosomu W a Y nikdy neocitnou v homozygotním stavu, nepůsobí zde selekce proti škodlivým recesivním mutacím. Navíc geny na těchto chromosomech mají v populaci třikrát méně kopií než geny na chromosomech X a Z a čtyřikrát méně než geny na autosomech. Geny na těchto chromosomech mají tedy sníženou efektivní velikost populace, a tím pádem zde může docházet k fixaci negativních mutací genetickým driftem. Tyto jevy však sami o sobě nedokáží vysvětlit rychlost degenerace heteromorfních chromosomů, důležitou úlohu zde hrají i další procesy jako je Müllerova rohatka, selekce na pozadí, Hill-Robertsonův efekt a evoluční „svezení“ („hitchhiking“) (Charlesworth a Charlesworth 2000).

Teorie Müllerovy rohatky popisuje jev, kdy v populacích o konečné velikosti dochází k náhodným ztrátám chromosomů, které obsahovaly nejméně mutací. V systému, kde chromosom s menším množstvím mutací nemůže vzniknout během rekombinace, je tedy jedinou šancí

na obnovení chromosomu s malým počtem mutací málo pravděpodobný vznik zpětné mutace (Charlesworth 1996, Charlesworth a Charlesworth 2000).

Teorie evolučního „svezení“ („hitchhiking“) popisuje způsob fixace negativní alely, která je v těsné vazbě s některou výhodnou alelou. Vzhledem k tomu, že na chromosomech W a Y neprobíhá crossing-over, může se tento jev uplatnit u všech jejich genů. Tento proces však dobře funguje pouze v případech, kdy na jednom chromosomu není více negativních mutací, pokud ovšem výhodná alela není selektována tak silně, že překoná snížení fitness způsobené negativními mutacemi (Charlesworth 1996, Charlesworth a Charlesworth 2000).

Selekce na pozadí označuje proces, kdy mírně výhodná mutace může být fixována pouze v případě, že se nenachází v těsné vazbě se škodlivou mutací. Jinak řečeno v nerekombinující oblasti heteromorfních chromosomů se může selekcí fixovat pouze taková výhodná mutace, která zvyšuje fitness jedince více, než o kolik ho sníží škodlivé mutace v téže oblasti (Charlesworth 1996, Charlesworth a Charlesworth 2000).

Hill-Robertsonův efekt je jev podobný Müllerově rohatce a selekci na pozadí, ty lze z určitého úhlu pohledu považovat za speciální varianty Hill-Robertsonova efektu. Tento jev se týká alel, na něž působí pouze slabá selekce a které jsou ve vazbě a interagují spolu. V takovém případě si alely navzájem brání v tom, aby ta výhodná z nich byla uchována, zatím co ta škodlivá eliminována (Charlesworth a Charlesworth 2000).

Dalším zdrojem degenerace pohlavních chromosomů W a Y je akumulace různých repetit. Jak mobilní elementy, tak tandemové repetice se přednostně šíří v oblastech, kde neprobíhá crossing-over a odkud tudíž nemohou být pomocí rekombinace odstraněny. Navíc na ně na chromosomech W a Y působí nižší selekční tlak (Charlesworth 1991, Steinemann a Steinemann 2005).

1.1.2. Genová konverze na Y chromosomu člověka

Přestože pohlavní chromosomy W a Y obsahují značné množství repetit a různých pseudogenů, nachází se na nich i nezanedbatelné množství funkčních genů, které se kvůli absenci rekombinace nemají jak zbavovat mutací, a jsou tedy v podstatě odsouzeny k zániku mechanismy uvedenými v předchozí kapitole. Během evoluce se proto pravděpodobně vyvinuly mechanismy umožňující opravu funkčních genů v nerekombinující oblasti heteromorfních chromosomů.

Skaletsky a kol. (2003) objevili v nerekombinující oblasti lidského Y chromosomu 8 rozsáhlých palindromů. Tyto palindromické sekvence mají ramena dlouhá od 9 kbp do 1,45 Mbp, která jsou od sebe oddělena mezerníkovými sekvencemi o délce 2-170 kbp. Palindromy obsahují ve více kopiích několik genů, které se exprimují výhradně ve varlatech. Jednotlivá ramena palindromů a v nich obsažené kopie genů vykazují vysokou míru identity (99,9-100%). Palindromické sekvence tedy v evoluci pravděpodobně vznikly genovou duplikací a jejich vysoký stupeň homologie je udržován pomocí genové konverze. Ta tak zároveň slouží k případné opravě mutované alely na alelu

původní. Genová konverze však samozřejmě není směřovaný děj, takže může docházet i k opačnému procesu, kdy z jedné divoké alely a jedné mutované vzniknou dvě alely mutované.

Podobné palindromické sekvence byly nalezeny i u primátů. Rozen a kol. (2003) našli několik palindromů ortologních k těm lidským u šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*), šimpanze bonobo (*Pan paniscus*) a gorily (*Gorilla gorilla*). Tyto palindromy tedy pravděpodobně vznikly už u společného předka člověka, šimpanze a gorily. U šimpanze, kde byly palindromy osekvenovány celé, bylo navíc potvrzeno, že i zde dochází ke genové konverzi.

1.2. Pohlavní chromosomy motýlů

Pro řád Lepidoptera je charakteristický velký počet malých uniformních holokinetických chromosomů a chromosomální určení pohlaví typu WZ, což znamená, že heterogametické pohlaví je samičí. Celá skupina však nemá jednotný systém pohlavních chromosomů, ale objevují se zde různé numerické varianty, jako W_1W_2Z/ZZ (např. u populace štětconoše *Orgyia thyellina* z oblasti Naganuma, Yoshido a kol. 2005b) nebo $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ (např. u populace martináče *Samia cynthia*, z oblasti Nagano, Yoshido a kol. 2005b). Existuje také varianta Z0/ZZ, ta může vzniknout druhotnou ztrátou chromosomu W, jako je tomu např. u můry *Orthosia gracilis* (Traut a Marec 1996) nebo u martináče *Samia cynthia ricini* (Yoshido a kol. 2005b). Zároveň je však tento systém považován za původnější, protože se nachází u primitivních druhů motýlů jako je např. chrostíkovník *Micropterix calthella* (Traut a Marec 1997). Navíc byl systém pohlavních chromosomů Z0/ZZ prokázán i u sesterské skupiny chrostíků, Trichoptera (Marec a Novák 1998). Chromosom W vznikl v evoluci řádu Lepidoptera až u společného předka skupin Dytrisia a Tischeriina, ty však zahrnují 98% známých druhů motýlů. V současné době existují dvě hypotézy o vzniku tohoto chromosomu. Podle jedné chromosom W vznikl z autosomu, jehož homolog zřúzoval s původním chromosomem Z. Druhá teorie předpokládá, že tento chromosom vznikl z B chromosomu (Lukhtanov 2000, Traut a kol. 2007).

W chromosom motýlů je převážně tvořen heterochromatinem. Zatím však není mnoho informací o molekulárním složení tohoto chromosomu. Pomocí metody komparativní genomové hybridizace (CGH) s různě značenou samčím a samičím DNA bylo zjištěno, že chromosom W obsahuje dva typy sekvencí. Jedná se o W-specifické sekvence a sekvence nacházející se i jinde v genomu, které se na chromosomu W akumulovaly. Poměr a distribuce těchto dvou typů sekvencí jsou druhově specifické, např. vysoký podíl W specifických sekvencí byl zjištěn u zavíječe moučného *Ephestia kuehniella*, naproti tomu takovéto sekvence téměř chybí u bource morušového, *Bombyx mori* (Traut a kol. 1999), a liší se i u blízké příbuzných druhů (Vítková a kol. 2007). Přestože v roce 2004 byl dvěma skupinami nezávisle osekvenován genom bource morušového *B. mori*, v obou případech si pro sekvenování vybrali jedince samčího pohlaví, takže W-sekvence zde chybí (Traut a kol. 2007). Bylo však osekvenováno 14 W-specifických klonů bakteriálních umělých chromosomů ("Bacterial Artificial Chromosome"; BAC) bource, které obsahovaly různé mobilní elementy, převážně LTR a non-LTR retrotransposony (Abe a kol. 2005).

Doposud bylo na chromosomu W nalezeno pouze několik genů, je to feminizační faktor Fem a gen ovlivňující velikost vajíček Esd u *B. mori*, také je zde pravděpodobně lokalizován faktor zabíjející samce u zavíječe *Ephestia kuehniella*. Žádný z nich však není osekvenován nebo přesně lokalizován (Traut a kol. 2007). W chromosom je však pravděpodobně zdrojem části malých RNA molekul, které interagují s Piwi proteinem (tzv. piRNA), ty jsou v ováriích bource morušového produkovány jako ochrana před šířením mobilních elementů v zárodečné linii (Kawaoka a kol. 2008).

V samičích interfázních jádrech chromosom W tvoří heterochromatinové tělísko, tzv. sex-chromatin. To je zvláště dobře pozorovatelné v polyploidních buňkách, které se u motýlů nachází v celé řadě tkání. Ve většině buněk se vyskytuje jen jedno heterochromatinové tělísko, které se zvětšuje se zvyšujícím se stupněm polyploidizace, a tedy s rostoucím počtem kopií chromosomu W v tělísku. Ve folikulárních a nutritivních buňkách se však nachází celá řada malých heterochromatinových tělísek. Pomocí autoradiografie ³H-thymidinu bylo zjištěno, že obsah DNA v heterochromatinovém tělísku koreluje s obsahem DNA v celém polyploidním jádře. Z toho vyplývá, že heterochromatinizovaná DNA se replikuje se stejnou frekvencí jako ostatní DNA v buňce (Traut a Marec 1996).

Chromosom Z, na rozdíl od chromosomu W, obsahuje značné množství genů. Zajímavé je, že zde však pravděpodobně nedochází ke kompenzaci genové dávky. První důkaz o tom přinesli Johnson a Turner (1979), kteří zjistili, že u motýlů *Heliconius melpomene* a *H. erato* je aktivita Z-lokalizovaného enzymu 6-fosfoglukonát dehydrogenázy dvakrát větší u samců než u samic. Podobně tomu je i u genu T15 bource morušového, jehož mRNA je u samce produkována ve dvojnásobném množství (Suzuki a kol. 1998). Zvýšenou expresi u samců *B. mori* pozoroval i Koike a kol. (2003) u 11 ze 14 genů, které se našli na Z chromosomu v oblasti genu Bmkettin. Další dva geny měly u obou pohlaví srovnatelnou expresi a gen Bmlap (gen pro protein podobný leucyl aminopeptidáze) byl dokonce u samic exprimován více. Nejrozsáhlejší studii na toto téma provedl Zha a kol. (2008). V této práci sledovali expresi 579 genů lokalizovaných na chromosomu Z bource morušového *B. mori* v různých tkáních. Přestože je míra exprese genů u samců a samic závislá na typu tkáně, celkové výsledky prokazatelně ukazují vyšší exprese většiny genů u samců.

