

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Katedra genetiky



**Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní  
sekvence genu *Notch* (*Drosophila*) u obaleče  
jablečného, *Cydia pomonella***

Diplomová práce

**Bc. Václav Kůta**

školitel: Prof. RNDr. František Marec, CSc.

České Budějovice

2011

Kůta V., 2011: Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní sekvence genu *Notch* u obaleče jablečného, *Cydia pomonella* [Isolation, characterization and localization of orthologous sequence of the *Drosophila Notch* gene in codling moth, *Cydia pomonella*. Mgr. Thesis, in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The codling moth, *Cydia pomonella* (Tortricidae) is a significant pest in apple orchards. In the 1990ies, a control programme using the Sterile Insect Technique (SIT) has been established, based on bisexual releases of sterile insects into wild populations of this pest. Male-only releases are not possible due to the lack of an efficient system to produce male-only progeny. Recently, a new approach has been proposed for the development of genetic sexing strains in Lepidoptera. It is based on insertion of a dominant conditional lethal mutation of the *Notch* gene, derived from the  $N^{60g11}$  allele of *Drosophila*, into the female W chromosome by means of transgenesis. This study deals with isolation, characterization, and chromosomal localization of a codling moth orthologue of the *Drosophila Notch* gene with the aim to prepare a mutant sequence of the orthologue to be used in plasmid constructs for germline transformation of this pest.

**Finanční podpora:**

Práce byla financována z grantu GAČR č. 523/09/2106 při Entomologickém ústavu BC AV ČR a z projektu GA JU č. 137/2010/P.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 2. 1. 2011

.....

Václav Kůta

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli za to, že mi umožnil práci na tomto tématu, při níž jsem si osvojil řadu cytogenetických i molekulárně biologických metod. Dále bych chtěl poděkovat kolegům, se kterými jsem spolupracoval na jednotlivých dílčích částech mé práce, především Radmile Čapkové-Frydrychové a Mirce Sýkorové, v neposlední řadě také Martině Dalíkové a Petru Nguyenovi, kteří mi vždy ochotně poradili, když jsem si nevěděl rady, a také ostatním členům laboratoře za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Také chci poděkovat všem svým přátelům, a rodině za podporu během mých studentských let. Na závěr bych také rád poděkoval Grantové agentuře za poskytnutí potřebných finančních prostředků.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Regulace populací hmyzích škůdců metodou SIT</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Genetická separace pohlaví</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. Balancovaně letální linie .....	3
1.2.2. Podmíněná letalita .....	4
<b>1.3. Gen <i>Notch</i></b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Struktura proteinu <i>Notch</i> .....	6
1.3.2. Signální dráha <i>Notch</i> .....	8
1.3.3. Mutantní alela N <sup>60g11</sup> .....	10
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. Materiál - obaleč jablečný</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2. Sekvenační analýza</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Izolace RNA .....	13
3.2.2. Syntéza cDNA .....	13
3.2.3. Navrhování primerů a amplifikace PCR .....	14
3.2.4. Purifikace PCR produktů .....	15
3.2.5. Ligace .....	15
3.2.6. Transformace kompetentních bakterií .....	16
3.2.7. Izolace plazmidové DNA a ověření přítomnosti inzertu .....	16
3.2.8. Sekvenování pozitivních klonů .....	17
3.2.9. Analýza sekvencí .....	17
<b>3.3. Kvantitativní PCR</b> .....	<b>17</b>
3.3.1. Extrakce genomové DNA .....	18
3.3.2. Kvantifikační strategie .....	18
3.3.3. Příprava reakce .....	18
3.3.4. Vyhodnocování výsledků .....	19
<b>3.4. Lokalizace genu <i>Notch</i> na chromosomech obaleče jablečného metodou BAC-FISH</b> .....	<b>19</b>
3.4.1. Příprava sondy .....	19
3.4.2. Vlastní prohledávání BAC knihovny .....	20
3.4.3. Extrakce BAC DNA .....	20
3.4.4. Značení sondy pro BAC-FISH .....	20
3.4.5. Příprava chromosomálních preparátů .....	21
3.4.6. Vlastní hybridizace .....	21
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1. Sekvenační analýza</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3. Lokalizace genu <i>Notch</i> na chromosomech obaleče jablečného metodou BAC-FISH</b> .....	<b>26</b>
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1. Charakterizace genu a proteinu <i>Notch</i></b> .....	<b>29</b>
<b>5.2. Lokalizace genu <i>Notch</i></b> .....	<b>29</b>
<b>5.3. Příprava pro budoucí transformaci obaleče jablečného mutantní verzí genu <i>Notch</i></b> .....	<b>30</b>
<b>6. SOUHRN</b> .....	<b>35</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>36</b>

# 1. ÚVOD

Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*, “codling moth”) je významný motýlí škůdce malvicových plodů (jablek, hrušek a kdoulí) a v některých oblastech i vlašských ořechů (Barnes 1991). Dříve byly volně žijící populace obaleče jablečného regulovány především širokospektrálními insekticidy. Extenzivní používání organofosfátových a jiných širokospektrálních insekticidů ale u obaleče vedlo k vývoji rezistence a křížové rezistence na tyto chemikálie (Varela et al. 1993), nemluvě o negativním dopadu na životní prostředí. Proto se způsob regulace populací tohoto škůdce přesunul z chemických metod na metody biologické, především na techniky používající sterilní jedince (“Sterile Insect Technique”, SIT) (Marec et al. 2005, Vreysen et al. 2010).

## 1.1. Regulace populací hmyzích škůdců metodou SIT

Obecně se jedná o metodu regulace volně žijících populací škodlivých druhů hmyzu, založenou na masových chovech škůdce následné introdukce velkého množství geneticky sterilních jedinců do volně žijící populace. Sterility je dosaženo působením ionizujícího záření, které indukuje u ozářených jedinců četné chromosomální zlomy, projevující se následně jako dominantně letální mutace (Robinson 2002a). Tato metoda byla úspěšně aplikována zatím u dvou motýlích druhů: u makadlovky *Pectinophora gossypiella* v USA (Staten et al. 1993) a právě u obaleče jablečného. Po prvních aplikacích SIT u obaleče v letech 1976-78 (Proverbs et al. 1982) byl v roce 1992 zahájen rozsáhlý program regulace tohoto škůdce v údolí Okanagan v Britské Kolumbii v Kanadě (Dyck et al. 1993, Bloem et al. 2000). Tento program dosáhl velmi dobrých výsledků – během deseti let se používání insekticidů snížilo o 82% a podíl jabloňových sadů nedotčených obalečem vzrostl ze 42% v roce 1995 na 91% v 1997 (Bloem et al. 2005). I přes tyto výborné výsledky je snaha dále regulaci obalečů touto metodou zefektivnit. Současná metoda SIT aplikovaná u obaleče jablečného je totiž založena na introdukci sterilních jedinců obou pohlaví (“bisexual releases”). U hmyzích škůdců z řádu *Diptera* však bylo experimentálně prokázáno, že mnohem efektivnější je vypouštění pouze sterilních samců (Rendón et al. 2004). Podobně i u obalečů lze předpokládat, že vypouštění

sterilních samců (“male-only releases“) by znamenalo redukci asortativního párování, zvýšení konkurenceschopnosti ozářených samců a v neposlední řadě také znatelné snížení nákladů (Marec et al. 2005). Bohužel u obaleče jablečného, ani u žádného jiného škůdce z řádu *Lepidoptera*, zatím nebyl vyvinut žádný efektivní způsob separace pohlaví, aplikovatelný v podmínkách masového chovu.

## 1.2. Genetická separace pohlaví

Snaha o genetickou separaci pohlaví, hlavně eliminaci samic (nejlépe už v embryonálním stádiu) a vytváření kmenů (“genetic sexing strains“, GSS) produkujících pouze samce, pramení nejen z úsilí o zefektivnění technik regulujících populace hmyzích škůdců metodou SIT, ale někdy také z čistě ekonomických záměrů. Je například známo, že samec bource morušového (*Bombyx mori*) produkuje o 20% více hedvábí než samice (Strunnikov 1987).

První GSS pro SIT byly vyvinuty v r. 1994 u význačného škůdce citrusových plodů, mouchy *Ceratitis capitata*. Sexingu u ní bylo dosaženo na základě dvou systémů translokací, vázaných na samčí pohlaví – jeden založený na barvě kukly (*wp*) a druhý na teplotní senzitivě (*tsl*). U kmenů *tsl* jsou samičí zygoty eliminovány vystavením vyšší teplotě. Podmíněná letalita samic je způsobena homozygotní konstitucí mutantní alely, kdežto samci jsou zachráněni díky tomu, že mají divokou alelu daného genu translokovanou na chromosom Y. U kmenů *wp* jsou samci a samice separovány podle barvy kukly (Robinson, 2002b).

U motýlů ale není možné použít podobné systémy genetické separace pohlaví jako u dvoukřídých. Je to dáno tím, že motýli mají heterogametické samičí pohlaví (typ *Abraxas* – samci mají zpravidla pohlavní chromosomy ZZ, samice WZ). Dřívější snahy o vývoj genetických linií či GSS, umožňující separaci pohlaví u motýlů byly založeny na mendelistických postupech. Tyto snahy byly téměř výhradně omezeny na bource morušového s cílem oddělit a masově chovat samčí potomstvo kvůli již zmíněné vyšší produkci hedvábí. První tzv. “sex-limited“ linie byly vytvořeny translokací autosomálního genu pro nějaký viditelný znak (např. barva vajíček nebo kokonu, fenotyp larvy) na chromosom W pomocí ionizačního záření. Tyto znaky se pak dědily jen přes samičí

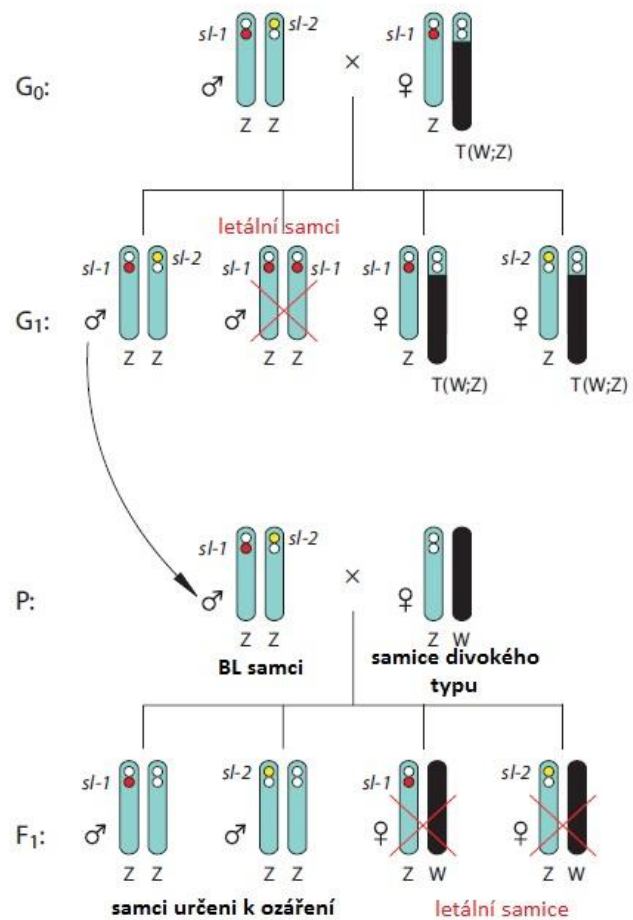
potomstvo a separace samců od samic pak byla prováděna manuálně podle fenotypu (viz souhrnný přehled v práci Nagaraju 1996).

### 1.2.1. Balancovaně letální linie

V roce 1975 byla navržena sofistikovanější metoda (Strunnikov, 1975), založená na konstrukci balancovaně letálních (BL) linií. Samci takových linií jsou trans-heterozygotní pro dvě nealelické, na chromosom Z vázané recesivní letální mutace, nejlépe exprimované už v embryogenezi (jedná se o bodové mutace nebo malé delece indukované mutagenem jako je např. ethylmethansulfonát). Tyto dva letální lokusy (např. *sl-1* a *sl-2*) by se měly nacházet blízko sebe na chromosomu, aby se minimalizovala pravděpodobnost rekombinace mezi nimi (měly by být v silné vazbě). Ionizujícím zářením (např. paprsky  $\gamma$ ) je u samic indukována translokace části chromosomu Z na chromosom W, tzv. T (W;Z) translokace. Tato translokace obsahuje standardní (funkční) alely obou letálních lokusů, což samice chrání před expresí některé letální alely. Polovina samčího potomstva zahyne už během embryonálního vývoje, protože jedna z letálních alel je v homozygotním stavu. Přeživší samci jsou „balancovaní“ pro dvě letální alely (BL samci). Produkce jednoho pohlaví („sexingu“) je dosaženo poté, co se BL samci spáří se samicemi divokého typu - produktem takového zkřížení je téměř výhradně samčí potomstvo, samičky umírají díky hemizygotnímu stavu jedné z letálních alel (Obr. 1).

Podle schématu V. A. Strunnikova byla například konstruována komerční odrůda bource morušového zvaná „Platina Boy“. Při konstrukci této linie byl pro každý krok použit genetický marker lokalizovaný na pohlavním chromosomu Z pro usnadnění detekce indukovaných mutací a T (W;Z) translokací nutných pro vytvoření balancované letálních linií a pro usnadnění jejich následného chovu. U bource byly konkrétně použity tři pohlavně-vázané markerové geny: *os* (průhledná kůže larev), *sch* (čokoládová barva těla nově vylíhlých larev) a *e* (prodloužené tělo larev) (viz souhrnný přehled v práci Traut et al. 2007). U jiných motýlů je však obtížné takovéto markery nalézt. Další velkou nevýhodou této metody je nutnost udržovat v masovém chovu dvě linie, mutantní BL a divokou, a nutnost pravidelné kontroly genetické struktury BL linie kvůli možné rekombinaci a kontaminaci. Kromě bource byly balancovaně letální linie konstruovány i u zavíječe moučného, *Ephesia kuehniella* (Marec 1991, Marec et al. 1999). Avšak díky výše uvedeným nevýhodám metoda BL linií není příliš vhodná pro produkci samců pro SIT v masových chovech (Marec et al. 2007).

**Obr. 1** – Schéma balancované letální linie a její využití pro produkci pouze samčího potomstva u zavíječe moučného, *Ephesia kuehniella* (upraveno podle Marec et al. 1999 a Traut et al. 2007). W, Z – pohlavní chromosomy; T(W;Z) – translokace části chromosomu Z na W; *sl-1*, *sl-2* – pohlavně-vázané recesivně letální mutace.



### 1.2.2. Podmíněná letalita

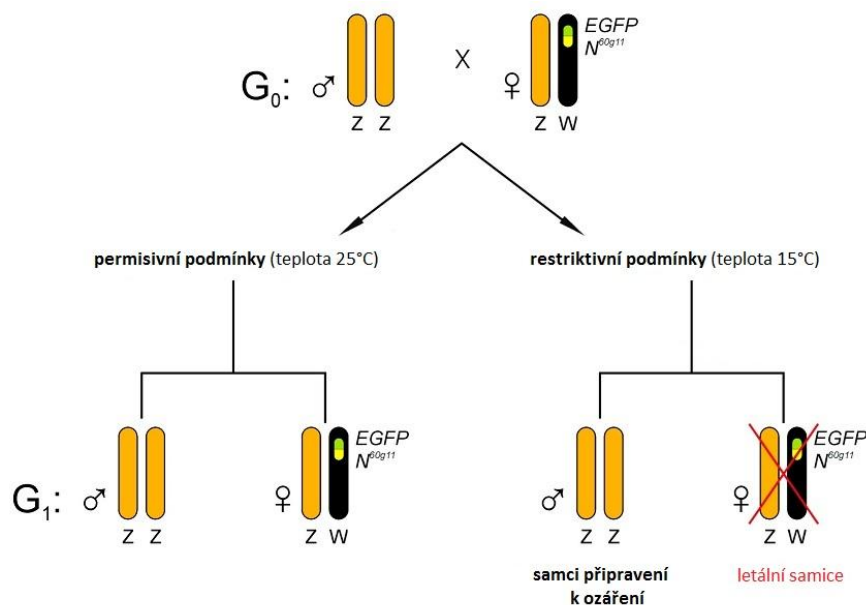
Problém udržování obou linií by teoreticky vyřešilo použití systému genetické separace pohlaví, založeného na dominantní podmíněně letální mutaci (DCLM) na samičím chromosomu W – DCLM by se dědila pouze matrilineárně, samci by nenesli žádnou mutaci, byli by tedy divokého typu. Obecný princip podmíněné letality je ten, že při permissivních podmínkách nemá DCLM mutace žádný nebo má jen nepatrný vliv na život jedince, zatímco při restriktivních podmínkách (např. změna teploty) by přítomnost DCLM alely znamenala letalitu pro jedince, který ji nese (Obr. 2). Problém ale je, že motýlí chromosom W neobsahuje takřka žádné geny (Traut et al. 2007, Marec et al. 2010), ve kterých by se dala DCLM indukovat klasickou mutagenezí. Kromě toho u žádného motýlího druhu dosud žádná DCLM izolována nebyla (Marec et al. 2005).

Řešením tohoto problému by mohla být transgenóza – vpravení nějaké známé DCLM přímo do genomu cílového druhu prostřednictvím nějakého vektoru (Marec et al. 2005). U



několika motýlích druhů již bylo dosaženo úspěšné transformace zárodečné linie za použití konstruktů obsahujících jako vektor transponovatelný element *piggyBac*. Mezi tyto druhy patří např. bourec morušový (Tamura et al. 2000), makadlovka *Pectinophora gossypiella* (Peloquin et al. 2000) a také právě obaleč jablečný (Ferguson et al. 2010).

Ideální DCLM je mutace nějakého známého genu, který je v rámci hmyzu konzervovaný (aby byla aplikovatelná i u jiných druhů), nezbytný pro ontogenetický vývoj, nejlépe exprimovaný v embryogenezi a disponující vysokým stupněm dominance – jedna kopie DCLM alely musí být podmíněně dominantní nad dvěma kopiemi normálního genu. To je důležité, protože rekombinantní DNA se vloží do náhodného místa na chromosomu a při nízkém stupni dominance by tyto inzerty nemusely převážít účinek normálního homologického páru alel u diploidního příjemce. Dle práce Marec et al. (2005) je vhodným kandidátem mutace genu *Notch* ( $N^{60g11}$ ), popsaná u *Drosophila melanogaster* (Fryxell & Miller 1995).



**Obr. 2** – Schéma konstrukce genetické sexing linie založené na dominantně podmíněně letální mutaci mutace genu *Notch* ( $N^{60g11}$ ), popsané u *Drosophila melanogaster*, vpravené na chromosom W (upraveno podle Marec et al. 2005, 2007). W, Z – pohlavní chromosomy; EGFP – reportérový gen pro “Enhanced green fluorescent protein”.

### 1.3. Gen *Notch*

Gen *Notch* byl poprvé popsán v r. 1917 T.H. Morganem u *D. melanogaster* podle morfologické mutace projevující se zářezem na čepeli křídel. Teprve později bylo zjištěno, že se jedná o velmi důležitý gen ovlivňující řadu ontogenetických procesů (Welshons and von Halle 1962). Proteinem Notch zprostředkovaná signální dráha je v rámci mnohobuněčných živočichů evolučně konzervovaný mechanismus mezibuněčné komunikace, který má zásadní význam při diferenciačních procesech v zárodečném vývoji a homeostázi tkání u dospělců (Gordon et al. 2008). To dokazuje embryonální letalita spojená s poruchami signalizace Notch u mnohých modelových organismů, jakými jsou *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* a myš (Gordon et al. 2008), ale i různé typy vývojových anomálií a rakovin u člověka jako například Alagillův syndrom, spondylokostální dysotóza, mozková autosomálně dominantní arteriopatie, akutní lymfatická leukémie T buněk nebo TFAS syndrom (Tsien et al. 2009).

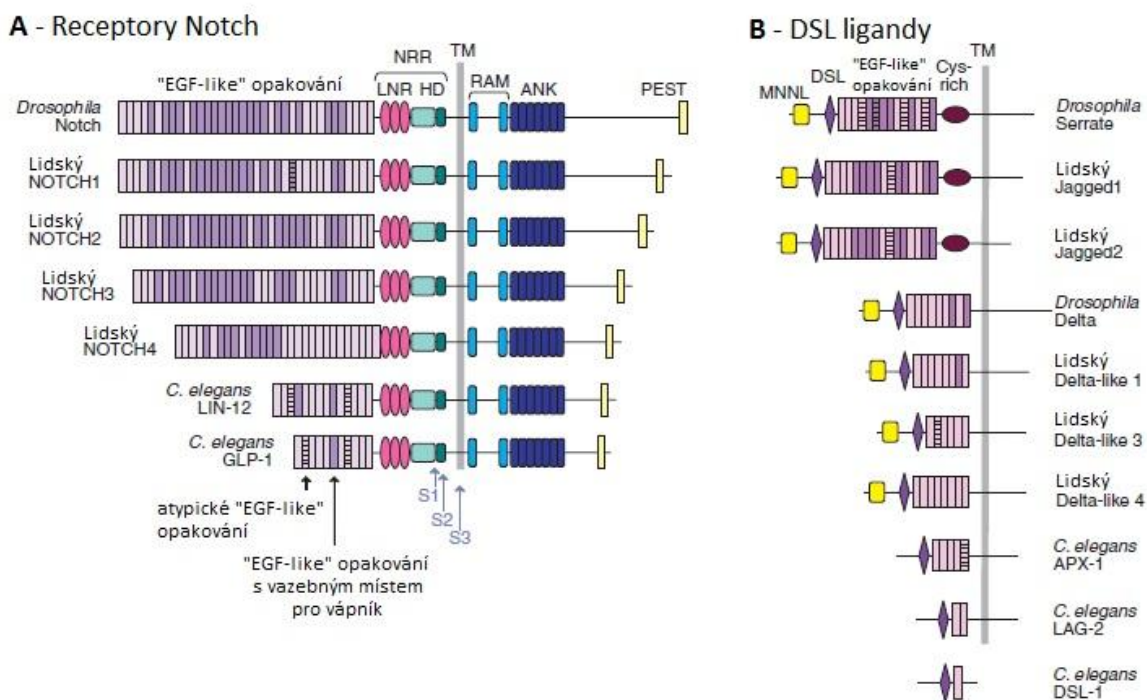
#### 1.3.1. Struktura proteinu Notch

Notch je transmembránový receptor s heterodimerní modulární strukturou, složený z extracelulární, krátké transmembránové a intracelulární domény, které jsou spojené Ca-dependentní nekovalentní vazbou.

N-terminální extracelulární doména (ECD/ECN) obsahuje u drozofily asi 1700 aminokyselin (aa) je u drozofily tvořena 36 repeticemi bohatými na cystein, vykazující podobnost s epidermálním růstovým faktorem (EGF, "epidermal growth factor-like repeats"), a regionem negativní regulace (NRR). Každá "EGF-like" repetice má okolo 38 aminokyselin (aa) a její terciární strukturou je ohyb ("fold") složený z dvouvláknového antiparalelního beta listu a především šesti konzervovaných cysteinových zbytků, které tvoří tři páry disulfidických vazeb. Většina „EGF-like“ repetice má N-terminální vazebné místo pro vápník. Vazba vápníkového kationtu je totiž důležitá při interakcích protein-protein. Má se za to, že gen vznikl opakovanou tandemovou duplikací těchto DNA jednotek. Kromě savčích růstových hormonů jsou tyto opakující se segmenty homologní s částmi srážecích faktorů IX a X u savců (Kidd et al. 1986) a zárodečnými proteiny Lin-12 (14 repetice) a Glp-1 (11 repetice) u *C. elegans*. NRR se skládá ze tří LNR (Lin-12/Notch, NL) domén (složených z repetice

bohatých na cystein) a heterodimerní domény (HD), a obsahuje štěpné místo pro furin (S1) a metaloproteázu (S2) (Gordon et al. 2008).

Intracelulární (cytoplazmatická) doména (ICD/ICN, u drozofily asi 900 aa) obsahuje N-terminální doménu RAM, ankyrinovou doménu (ANK), variabilní transaktivační doménu a C-terminální motiv PEST. Doména ANK obsahující 7 ANK repetit (homologních s cdc10/SWI6 repetitami – sekvencemi vyskytujících se u některých protein-protein interakcí) je nejkonzervovanější oblastí ICD a je nezbytná pro funkci celého receptoru. Každá tato repetice je asi 33 aa dlouhá, složená do páru antiparalelních helixů, následovaných beta-vlásenkou, která navazuje na další repetici (Gordon et al. 2008). Motiv PEST se vyznačuje vysokou koncentrací prolinu, glutamové kyseliny, aspartátu, serinu a threoninu, a reguluje změnu konformace ICD po aktivaci. Struktura proteinu Notch u různých modelových druhů je zobrazena na Obr. 3.



**Obr. 3** – Organizace jednotlivých domén receptoru Notch (A) a ligandů z rodiny DSL (B) u drozofily, člověka (savci mají 4 proteiny Notch) a *C. elegans* (upraveno podle Gordon et al. 2008). Viz kap. 1.3.1. a 1.3.2. pro bližší informace a vysvětlení zkratk.

### 1.3.2. Signální dráha Notch

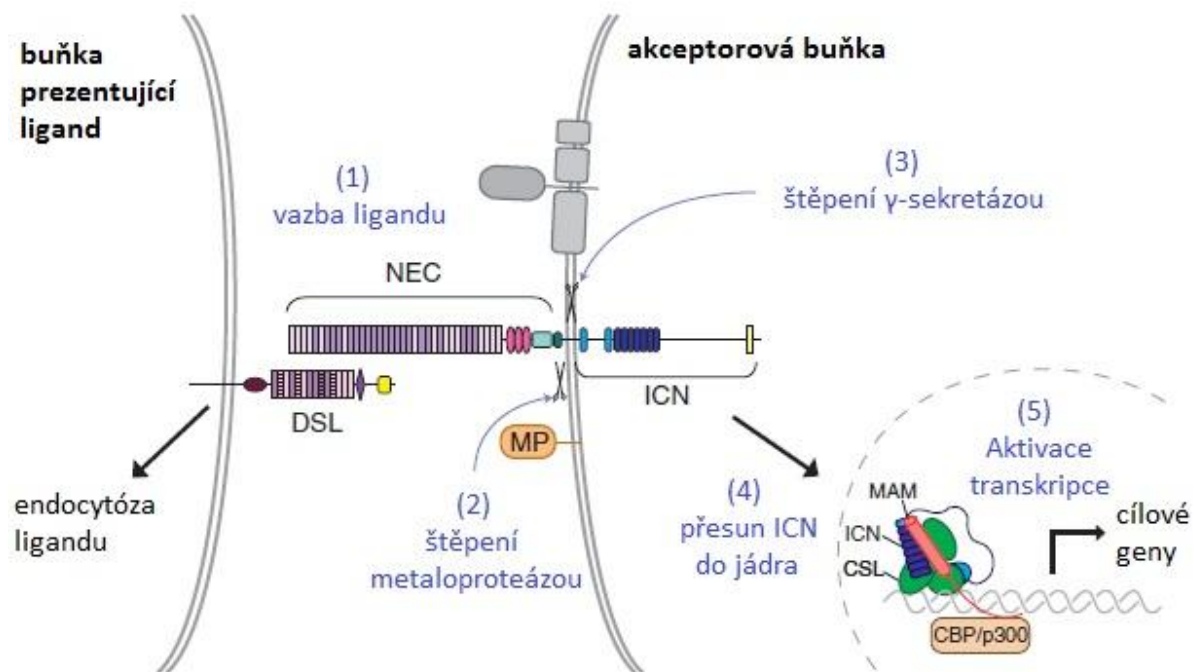
Aktivace proteinem Notch zprostředkované signální dráhy je zahájena prostřednictvím ligandů (Delta/Serrate/LAG-2) rodiny DSL (Fehon et al. 1990). Jedná se vesměs o jiné transmembránové receptory, proto aktivace této dráhy probíhá prostřednictvím kontaktu dvou buněk. Drozofila disponuje dvěma ligandy, Delta a Serrate; u savců jsou obdobné ligandy: 3 Delta-like (Dll 1, 2 a 4), 2 Jagged (místo Serrate) a mnoho dalších, např. F3/contactin. Ligandy DSL mají na N-konci konzervovaný modul MNNL (“module at the N-terminus of Notch ligands”), u *C. elegans* se však tento modul nevyskytuje. Dále následuje doména DSL bohatá na cystein, následovaná řadou repetitivních “EGF-like”, tvořících transmembránový segment. Serrate a Jagged také obsahují doménu bohatou na cystein mezi “EGF-like” repetitivcemi a transmembránovou doménou, zatímco ligandy Delta ne (Gordon et al. 2008).