Přestože není známa homologní oblast mezi pohlavními chromosomy W a Z motýlů, během meiózy dochází k jejich párování a tvorbě synaptonemálního komplexu (SC). Průběh tohoto procesu byl studován u zavíječe moučného *Ephestia kuehniella*. U *E. kuehniella* jsou chromosomy W a Z zcela nehomologní a navíc mají různou délku (chromosom Z je delší). Párování pohlavního bivalentu WZ probíhá v několika krocích. Zahajuje ho jedna koncová část laterálních elementů (LE) obou chromosomů tím, že se k sobě přiblíží na začátku pachytene, tedy opožděně v době, kdy jsou autosomy už zcela spárované. V dalším kroku dojde k podélnému přiložení a částečnému párování obou LE o nestejných délkách. V následujícím kroku dojde k obtočení delšího LE chromosomu Z okolo kratšího LE W chromosomu. Konečným stádiem je stav, kdy dojde k vyrovnání délek obou LE, tzv. „synaptickému přizpůsobení“, za vzniku plnohodnotného SC (Marec a Traut 1994)

1.2.1. Pohlavní chromosomy obaleče jablečného *Cydia pomonella*

Modelový druh mé práce, obaleč jablečný *Cydia pomonella* má 28 párů holokinetických chromosomů, které je možno rozdělit podle velikosti do 5 skupin, z nichž nejpočetnější jsou středně velké chromosomy. Má WZ/ZZ systém pohlavních chromosomů, charakteristický pro většinu motýlů skupiny Dytrisia. Chromosom Z je největším elementem v karyotypu a je tvořen euchromatinem. Naopak chromosom W je celý tvořen heterochromatinem. Výsledky komparativní genomové hybridizace (CGH) napovídají, že převážně obsahuje nahromaděné repetice z celého genomu (Fuková a kol. 2005).

Při sekvenování mikrodisekovaných chromosomů W obaleče jablečného bylo nalezeno několik typů sekvencí. Jednak byly nalezeny W-specifické sekvence, které se v genomu nachází v jedné (CpW5) nebo několika málo kopiích (CpW2). Další skupinu tvořily sekvence nacházející se po celém genomu, ale obohacené na chromosomu W (např. sekvence CpW27). Byly nalezeny i sekvence obohacené na obou pohlavních chromosomech a také převážně autosomální sekvence. Většina takto získaných sekvencí nevykazovala žádnou signifikantní homologii s dosud známými sekvencemi, ale tři sekvence byly homologní se známými LTR a non-LTR retrotransposony (Fuková a kol. 2007).

1.3. Bakteriální umělé chromosomy

V současné době existuje řada vektorů, které mohou sloužit ke klonování velkých fragmentů DNA. Nejstarším takovým vektorem jsou kvasinkové umělé chromosomy (YAC, “Yeast Artificial Chromosome”), do kterých lze zaklonovat DNA až do velikosti 2 Mbp. Kvasinkové umělé chromosomy mají však celou řadu nevýhod, které ztěžují jejich využití. Mezi hlavní nevýhody patří velké množství chimerických klonů (40-60%); ty mohou vznikat jak *in vitro* při ligaci dvou různých fragmentů do jednoho vektoru, tak i *in vivo* mezi dvěma odlišnými kvasinkovými umělými chromosomy, které se nacházejí v jedné buňce. Další nevýhodou při práci s YAC klony je jejich nestabilita a tendence k vyštěpování velkých částí inzertů. Značný problém také způsobuje obtížná izolace čistých umělých kvasinkových chromosomů. Proto byla vyvinuta řada jiných systémů vhodných ke klonování dlouhých úseků DNA, které odstraňují většinu nevýhod YAC vektorů avšak nedosahují tak vysoké klonovací kapacity. Jeden z takovýchto vektorů je klonovací systém založený na bakteriofágu P1 a od něj odvozený PAC vektor (Monaco a Larin 1994).

Bakteriální umělé chromosomy (BAC, “Bacterial Artificial Chromosome”) představují v současné době asi nejrozšířenější variantu k YAC vektorům. Jedná se o bakteriální klonovací systém, který je založen na F-faktoru *Escherichia coli* a umožňuje klonovat úseky DNA dlouhé až 300 kbp. V buňce se nachází v jedné až dvou kopiích a díky tomu nemůže docházet k různým rekombinačním přestavbám inzertů, jejich vysoká stabilita se tak počítá mezi hlavní výhody tohoto

klonovacího systému (Shizuya a Kouros-Mehr, 2001). Přesto se však v některých případech ukázalo, že u inzertů, které obsahují tandemové repetice, dochází k rozsáhlým delecím (Song a kol. 2001).

Každý bakteriální chromosom obsahuje několik důležitých částí, jako je klonovací oblast s restrikcími místy pro enzymy EcoRI, HindIII a BamHI, dále pak CG-bohatou oblast s restrikcími místem pro enzym NotI, který může sloužit k případnému vyštěpení inzertu. Další nepostradatelnou částí BAC vektoru je místo s počátkem transkripce *oriS*, které spolu s lokusy *parA*, *parB* a *repE* udržuje vektor v jedné kopii na buňku. Většina bakteriálních umělých chromosomů také obsahuje gen pro chloramfenicolovou rezistenci a gen pro β -galaktosidázu, v němž se nachází klonovací místo a umožňuje tak využití modrobílé selekce (Shizuya a Kouros-Mehr 2001).

První bakteriální umělý chromosom vytvořili Shizuya a kol. (1992). Tento vektor nazvaný pBAC108L však ještě neobsahoval gen pro β -galaktosidázu. Selektce vektorů na přítomnost inzertů musela být tudíž prováděna místo kultivací na mediu obsahujícím X-gal pomocí koloniové hybridizace. V následujících letech vznikla celá řada různých BAC vektorů. Například Frijters a kol. (1997) vytvořili vektor nazvaný pECBAC1, který na rozdíl od většiny bakteriálních umělých chromosomů obsahuje restrikcí místo pro enzym EcoRI pouze v klonovací oblasti. Pomocí místně specifické mutagenese se jim podařilo odstranit další takové restrikcí místo, které se nachází v genu pro chloramfenicolovou rezistenci.

Přestože bakteriální umělé chromosomy skýtají řadu výhod, mají i svá negativa. Jedním z nich jsou nízké výtěžky při izolaci BAC DNA způsobené malým počtem vektorů v hostitelské buňce. Tento problém vyřešili Wild a kol. (2008) vytvořením BAC vektoru, u něhož je možno regulovat počet kopií. Vektor pBAC/*oriV* obsahuje kromě *oriS* ještě další počátek replikace *oriV*, který je pod kontrolou proteinu TrfA. Gen pro tento protein u většiny kmenů *E. coli* chybí, za normálních okolností je tudíž tento počátek replikace inaktivní. Spolu s vektorem pBAC/*oriV* je potřeba do buněk transformovat i vektor nesoucí mutovanou alelu genu *trfA*, jejíž produkt vede ke zvýšení počtu kopií plasmidů s *oriV*, pod kontrolou *araC-P_{araBAD}* promotoru. Za normálních podmínek je tedy vektor pBAC/*oriV* v každé buňce pouze v jedné kopii, pokud však do média přidáme L-arabinózu, dojde k transkripci mutantní alely *trfA* a k navýšení kopií vektoru.

Přestože Tao a Zhang (1998) prokázali, že ke klonování fragmentů o velikosti až 310 kbp lze využít tradičních plasmidových vektorů, bakteriální umělé chromosomy jsou dodnes důležitým typem vektoru pro klonování dlouhých úseků DNA a využívá se jich v celé řadě různých aplikací.

V současné době existuje několik genomových BAC knihoven od zástupců řádu Lepidoptera. Patří mezi ně dvě knihovny bource morušového *Bombyx mori* (Wu a kol. 1999), dále pak knihovna lišaje tabákového *Manduca sexta* a dalších (Wu a kol. připravováno do tisku). Tyto knihovny už byly využity k řadě cytogenetických studií, jako identifikace chromosomu W u bource morušového (Sahara a kol. 2003), sestavení karyotypu *Bombyx mori* (Yoshido a kol. 2005a), studium syntenie genů (Sahara a kol. 2007) a studiem evoluce genomu (Yasukochi a kol. připravováno pro tisk). K dispozici je i genomová BAC knihovna obaleče jablečného (viz. kapitola 3.2.), kterou jsem využila ve své práci.

2. Cíle práce

V současné době se v cytogenetických studiích stále více využívají bakteriální umělé chromosomy (BAC), které je možné metodou BAC-FISH lokalizovat přímo na chromosomech studovaného druhu. Tuto metodu lze využít v mnoha aplikacích, např. pro identifikaci jednotlivých chromosomů a sestavení karyotypu, pro mapování genů a analýzu jejich syntenie srovnáním cytogenetických map příbuzných druhů a pro studium evoluce karyotypů.

Hlavním cílem mé magisterské diplomové práce bylo vyselektovat pomocí molekulárních markerů z BAC knihovny obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, BAC klony odvozené z pohlavních chromosomů a pomocí metody BAC-FISH je využít pro analýzu struktury pohlavního chromosomu W, lokalizaci W-specifických sekvencí DNA a případně sestavení cytogenetické mapy chromosomu W. Dalším cílem bylo pomocí vybraných W-BAC a Z-BAC klonů s vhodnou lokalizací zjistit vzájemnou orientaci pohlavních chromosomů při párování během meiotické profáze I a potvrdit či vyvrátit tak hypotézu o nespecifickém párování chromosomů W a Z jako důsledku absence homologie mezi nimi.

Pro selekci BAC klonů z BAC knihovny obaleče jablečného jsem použila tři typy molekulárních markerů pohlavních chromosomů, izolovaných v rámci dřívějšího i současného výzkumu naší laboratoře: (1) dvě sekvence DNA specifické pro chromosom W (CpW2 a CpW5; Fuková a kol. 2007, 2009), (2) čtyři sekvence ortologů genů, lokalizovaných na chromosomu Z u jiných druhů motýlů (Provazník 2008, Nguyen 2009) a (3) čtyři repetitivní sekvence obohacených na chromosomu Z (Šíchová 2009). Dílčím úkolem mé práce bylo též prodloužení příliš krátké sekvence CpW5 (93 bp) pomocí inverzní PCR s cílem získat další informace o této jediné unikátní sekvenci chromosomu W a rozšířit tak její využití jako W-specifického molekulárního markeru.

3. Materiál a metody

3.1. Hmyz

Veškeré pokusy byly prováděny na laboratorním kmeni Krym-61 obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Larvy byly chovány na umělé stravě při teplotě 26-28°C a fotoperiodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Podrobnosti o původu tohoto kmene a jeho chovu jsou uvedeny v práci Fuková a kol. (2005).