Vazba ligandu DSL na extracelulární doménu Notch zahajuje proces zvaný regulovaná intramembránová proteolýza (RIP), který zahrnuje dvě proteolytická štěpení (Gordon et al. 2008). Při prvním štěpení metaloproteáza TACE (“Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme”) z proteinové rodiny ADAM štěpí protein Notch vně membrány na specifickém místě (S2) (Brou et al. 2000); tím se tato vnější část uvolní, zůstane navázaná na ligand a tento komplex je pak endocytován buňkou prezentující ligand. Následuje druhé štěpení: enzym  $\gamma$ -sekretáza štěpí zbytek proteinu v místě S3/4 na vnější straně v oblasti NEXT (“*Notch external truncation*”) (De Strooper et al. 1999). To uvolní intracelulární část proteinu Notch (ICN), jež následně putuje do jádra, kde nakonec aktivuje komplex transkripčních aktivátorů (Jarriault et al. 1995), např. na *hes 1* (“*Hairy and enhancer of split 1*”) promotoru, a tím pádem expresi genů nacházejících se ve směru 3’ (Obr. 4).

Tento aktivační komplex (“*Notch ternary complex*”, NTC) je tvořen faktorem ICN ( $N^{intra}$ ), CSL (“C-promotor-binding factor” - CBF1/RBPJk u savců, “suppressor of hairless” - SuH u much a LAG-1 u *C. elegans*) a koaktivátorem z proteinové rodiny Mastermind (MAM/LAG-3/MAM-like u savců) (Gordon et al. 2008). Aktivace transkripce na vazebných místech CSL také závisí na účasti přídavných koaktivátorů p300 (E1A vázající protein) a CBP (CREB vázající protein) (Gordon et al. 2008). CSL má 3 domény: RHR-N, BTD a RHR-C. Nejprve dojde k vysoce afinitní interakci mezi doménou RAM proteinu Notch a doménou BTD proteinu CSL. Tento krok umožní následnou nízkoafinitní interakci domény ANK s doménami

RHR (Gordon et al. 2008). Vznikne tak kompoziční místo pro vazbu MAM v komplexu s CBP/p300. Aktivitu CSL ovlivňují některé proteiny, které také vážou intracelulární doménu Notch - Deltex (Dx), Numb, Dishevelled (Dsh) a Hairless (Wesley & Saez 2000). Deltex přispívá dráze zprostředkované komplexem ICN-CSL (Matsuno et al. 1995), zatímco Numb, Dishevelled a Hairless na tuto dráhu působí antagonisticky.

Během embryogeneze drozofily se tvoří dvě formy proteinu Notch. Při laterální inhibici se vytváří nezkrácený protein Notch (Nfull), ve stádiu následujícím po laterální inhibici (když se začíná vytvářet centrální nervová soustava, CNS) se tvoří proteiny Notch, kterým chybí C-terminální část od konce domény ANK (NΔCterm). Tento zkrácený receptor, který nemá vazebná místa pro Dishevelled, jedno ze dvou pro Numb a PEST sekvenci, pak může sloužit jako receptor jen pro Deltex (Wesley & Saez 2000). Buňky s receptory Nfull vykazují vysokou hladinu signalizace Notch, spouští expresi genů E(spl)C (“Enhancer of split complex”), zastaví expresi protoneurálních genů “Achaete scute complex” a stávají se epidermálními prekurzorovými buňkami (EPC). Buňky produkující velké množství NΔCterm vykazují nízkou hladinu Nfull a slabou Notch signalizaci, nespustí se u nich exprese E(spl)C, zato u nich pokračuje exprese genů “Achaete-scute complex” a stanou se neurálními prekurzory (NPC) (Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Wesley & Mok 2003).



**Obr. 4** – Signální dráha Notch (upraveno podle Gordon et al. 2008). Bližší informace viz kap. 1.3.2.

V embryonálním stádiu je tedy aktivita Notch důležitá zejména pro diferenciaci ektodermu a v zásadě určuje, zda se ektodermální buňka diferencuje v neurální nebo epidermální prekurzor, přičemž rozhodující je poměr množství Nfull / NΔCterm. Buňky s vyšší hodnotou poměru jsou schopny akumulovat protein CSL, čímž se zvýší přístup tohoto proteinu pro Nfull, a to má na principu pozitivní zpětné vazby za následek další zvýšení množství CSL. Tím je zajištěna stabilní signalizace Notch v epidermálních buňkách. Naproti tomu u buněk s nižším poměrem Nfull / NΔCterm je snížena přístupnost CSL pro Nfull a díky negativní zpětné vazbě je pak množství CSL a Nfull ještě více sníženo. Nakonec signalizace Notch v těchto buňkách úplně vymizí a stanou se z nich buňky NPC (CNS) (Wesley & Mok 2003).

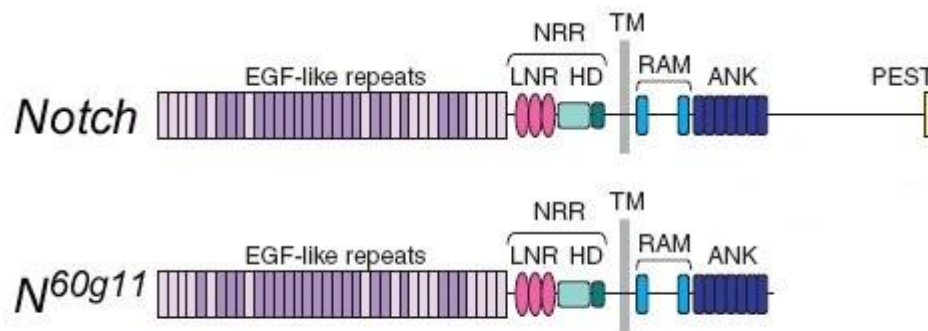
### 1.3.3. Mutantní alela N<sup>60g11</sup>

U drozofily bylo (většinou rentgenovým zářením) indukováno několik mutací lokusu *Notch* za účelem změny struktury exprimovaného proteinu. Fenotypové projevy těchto mutací, např. přítomnost výše zmíněných vroubků na křídlech, množství hrudních chloupků, uspořádání omatidií a další znaky související s vývojem nervového systému, ale především letalita, byly studovány jak v homozygotní, tak heterozygotní konstituci (Lyman et al. 1993).

Pro nás je nejdůležitější mutantní alela N<sup>60g11</sup>. Jedná se o dominantní zesilující (“gain-of-function”) mutaci, způsobenou nukleotidovou substitucí (Ser→Gly na pozici 2257) a šestnáctinukleotidovou delecí T<sup>15442</sup>-A<sup>15457</sup>. Delece způsobuje v intracelulární doméně posun čtecího rámce, což má za následek ztrátu části intracelulární domény, zahrnující motiv PEST. Doména ANK však zůstává zachována, což pravděpodobně způsobuje dominanci. Mutantní alela N<sup>CO</sup> má totiž intracelulární doménu deletovanou úplně a chová se pak jako neplatná alela, čili nulová mutace (Lyman et al. 1993). Struktura proteinu kódovaného touto alelou je zobrazena na Obr. 5.

Důležité je, že zkrácená verze proteinu mutace N<sup>60g11</sup> je pak teplotně senzitivní – heterozygotní embrya drozofily držená v teplotě pod 20°C hynou (Fryxell & Miller 1995). Tato mutace má tedy za následek chladově podmíněnou letalitu, a to přinejmenším ve dvou různých vývojových stádiích – v embryonálním a larválním/kukelním. Díky tomu, že N<sup>60g11</sup>

mutace způsobuje dominantní, teplotně závislou letalitu, se zdá být vhodná jako DCLM mutace pro genetickou separaci pohlaví.



**Obr. 5** – Porovnání proteinových sekvencí kódovaných standardní alelou genu *Notch* a mutantní alelou *N<sup>60g11</sup>*. u *Drosophila melanogaster* (struktura standardní vložky převzata z práce Gordon et al. 2008; schéma mutantní alely připraveno dle popisu v práci Lyman et al. 1993). Viz kap. 1.3.3. pro bližší informace a vysvětlení zkratk.

## 2. CÍLE PRÁCE

Jak jsem zmínil v úvodu, pro regulaci obaleče jablečného v komerčních jabloňových sadech v Britské Kolumbii (Kanada) byla zavedena a je stále používána metoda SIT, založená na masovém chovu tohoto škůdce, sterilizaci zářením a následném vypouštění sterilních jedinců obou pohlaví do jeho populací. Velký úspěch této nechemické a druhově specifické metody zvýšil zájem o zavedení SIT proti obaleči jablečnému i v řadě dalších zemí (Vreysen et al. 2010). Jednou z cest jak zvýšit efektivitu této metody je produkce a vypouštění pouze samců. K tomu je však nezbytné nalézt způsob, jak dosáhnout „sexingu“ (oddělení pohlaví) už v zárodečném vývoji, tedy jak eliminovat samičí potomstvo během embryogeneze. Slibným řešením se zdá být vpravení genu *Notch*, upraveného podle podmíněně (konkrétně chladově) letální mutantní alely  $N^{60g11}$  z drozofily do samičího chromosomu W. Předpokladem k potenciálnímu úspěchu je fakt, že transgenóza zárodečné linie obaleče jablečného již byla úspěšně provedena (Ferguson et al. 2010). Cílem mé práce bylo připravit vše potřebné pro budoucí transformaci obaleče jablečného podmíněně letální mutantní alelou jeho vlastního ortologu genu *Notch* (v tomto případě tedy mluvíme o cisgenózi).

K dosažení tohoto cíle byly navrženy tyto dílčí kroky. V první řadě bylo zapotřebí izolovat ortolog genu *Notch* z genomu obaleče jablečného, osekvenovat jej a charakterizovat jeho strukturu. V dalším kroku bylo třeba na základě získané a charakterizované sekvence určit úsek ortologní s mutantní alelou  $N^{60g11}$  drozofily a tento úsek poté zaklonovat pro použití do připravovaného konstruktů pro transformaci obaleče. Posledním krokem bylo získání nezbytných fyzických charakteristik genu *Notch* v genomu obaleče jablečného jednak nepřímo zjištěním počtu jeho kopií pomocí realtime PCR a dále přímou lokalizací tohoto genu na chromosomech metodou BAC-FISH.



### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1. Materiál - obaleč jablečný

Jako materiál pro mou práci byl použit laboratorní kmen Krym-61 obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) z čeledi Tortricidae, jehož chov je zaveden na Entomologickém ústavu BC AV ČR. Detaily o původu tohoto kmene a podmínkách jeho chovu jsou uvedeny v práci Fuková et al. (2005). Karyotyp obaleče sestává z 56 chromosomů (2n), takže v meiotické profázi I spermatocytů a oocytů se tvoří 28 bivalentů. Chromosomové určení pohlaví je WZ/ZZ, samice jsou heterogametické.

#### 3.2. Sekvenační analýza

Jako templát pro sekvenační analýzu genu *Notch* obaleče jablečného sloužila jeho cDNA, syntetizovaná podle RNA.

##### 3.2.1. Izolace RNA

K izolaci celkové RNA byla použita souprava "RNA Blue" (Top-Bio, Praha, ČR). Pro každou izolaci byla použita jedna kukla (cca 100 mg), která byla homogenizována v 1 ml RNA Blue. Následovala fázová separace pomocí chloroformu a precipitace izopropylalkoholem a 75% etanolem. Pro eliminaci potenciální kontaminace DNA, bylo provedeno ošetření DNázou I (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Konečný výtěžek RNA byl získán následnou precipitací směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol a následně isopropanolem.

##### 3.2.2. Syntéza cDNA

K syntéze prvního vlákna cDNA byla použita souprava SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). V reakční směsi (o celkovém finálním objemu 80  $\mu$ l) bylo jako templát použito přibližně 5  $\mu$ g celkové RNA, byly přidány 2  $\mu$ l Oligo dT (100  $\mu$ M) a 4  $\mu$ l dNTPs

(10 mM). Směs byla inkubována 5 min. při teplotě 65°C a poté ochlazena na ledě. Po denuraci bylo přidáno 16 µl 5x „First-strand pufu, 4 µl 0,1M DTT, 4 µl “Superase-In“ (20 U/µl) a 4 µl reverzní transkriptázy SuperScript III (200 U/µl). Směs byla nejprve inkubována 5 min. při 25°C, a poté 50 min. při 50°C. Reverzní transkriptáza byla poté inaktivována vystavením teplotě 80°C na 5 min. Pro eliminaci zbylé RNA bylo do směsi přidáno 0,5 µl RNázy H (60U/µl) a směs byla inkubována 20 min. při 37°C. RNáza H byla nakonec inaktivována inkubací při 65°C na 20 min.

### 3.2.3. Navrhování primerů a amplifikace PCR

Pro získání první sekvence části ortologu genu *Notch* obaleče jablečného jsem použil degenerované primery, které jsem navrhl na základě srovnání konzervovaných oblastí genu *Notch* drozofily a bource morušového. Drozofila a bourec jsou evolučně poměrně vzdálené druhy, takže jsem počítal jen s minimální pravděpodobností, že úseky konzervované v rámci těchto dvou druhů se budou u obaleče jablečného lišit. Srovnávání sekvencí a navrhování primerů jsem prováděl *in silico* za použití aplikací v rámci souboru programů Lasergene 8 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA). Mezi vysoce konzervovanými úseky v rámci ankyrinové domény jsem vyhledal ty, které obsahují co nejméně aminokyselin kódovaných velkým počtem kodonů (jako Arg, Ser, Leu atd.), a v těchto úsecích jsem poté navrhl degenerované primery. Takto jsem získal první část sekvence ortologu genu *Notch* obaleče jablečného, ze které jsem mohl vycházet. Dále jsem postupoval pomocí modifikované PCR, tzv. “targeted gene walking” (Paker et al., 1991), která slouží k amplifikaci neznámých částí genu sousedících s krátkou známou sekvencí. Při rozšiřování známé sekvence směrem k 3' konci jsem tedy použil specifický forward primer (“targeted primer”) v již osekvenované části a degenerovaný reverse primer (“walking primer”) v dosud neznámé části nacházející se ve směru čtecího rámce. Seznam všech použitých primerů je uveden v Tab. 1.

Reakční směs (10 µl) sestávala z 10 nm u každého primeru, 0,5 U “Hot Start PCR” (TaKaRa Ex Taq HS, Takara, Otsu, Japonsko) polymerázy (jejíž aktivita je zahájena až při 92°C v prvním kroku PCR) a 50-100 ng templátové DNA. V případě degenerovaných primerů bylo použito 100 nm u každého primeru. Teplotní profil PCR sestával z počáteční denaturace při 94°C po dobu 3 min. a 35 cyklů zahrnujících denaturaci po 30 vteřin při 94°C, nasednutí

primerů po 30 vteřin a prodlužování primerů po 2 min. při 72°C. Závěrečné prodlužování primerů trvalo 3 min. při 72°C.

Pokud jsem používal specifické primery, teplota nasedání primerů (“annealing temperature“,  $T_a$ ) byla určena podle pravidla  $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $T_m$  – “melting temperature“ dle údaje od výrobce Generi Biotech, Hradec Králové, ČR). Pokud jsem používal kombinaci dvou degenerovaných primerů nebo kombinaci specifického a degenerovaného primeru, stanovil jsem optimální teplotu pomocí tzv. gradientové PCR – reakce byla rozdělena do několika zkumavek, přičemž pro každou zkumavku byla nastavena jiná teplota nasedání primerů. Seznam použitých primerů společně s optimální teplotou nasednutí (u degenerovaných primerů zjištěnou empiricky) je uveden v Tab 1. Ke gradientové PCR amplifikaci jsem používal termocycler Eppendorf Mastercycler egradient S.

Produkty PCR byly analyzovány na 1% agarózovém gelu, přičemž jejich elektroforetická separace probíhala při napětí 50 – 80 V. Poté byl gel nabarven v roztoku ethidium bromidu nebo GelRed po 15 min. a vizualizován v UV transiluminátoru.

#### 3.2.4. Purifikace PCR produktů

Pokud byl na gelu zjištěn produkt odpovídající předpokládané délce, byla PCR zopakována, tentokrát s optimální teplotou nasednutí primerů (při níž nedocházelo ke vzniku nespecifických produktů) a v reakci o celkovém objemu 20 nebo 30  $\mu\text{l}$ . Po elektroforetické separaci a obarvení gelu v čerstvém roztoku ethidium bromidu nebo GelRedu byl pod UV lampou příslušný proužek vyříznut a přečištěn na kolonce za použití soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Koncentrace přečištěné DNA poté byla změřena na fluorometru Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

#### 3.2.5. Ligace

Pro ligaci fragmentů DNA do bakteriálního vektoru byl použit systém “pGEM-T Easy Vector System“ (Promega), ve kterém se k ligaci využívá T přesah na koncích inzertu. Na jednu

reakci (10  $\mu$ l) byly použity 3 U T4 ligázy, 50 ng vektoru pGEM-T Easy a množství DNA inzertu závislé na jeho délce a na poměru množství inzertu ku vektoru (cca 20 – 50 ng).

### 3.2.6. Transformace kompetentních bakterií

K transformaci byly použity kompetentní buňky *E.coli* DH5 $\alpha$ . K 2  $\mu$ l ligační směsi jsem přidal 50  $\mu$ l kompetentních buněk. Směs byla inkubována 30 min. na ledě a samotná transformace proběhla pomocí tepelného šoku – tak, že jsem buňky vystavil 42°C na 90 sek a pak je rychle přenesl na led. Ke směsi jsem poté přidal 800  $\mu$ l tekutého LB média (složení: 10 g tryptinem natráveného peptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g chloridu sodného, 15 g agaru, 1 l H<sub>2</sub>O; sterilizováno v autoklávu 30 min. při 120°C) bez antibiotik a následně jsem směs nechal inkubovat 45 min. při 37°C. Na každou připravenou Petriho misku jsem nanesl 40  $\mu$ l ampicilinu (50  $\mu$ g/ $\mu$ l), 14  $\mu$ l X-Gal (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) a 70  $\mu$ l 100mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu). Poté jsem na každou Petriho misku nalil cca 20 ml 1,5% agarového LB média.

Na takto připravené misky jsem poté vysel 150  $\mu$ l bakteriální směsi. Následovala inkubace cca 17 hodin při 37°C. Selektce transformantů byla zajištěná genem pro ampicilinovou rezistenci na plazmidu pGEM-T Easy, selektce pozitivních rekombinantů pak probíhala vizuálně – díky tomu, že byl inzertem přerušen gen pro zpracování X-Gal, měly rekombinantní kolonie bílou barvu. Vybrané bílé kolonie jsem sterilním párátkem inokuloval do 3 ml tekutého LB média s ampicilinem a nechal je kultivovat 12 hodin za stálého třepání.

### 3.2.7. Izolace plazmidové DNA a ověření přítomnosti inzertu

K izolaci plazmidů z pozitivních klonů byl použit QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, SRN). Ověření zaklonování správného fragmentu jsem poté provedl restrikčním štěpením *EcoRI*. Jedna reakce (10  $\mu$ l) obsahovala 1  $\mu$ l H pufru, 2 U *EcoRI*, takové množství plazmidové DNA, aby v reakci bylo minimálně 50 ng inzertu, směs byla doplněna H<sub>2</sub>O do 10  $\mu$ l. Reakce probíhala 1 hod při 37°C, poté byla provedena elektroforetická separace na 1% agarózovém gelu a poté na elektroforeogramu ověřena přítomnost fragmentu požadované velikosti.

### 3.2.8. Sekvenování pozitivních klonů

Sekvenování pozitivních klonů bylo prováděno v Laboratoři genomiky při Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích. K sekvenaci byl použit ABI Kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a univerzální primery M13F a M13R, komplementární k sekvencím, které se nacházejí po stranách inzerčního místa v plazmidu pGEM-T Easy. K sekvenování jsem dodal cca 150 ng DNA, doplněné H<sub>2</sub>O na celkový objem 7,5 µl. Pokud jsem nechtěl znát sekvenci koncových částí inzertu ale jeho vnitřní části, ohraničené již známými sekvencemi, přidal jsem ještě do směsi specifické primery (2,5 pmol).

### 3.2.9. Analýza sekvencí

Při použití univerzálních M13 primerů jsem nejprve získané sekvence zbavil krajních plazmidových úseků pomocí internetového nástroje VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) a identifikoval je v databázi GenBank NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomocí algoritmu „blastn“. Sekvence jsem zpracovával v aplikaci SeqBuilder a srovnával je se sekvencemi genu *Notch* drozofily a bource morušového v programu MegAlign prostřednictvím algoritmu ClustalW. Aplikace SeqBuilder a MegAlign jsou součástí softwarového souboru Lasergene 8 (DNASTAR).

## 3.3. Kvantitativní PCR

Pro zjištění, zda se gen *Notch* nachází na autosomu nebo chromosomu Z, jsem použil kvantitativní PCR (realtime PCR, qPCR) ke srovnání relativního počtu kopií genu v genomu samce a samice. K tomuto účelu se qPCR velmi dobře hodí, neboť autosomální gen by měl vykazovat stejný počet kopií u obou pohlaví, zatímco gen lokalizovaný na chromosomu Z by měl u samic vykazovat jen jednu kopii oproti dvěma kopiím v genomu samce.

### 3.3.1. Extrakce genomové DNA

Jako templát pro kvantitativní PCR sloužila genomová DNA (gDNA) izolovaná z imág samců a samic obaleče jablečného pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Před extrakcí byla jedincům odstraněna křídla a samičky byly zbaveny zadečků, pro zamezení potenciální kontaminace samčí DNA oplodněných vajíček. Pro každou extrakci bylo použito 20 mg tkáně. Pro dosažení co nejvyšší objektivit byly provedeny tři nezávislé extrakce samčí i samičí DNA.

### 3.3.2. Kvantifikační strategie

Prováděl jsem relativní kvantifikaci, tj. srovnání amplifikace cílového genu vzhledem k amplifikaci interní kontroly. Jako interní kontrolu jsem si zvolil autosomální gen pro elongační faktor *EF1 $\alpha$* , "housekeeping" gen se stálou expresí a známým počtem kopií v genomu. Použil jsem dva páry specifických primerů – jeden pár pro gen *Notch* a druhý pár pro referenční gen *EF1 $\alpha$* . Primery byly zvoleny tak, aby jejich produkt měl délku cca 150 nukleotidů. Primery specifické pro ortolog genu *Notch* obaleče jablečného jsem navrhl na základě známé sekvence získané při předchozí sekvenační analýze. Pro navržení specifických primerů pro ortolog *EF1 $\alpha$*  obaleče byly nejprve navrženy degenerované primery podle sekvence ortologu bource morušového a poté byl produkt osekvenován a ověřen reamplifikací pomocí specifických primerů.

### 3.3.3. Příprava reakce

Reakce byly nanášeny na PCR mikrodestičku Hard Shell s 96 jamkami (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Na jednu dílčí reakci (25  $\mu$ l) připadlo 5  $\mu$ l DNA (20 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l (10 nm) každého primeru a 12,5  $\mu$ l fluorescenční směsi 2x SYBRgreen (Invitex, Berlin, SRN)), doplněné vodou. Při každé PCR byly pro každý typ primeru použity tři nezávisle izolované templáty samčí i samičí DNA. Reakce se stejnou templátovou DNA byly navíc rozděleny do triplikátů pro eliminaci potenciálních odchylek vzniklých nepřesným pipetováním či chybami ve vlastní reakci. Po nanesení všech reakcí byla vrchní strana destičky zapečetěna fólií Microseal B Film (Bio-Rad). Vlastní PCR probíhala na přístroji termocykleru C1000 Thermal Cycler s nástavcem CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). Reakce probíhala v režimu 3 min (95°C) – 39x [30 s (94°C) – 30 s

(58°C) – 30 sek (72°C)] – 15 sek (95°C). Na závěr reakce se teplota postupně zvyšovala z 65°C na 95°C o 0,5°C každých 5 sek.

#### 3.3.4. Vyhodnocování výsledků

Výstupní data byla uložena v programu CFX Manager (Bio-Rad) a statisticky vyhodnocovány v programu Microsoft Excel. Hodnoty Ct jednotlivých triplikátů byly zprůměrovány a poměr počtu kopií (R) obou genů byl vypočten podle vzorce  $\frac{2^{-\overline{CtEF1a}}}{2^{-\overline{CtNotch}}}$  (na základě srovnání amplifikačních produktů získaných konvenční PCR s primery pro cílový a referenční gen, jsem předpokládal přibližně stejnou efektivitu obou párů primerů). Následně byly zprůměrovány poměry počtů kopií pro všechny tři použité templáty. Nakonec byl porovnán celkový průměr poměrů počtu kopií u samčí a u samičí DNA.

### 3.4. Lokalizace genu *Notch* na chromosomech obaleče jablečného metodou BAC-FISH

Pro přímou lokalizaci genu *Notch* bylo nejprve nutné vyselektovat příslušný bakteriální klon z BAC ("Bacterial Artificial Chromosome") knihovny obaleče jablečného, která je k dispozici v Laboratoři molekulární cytogenetiky při Entomologickém ústavu BC AV ČR. Knihovna je tvořena fragmenty genomu obaleče jablečného, zaligovanými do vektorů pECBAC1 s chloramfenikolovou rezistencí (bližší informace jsou uvedeny v práci Dalíková 2009). Vyselektovaný BAC klon, obsahující ortolog genu *Notch*, byl pak použit jako sonda pro mapování na chromosomech obaleče modifikovanou verzí fluorescenční *in situ* hybridizace, tzv. BAC-FISH (Yoshido et al. 2005).