3.2. Prohledávání BAC knihovny obaleče jablečného *C. pomonella*

Genomová BAC knihovna obaleče jablečného, která je k dispozici v laboratoři L.G. Neven (Yakima Agriculture Research Laboratory, Wapato, USA), byla konstruována v laboratoři H.-B. Zhanga (GENEfinder Genomic Resources Laboratory, Texas A&M University, College Station, TX, USA). Pro její tvorbu byl použit vektor pECBAC1 (Frijters a kol. 1997). Knihovna sestává z 18 432 klonů o průměrné velikosti 140 kbp, což odpovídá zhruba čtyřnásobku genomu obaleče jablečného (při odhadované velikosti genomu obaleče přes 600 Mbp; F. Marec, ústní sdělení).

3.2.1. Příprava sond podle W-specifických sekvencí

BAC klony jsem z genomové knihovny obaleče selektovala podle W-specifických sekvencí CpW2 (acc. No. AM292090) a CpW5 (acc. No. AM292091) (Fuková a kol. 2007). Části těchto sekvencí byly amplifikovány z genomové DNA obaleče jablečného pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro amplifikaci 401 bp dlouhého úseku ze sekvence CpW2-EcoRI (acc. No. ET203621) (Fuková a kol. 2009) jsem použila primery CpW2-954F (5'-TTC TCA CAT ACC CCG ATG GT-3') a CpW2-1354R (5'-TGC TTT CTC GGG ATA ACG TC-3') a pro amplifikaci 83 bp úseku z CpW5 sekvence primery F13 (5'-TGG TAT GTG GGA TTG GAA TTT C-3') a R95 (5'-AGG AGT GTA AAT TTA ACC AGT GAT C-3').

Reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala 1x Taq pufr a 1U ExTaq HS DNA polymerázy (Takara, Shiga, Japonsko), 50 µM každého dNTP, 500 µM každého z primerů (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká Republika) a 100 ng samičí genomové DNA. PCR reakce byla prováděna za následujících podmínek: počáteční denaturace 3 min při 95°C, poté 35 cyklů s těmito kroky - denaturace 20 s při 94°C, annealing 20 s při 60°C, extenze 20 s při 72°C - a závěrečná extenze 3 min při 72°C.

Značení sond alkali-labilním digoxigeninem probíhalo za stejných podmínek, pouze reakční směs obsahovala místo běžných nukleotidů směs 80 µM dGTP, dATP a dCTP, 52 µM dTTP a 28 µM AL-DIG-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) a jako templát byl použit 1 ng PCR produktu.

3.2.2. Vlastní prohledávání BAC knihovny

Prohledávání genomové knihovny obaleče jablečného probíhalo v rámci stáže v laboratoři Lisa G. Neven (Yakima Agriculture Research Laboratory, Wapato, USA), které jsem se účastnila společně s Magdou Vítkovou. BAC klony jsme selektovaly podle třech různých markerů: (1) dvou W-specifických sekvencí CpW2 a CpW5; (2) čtyřech Z-lokalizovaných genů; (3) čtyřech Z-obohacených repetit.

BAC klony byly selektovány pomocí hybridizace sondy značené alkali-labilním digoxigeninem s speciální, Hybond-N⁺ nylonovou membránou (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), na které byly nanесeny dvě kopie od každého klonu knihovny (tzv. "high-density BAC colony filter"). Filtry byly před použitím skladovány při teplotě -80°C.

Membránu jsme nejprve inkubovali 1 hodinu v prehybridizačním roztoku (1 M NaCl, 5x Denhardt, 0,5 % SDS, 40% formamide, 10 mM Tris-HCl o pH 7,6, 1 mM EDTA) při teplotě 42°C. Hybridizace probíhala přes noc při 42°C v roztoku, který měl stejné složení jako prehybridizační pufr, ale navíc obsahoval 200 ng denaturované sondy.

Po hybridizaci jsme filtr promyly dvakrát po 5 minutách v odmývacím pufru I (2x SSC, 0,1% SDS) při pokojové teplotě a poté dvakrát po 15 minutách v odmývacím pufru II (0,2x SSC, 0,1% SDS) při 68°C. Následně jsme membránu krátce opláchly v mycím roztoku (0,3% Tween 20, 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5) a 30 minut až 1 hodinu inkubovali při pokojové teplotě v blokovacím roztoku (5% odtučněné sušené mléko, 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5). Poté následovala inkubace s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Roche Diagnostics), která byla ředěna v blokovacím roztoku v poměru 1: 10 000. Přebytečnou protilátku jsme odstranily promytím filtru v mycím roztoku dvakrát po 5 minutách při pokojové teplotě. Poté jsme membránu opláchly v detekčním pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) a inkubovali 5 minut se substrátem alkalické fosfatázy CDP Star (Roche Diagnostics).

Jelikož sondy byly značené alkali-labilním digoxigeninem, mohla být membrána po jeho odstranění použita pro další hybridizaci. Nejprve jsme filtr opláchly v miliQ vodě, aby se odstranil substrát CDP Star, a následně byl inkubován v „stripovacím“ roztoku (0,2 M NaOH, 0,1% SDS) při 37°C po dobu dvakrát 15 minut. Poté byla membrána omyta 5 minut v 2x SSC a uskladněna pro další použití.

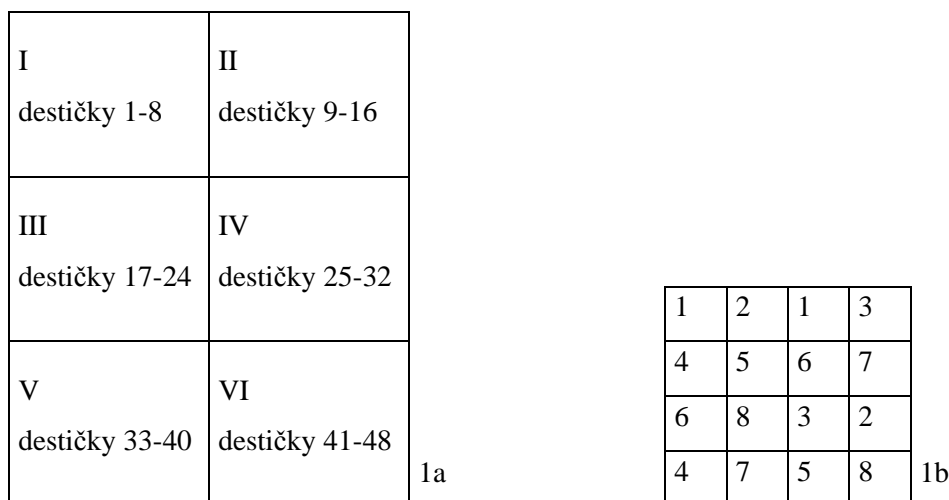
Přítomnost CpW2 respektive CpW5 fragmentu ve vyselektovaných BAC klonech byla ověřena pomocí PCR reakce, která byla prováděna za stejných podmínek jako amplifikace těchto fragmentů z genomové DNA (viz. kapitola 3.2.1.), pouze jako templát sloužilo 10 ng vyizolované BAC DNA. Fragmenty DNA byly analyzovány na 3% agarózovém gelu.

3.2.3. Odečítání výsledků

18 432 klonů BAC knihovny obaleče jablečného je rozděleno do 48 destiček po 384 jamkách. "Highdensity colony filter", pomocí něhož bylo prováděno prohledávání knihovny, je rozdělen na šest

sekcí, z nichž každá obsahuje klony z osmi destiček knihovny (obr. 1a). Každá sekce obsahuje 384 čtverečků uspořádaných do 24 sloupců a 16 řad, které odpovídají sloupečkům (1-24) a řádkům (A-P) v jednotlivých destičkách. Jednotlivé čtverečky se skládají z osmi různých klonů (vždy jeden klon z každé destičky v dané sekci), přičemž každý klon je ve čtverečku zastoupen dvakrát. Jednotlivé kopie klonů jsou ve čtverci umístěny tak, aby je jejich vzájemná poloha umožnila identifikovat.

BAC klon, který hybridizoval se sondou, se po detekci na membráně objevil jako dvojtečka. Podle toho, v jaké sekci se signál nacházel a jaké bylo umístění dvojtečky ve čtverci, bylo možné rozpoznat destičku BAC knihovny, ve které se daný klon nachází (viz obr. 1b). Umístění klonu na destičce potom odpovídá umístění čtverečku s jeho signálem v dané sekci.



Obr. 1. Schéma “high density colony filter”. (a) Rozmístění jednotlivých sekcí a jim odpovídajících destiček na filtru. (b) Rozmístění klonů ve čtverečku sekce I, číslo označuje destičku, ze které klon pochází, v dalších sekcích je poloha klonů ve čtverci stejná, pouze pozice klonu z destičky č. 1 odpovídá pozici klonu z destičky č. 9 atd.

3.3. Izolace BAC DNA

BAC DNA jsem izolovala metodou alkalické lyze z bakteriální kultury pěstované v LB médiu (1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 0,5% NaCl) s 12,5 µg/ml chloramphenikolu přes noc při teplotě 37°C. Po ochlazení na ledu jsem kulturu centrifugovala (3000 g, 10 min, 4°C) a pellet resuspendovala ve stejném objemu TEG pufru (50 mM glukóza, 10mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8). Poté jsem přidala dvojnásobný objem alkalického roztoku SDS (0,2 M NaOH, 1% SDS) přehřátého na 37°C a 1,5-násobek objemu 3 M octanu draselného, pH 5,3. Směs jsem promíchala a inkubovala 15 minut v -80°C. Vzniklou sraženinu jsem odstranila centrifugací (5000 g, 20 minut, 4°C) a k supernatantu jsem přidala 0,6 násobek objemu isopropanolu. Roztok jsem promíchala a centrifugovala (12 000 g, 10 min). Pelet jsem rozpustila v TE pufru (0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Abych ze vzorku odstranila kontaminaci RNA, inkubovala jsem ho 1,5 hodiny při 37°C s 200 µg/ml RNázy A. Z roztoku jsem poté BAC DNA vyizolovala metodou fenol-chloroform-isoamylalkoholové extrakce (viz kapitola 3.4.3). DNA byla nakonec rozpuštěna v takovém množství TE pufru, aby její koncentrace byla alespoň 100 ng/µl.

Později jsem BAC DNA izolovala za pomoci soupravy Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Venlo, Holandsko) podle návodu pro izolaci BAC DNA uvedeného na internetových stránkách výrobce.

3.4. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

3.4.1. Příprava chromosomálních preparátů

Preparáty meiotických chromosomů pro fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) jsem připravovala "spreading" metodou na histologické plotýnce podle postupu v práci Sahara a kol. (1999). Ovária jsem vypitvala ve fyziologickém roztoku pro *Ephestia* (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃). Materiál jsem fixovala 15 minut ve fixáži Carnoy (etanol-chloroform-kyselina octová, 6:3:1). Po fixaci jsem ovária přenesla do kapky 60% kyseliny octové na podložním skle očištěném v kyselém etanolu (1% HCl v 96% etanolu) a macerovala pomocí wolframových jehel. Bezprostředně po maceraci jsem provedla rozptyl materiálu na podložním skle pomocí histologické plotýnky zahřáté na 45°C. Hotové preparáty jsem odvodnila v etanolové řadě (70% - 80% - 100%, po 30 vteřinách) a skladovala při -20°C do dalšího použití.