#### 3.4.1. Příprava sondy

Jako sondu pro prohledávání BAC knihovny jsem použil vzorek rekombinantní plazmidové DNA, obsahující část sekvence ortologu *Notch* obaleče jablečného, získaný při provádění sekvenační analýzy. Sonda byla značena prostřednictvím PCR alkali-labilním digoxigeninem (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN). Značící reakce (30 µl) obsahovala 3 µl 1x Ex *Taq*

pufri, 2,4 µl směsi nukleotidů (0,08 mM dGTP, dCTP, dATP, 0,052 mM dTTP a 0,028 mM DIG-11-dUTP), 1,5 µl 0,5 µM univerzálních primerů M13-26 a M13-24, cca 4 µg plazmidové DNA a 0,25 µl Takara Ex *Taq* HS polymerázy. Při PCR reakci byla použita teplota nasedání primerů 57°C. Pro purifikaci naznačené sondy jsem použil kit Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

#### 3.4.2. Vlastní prohledávání BAC knihovny

Identifikace pozitivního BAC klonu byla provedena pomocí hybridizace sondy značené alkali-labilním digoxigeninem na tzv. "high-density colony filter", což je speciální Hybond-N+ nylonová membrána, na kterou byly naneseny dvě kopie od každého klonu knihovny (viz Dalíková 2009). BAC klon, který hybridizoval se sondou, bylo možné na membráně detekovat jako dvojici signálů. Podle souřadnic na membráně a vzájemné polohy obou signálů bylo možné určit destičku BAC knihovny, ve které se daný klon nachází.

#### 3.4.3. Extrakce BAC DNA

Předchozí hybridizací vytipovaný BAC klon byl přenesen na pevné LB médium s chloramfenykolem a poté byl inokulován do 100 ml LB média s 2,5 mg chloramfenykolu. K extrakci BAC DNA byl použit Plasmid Midi Kit (Qiagen, Venlo, NL). Pro ověření přítomnosti genu *Notch* v BAC klonu byla provedena PCR s primery specifickými pro ortolog genu *Notch* obaleče jablečného a vzniklý produkt byl následně sekvenován.

#### 3.4.4. Značení sondy pro BAC-FISH

Značení získané BAC DNA jsem provedl metodou "nick" translace. Značící směs (20 µl) obsahovala 1 µg BAC DNA, 1 µl 50x dNTP směsi pro značení dUTP, 0,7 µl fluorochrom-dUTP, 4 µl 5x Nick Translation Mix (Roche Diagnostics) a byla doplněna vodou. Značící reakce probíhala přes noc při teplotě 15°C a poté byla ukončena zahřátím směsi na 65°C na 10 min. Jako značící fluorochromy jsem používal AlexaFluor488-dUTP (zelený; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) a Cy3-dUTP (červený; Amersham Biosciences).



#### 3.4.5. Příprava chromosomálních preparátů

Pro BAC-FISH jsem použil preparáty pachytenních chromosomů ze samců obaleče jablečného, připravené metodou "spreading" na histologické plotýnce. Testes byla vypitvána ve fyziologickém roztoku z larev pátého instaru a inkubována v hypotonickém roztoku 0,075 M KCl po dobu 10 min. Poté byla fixována 15 min. ve fixáži Carnoy (6 etanol : 3 chloroform : 1 kyselina octová). Následně byla část testes přenesena do kapky 60% kyseliny octové na podložním skle očištěném v kyselém etanolu, macerována wolframovými jehlami a poté rozptýlena na histologické plotýnce při 45°C. Kvalita preparátu byla ověřena v mikroskopu s fázovým kontrastem. Poté byl preparát odvodněn v etanolové řadě (70%, 80% a 96%, v každém po 30 sek.) a uchován do dalšího použití při -20°C.

#### 3.4.6. Vlastní hybridizace

Vlastní BAC-FISH byla prováděna dle postupu uvedeného v práci Dalíková (2009). Hybridizační směs pro jeden preparát (10 µl) obsahovala 200 ng sondy značené červeným fluorochromem a 450 ng sondy značené zeleným fluorochromem, trojnásobek až osminásobek hmotnosti sondy neznačené sonikované samčí genomové DNA obaleče jablečného, 25 µg sonikované DNA ze spermií lososa, 50% deionizovaný formamid a 10% dextran sulfát v 2x SSC pufru. Tato směs byla denaturována 5 min. při teplotě 90°C.

Chromosomální preparáty byly po vyjmutí z mrazničky odvodněny v etanolové řadě a po oschnutí denaturovány 3,5 minuty při 68°C v 70% deionizovaného formamidu v 2x SSC pufru. Po opětovném odvodnění jsem na každý preparát nanesl 10 µl hybridizační směsi, přikryl krycím sklíčkem a nechal inkubovat 3 dny ve tmě při teplotě 37°C. Po hybridizaci byly preparáty promyty v 0,1x SSC/1% Triton X-100. Chromosomy byly poté podbarveny 0,5 µg/ml DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v 1% PBS pufru, uzavřeny v médiu pro zabránění vyhasínání fluorescence, obsahujícímu DABCO (1,4-diazabicyclo(2.2.2)-octane; Sigma-Aldrich).

Preparáty jsem vyhodnocoval ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Jena, SRN). Digitální mikrofotografie jsem snímal pomocí chlazené CCD kamery F-View a programu AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System, Münster, SRN). Skládání vrstev pro jednotlivé filtry jsem prováděl v programu Adobe Photoshop CS5.

Tab. 1. Použité primery.

<b>Pracovní název primeru</b>	<b>Sekvence (5'-3')</b>	<b>Použit v kombinaci s primerem (optimální teplota nasednutí)</b>
F1521 (forward)	AACAACGCCGAGTGCAACTGGGA	R2044 (60°C)
R2044 (reverse)	ATYTGRAANACNCCCATNGCRTC	F1521 (60°C)
Nseq2R (forward)	CTTGTAACGGCGCAGAGGAA	Nseq1R (62°C) NRdeg2 (63°C) N6352R (62°C)
Nseq1R (reverse)	AAGCCGTCGTCATCATCATCCGAC	Nseq2R (62°C)
NRdeg2 (reverse)	CARTCYTCRTARCTNGGNGG	Nseq2R (63°C)
N5764F (forward)	CTGGACACCGGATCGGACGC	N6352R (60°C)
N6352R (reverse)	GGCAGACGGTCCATGTGGTC	N5764F (60°C) Nseq2R (62°C)
Not_RT_F (forward)	CAACGCCTTCCCCATCTTCAA	Not_RT_R (58°C)
Not RT_R (reverse)	TTGTAACGGCGCAGAGGAAGC	Not_RT_F (58°C)
EF1_F03_RT (forward)	CTGGTTCAAGGGATGGCAGA	EF1_R03_RT (58°C)
EF1_R03_RT (reverse)	ACCAATACCGCCGATTTTGT	EF1_F03_RT (58°C)
BAC3F (forward)	CGGCCCGGACGGACAAGAGAT	BAC3R (58°C)
BAC3R (reverse)	ATGGACGCAGCAGCACCTTGA	BAC3F (58°C)
M13-26 (forward)	CAGGAAACAGCTATGAC	M13-24
M13-24 (reverse)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	M13-26

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Sekvenační analýza

Před zahájením mé práce nebyla známa žádná sekvence z ortologu genu *Notch* obaleče jablečného. Vycházel jsem proto ze sekvencí původně popsaného genu *Notch* octomilky *D. melanogaster* a jeho ortologu u bource morušového (*B. mori*), které jsem získal z databází Flybase (<http://flybase.org>), resp. Kaikobase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase>). U drozofily se lokus *Notch* nachází na chromosomu X a je dlouhý 37 390 bp; z toho je 8112 bp kódující sekvence, čemuž odpovídá protein Notch tvořený 2704 aminokyselinami (acc. no. NP\_476859). Ortolog genu *Notch* bource morušového je dlouhý 59 747 bp a nachází se na chromosomu 15; jeho kódující sekvence je dlouhá 7392 bp a protein je tvořen 2463 aminokyselinami (acc. no. NP\_001157370). Jednotlivé funkční domény proteinové sekvence jsem analyzoval v internetové aplikaci SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

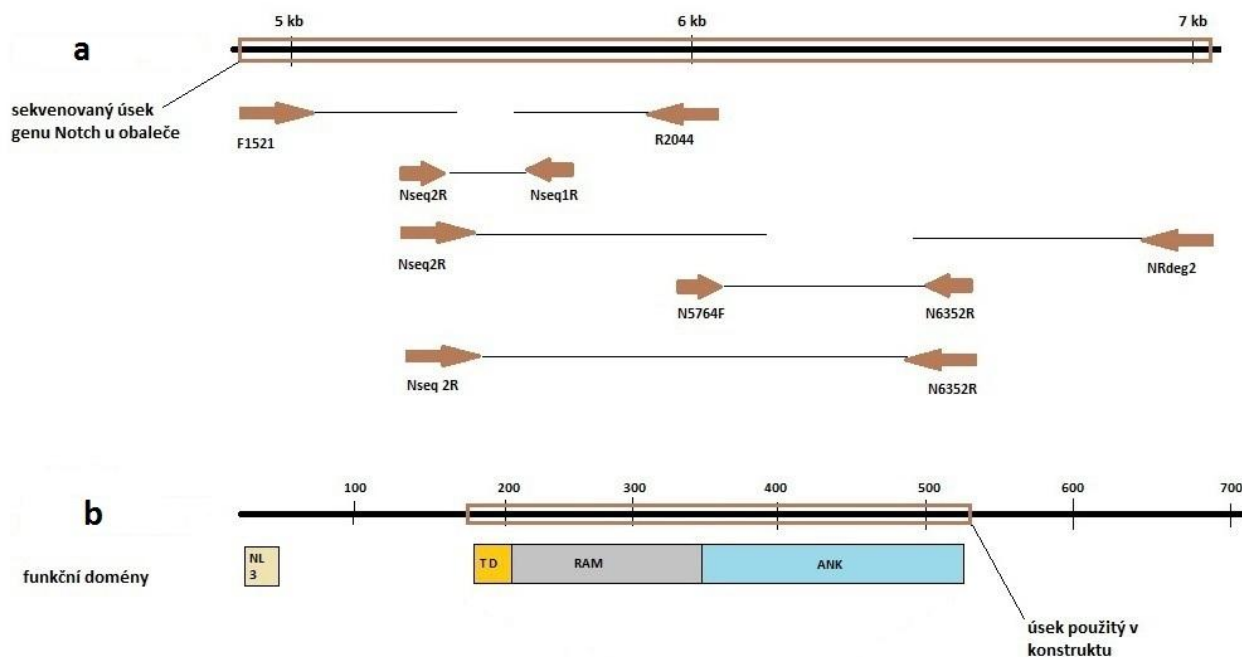
Srovnáním proteinových sekvencí jsem identifikoval konzervované úseky. Využil jsem znalosti, že nejkonzervovanější úsek genu je ten, který kóduje ankyrinovou doménu (Gordon et al., 2008). Zjistit sekvenci ankyrinové domény obaleče bylo navíc prioritou, neboť byla zamýšlena pro použití do transformačního konstruktů. V této sekvenci jsem navrhl degenerované primery - forward primer F1521 (Tab. 1) odpovídal aminokyselinové sekvenci NNAECNWD (pozice 1578-1585 v aminokyselinové sekvenci bource), reverse primer R2044 (Tab. 1) pak sekvenci DAMGVFQI (pozice 1999-2006 v aminokyselinové sekvenci bource). Provedl jsem PCR reakci s těmito primery, přičemž jako templát byla použita cDNA obaleče jablečného. Výsledný produkt amplifikace byl dlouhý 1277 bp. Tento produkt byl zaligován, klonován a osekvenován za použití univerzálních primerů M13. K osekvenování jeho vnitřní části jsem použil kombinaci již specifických "nested" primerů Nseq2R a Nseq 1R (Tab. 1). Takto jsem získal první úsek ortologu genu *Notch* obaleče, ze kterého jsem vycházel při dalším sekvenování.

Specifický primer Nseq2R jsem použil jako "targeted" forward primer pro rozšiřování známé sekvence směrem k 3' konci, v kombinaci s nově navrženým degenerovaným reverse primerem NRdeg2 (Tab. 1). Vnitřní úsek jsem dosekvenoval za použití specifických „nested“ primerů N5764F a N6352R (Tab. 1). Známou sekvenci ortologu

*Notch* obaleče jablečného jsem takto prodloužil o dalších 817 bazí. Abych měl jistotu správnosti sekvence, která bude použita do konstruktů, zaklonoval jsem ještě úsek amplifikovaný primery Nseq2R a N6352R, přičemž při PCR byla použita polymeráza s „proofreadingovou“ aktivitou (Qiagen) a jako templáty sloužily cDNA syntetizované ze tří různých jedinců obaleče. Přibližná poloha jednotlivých primerů spolu s jejich produkty je znázorněna na obr. 6.

Touto strategií jsem postupně získal pět částečně se překrývajících sekvencí a celkem jsem zaklonoval a sekvenoval 2094 bp dlouhý fragment kódující sekvence (Obr. 6a), což odpovídá proteinové sekvenci o délce 698 aminokyselin. Srovnáním této proteinové sekvence se sekvencemi v databázi GenBank (za použití algoritmu „blastx“) bylo potvrzeno, že se jedná o ortologní sekvenci genu *Notch* obaleče jablečného. Analýzou funkčních domén osekvenované proteinové sekvence jsem zjistil, že tato sekvence zahrnuje třetí extracelulární doménu NL (pozice 4-33), transmembránovou doménu (pozice 181-203), doménu RAM a ankyrinovou doménu (pozice 347-523). Ze získané sekvence byla do konstruktů pro transformaci obaleče, připravovaného v naší laboratoři, navrženo použití fragmentu dlouhého 1176 bp (392 aa), obsahující transmembránovou doménu (aa pozice 5-24), doménu RAM (pozice 25-169) a ankyrinovou doménu (pozice 170-379) (Obr. 6b).

Srovnáním proteinové sekvence bource a mnou osekvenovaného úseku obaleče jsem měl možnost porovnat míru konzervovanosti. Z celkových 698 aa bylo celkem 356 polymorfních míst, zahrnujících i delece a inserce, přičemž nejmenší míru homologie (13%) vykazoval úsek transaktivační domény, následující doménu ANK směrem k C konci, kde nebylo možné nalézt jakýkoli konsensus. Naopak vysokou míru homologie (96%) vykazoval úsek, který byl použit do konstruktů. V tomto úseku bylo zaznamenáno pouze 16 polymorfních míst (z toho 1 delece aminokyseliny u obaleče). To odpovídá 124 polymorfním místům (mutacím) v sekvenci DNA (včetně delece jednoho tripletu). Při srovnání proteinové sekvence samotných ankyrinových domén jsem zjistil pouze 4 polymorfní místa (98% homologie). Porovnání ankyrinové domény drozofily a obaleče odhalilo 29 variabilních míst, nicméně i tak byla prokázána velmi vysoká míra konzervovanosti této domény.



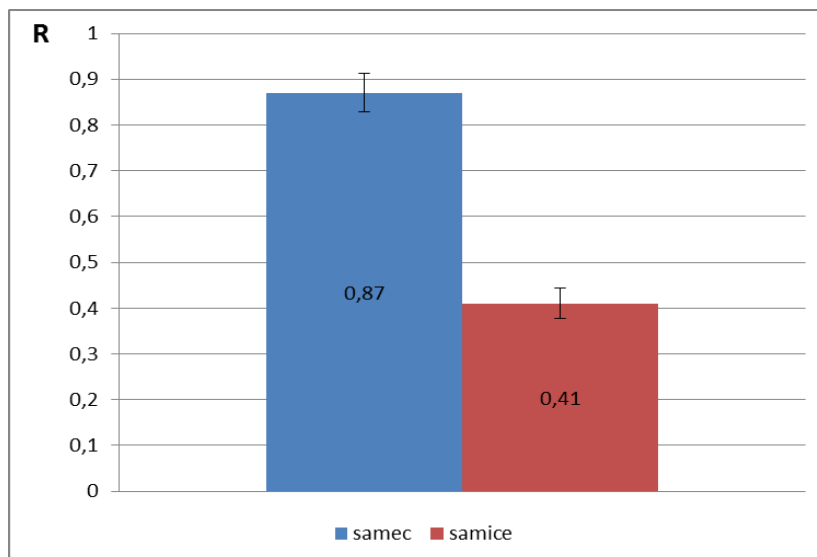
**Obr. 6** – Schéma sekvenační analýzy. **a** – část genu *Notch* bource s vyznačeným úsekem, který byl sekvenován u obaleče a polohou použitých primerů. **b** – aminokyselinová sekvence odvozená z osekvenovaného fragmentu genu *Notch* obaleče s vyznačeným úsekem, který byl navržen pro použití do transformačního konstrukt.

#### 4.2. Srovnání počtu kopií genu *Notch* u samic a samců obaleče pomocí kvantitativní PCR

Pro kvantitativní PCR jsem použil primery NotRT\_F a NotRT\_R pro gen *Notch* a primery EF1\_F a EF1\_R pro referenční elongační faktor *EF-1α* (Tab. 1). Provedl jsem tři nezávislé kvantitativní PCR reakce; přičemž u všech vycházel podobný poměr *EF-1α/Notch* (hodnota R). Průměrné hodnoty R jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2. Výstupní data kvantitativní PCR.

Pořadové číslo pokusu	1		2		3	
	samci	samice	samci	samice	samci	samice
Průměr hodnot R	0,73	0,45	0,81	0,42	0,77	0,39
pro jednotlivé triplikáty	1,15	0,41	0,87	0,32	0,94	0,47
	0,87	0,42	0,84	0,37	0,90	0,41
<b>Průměr</b>	<b>0,92</b>	<b>0,43</b>	<b>0,84</b>	<b>0,37</b>	<b>0,86</b>	<b>0,43</b>
Směrodatná odchylka (SD)	0,30	0,03	0,04	0,07	0,11	0,06



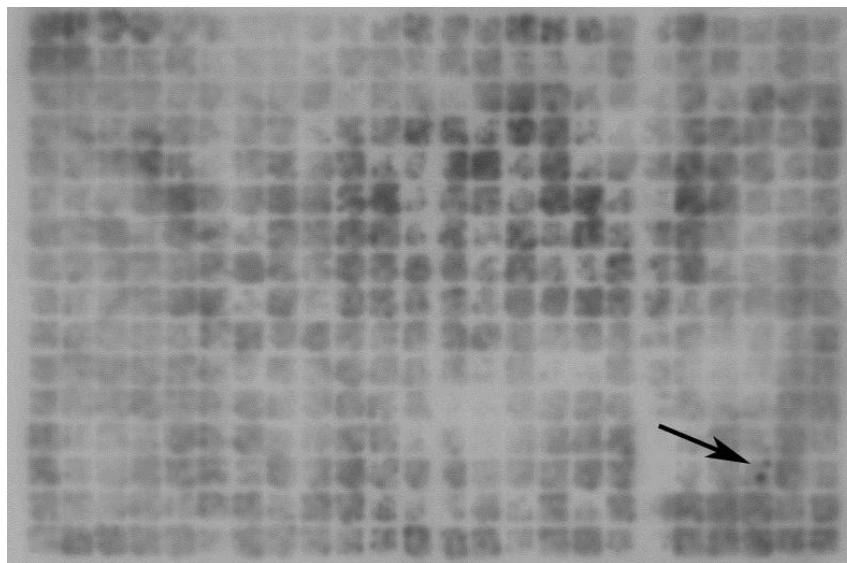
**Obr. 7** - Srovnání průměrných hodnot R včetně směrodatných odchylek u samců a samic obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Sloupce znázorňují relativní počet kopií genu *Notch* v genomové DNA obaleče, vztažené k počtu kopií referenčního genu *EF-1 $\alpha$* .

Zjištěná průměrná hodnota R u samců (0,87) je blízká jedné, což implikuje přibližně stejný počet kopií genu *Notch* jako u referenčního genu *EF-1 $\alpha$* , tedy 2 kopie (= 2 alely). Naproti tomu u samic vyšel průměrný poměr 0,41, takže v samičím genomu je gen *Notch* zastoupen polovičním počtem kopií vzhledem ke genu *EF-1 $\alpha$* , tedy jednou kopií (Obr. 7). Tyto výsledky naznačují, že je gen *Notch* u obaleče jablečného lokalizován na pohlavním chromozomu Z, neboť jedině hemizygotní konstitucí pohlavních chromosomů (WZ) je možné vysvětlit jeho poloviční zastoupení u samic oproti autosomálnímu genu *EF-1 $\alpha$* .

#### 4.3. Lokalizace genu *Notch* na chromosomech obaleče jablečného metodou BAC-FISH

Pro mapování ortologu genu *Notch* na chromosomálních preparátech jsem nejdříve musel identifikovat BAC klon v BAC knihovně obaleče, který tento gen obsahuje. Jako materiál pro přípravu sondy pro prohledávání BAC knihovny jsem použil rekombinantní plazmidovou DNA, obsahující část ortologu genu *Notch* obaleče, kterou jsem dříve získal při práci na sekvenační analýze. Konkrétně se jednalo o produkt PCR s primery Nseq2R a Nrdeg2 (Tab. 1), dlouhý 1,5 kb. Podle specifických signálů ve tvaru dvojtečky po hybridizaci na membráně

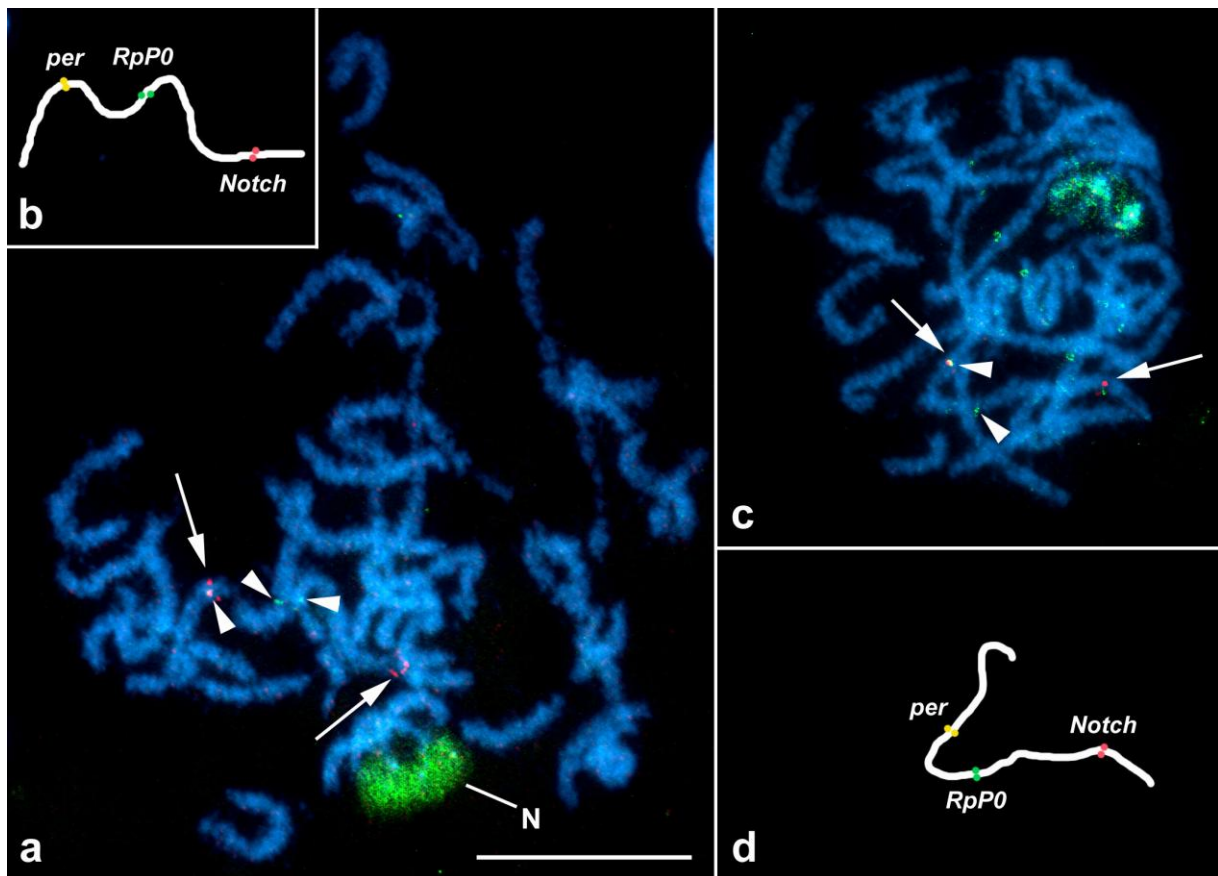
s kopií BAC knihovny jsem vyseletoval tři BAC klony (viz příklad na Obr. 8) a označil je podle jejich souřadnic v knihovně stejným systémem jako je uvedeno v práci Dalíková (2009) – první číslo odpovídá číslu destičky, následující písmeno a číslo odpovídají konkrétnímu řádku a sloupečku v dané destičce. Jednalo se o klony 19N22, 07C12 a 01D12. Přítomnost genu *Notch* ve vyselektovaných BAC klonech jsem ověřoval metodou PCR za použití specifických primerů BAC3F a BAC3R (Tab 1). Očekávaný produkt, dlouhý 280 bp, byl získán pouze u klonu 19N22, ostatní dva klony se ukázaly být falešně pozitivní.



**Obr. 8** – Detail membrány s nanesenými kopiemi BAC klonů knihovny obaleče jablečného po hybridizaci s 1,5 kb sondou DNA (ortologní sekvence genu *Notch* obaleče). Dvojitý hybridizační signál, odpovídající BAC klonu 19N22 je označen šipkou. Délka expozice byla 30 minut.

Přítomnost genu *Notch* v tomto klonu byla následně potvrzena sekvenováním a izolovaná BAC DNA poté sloužila k přípravě sondy značené červeným fluorochromem Cy3-dUTP pro zjištění lokalizace genu na chromosomech obaleče metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Vlastní BAC-FISH jsem provedl na samčích preparátech obaleče jablečného. Pro zjištění relativní polohy genu *Notch* vůči dalším genům vázaným na chromosom Z jsem hybridizaci provedl v kombinaci s BAC sondami pro další dva geny – gen pro ribosomální protein P0 (*RpP0*) a gen *Period* (*Per*). BAC sonda pro gen *RpP0* (BAC klon byl izolován M. Sýkorovou) byla značena zeleným fluorochromem Alexa Fluor 488-dUTP. Pro

lokalizaci genu *Per* (BAC klon byl izolován v práci Dalíková, 2009) byly použity současně sondy značené oběma fluorochromy. Všechny sondy hybridizovaly k jednomu pachytennímu bivalentu v pořadí *Per* (oranžová) – *RpP0* (zelená) – *Notch* (červená) (Obr. 9). Hybridizační signály sond pro pohlavně vázané geny *Per* a *RpP0* jednoznačně dokládají, že se jedná o bivalent chromosomů Z. Tímto způsobem jsem potvrdil lokalizaci genu *Notch* u obaleče jablčného na pohlavním chromosomu Z, a to v jeho distální části.