3.4.2. Značení sondy

Jako sondu pro FISH jsem používala značenou BAC DNA. Značení jsem prováděla metodou tzv. Nick translace. Reakční směs, která obsahovala 50 ng/µl DNA, dNTPs (50 µM každého až na 14 µM dTTP), 35 µM fluorochrom-dUTP, 1x Nick Translation Mix (Roche Diagnostics), jsem inkubovala přes noc při teplotě 16°C. Reakci jsem zastavila zahřátím směsi na 65°C po dobu 10 minut. Jako značené nukleotidy jsem používala buď SpectrumGreen-dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) nebo Cy3-dUTP (GE Healthcare, Milwaukee, USA). Jako DNA pro značení sondy byla použita buď přímo vyizolovaná BAC DNA nebo byla tato DNA před značením namnožena pomocí soupravy illustra GenomiPhi HY DNA Amplification Kit (GE Healthcare), a to podle protokolu od výrobce.

3.4.3. Izolace genomové DNA pro výrobu samčího kompetitora

Genomovou DNA jsem izolovala z dospělých samců *C. pomonella* standardní fenol-chloroform-izoamylalkoholovou extrakcí. Materiál jsem homogenizovala v předchlazené třecí misce s tekutým dusíkem. Poté jsem homogenát přenesla do extrakčního pufru (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 0,5% sarkosyl, 100 µg/ml proteináza K) v poměru zhruba 0,3 g homogenátu na 10 ml pufru. Směs jsem inkubovala přes noc při 37°C za stálého míchání. Potom jsem k roztoku

přidala RNázu A (10 µg na 1 ml extračního pufru) a směs ponechala 1 hodinu inkubovat opět při teplotě 37°C.

Po zchladnutí na pokojovou teplotu jsem k roztoku přidala stejný objem fenolu o pH 8. Směs jsem nechala zvolna promíchávat po 30 minut a poté centrifugovat (5000 g, 15 minut, pokojová teplota). Vrchní vodnou vrstvu s DNA jsem přenesla do nové zkumavky. Fenolovou extrakci jsem ještě jednou zopakovala. Poté jsem k horní vrstvě přidala stejné množství směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1). Následně jsem směs inkubovala 15 minut při pokojové teplotě a centrifugovala (5000 g, 15 minut, pokojová teplota). Vrchní fázi jsem přenesla a doplnila stejným objemem chloroform-izoamylalkoholu (24:1). Následovala opět inkubace 15 minut při pokojové teplotě a centrifugace (5000 g, 15 minut, pokojová teplota).

Po centrifugaci jsem k horní fázi přidala 0,1x objem 3 M octanu sodného a 0,7x objem izopropanolu. Vzniklou směs jsem promíchávala, dokud z vysrážené DNA nevzniklo klubko. To jsem přenesla do zkumavky se 70% etanolem a centrifugovala (3000 g, 10 minut, pokojová teplota). Pelet jsem dvakrát promyla v 70% etanolu a poté jsem ho nechala oschnout. DNA jsem rozpustila v takovém množství TE pufru, aby přibližná koncentrace DNA byla okolo 500 ng/µl. Získaná vysokomolekulární DNA byla na závěr fragmentována sonikátorem, abych ji mohla použít jako kompetitora do hybridizační směsi pro FISH.

3.4.4. Vlastní provedení fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Pro zamapování „BACového“ inzertu na chromosomech obaleče jablečného jsem použila modifikaci fluorescenční in situ hybridizace, tzv. BAC-FISH, dle protokolu v práci Sahara a kol. (2003) modifikovaného podle protokolu pro komparativní genomovou hybridizaci (Traut a kol. 1999).

Pro přípravu hybridizační směsi pro jeden preparát jsem smíchala 300 ng značené BAC DNA (v případě sondy značené fluorochromem SpectrumGreen jsem používala 600 ng), desetinásobek množství sondy sonikované samčí DNA a 25 µg sonikované DNA ze spermií lososa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Poté jsem přidala 0,1x objem 3 M octanu sodného a 2,5x objem 100% ledového etanolu. Hybridizační směs jsem promíchala a precipitovala při -80°C po dobu 30-60 minut. Po precipitaci jsem směs centrifugovala (13 000 rpm, 4°C, 15 minut) a po odstranění supernatantu jsem pelet promyla přidáním 200 µl ledového 70% etanolu a opět centrifugovala za stejných podmínek. Po odstranění veškerého supernatantu a oschnutí peletu při pokojové teplotě jsem hybridizační směs rozpustila inkubací s 5 µl 100% deionizovaného formamidu po dobu 30 minut při teplotě 37°C. Poté jsem směs doplnila 5 µl 20% dextran sulfátu v 4x SSC. Sondu jsem denaturovala 5 minut při 90°C a poté jsem ji ponechala alespoň 3 minuty na ledu.

Během přípravy hybridizační směsi jsem si připravila a zdenaturovala chromosomální preparáty. Skla jsem vyjmula z -20°C a odvodnila v etanolové řadě (ledový 70% - 80% - 100%). Po dokonalém oschnutí na vzduchu jsem na každý preparát nanasla 100 µl 70% formamidu v 2 x SSC a přikryla jsem ho krycím sklíčkem. Preparáty jsem denaturovala 3,5 minuty při 68°C a okamžitě poté

jsem je ponořila na 2 minuty do ledového 70% etanolu, poté jsem dokončila odvodnění v etanolové řadě (80% - 100%, po 30 sekundách) a skla jsem ponechala oschnout na vzduchu.

Na každý preparát jsem nanesla 10 μ l denaturované sondy. Preparát jsem zakryla krycím sklíčkem, jehož okraje jsem utěsnila kaučukovým lepidlem Fixogum (Marabuwerke, Německo). Preparát jsem nechala hybridizovat 3 dny při 37°C v komůrce navlhčené 2x SSC pufrům.

Po hybridizaci jsem krycí sklíčko odmyla v 0,1x SSC/1% Triton X-100 při pokojové teplotě a následně jsem preparát promyla 5 minut při 62°C v 0,1x SSC/1% Triton X-100. Poté jsem preparát podbarvila DAPI, a to tak, že jsem ho nejprve inkubovala 5 minut v PBS/1% Triton X-100 a potom 15 minut barvila v PBS/1% Triton X-100 s 0,5 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich). Po obarvení jsem preparát promyla 5 minut v PBS/1% PhotoFlo (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) a 1 minutu v miliQ H₂O/1% PhotoFlo. Po oschnutí jsem na preparát nanesla 15 μ l média zabraňujícího vyhasínání fluorescence – 0,2 M DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma-Aldrich); 20 mM Tris-HCl pH 8, 90% glycerol). Nakonec jsem preparát zakryla krycím sklíčkem, jehož okraje jsem utěsnila bezbarvým lakem na nehty.

Preparáty byly vyhodnocovány na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Jena, Německo). Obrázky byly snímány pomocí chlazené F-View CCD kamery a programu AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System, Münster, Německo). Ke zpracování obrázků jsem používala program Adobe Photoshop 7.0.

3.5. Prodloužení CpW5 sekvence pomocí inverzní PCR

3.5.1. Southernova hybridizace

Southernova hybridizace sloužila k zjištění takových restrikčních enzymů, jejichž štěpením vznikne fragment DNA obsahující CpW5 sekvenci o vhodné délce pro inverzní PCR.

BAC DNA byla štěpena restrikčními enzymy AfaI (10 U/ μ l, Takara), BamHI (15 U/ μ l, Takara), HindIII (15 U/ μ l, Takara), NspI (10 U/ μ l, New England Biolabs, Ipswich, Velká Británie), PstI (15 U/ μ l, Takara), SspI (8 U/ μ l, New England Biolabs) a XbaI (12 U/ μ l, Takara). Reakční směs o objemu 10 μ l obsahovala 1x příslušný pufr, 1 μ l enzymu, 600 ng DNA a v případě restriktáz AfaI a XbaI ještě navíc 0,01 % BSA. Reakce probíhala 2 hodiny při teplotě 37°C. Poté byly enzymy inaktivovány zahřátím na 70°C po dobu 15 minut.

Naštěpená DNA byla elektroforeticky rozdělena na 1% agarózovém gelu v TBE (45 mM Tris-borát, 1 mM EDTA). Jako velikostní marker jsem použila DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Roche Diagnostics). Po elektroforéze byla DNA v gelu fragmentována inkubací v 0,25 M HCl po dobu 15 minut. Poté následovala inkubace dvakrát 15 minut v denaturačním roztoku (50 mM NaOH, 0,15 M NaCl) a dvakrát 15 minut v neutralizačním roztoku (50 mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5).

DNA byla z gelu přenesena na nylonovou membránu Hybond N+ (GE Healthcare) pomocí kapilárního přenosu, který pobíhal přes noc (nejméně 15 hodin); jako přenosové médium jsem použila 20x SSC. Druhý den jsem membránu opláchla v 6x SSC, nechala ji oschnout a zafixovala ve Stralinker UV crosslinkeru (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Poté jsem membránu opláchla v 2x SSC a nechala 1 hodinu prehybridizovat v roztoku DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) při teplotě 42°C. Hybridizace probíhala přes noc při stejné teplotě v 10 ml roztoku DIG Easy Hyb se 100 ng denaturované CpW5 sondy značené alkali-labilním digoxigeninem (příprava sondy viz kapitola 3.2.1.).

Detekci sondy jsem prováděla stejně jako při prohledávání BAC knihovny (viz kapitola 3.2.2.). Chemoluminiscence byla snímána pomocí CCD kamery LAS-3000 Lumi-Imager (Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, Německo).

3.5.2. Inverzní PCR

Štěpící reakční směs, která obsahovala 3 µg BAC DNA, 1x pufr pro daný enzym, 0,01 % BSA a 1 µl enzymu (AfaI nebo XbaI) v celkovém objemu 50 µl, jsem inkubovala 3 hodiny při teplotě 37°C. Reakce byla poté přečištěna pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

Ligační reakce probíhala přes noc při teplotě 16°C. Reakční směs o objemu 500 µl, která obsahovala 500 ng naštěpené DNA, 1x pufr a 1750 U T4 DNA ligázy (Takara, Otsu, Japonsko), jsem poté opět přečistila pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

Jako templát pro vlastní inverzní PCR jsem použila 10 ng DNA po ligaci, reakční směs pak dále obsahovala 1x pufr a 1 U ExTaq HS DNA polymerázy (Takara), 50 µM každý dNTP, 500 µM každý z primerů (CpW5invF: 5'-GGT TGC GGT TAC TTC CTG AGC CAC-3'; CpW5invR: 5'-TCC CAC ATA CCA GCC TCG AGT CG-3'; Generi Biotech). PCR reakce byla prováděna za následujících podmínek: počáteční denaturace 95°C 3 min, poté 35 cyklů s denaturací 94°C po 30 s, annealing 59°C po 30 s, extenze 72°C po 90 s; závěrečná extenze byla 5 min při 72°C.