**Obr. 9** – Výsledky mapování genu *Notch* metodou BAC-FISH na chromosomech obaleče jablčného. Chromosomy byly podbarveny DAPI. Červené signály (šipky) odpovídají sondám značeným fluorochromem Cy3-dUTP, zelené (hroty šipek) fluorochromem Alexa Fluor 488-dUTP. **a, c** – Samčí pachytenní jádra s hybridizačními signály BAC sond, obsahující geny *Per* (oranžové signály), *RpP0* (zelené signály) a *Notch* (červené signály). **b, d** – Schématické znázornění polohy sond na bivalentu pohlavních chromosomů ZZ z jader na snímcích **a** a **c**. N – jádérka přiléhající k NOR-bivalentu, zvýrazněná při úpravě kontrastu na snímcích. Měřítko znázorňuje 20  $\mu$ m.



## 5. DISKUSE

### 5.1. Charakterizace genu a proteinu Notch

Kódující sekvence genu *Notch* je dlouhá v průměru 7,5 kb, jedná se tedy o poměrně velký gen. Proteinová struktura a rozdělení jednotlivých funkčních domén je v rámci mnohobuněčných živočichů víceméně stálá (Gordon et al. 2008). V této práci jsem izoloval 2,1 kb dlouhou kódující sekvenci ortologu genu *Notch* u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Tato sekvence obsahuje téměř celou intercelulární doménu zahrnující třetí doménu NL, transmembránovou doménu, doménu RAM a ankyrinovou doménu (Obr. 6). Porovnání proteinových sekvencí intracelulární části proteinu drozofily, bource a obaleče ukázalo, že nejkonzervovanějším úsekem je ankyrinová doména, která je také esenciální pro přenos signálu proteinem Notch zprostředkované signální dráhy do jádra. V práci jsem se nezabýval izolací PEST domény, kterou by bylo vhodné též prostudovat vzhledem k její předpokládané roli ve stabilitě konformace funkční ankyrinové domény (Gordon et al. 2008).

### 5.2. Lokalizace genu Notch

U motýlů byl dosud charakterizován ortolog genu *Notch* jedině u bource morušového, *Bombyx mori*. U tohoto modelové druhu je gen lokalizován na chromosomu 15 v pozici 2350150-2409987 (KaikoBase, ID genu BGIBMGA007929), tedy spíše v distální části jednoho z konců chromosomu 15. Vzhledem k shodnému počtu chromosomů bource jako u obaleče jablečného ( $2n=28$ ) a hromadících se důkazech o vysoce konzervované syntenii genů mezi chromosomy bource a jiných druhů motýlů (Pringle et al. 2007, Beldade et al. 2009, Yasukochi et al. 2009) jsem tedy předpokládal, že ortolog genu *Notch* u obaleče bude také lokalizován na autosomu.

Srovnání počtu kopií ortologu genu *Notch* obaleče jablečného v genomu samců a samic pomocí kvantitativní PCR však odhalilo, že u samic je gen zastoupen jen polovičním počtem kopií a tudíž je pravděpodobně lokalizován na pohlavním chromosomu Z. Naopak u genu pro elongační faktor (*EF-1 $\alpha$* ), který byl použit jako referenční gen a u kterého byla

autosomální lokalizace též předpokládána (u bource morušového se nachází na chromosomu 5 – viz Kaikobase), kvantitativní PCR potvrdila stejnou dávku genu u obou pohlaví, a tedy i autosomální lokalizaci tohoto genu.

Pro mapování genu *Notch* na chromosomech byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace s bakteriálními umělými chromosomy (BAC-FISH) na samčích pachytenních preparátech. Z BAC klonu pozitivního na přítomnost genu *Notch* byla zkonstruována sonda, která byla použita pro BAC-FISH v kombinaci se sondami pro další dva Z-vázané geny, gen *Period* (*Per*) a gen pro ribosomální protein P0 (*RpP0*), s cílem potvrdit lokalizaci genu *Notch* na chromosomu Z a určit pořadí jednotlivých genů. Všechny tři signály se nacházely na jednom bivalentu, a to v pořadí *Notch* – *RpP0* – *Per*. Gen *RpP0*, který je u bource lokalizován v distální části chromosomu 15, mapuje u obaleče přibližně ve středu délky chromosomu Z, což naznačuje, že u předka došlo k translokaci či fúzi chromosomu Z a 15. Tyto závěry potvrzují i další výsledky dosažené v naší laboratoři, ať už se jedná o výsledky mapování syntenie Z-vázaných genů u obaleče jablečného (P. Nguyen, nepublikováno) nebo zjištění přítomnosti genu pro acetylcholinesterázu 1 (*Ace-1*) na chromosomu Z obaleče, který je u bource také lokalizován na chromosomu 15 (Sýkorová, 2011). Mezi další fakta, podporující translokaci autosomu (u bource chromosom 15) na chromosom Z, patří značná délka chromosomu Z u obaleče a též redukce počtu chromosomů z předpokládaného ancestrálního počtu  $n=31$  u motýlů (Robinson 1971, Lukhtanov 2000) na  $n=28$ .

### 5.3. Příprava pro budoucí transformaci obaleče jablečného mutantní verzí genu *Notch*

Moje práce byla součástí projektu, týkajícího se přípravy transformačního konstruktů pro transformaci obaleče jablečného, jakožto vhodného nástroje pro budoucí konstrukci genetických linií umožňujících produkci pouze samčího potomstva (Mare et al. 2005, 2007). Transformace zárodečné linie obaleče již byla úspěšně provedena, a to pomocí mikroinjekce vektoru obsahujícího *piggyBac* transpozon a reportérový gen *EGFP* (Ferguson et al. 2010). Byl dokonce vytvořen i plazmidový konstrukt obsahující *piggyBac* s ankyrinovou doménou drozofilního ortologu genu *Notch* (forma proteinu  $\Delta Cterm^{intra}$ ) v tandemu s reportérovým genem *EGFP* pod promotorem *Actin A3* z bource morušového. Vajíčka transgenních linií, transformovaných tímto konstruktem, byla vystavena teplotě 12°C po dobu dvou dní a 50%

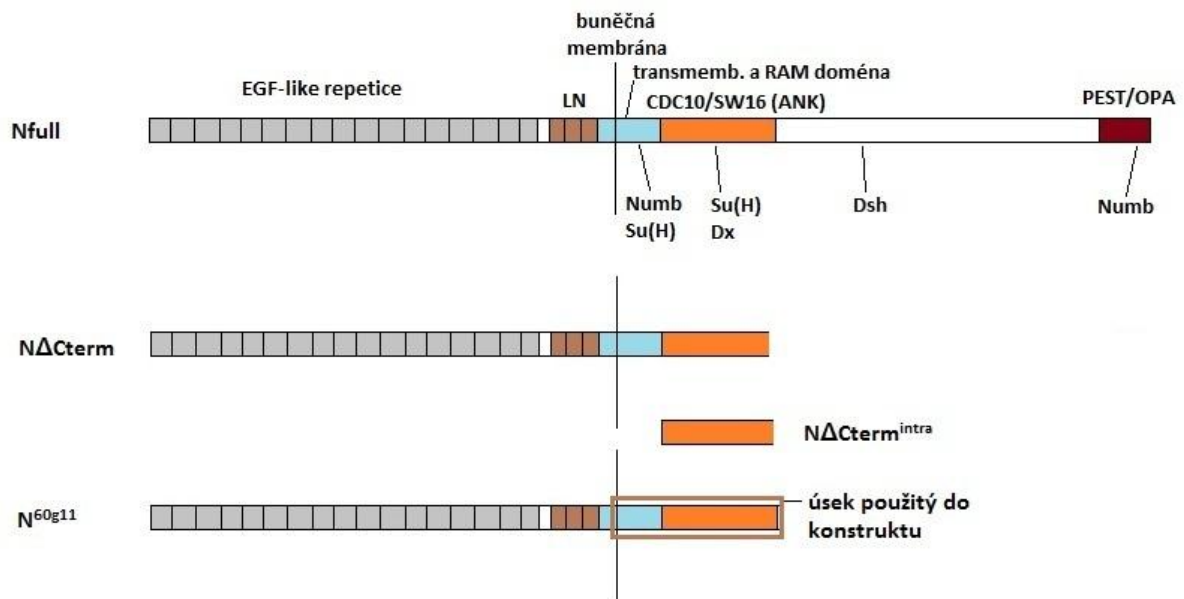
embryí zahynulo, přičemž žádné z přeživších nevykazovalo EGFP fluorescenci, což dokazuje dominantní podmíněně letální charakter vloženého inzertu (L. Neven, nepublikováno). Podle práce Wesley & Mok (2003) použití pouhé ankyrinové domény ( $N\Delta Cterm^{intra}$ ) stačí k dosažení stejného efektu, jaký má celá mutantní alela  $N^{60g11}$  (tedy chladové senzitivity).

Jaký je ale vlastně mechanismus účinku podmíněně letální alely  $N^{60g11}$ ? Napovědět by mohly poznatky o zkrácené verzi proteinu Notch  $N\Delta Cterm$ , který postrádá C-terminální úsek od konce ankyrinové domény (viz Úvod). Jedná se o formu proteinu Notch téměř identickou s produktem mutantní alely  $N^{60g11}$  (Obr. 10), která se tvoří přirozeně v protoneurálních buňkách během embryonální fáze následující po laterální inhibici, kdy je také aktivován ligandem Delta. Přítomnost  $N\Delta Cterm$  proteinu predeterminuje buňku v budoucí buňku CNS. Karboxylový konec proteinu (doména PEST) je tedy zřejmě důležitý pro vysokou úroveň signalizace Notch a jeho přítomnost naopak způsobuje diferenciaci v epidermální buňku.

Intenzita signalizace Notch je tedy přepínačem pro diferenciaci prekurzorů do těchto dvou různých tkání a je regulována poměrem  $N_{full} / N\Delta Cterm$ . Tento poměr závisí na teplotě, proto je i signalizace Notch (a tedy přežití jedince) závislá na teplotě (Wesley & Mok 2003). Chladová senzitivita je pravděpodobně způsobena celkově zvýšenou produkcí neurálních buněk. Zdá se, že přítomnost mutantní alely  $N^{60g11}$  u heterozygotních drozofil, vystavených nízké teplotě, snižuje přirozený poměr  $N_{full} / N\Delta Cterm$ , čímž pravděpodobně dochází k takové nadprodukci prekurzorů neurálních buněk, která není slučitelná se životem.

Do konstruktů pro transformaci obaleče jablečného, který byl připravován kolegyní R. Čapkovou Frydrychovou, byla z mnou osekvenované části obalečího ortologu genu *Notch* použita kromě ankyrinové domény také doména RAM a transmembránová doména, za účelem možné zvýšení afinity receptoru. Koncept vektoru založeného na transposabilním elementu *piggyBac* byl v našem případě ponechán, neboť se ukázal být účinným vektorem pro transformaci zárodečné buněčné linie u hmyzu (Handler et al. 2003), včetně obaleče jablečného (Ferguson et al. 2010). Kromě stabilní integrace do genomu však existuje potenciální možnost extrachromosomální tranzientní exprese transgenu. To lze ověřit pomocí Southernovy hybridizace za použití restriktáz a sond, které identifikují 5' a 3' konec vektoru. Ještě přesnější metoda zjištění úspěšné integrace je osekvenování inzerčního místa pomocí inverzní PCR. Bylo prokázáno, že transpozon *piggyBac* je schopen horizontálního přenosu, a to i na jiné druhy. Existuje nebezpečí, že v hostitelském genomu může dojít ke

krosmobilizaci transpozonu, především pokud je už v hostitelském genomu nějaký podobný transpozon přítomen. Velmi nežádoucí je i možnost intragenomického přesunu, neboť by mohlo dojít k přesunu transgenů na nežádoucí místo nebo ke změně efektu genové dávky, případně k integracím vedoucím k letalitě. Je proto důležité provést detekci krosmobilizace prostřednictvím excizní nebo transpoziční eseje (Handler et al. 2003).

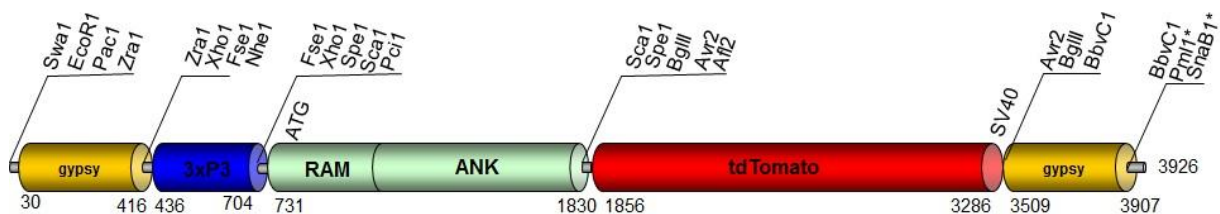


**Obr. 10** – Různé formy proteinu Notch s označenými vazebnými místy pro proteiny, které se také účastní signální dráhy. Formy Nfull a N $\Delta$ Cterm se přirozeně tvoří během embryonálního vývoje drozofily. Modifikace N $\Delta$ Cterm<sup>intra</sup> má stejný účinek jako N $\Delta$ Cterm. Dole je proteinový produkt dominantní podmíněně letální alely N<sup>60g11</sup> s vyznačeným úsekem, odpovídajícím ortologní sekvenci obaleče jablečného použité do transformačního konstruktů v naší laboratoři.

Protože EGFP u obaleče vykazuje poměrně silnou autofluorescenci v zelené části spektra (Ferguson et al. 2010), v našem konstruktě byl jako reportérový gen použit gen pro červeně fluoreskující protein td (tandem dimer) Tomato, vyvinutý v laboratoři Rogera Tsiena (Department of Chemistry & Biochemistry, UCSD, University of California). Jeho excitační maximum je při 554 nm, emisní maximum při 581 nm. Promotor *Actin A3* bource morušového byl v našem konstruktě nahrazen silnějším, fotoreceptorově specifickým promotorem *3xP3*, který expresi směřuje do očí a CNS (Thomas et al. 2002).