3.5.3. Klonování a sekvenování fragmentů z inverzní PCR

Produkt z inverzní PCR byl separován na 1% agarózovém gelu. Fragmenty o příslušné délce byly vyříznuty a DNA byla vyzolována pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Takto získanou DNA jsem zaklonovala pomocí pGEM-T Easy Vector System (Promega).

Ligační reakci jsem nechala inkubovat přes noc při 4°C a druhý den jsem jí transformovala kompetentní buňky *E. coli*, kmen DH10B. Transformaci jsem prováděla elektroporací na přístroji Electroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg, Německo) při napětí 12,5 kV/cm. Po elektroporaci jsem buňky nechala regenerovat 1 hodinu při 37°C v LB médiu s 2% glukózou. Poté jsem je vysela na plotny (LB médium, 2% agar, 100 µg/ml ampicilin, 350 µM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid, 35 mg/ml X-gal). Bílé kolonie jsem následně testovala na přítomnost inzertu pomocí PCR s univerzálními

primery M13-26 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') a M13-24 (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'). Reakční směs ve 25 µl obsahovala 1x pufr a 1 U ExTaq HS DNA polymerázy (Takara), 62,5 µM každého dNTP a 1 µM každého z primerů (Generi Biotech). Reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 3 min při 94°C, poté 30 cyklů s denaturací 30 s při 94°C, „annealingem” 30 s při 57°C, extenzí 3 min při 72°C; nakonec následovala 5-ti minutová extenze za teploty 72°C.

Vybrané klony s inzertem o správné velikosti jsem namnožila ve 3 ml LB média se 100 µg/ml ampicilinu (inkubace přes noc při 37°C) a vyizolovala pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) podle návodu od výrobce. Sekvenační reakci jsem prováděla pomocí BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Sekvenaci jsem prováděla jak s primery M13-24 a M13-26, tak s oběma primery pro inverzní PCR. Reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala 3 µl RR mixu, 2 µl sekvenačního pufru, 25 nM primer a 700 – 800 ng plazmidové DNA. Reakční podmínky byly následující: počáteční denaturace 2 min při 94°C, poté 35 cyklů s denaturací 10 s při 94°C, „annealingem” 10 s při 53°C (pro univerzální primery) nebo 59°C (primery pro inverzní PCR) a extenzí 3 min při teplotě 60°C.

Získané sekvence jsem zpracovávala v programu BioEdit Sequence Alignment Editor. Části sekvencí pocházející z vektoru jsem vyhledávala v programu BLAST v databázi National Centre for Biotechnology Information (NCBI) pomocí funkce „vector contamination”. Upravené sekvence jsem poté porovnávala s nukleotidovou databází pomocí programu BLASTN a po přeložení do aminokyselinové sekvence jsem je také porovnávala s proteinovou databází pomocí BLASTX.

4. Výsledky

4.1. Selektce klonů z genomové knihovny obaleče jablečného

BAC klony vyselektované z genomové knihovny obaleče jablečného jsem označovala podle jejich umístění v genomové knihovně obaleče, a to tak, že první číslo v názvu odpovídá číslu destičky, následující písmeno a číslo pak odpovídají konkrétnímu řádku a sloupečku v dané destičce. Celkem bylo vyselektováno 54 BAC klonů, počet klonů vyselektovaných podle jednotlivých sekvencí je uveden v tabulce 1.

Typ sekvence		Počet vyselektovaných BAC klonů
W-specifické sekvence ^a		3
Z-lokalizované geny ^b	Period	2
	Kettin	2
	Laktát dehydrogenáza	4
	Topoizomeráza	4
Z-obohacené repetice ^c		39

Tab.1. Počty BAC klonů, které byly vyselektovány podle jednotlivých typů sekvencí pomocí koloniové hybridizace. ^aSekvence CpW2 a CpW5 (Fuková a kol. 2007); ^bortology těchto genů izoloval a mapoval u obaleče jablečného P. Nguyen, který též připravil sondy pro hybridizaci (Nguyen 2009); ^csondy ze sekvencí CpZ6, CpZ7, CpZ13 a CpZ28 připraveny dle práce Šíchová (2009).

Sonda vyrobená podle CpW2 sekvence poskytla na membráně pro prohledávání knihovny jednu dvojici velmi silných signálů, která odpovídala klonu 23N12, a jednu dvojici silných signálů, ta patřila klonu 26J11 (obr.2). Při hybridizaci membrány se sondou podle CpW5 sekvence došlo opět k hybridizaci klonů 23N12 a 26J11 s přibližně stejnou intenzitou signálu jako při hybridizaci s CpW2 sondou. Navíc další dvojici silných signálů se sondou dle CpW5 poskytl ještě klon 25F22 (obr.3)

Přítomnost CpW2 a CpW5 sekvencí ve vyselektovaných BAC klonech jsem ověřovala pomocí PCR. V BAC klonu 23N12 se potvrdila přítomnost obou dvou sekvencí, avšak v případě klonu 26J11 došlo k amplifikaci pouze CpW5 sekvence a u klonu 25F22 se metodou PCR nepotvrdila přítomnost ani této sekvence (obr. 4), proto jsem s tímto klonem v dalších experimentech nepokračovala.

4.2. Mapování BAC klonů

Vyselektované BAC klony jsem mapovala na pachytenní bivalenty obaleče jablečného pomocí metody FISH. Klon 23N12 poskytl po hybridizaci několik signálů na chromosomu W. Signály byly téměř symetricky rozmístěny po celém chromosomu, dva byly umístěny poblíž konců chromosomu a další čtyři až šest signálů, v závislosti na stupni kondenzace chromosomu, se nacházelo v jeho středové oblasti (obr. 5 a 6). Na více kondenzovaných chromosomech v metafázi I došlo k splynutí středových signálů (obr. 8). V interfázních jádrech byl signál jasně lokalizovaný na heterochromatinovém tělísku, to však nebylo sondou naznačeno zcela, ale jen částečně (obr. 7). Naproti tomu BAC 26J11 na chromosom W hybridizoval jen velmi slabě, srovnatelně s ostatními chromosomy, ale poskytl silný signál zhruba v jedné čtvrtině délky jednoho z homologních párů autosomů (obr. 9 a 10).

Ani jeden z BAC klonů, které jsem vyselektovala podle W-specifických sekvencí, nebyl na chromosomu lokalizován tak, aby podle něj mohla být určena orientace chromosomu W a šel by tudíž využít ke studiu párování pohlavních chromosomů obaleče jablečného během meiosis. BAC klon s takovouto lokalizací jsem se proto snažila najít mezi klony vyselektovanými z genomové knihovny obaleče Ivou Fukovou podle W-obohacené sekvence CpW27. BAC klon W27-1 značil v interfázních jádrech téměř celé heterochromatinové tělísko (obr. 12), na pachytenních bivalentech tato sonda sice hybridizovala s chromosomem W po celé jeho délce, ale poblíž jednoho konce tvořil silný signál (obr. 11). Rozhodla jsem se proto tento klon využít pro studium párování WZ chromosomů. Něměla jsem však k dispozici dostatečné množství DNA pro další pokusy, v následujících experimentech jsem proto používala pro přípravu sondy DNA namnoženou pomocí illustra GenomiPhi HY DNA Amplification Kit (GE Healthcare). Zda takto namnožená DNA má stejný hybridizační signál jako původní BAC jsem ověřila pomocí kohybridizace sond z namnožené a přímo vyizolované DNA BAC klonu 23N12. Přestože signál zeleně značené sondy byl slabší, namnožení DNA pomocí tohoto kitu nijak nepozměnilo její hybridizační signál (obr. 13).

4.3. Studium párování pohlavních chromosomů obaleče jablečného

K zjištění orientace chromosomu W jsem použila výše zmíněný BAC klon W27-1, orientaci chromosomu Z jsem určovala pomocí klonu 33L16, který byl z genomové knihovny obaleče jablečného vyselektován podle genu Kettin a kolega Petr Nguyen ho lokalizoval nedaleko konce chromosomu Z (Nguyen 2009). Na všech pachytenních bivalentech WZ jsem pozorovala totožný způsob párování chromosomů, a to takový, že signály W- a Z-BAC klonů ležely na protilehlých koncích bivalentu (obr. 14 a 15).

Zajímavá byla také samotná hybridizace klonu 33L16, jeho signál byl lokalizován nejen na chromosomu Z, ale v příslušné oblasti i na chromosomu W (obr. 14 a 15). Srovnatelná intenzita hybridizačních signálů tohoto klonu, izolovaného podle genu lokalizovaného na chromosomu Z (Nguyen 2009), naznačuje vysoký stupeň homologie v daném úseku mezi chromosomy Z a W.

4.4. Prodloužení CpW5 sekvence pomocí inverzní PCR

Jako templát jsem použila BAC klon 23N12. Pomocí Southernovy hybridizace jsem vybrala restriční enzymy, které vyštěpí fragment s CpW5 sekvencí o optimální délce. K štěpení DNA jsem si vybrala restiktázy AfaI a XbaI, které vyštěpují fragment s CpW5 o délce přibližně 1 kbp, respektive 1,3 kbp (obr. 16). Pomocí inverzní PCR se mi podařilo amplifikovat fragmenty o příslušné délce, jak po štěpení enzymem AfaI tak XbaI (obr. 17). Fragmenty jsem zaklonovala a částečně osekvenovala.

CpW5 sekvenci jsem prodloužila z původních 93 bp na 688 bp, a to na jejím 3'konci. Tato sekvence obsahovala otevřený čtecí rámeček o délce 137 aminokyselin. Nevykazovala však žádnou homologii s již známou nukleotidovou nebo proteinovou sekvencí.

5. Diskuse

5.1. Selektce BAC klonů pomocí molekulárních markerů pohlavních chromosomů

V naší laboratoři je v současnosti k dispozici celkem více než 60 BAC klonů vyselektovaných podle sekvencí pohlavních chromosomů obaleče jablečného. 15 klonů vyselektovala Iva Fuková podle repetice CpW27 obohacené na pohlavním chromosomu W. Dalších 54 klonů jsem vyseletovala společně s Magdou Vítkovou během stáže v laboratoři L. G. Neven podle W-specifických sekvencí, Z-lokalizovaných genů a Z-obohecených repetic. V této práci jsem se dále zabývala pouze BAC klony odvozenými od pohlavního chromosomu W. Z-BAC klony získané podle genů byly využity ke studiu syntenie pohlavního chromosomu Z v magisterské práci Petra Nguyena. Zbylé klony odvozené od Z-obohecených repetic budou předmětem dalšího studia v naší laboratoři.