Při transformaci je vždy nutno brát v úvahu epigenetické faktory, jako je transkripční interference a interakce hostitelského genomu s vektorem obecně. Vytvoření podmíněně letálního kmene samic obaleče jablečného vyžaduje vložení transgenů do chromosomu W. Tento chromosom je však složen převážně z heterochromatinu (Traut & Marec 1996, Fuková et al. 2005), který může snížit šanci úspěšné inserce, a naopak zvýšit pravděpodobnost umlčení („silencingu“) inzertu – u drozofily je tento jev známý jako poziční efekt (Schotta et al. 2003). Proto byly po stranách transgenů umístěny insulátory *gypsy* (Gdula et al. 1996), které mohou zabránit supresi promotoru modulací struktury chromatinu (Chen & Corces 2001).

Každý komponent konstruktů byl navíc ohraničen polylinkry se specifickými místy pro různé restriční endonukleázy pro případné snadné zaměňování. Konstrukt byl nazván RATOM a syntetizován na zakázku firmou GeneScript (Piscataway, NJ & Hong Kong). Schéma konstruktů je znázorněno na Obr. 11. Byly dokonce provedeny testy konstruktů v embryonální buněčné kultuře Bm1 bource morušového, kde se transgen úspěšně exprimoval (R. Čapková-Frydrychová, ústní sdělení).



**Obr. 11** – Schéma konstruktů RATOM. Konstrukt obsahuje domény RAM a ANK obalečného ortologu genu *Notch* pod promotorem *3xP3* v tandemu s reportérovým genem *tdTomato*; celá kazeta je ohraničena insulátory *gypsy* a zaligována do vektoru *piggyBac*.

Potenciální nevýhodou transformace je fakt, že není jisté, zda se transgen bude opravdu exprimovat tak, jak chceme (aby měl chladově letální efekt). Signalizace Notch je citlivá na genovou dávku. Je otázka, jaký dopad bude mít na chladovou letalitu náš transgen, který sice bude pod silným promotorem *3xP3*, ale v optimálním případě bude vložen v chromosomu W, tvořeném převážně heterochromatinem. Další otázky do tohoto problému vneslo zjištění lokalizace genu *Notch* v karyotypu obaleče jablečného. V případě úspěšného

vnesení transgenu do chromosomu W bude transgen dominantní nad divokou alelou genu *Notch*, která je za normalních podmínek v samičím genomu obaleče v hemizygotní konstituci. Existuje možnost, že díky přítomnosti pouze jediné divoké alely genu bude mít přítomnost transgenu s dominantní mutantní alelou, navíc pod silným promotorem, letální účinek i při permisivních podmínkách. Skutečnou funkčnost transgenu odhalí až vlastní transformační experimenty; určitou nápodědu by mohly poskytnout výsledky experimentů, které byly dříve prováděny na mutagenizovaných drozofilách (Fryxell & Miller 1995, Lyman & Young 1993).

Díky tomu, že u drozofily je gen *Notch* lokalizován na pohlavním chromosomu X, znamená jeho lokalizace na chromosomu Z u obaleče jablečného obdobnou situaci. Při experimentech prováděných na embryích drozofily, samičky homozygotní pro  $N^{60g11}$  (s dvěma kopiemi alely  $N^{60g11}$  na jednom páru chromosomů) nesoucí duplikaci standardní alely genu *Notch* (na jiném páru chromosomů, aby modelovaly situaci transgenní mouchy) byly životaschopné při 29°C, ale teplota 21°C pro ně byla letální. Proto při nízké teplotě mohou přežít samičky s jednou kopií standardní alely *Notch*, ale ne s dvěma kopiemi alely  $N^{60g11}$  (Fryxell & Miller 1995). Velkou roli však může hrát skutečnost, že u drozofil existuje jev kompenzace genové dávky, a to zesílením exprese genů nacházejících se na jediném chromosomu X u samců, kdežto u motýlů žádný systém kompenzace genové dávky není znám (Traut et al. 2007).

## 6. SOUHRN

Cílem této práce bylo vytvořit zázemí pro budoucí transformaci obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) dominantní, podmíněně (chladově) letální mutantní alelou genu *Notch*, odvozenou z jeho vlastního ortologu. Za tímto účelem jsem nejprve izoloval ortologní sekvenční genu *Notch* obaleče a provedl jejich sekvenční analýzu. Při sekvenční analýze jsem vycházel z dostupných sekvencí genu *Notch* drozofily a jeho ortologu u bource morušového; tyto sekvenční jsem využil jak k navrhování degenerovaných primerů, tak i k porovnávání míry homologie jednotlivých funkčních domén proteinu Notch. Celkem jsem zaklonoval a osekvenoval úsek dlouhý 2094 bp. Proteinová sekvenční tohoto úseku je složena z 698 aminokyselin a zahrnuje malou část extracelulární domény (konkrétně třetí doménu NL) a většinu intracelulární domény (doménu RAM včetně transmembránové domény a ankyrinovou doménu). Zjistil jsem, že nejvyšší míru homologie a zároveň nejméně polymorfních míst nahromaděných během evoluce vykazuje ankyrinová doména (ANK).

Izolace genu *Notch* obaleče jablečného položila základy projektu týkajícího se vytvoření transformačního konstruktů pro budoucí transformaci obaleče podmíněně (chladově) letální alelou genu *Notch*. Do tohoto konstruktů jsem na základě výsledků sekvenční analýze navrhl použití fragmentu ortologu *Notch* u obaleče, zahrnujícího domény RAM a ANK.

V rámci bližší charakterizace izolovaného ortologu genu *Notch* jsem se zabýval jeho lokalizací v genomu obaleče. Metodou kvantitativní PCR jsem prokázal dvojnásobný počet kopií genu v genomové DNA (gDNA) samců ve srovnání s gDNA samic, což naznačovalo jeho vazbu na pohlavní chromosom Z, ačkoliv u bource morušového je tento gen autosomální a vyskytuje se na chromosomu 15. Tuto skutečnost jsem následně potvrdil fyzickou lokalizací ortologu genu *Notch* na chromosomech obaleče metodou BAC-FISH, což naznačuje, že během evoluce karyotypu obaleče došlo k fúzi chromosomu Z a autosomu odpovídajícímu chromosomu 15 u bource. Zjištění vazby genu *Notch* na pohlavní chromosom Z může hrát významnou roli v transformačních experimentech s mutantní formou tohoto genu.

## 7. LITERATURA

- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770–776.
- Barnes MM (1991) Codling moth occurrence, host race formation, and damage. *In* L.P.S. Van der Geest, and H. H. Evenhuis [eds.], *Tortricid pests: their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 313-327.
- Beldade P, Saenko SV, Pul N, Long AD (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS Genet* **5**(2): e1000366.
- Bloem, K. A., and S. Bloem. (2000). SIT for codling moth eradication in British Columbia, Canada. *In: Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia. pp. 207-214.
- Bloem, K. A., S. Bloem, and J. Carpenter. (2005). Impact of moth suppression/eradication programmes using the sterile insect technique or inherited sterility. *In: V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson [eds.], Sterile insect technique. Principles and practice in areawide integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 677-700.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* **5**: 207-216.
- Dalíková M (2009) Využití BAC klonu při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Mgr. Thesis, in Czech. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 30 p.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**: 518-522.
- Dyck, V. A., S. H. Graham, and K. A. Bloem (1993). Implementation of the sterile insect release programme to eradicate the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae), in British Columbia, Canada. *In: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques*. IAEA, Vienna, Austria. pp. 285-297.
- Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA, Artavanis-Tsakonas S (1990) Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**: 523-534.



- Ferguson HJ, Neven LG, Stephen TT, Mohammed A, Fraser M (2010) Genetic transformation of the codling moth, *Cydia pomonella* L., with *piggyBac* EGFP. *Transgenic Res.* (DOI 10.1007/s11248-010-9391-8).
- Fryxell KJ, Miller TA (1995) Autocidal biological control: a genetic strategy for insect control based on genetic transformation with a highly conserved gene. *J. Econ. Entomol.* **88**: 1221-1232.
- Gdula DA, Gerasimova TI, Corces VG (1996) Genetic and molecular analysis of the *gypsy* chromatin insulator of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 9378-9383.
- Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC (2008) The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. *Journal of Cell Science* **121**: 3109-3119.
- Handler AM (2003) Understanding and improving transgene stability and expression in insects for SIT and conditional lethal release programs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 121–130.
- Chen S, Corces VG (2001) The Gypsy Insulator of *Drosophila* Affects Chromatin Structure in a Directional Manner. *Genetics* **159**: 1649-1658.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-358.
- Kidd S, Kelley MR, Young MW (1986) Sequence of the Notch Locus of *Drosophila melanogaster*: Relationship of the Encoded Protein to Mammalian Clotting and Growth Factors. *Mol Cell Biol.* **6**(9): 3094-3108.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrypsian Lepidoptera (Insecta). *Zool Syst Evol Res.* **38**: 73-79.
- Lyman D, Young MW (1993) Further evidence for function of the *Drosophila* Notch protein as a transmembrane receptor (cell-fate regulation/neurogenesis/dominant gain of function). *Genetics* **90**: 10395-10399.
- Marec F (1991) Genetic control of pest strain in *Ephestia kuehniella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **61**: 271-283.
- Marec F, Kollárová I, Pavelka J (1999) Radiation-induced inherited sterility combined with a genetic sexing system in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America* **92**: 250-259.
- Marec F., Neven L.G., Fukova I. (2007) Developing transgenic sexing strains for the release of non-transgenic sterile male codling moths *Cydia pomonella*. In: Vreysen M.J.B., Robinson A.S., Hendrichs J. (eds.) *Area-Wide Control of Insect Pests. From Research to Field Implementation*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 103-111.

- Marec F, Neven LG, Robinson AS, Vreysen M, Goldsmith MR, Nagaraju J, Franz G (2005) Development of genetic sexing strains in Lepidoptera: from traditional to transgenic approaches. *Journal of Economic Entomology* **98**: 248-259.
- Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development*. **121**: 2633–2644.
- Nguyen P (2009) Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného, *Cydia pomonella* metodou BAC-FISH. Mgr. Thesis, in Czech. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 38 p.
- Nagaraju J (1996) Sex determination and sexlimited traits in the silkworm, *Bombyx mori*; their application in sericulture. *Indian Journal of Sericulture* **35**: 83-89.
- Paker JD, Rabinovitch PS, Burmer GC (1991) Targeted gene walking polymerase chain reaction. *Oxford University Press* **19** (11): 3055-3060.
- Peloquin JJ, Thibault ST, Staten R, Miller TA (2000) Germline transformation of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) mediated by the piggyBac transposable element. *Insect Molecular Biology* **9**: 323-333.
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF, Jiggins CD (2007) Synteny and Chromosome Evolution in the Lepidoptera: Evidence from Mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**(1): 417-426.
- Proverbs MD, Newton JR, Campbell CJ (1982) Codling moth: a pilot program of control by sterile insect release in British Columbia. *Can. Entomol.* **114**: 363-376.
- Rendón P, McInnes D, Lance D, Stewart J (2004) Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *J. Econ. Entomol.* **97**: 1547-1553.
- Robinson AS (2002a) Mutations and their use in insect control. *Mutation Res.* **511**: 113-132.
- Robinson AS (2002b) Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* **116**: 5-13.
- Robinson R (1971) Lepidoptera genetics. Pergamon, Oxford, England
- Schotta G, Ebert A, Dorn R, Reuter G (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**: 67-75.
- Staten RT, Rosander RW, Keaveny DF (1993) Genetic control of cotton insects: the pink bollworms as a working programme *In: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques*. IAEA, Vienna, Austria. pp. 269-284.
- Strunnikov VA (1987) Genetic methods of selection and sex control in the silkworm. Agropromizdat, Moskva, SSSR.

- Strunnikov VA (1975) Sex control in silkworms. *Nature* (Lond.) **255**: 111-113.
- Sýkorová M (2011) Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Mgr. Thesis, in Czech. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 34 p.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature Biotechnology* **18**: 81-84.
- Thomas JL, Da Rocha M, Besse A, Mauchamp B, Chavancy G (2002) 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. From the embryonic stage onwards. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 247-253.
- Tien AC, Rajan A, Bellen HJ (2009) A Notch updated. *J. Cell Biol.* **184**(5): 621–629.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q. Rev. Biol.* **71**: 239-256.
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* **1**: 332-346.
- Varela LG, Welter SC, Jones VP, Brunner JF, Riedl H (1993) Monitoring and characterisation of insecticide resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four western states. *J. Econ. Entomol.* **86**: 1-10.
- Vreysen M.J.B., Carpenter J.E., Marec F. (2010) Improvement of the sterile insect technique for codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera, Tortricidae) to facilitate expansion of field application. *Journal of Applied Entomology* **134**: 165–181.
- Welshons WJ, von Halle ES (1962) Pseudoallelism at the *Notch* locus in *Drosophila*. *Genetics* **47**: 743-759.
- Wesley CS, Mok LP (2003) Regulation of Notch signaling by a novel mechanism involving Suppressor of Hairless stability and carboxyl terminus-truncated Notch. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 5581–5593.
- Wesley CS, Saez L (2000) Analysis of Notch lacking the carboxyl terminus identified in *Drosophila* embryos. *J Cell Biol.* **149**(3): 683-696.
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Kamimura M, Nakano R, Naito Y, Ishikawa Y, Sahara K (2011) Isolation of BAC clones containing conserved genes from libraries of three distantly related moths: A Useful resource for comparative genomics of Lepidoptera. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (doi:10.1155/2011/165894)
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K (2005) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**: 675–685.