5.2. BAC klony odvozené z chromosomu W

Při selekci BAC klonů obsahujících CpW2 sekvenci pomocí koloniové hybridizace, jsem získala dva pozitivní klony, ale pouze u jednoho z nich byla přítomnost CpW2 sekvence potvrzena pomocí PCR. Podobná situace byla i se selekcí klonů s CpW5 sekvencí, kde jsem po koloniové hybridizaci získala tři pozitivní klony, z nichž u dvou byla přítomnost této sekvence potvrzena PCR. Tento rozdíl může být způsoben tím, že v některých BAC klonech, které obsahují část dané sekvence, chybí místo pro nasednutí jednoho z primerů a PCR reakce tudíž nemůže probíhat. Mnohem pravděpodobnější vysvětlení ovšem je, že zvolené hybridizační podmínky umožnili sondám hybridizovat i s ne zcela homologními úseky.

U BAC klonu 23N12 byla zjištěna přítomnost jak CpW2, tak CpW5 sekvencí. To poukazuje na lokalizaci těchto sekvencí ve vzájemné blízkosti zhruba do vzdálenosti 140 kbp, což je průměrná velikost klonu v BAC knihovně obaleče jablečného. Sekvence CpW2 však pravděpodobně bude lokalizována ještě jinde v genomu, protože na rozdíl od CpW5 sekvence se v genomu nachází ve více než jedné kopii (Fuková a kol. 2007).

5.2. Lokalizace vyselektovaných klonů

BAC klon 23N12, který obsahuje jak CpW2, tak i CpW5 sekvenci, poskytuje několik hybridizačních signálů roztroušených téměř symetricky po celé délce chromosomu W. Jelikož mají všechny hybridizační signály podobnou intenzitu, je těžké určit, který z nich koresponduje s místem původu tohoto BAC klonu. Pravděpodobně se ale toto místo bude nacházet spíše ve středové oblasti chromosomu, protože koncové signály jsou o něco méně intenzivní. Za všechny hybridizační signály, kterých v závislosti na stupni kondenzace chromosomů mohlo být až osm, však nemohou odpovídat homologie se sekvencemi CpW2 a CpW5, protože tyto sekvence se v genomu podle výsledků Southernovy hybridizace pravděpodobně vyskytují pouze v jedné až třech kopiích (Fuková a kol.

2007). Některé hybridizační signály tedy musí odpovídat místům, kde se nacházejí jiné sekvence obsažené v tomto BAC klonu.

BAC klon W27-1, který byl vyselektovaný podle W-obohacené repetice, sice hybridizoval k chromosomu W po celé jeho délce, ale na jednom konci vytvořil výrazný signál. Ten pravděpodobně odpovídá místu původu klonu.

Přestože oba dva výše zmíněné BAC klony hybridizovaly k chromosomu W na více místech, neoznačily jednoduše celý chromosom, jak tomu je například při hybridizaci W-BAC klonů u bource morušového *Bombyx mori* (Sahara a kol. 2003) nebo u zebřičky pestré *Taeniopygia guttata* (Itoh a kol. 2008). Chromosom W obaleče jablečného nemá tedy na rozdíl od tohoto chromosomu u bource morušového homogenní složení, a to přesto, že chromosomy W u obou těchto druhů obsahují převážně nahromaděné repetice z celého genomu (Traut a kol. 1999, Fuková a kol. 2005). Přestože většina W-BAC klonů bource morušového značí jednoduše celý chromosom W, byl nalezen i klon s odlišným způsobem hybridizace. BAC klon 20H9D u bource morušového vytvořil na chromosomu W tři klastry hybridizačních signálů. Podobně jako u klonu 23N12 obaleče jablečného, jsou signály lokalizovány na koncích a ve středové oblasti chromosomu W (Yoshida a kol. 2007).

BAC klon 26J11 byl pomocí metody BAC-FISH lokalizován na autosomu, přestože byl izolován pomocí sekvence CpW5, která je W-specifická (Fuková a kol. 2007). Ačkoli primery použité pro PCR ověření přítomnosti sekvence CpW5 poskytují produkt jenom u samičí DNA (Iva Fuková, ústní sdělení), přítomnost této sekvence bude pro jistotu třeba ověřit sekvenováním tohoto PCR produktu. Pokud se potvrdí přítomnost CpW5 sekvence, vysvětlením by mohlo být, že v její blízkosti se na chromosomu W nachází sekvence akumulovaná na autosomu. Je však možné, že zmíněný BAC klon skutečně pochází z autosomu a z BAC knihovny obaleče jablečného byl vybrán pouze na základě neúplné homologie s CpW5 sekvencí. W specifické BAC klony s CpW5 sekvencí by tedy bylo lepší selektovat podle prodloužené varianty této sekvence, kterou se mi podařilo v rámci mé práce získat.

5.3. Hybridizace DNA amplifikované pomocí polymerázy Φ 29

Protože jsem neměla k dispozici dostatečné množství BAC DNA z klonu W27-1, který jsem chtěla využít pro studium párování pohlavních chromosomů, musela jsem si tuto DNA namnožit. Pokusy o elektroporaci této DNA do kompetentních buněk *E. coli* se ukázaly jako neúspěšné. Po izolaci byly totiž získány klony s chybějícími částmi inzertů. K částečné delecii mohlo dojít v důsledku nestability BAC klonů, které obsahují tandemové repetice (Song a kol. 2001). Vzhledem k tomu, že chromosom W motýlů je bohatý na různé repetitivní sekvence, je vysoce pravděpodobné, že i tento klon je převážně tvořen repetitivními sekvencemi (viz Fuková a kol. 2007). Dalším možným vysvětlením je, že BAC DNA, kterou jsem používala k elektroporaci, byla z velké části linearizovaná nebo částečně fragmentovaná, takže po transformaci do buněk došlo vlivem reparačních mechanismů k částečným delecím.

BAC DNA jsem proto pro účely přípravy sondy pro FISH amplifikovala pomocí illustria GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare). Tento systém využívá fágovou DNA polymerázu $\Phi 29$. Pomocí tohoto enzymu lze amplifikovat jak kruhovou DNA plasmidů, tak lineární celogenomovou DNA. Templátová DNA je amplifikována rovnoměrně a s minimem chyb, proto lze této metody využít v mnoha aplikacích (Lovmar a Syvänen 2006). Namnožení DNA tímto enzymem nemělo dle mých experimentů vliv na hybridizaci sondy, což je v dobré shodě s prací Roohi a kol. (2008), kteří tuto metodu amplifikace také použili pro přípravu sond pro FISH.

5.4. Párování pohlavních chromosomů WZ

Chování páru pohlavních chromosomů WZ v meióze samic motýlů je ve srovnání se systémy XY unikátní, neboť v meiotické profázi I se oba chromosomy párují navzdory zjevné absenci homologie (W tvořen zcela heterochromatinem, Z euchromatinem) a vytvářejí kompletní synaptonemální komplex. Toto párování je však vzhledem k autosomům opožděné a vykazuje znaky typické pro nehomologní párování. Přestože dosud není známa žádná homologní sekvence mezi W a Z chromosomem motýlů včetně obaleče jablečného, na všech pachytenních bivalentech WZ tohoto druhu jsem pomocí BAC sond, použitých jako cytogenetických markerů chromosomů W a Z, pozorovala a prokázala totožnou vzájemnou orientaci pohlavních chromosomů během meiotického párování. Toto zjištění je v rozporu s prací Marec a kol. (2001). Tato práce se zabývá studiem párování pohlavních chromosomů a jejich fragmentů u mutantních linií ASF (“Abnormal Segregating Female”) zavíječe moučného *Ephestia kuehniella*. U linie ASF-2, u které samice kromě normálního chromosomu Z mají ještě fragment tohoto chromosomu fúzovaný s částí chromosomu W (Z^{dz+}) a částečně deletovaný chromosom W (W^{del}), bylo s použitím komparativní genomové hybridizace (CGH), která označila zkrácený chromosom W i W-chromatin fragmentu Z^{dz+} , pozorováno náhodné párování Z^{dz+} chromosomu s původním chromosomem Z. To, že se tyto dva chromosomy párovaly v náhodné orientaci, však může být v tomto případě způsobeno chromosomální aberací, která narušila standardní párování, neboť chromosomální fragment Z^{dz+} svým úsekem chromosomou W konkuroval během párování zkrácenému chromosomu W.

Pozorovaný charakter párování pohlavních chromosomů WZ by mohl nasvědčovat existenci určité homologní oblasti mezi těmito chromosomy. Existují sice mechanismy párování zcela nehomologních chromosomů. Např. u octomilky *Drosophila melanogaster*, je párování chromosomů X a Y zajištěno pomocí intergenových sekvencí v rDNA klastrech, které jsou lokalizovány v centromerickém heterochromatinu dlouhého raménka chromosomu X a na krátkém raménku chromosomu Y (McKee a kol. 1992). Toto však nemůže být případ obaleče jablečného, protože u něj se dva organizátory jadérka nacházejí na koncích páru autosomů (Fuková a kol. 2005).

Dalším možným důkazem pro existenci homologní oblasti na pohlavních chromosomech obaleče jablečného *Cydia pomonella*, je fakt, že BAC klon 33L16, který obsahuje gen Kettin lokalizovaný na chromosomu Z (Nguyen 2009), nehybridizoval pouze k Z chromosomu, ale ve stejné

oblasti i k chromosomu W. Případná existence homologní oblasti by pak podporovala hypotézu o vzniku chromosomu W z autosomu, jehož homolog zfúzoval s chromosomem Z (Traut a kol. 2007). Vzhledem k tomu, že jde o vůbec první indicii existence homologní oblasti (s výjimkou neo-pohlavních chromosomů) mezi pohlavními chromosomy W a Z u motýlů, je BAC klon 33L16 kandidátem pro detailní molekulární analýzu. Zejména osekvenování celého klonu by mohlo přinést zásadní poznatky pro pochopení unikátního párování zdánlivě nehomologních pohlavních chromosomů motýlů.

6. Souhrn

Ve své práci jsem se zabývala využitím bakteriálních umělých chromosomů (BAC) při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Z BAC knihovny obaleče jablečného jsem vyizolovala pomocí molekulárních markerů pohlavních chromosomů obaleče celkem 54 klonů BAC. Z těchto klonů byly tři selektovány pomocí sekvencí CpW2 a CpW5, specifických pro heterochromatinový chromosom W. U dvou z nich byla přítomnost W-specifické sekvence potvrzena pomocí PCR. Tyto klony dva BAC klony podle W-specifických sekvencí CpW2 a CpW5 jsem spolu s dalším klonem, který byl selektován dříve podle W-obohacené repetice, lokalizovala na chromosomech pomocí modifikované fluorescenční in situ hybridizace (FISH), tzv. BAC-FISH. Ostatní izolované klony nebyly detailně studovány a charakterizovány v této práci, neboť jsou objektem výzkumu jiných pracovníků naší laboratoře.

Zatímco BAC klony odvozené z euchromatinového chromosomu Z či z autosomů u jiných druhů motýlů poskytují striktně lokalizované signály, dva W-BAC klony mapované v této práci metodou BAC-FISH vykazovaly klastry signálů na více místech chromosomu W, na rozdíl od W-BAC sond u modelového druhu bource morušového, *Bombyx mori*, neobarvily uniformně celý chromosom W. Přestože oba dva klony hybridizovaly k chromosomu na více místech, což je pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem repetic na tomto chromosomu, ani jeden neoznačil celý chromosom jednotlivě. Roztroušené hybridizační signály těchto BAC klonů na chromosomu W sice podporují dřívější výsledky o převážně repetitivním obsahu tohoto chromosomu, ale zároveň poukazují na jeho heterogenní složení.

BAC klonů, odvozených z pohlavních chromosomů obaleče jsem využila k ověření hypotézy o nehomologním párování pohlavních chromosomů W a Z u motýlů. Avšak na rozdíl od dříve publikovaných údajů o nespecifickém a náhodném párování W a Z jsem prokázala u bivalentů WZ v pachytenních oocytech vždy shodnou vzájemnou orientaci W a Z, svědčící o specifickém párování těchto heterochromosomů v meióze I. Kromě toho, symetrická kolokalizace BAC klonu izolovaného pomocí genu, lokalizovaného na chromosomu Z, na obou pohlavních chromosomech svědčí o existenci homologní sekvence mezi těmito chromosomy, což by podporovalo teorii o vzniku pohlavního chromosomu W z autosomu, jehož homolog zfúzoval s původním chromosomem Z.

V další části mé práce jsem pomocí inverzní PCR a osekvenováním okolní oblasti prodloužila sekvenci CpW5, která je jedinou známou unikátní sekvencí chromosomu W obaleče, zhruba o dalších 590 bp. V získané sekvenci byl sice nalezen otevřený čtecí rámec, sekvence však nevykazovala žádnou homologii k dosud známým sekvencím. Tato prodloužená sekvence je velmi vhodným markerem pro izolaci dalších klonů BAC, odvozených z chromosomu W obaleče jablečného.

Výsledky mé práce významně přispívají k detailnímu poznání molekulárního složení chromosomu W, determinujícího samičí pohlaví a přinášejí nové zásadní poznatky o jeho chování během meiotického párování nejen u obaleče jablečného, ale u motýlů obecně.

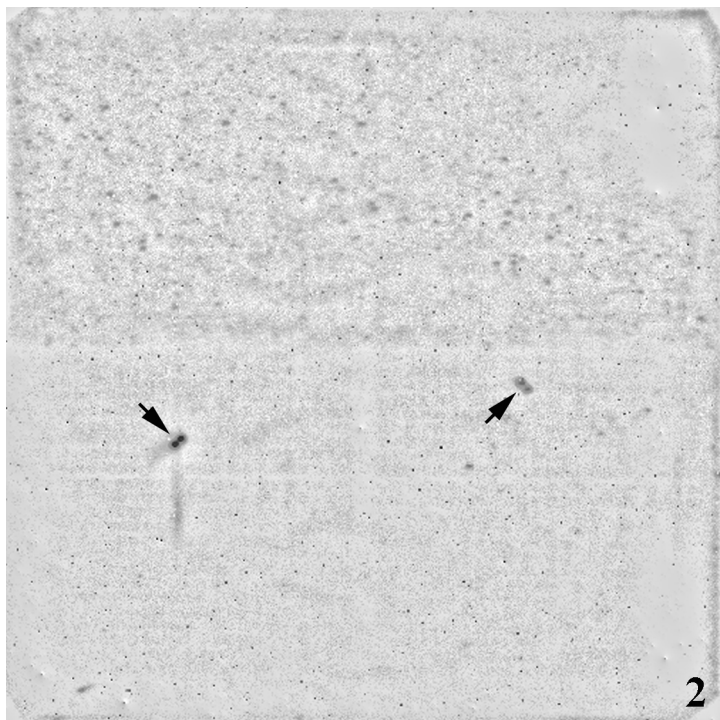
7. Literatura

- Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet. Genome Res.* **110**: 144-151.
- Frijters ACJ, Zhang Z, van Damme M, Wang GL, Ronald PC, Michelmore RW (1997) Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large EcoRI and HindIII genomic fragment of lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 390-399
- Fuková I, Neven LG, Bárcenas NM, Gund NA, Dalíková M, Marec F (2009) Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and larvae. *J. Appl. Entomol.* **133**: 249–261
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 1083–1092
- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubíčková S, Marec F (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**: 135-145
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* **251**: 1030-1033
- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.* **6**: 149-162
- Charlesworth B, Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosome. *Phil. Trans. Biol. Sci.* **355**: 1563-1572
- Charlesworth D, Charlesworth B (2005) Sex chromosomes: Evolution of the wierd and wonderful. *Curr. Biol.* **15**: 129-131
- Itoh Y, Kampf K, Arnold AP (2008) Molecular cloning of zebra finch W chromosome repetitive sequences: evolution of the avian W chromosome. *Chromosoma* **117**: 111-121
- Johnson MS, Turner JRG (1979) Absence of dosage compensation for a sex-linked enzyme in butterflies (*Heliconius*). *Heredity* **43**: 71-77
- Kawaoka S, Hayashi N, Katzuna S, Kishino H, Kohara Y, Mita K, Shimada T (2008) *Bombyx* small RNAs: Genomic defense system against transposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec.* **38**: 1058-1065
- Koike Y, Mita K, Suzuky MG, Maeda S, Abe H, Osoegawa K, deJong PJ, Shimada T (2003) Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a kettin ortholog. *Mol. Gen. Genet* **269**: 137-149
- Lovmar L, Syvänen AC (2006) Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies. *Hum. Mut.* **27(7)**: 603-614
- Lucchesi JC (1999) On the origin of sex chromosomes. *BioEssays* **21**: 188-190
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* **38**: 73-79.

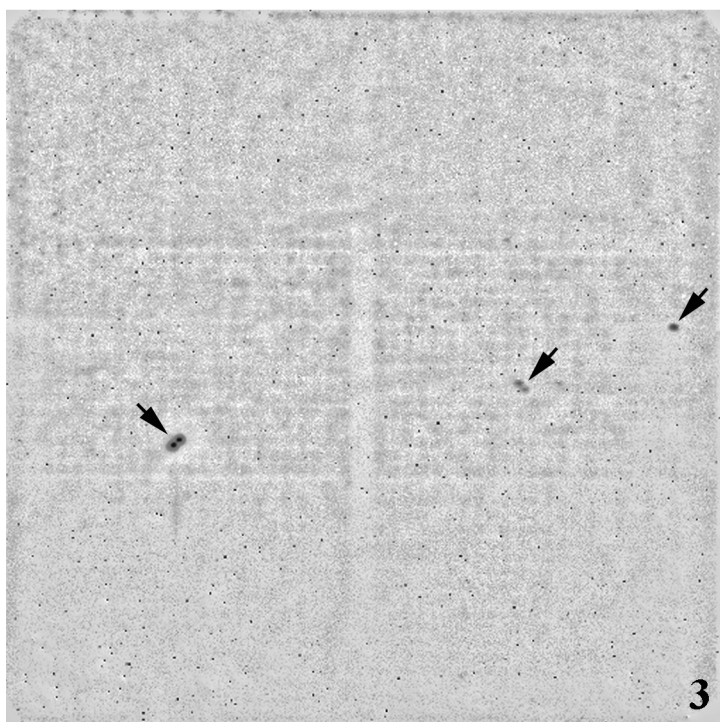
- Marec F, Novák K (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *Eur. J. Entomol.* **95**: 197-209
- Marec F, Thotová A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity* **87**: 659-671
- Marec F, Traut W (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in WZ translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome* **37**: 426-435
- McKee BD, Habera L, Vrana JA (1992) Evidence that intragenic spacer repeats of *Drosophila melanogaster* rRNA genes function as X-Y pairing sites in male meiosis and a general model for achiasmatic pairing. *Genetics* **132**: 529-544
- Monaco AP, Larin Z (1994) YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol.* **12**: 280-286
- Nguyen P (2009) Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného metodou BAC-FISH. Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Provazník J (2008) Identifikace genů chromosomu Z pro studium evoluce pohlavních chromosomů motýlů. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice
- Roohi J, Cammer M, Montagna C, Hatchwell E (2008) An improved method for generating BAC DNA suitable for FISH. *Cytogenet. Genome Res.* **121**: 7-9
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and apes Y chromosomes. *Nature* **423**: 873-876
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* **7**: 449-460.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H, Mita K, Oshiki T a kol. (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**: 48-55.
- Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fukova I, Zhang HB, Wu CC, Goldsmith MR, Yasukochi Y (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* **50**: 1061-1065
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragment of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *PNAS* **89**: 8794-8797
- Shizuya H, Kouros-Mehr H (2001) The development and application of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio. J. Med.* **50** (1): 26-30
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S a kol. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**: 825-837

- Song J, Dong F, Lilly JW, Stupar RM, Jiang J (2001) Instability of bacterial artificial chromosome (BAC) clones containing tandemly repeated DNA sequences. *Genome* **44**: 463-469
- Steinemann S, Steinemann M (2005) Y chromosome: born to be destroyed. *BioEssays* **27**: 1076-1083
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* **81**: 275-283
- Šíchová J (2009) Analýza pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) pomocí laserové mikrodisekce. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Tao OZ, Zhang HB (1998) Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4901-4909
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q. Rev. Biol.* **71**: 239-291
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Res.* **5**: 283-291
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* **1**: 332-346
- Traut W, Sahara K, Otto DT, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**: 173-180
- Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyramid moth (Lepidoptera). *Chromosome Res.* **15**: 917-930
- Wild J, Hradecna Z, Szybalski W (2008) Conditionally amplifiable BACs: Switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. *Genome Res.* **12**: 1434-1444
- Wu C, Asakawa S, Shimizu N, Kawasaki S, Yasukochi Y (1999) Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Gen Genet.* **261**: 698-706
- Wu C, Proestou D, Carter D, Nicholson E, Santos F, Zhao S, Zhang HB, Goldsmith MR (připravováno pro tisk) Construction and sequence sampling of deep-coverage, large-insert BAC libraries for three model Lepidopteran species.
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Shibata F, Yoshido A, Marec F, Wu C, Zhang HB, Goldsmith MR, Sahara K (připravováno pro tisk) Extensive conserved synteny of genes between karyotypes of *Manduca sexta* and *bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping.
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K (2005a) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**: 193-202
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005b) Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**: 193-202

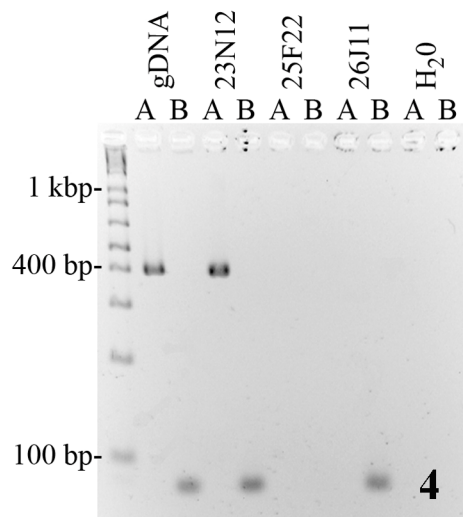
- Yoshido A, Yasukochi Y, Marec F, Abe H, Sahara K (2007) FISH analysis of the W chromosome in *Bombyx mori* and several other species of Lepidoptera by means of *B.mori* W-BAC probes. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **76**: 1-7
- Zha X, Xia Q, Duan J, Wang C, He N, Xiang Z (2009) Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press



2



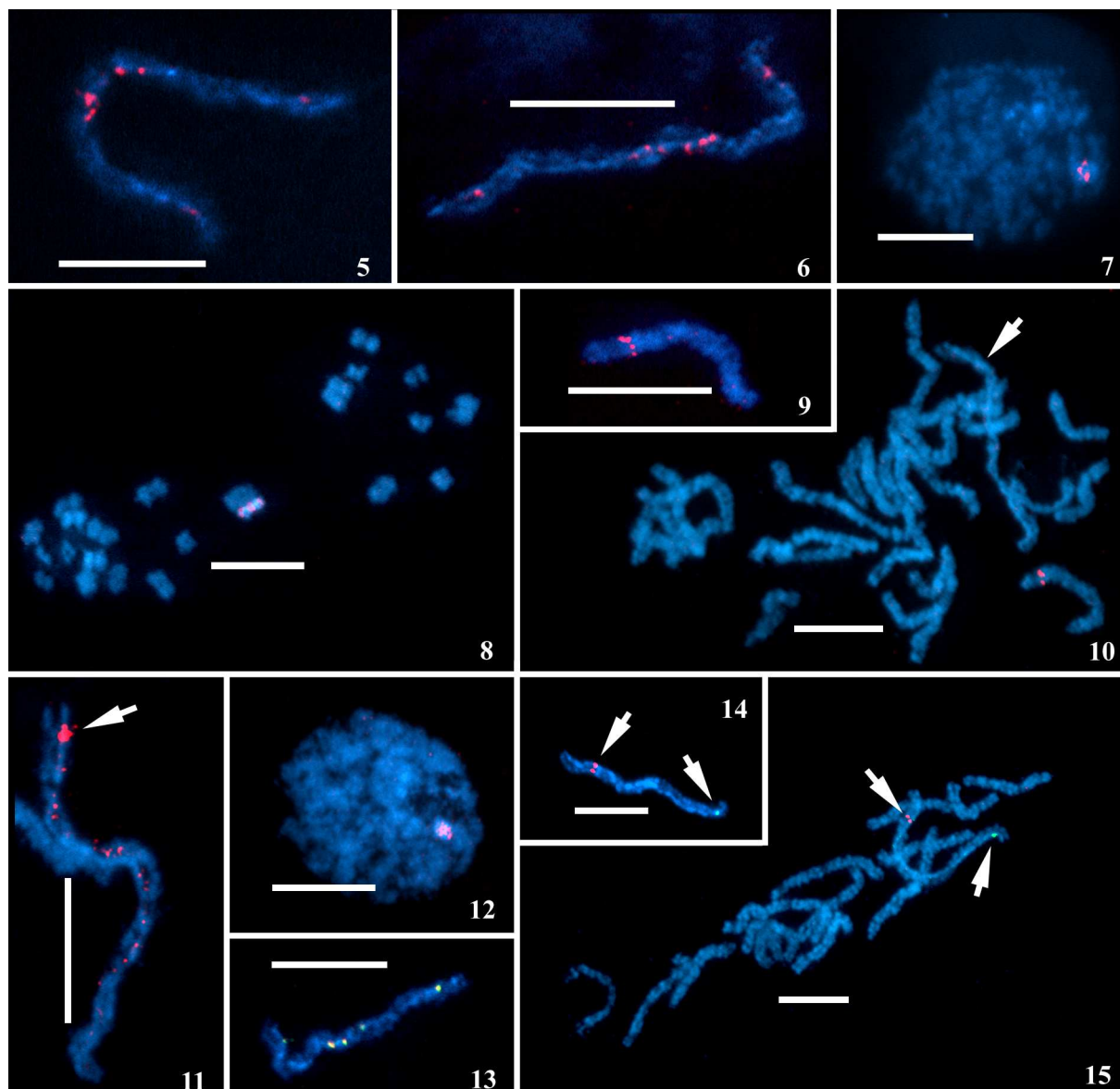
3



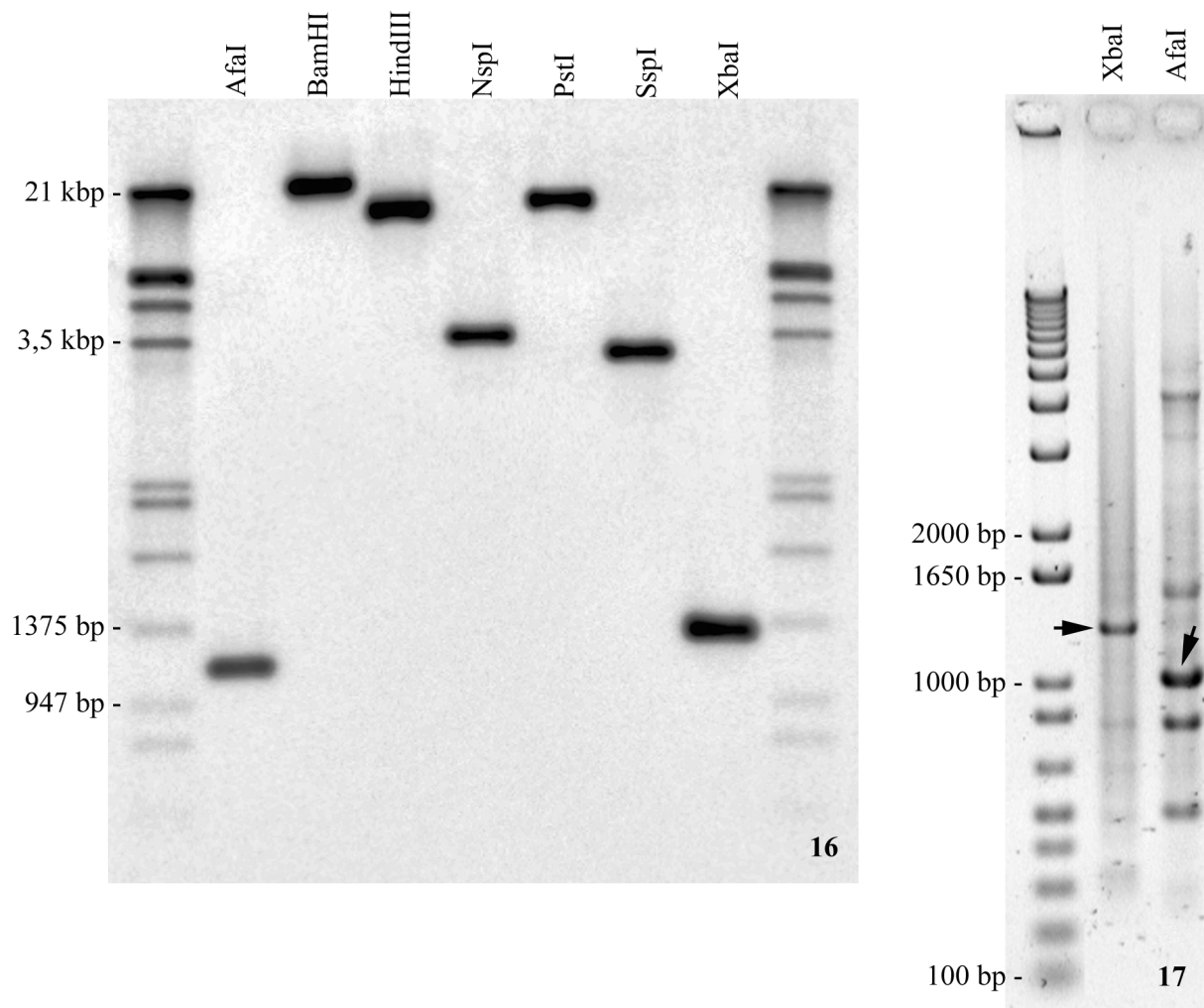
Obr. 2. “High density colony filter” po hybridizaci s CpW2 sondou. Šipky ukazují na signály, které odpovídají BAC klonům 23N12 a 26J11. Délka expozice byla 30 minut.

Obr. 3. “High density colony filter” po hybridizaci s CpW5 sondou. Šipky ukazují na signály, které odpovídají BAC klonům 23N12, 25F22 a 26J11. Délka expozice byla 30 minut.

Obr. 4. PCR test BAC klonů na přítomnost CpW2 (A) a CpW5 (B) sekvence. Jako pozitivní kontrola byla použita samičí genomová DNA. Fragmenty byly analyzovány na 3% agarózovém gelu, jako velikostní marker jsem použila 1 kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).



Obr. 5-15. FISH s BAC klony. Červené signály odpovídají sondám značeným fluorochromem Cy3, zelené fluorochromem SpectrumGreen. Chromosomy jsou podbarveny DAPI. Měřítko představuje 10 μ m. **5-6.** WZ bivalent s hybridizačními signály BAC klonu 23N12. **7.** Interfázní jádro po hybridizaci s klonem 23N12. **8.** Chromosomy nutritivní buňky ve stádiu metafáze I, hybridizace s klonem 23N12. **9-10.** Autosomální bivalent a pachytenní jádro po hybridizaci s BAC klonem 26J11. Šipka označuje WZ bivalent. **11-12.** WZ bivalent a interfázní jádro po hybridizaci BAC klonem W27-1. Šipka označuje hlavní hybridizační signál. **13.** WZ bivalent po hybridizaci s BAC klonem 23N12, červeně je značená BAC DNA a zeleně DNA namnožená pomocí illustria GenomiPhi HY Amplification Kit (GE Healthcare). **14-15.** WZ bivalent a pachytenní jádro po hybridizaci s zeleně značeným BAC klonem W27-1 a červeně značeným klonem 33L16. Signály jsou označeny šipkami.



Obr. 16. Southernova hybridizace BAC klonu 23N12 štěpeného různými restrikčními enzymy s CpW5 sondou. Jako velikostní marker jsem použila DNA marker III, DIG-labeled (Roche Diagnostics). Délka expozice byla 10 sekund.

Obr. 17. Inverzní PCR s primery navrženými podle CpW5 sekvence. Jako templát sloužil BAC klon 23N12 štěpený restrikčním enzymem AfaI nebo XbaI. Fragменты jsem analyzovala na 1% agarózovém gelu, jako velikostní marker jsem použila 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). Šipky označují proužky, které jsem z gelu vyizolovala, zaklonovala a částečně osekvenovala.