

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



**Charakterizace molekulárního složení genomu obaleče
jablečného, *Cydia pomonella*, s využitím reasociační kinetiky**

Diplomová práce

Barbora Blažková

Školitel: Prof. RNDr. František Marec, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Petr Nguyen

České Budějovice

2012

Blažková, B., 2012: Charakterizace molekulárního složení genomu obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, s využitím reasociační kinetiky. [Characterization of molecular composition of the codling moth (*Cydia pomonella*) genome using reassociation kinetics. Mgr. Thesis, in Czech] – 34 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: In this study, the reassociation kinetics of codling moth (Cydia pomonella) was performed in order to characterize the molecular composition of the codling moth (Cydia pomonella) genome and to isolate highly repetitive and unique DNA components. The effectivity of distinct repetitive DNA fractions as a specific competitor in fluorescence in situ hybridization was tested.

Finanční podpora:

Práce byla financována z prostředků grantu Grantové agentury ČR, reg. č. 523/09/2106 (řešitel F. Marec) a z grantu Studentské grantové agentury PŘF JU SGA 2011 (řešitel B. Emmerová).

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené 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 14. 12. 2012

.....
Barbora Blažková

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Frantovi Marecovi za přijetí do laboratoře a zadání zajímavého tématu, ochotu se mi vždy věnovat a tolerantní přístup. Dále děkuji svému školiteli specialistovi Petrovi Nguyenovi za vedení, vlídný přístup a obětavou pomoc po devět měsíců, kdy jsem se potřebovala vyhnout potenciálně teratogenním látkám. Můj velký dík patří celému kolektivu laboratoře za bezvadnou pracovní atmosféru a baby - friendly přístup. Dále chci poděkovat Tomášovi Fesslovi za uvedení do tajů cirkulárního dichroismu a trpělivost při vysvětlování následných výpočtů. V neposlední řadě velice děkuji celé své rodině za ohromnou podporu a tchýni Hance, která mi poslední semestr kryla záda. Všem Vám děkuji!

1. Úvod.....	5
1.1. Chromatin.....	5
1.2. Repetitivní sekvence a jejich studium.....	7
1.3. Genomy motýlů.....	9
1.4. Obaleč jablečný <i>Cydia pomonella</i>	11
2. Cíle práce.....	13
3. Materiál a metody.....	14
3.1. Hmyz.....	14
3.2. Extrakce DNA.....	14
3.3. Fragmentace DNA.....	14
3.4. Určení teploty tání DNA (T_m).....	14
3.5. Reasociace DNA.....	15
3.6. Chromatografická separace.....	15
3.7. Analýza dat: CotQuest.....	15
3.8. Dialýza.....	15
3.9. Příprava chromosomálních preparátů.....	16
3.10. Příprava kompetitorů a značení sond pro <i>in situ</i> hybridizace.....	16
3.11. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	16
4. Výsledky.....	18
4.1. Měření cirkulárního dichroismu vzorku fragmentované DNA <i>C. pomonella</i>	18
4.2. Reasociace genomové DNA <i>Cydia pomonella</i>	20
4.3. Hybridizační experimenty.....	22
5. Diskuze.....	25
6. Souhrn.....	28
7. Literatura.....	29

1. Úvod

Již od poloviny minulého století přitahují pozornost vědců repetitivní sekvence jako dosud málo prozkoumaná oblast genomu eukaryot. Přestože byly tyto sekvence původně považovány za nezajímavou výplň mezi kódujícími geny, dnes nikdo nepochybuje o jejich strukturní a funkční roli v genomu a v neposlední řadě o významu v jeho evoluci (McClintock, 1950). Rozkrytí tajů genomu je a vždy bude jednou z hlavních otázek, jimiž se moderní genetika zabývá. V současnosti na úspěšný projekt čtení lidského genomu navázal projekt Encyklopedie DNA elementů (ENCODE). ENCODE potvrdil, že kromě sekvence bílkovin genetická informace kóduje také regulační RNA a určuje místa epigenetických modifikací a vazby transkripčních faktorů. V neposlední řadě ENCODE ukázal, že většina repetitivní DNA obsahuje esenciální regulační informaci, ze které část dokonce může být přepsána na RNA s dosud neznámou funkcí (Pennisi, 2012).

1.1. Chromatin

Genomem rozumíme souhrn veškeré DNA buňky zahrnující kódující i nekódující sekvence. DNA je uložena z větší části v chromosomech v buněčném jádře, z části potom také v jiných organelách jako jsou například plastidy nebo mitochondrie. Chromosom sestává z histonových proteinů, na něž se navíjí molekula DNA. Tento komplex DNA a bílkovin bývá také nazýván chromatin. Cytogeneticky lze podle barvitelnosti rozlišit dva typy chromatinu, euchromatin a heterochromatin. Slaběji barvitelný euchromatin je charakteristický rozvolněným nespiralizovaným stavem, díky čemuž je přístupný transkripčním a replikačním proteinovým komplexům. V euchromatinu se nachází většina genů. Heterochromatin je spiralizovaný, geneticky inaktivní, intenzivně barvitelný chromosomální materiál, pro který je specifická nízká hladina acetylovaných histonů. Rozeznáváme dva typy heterochromatinu, fakultativní a konstitutivní. Heterochromatin konstitutivní má vždy charakter heterochromatinu. Nachází se zejména v oblasti centromer a telomer, tvořených krátkými repetitivními satelitní DNA, v pohlavních chromosomech Y a v tzv. B chromosomech (White M.J.D, 1973; Lohe a kol., 1993). U motýlů je konstitutivním heterochromatinem tvořena velká část chromosomu W (Traut a Marec, 1996). Fakultativní heterochromatin má charakter heterochromatinu jenom dočasně za určitých podmínek. Typickým příkladem fakultativního heterochromatinu je Barrovo tělísko či „sex chromatin“ vzniklý inaktivací jednoho z dvojice pohlavních chromosomů X pozorovatelný u samic savců (Ray a Venketeswaran, 1978). Odlišné barvitelnosti heterochromatinu a euchromatinu využívají tzv. „proužkovací“ neboli

„banding“ cytogenetické techniky. Diferencování se provádí barvením Giemsou jako například u C- nebo G – proužkování nebo fluorescenčními barvivy jako je například quinakrin, Hoechst nebo DAPI. „C - banding“ se používá pro identifikaci konstitutivního heterochromatinu. Po obarvení Giemsou tmavé pruhy odpovídají heterochromatinu a světlé euchromatinu. Tmavé proužkování Giemsou vytváří i „G - proužkování“, kde tmavší pruhy odpovídají AT bohatým oblastem DNA. Na druhou stranu „Q – proužkování“ barvicí fluorescenčním barvivem quinakrinem barví heterochromatinové i euchromatinové proužky. Nejsilněji po působení quinakrinem svítí proužky s vysokým obsahem AT párů, které preferenčně barví také DAPI (Kapusinski a kol., 1995). Proužkovací techniky umožňují identifikaci jednotlivých chromosomů při sestavování karyotypů podle charakteristických barvicích paternů každého chromosomu a případně usnadňují detekci strukturálních aberací (Schreck a kol., 2001).

V 80. letech Bernardi a kol. odhalili nerovnoměrné rozložení bazí v genomech. Tehdy byly prvně popsány tzv. „isochory“, více než 200 kilobazové homogenní segmenty DNA vyznačující se vysokým obsahem guaninu a cytosinu (Bernardi a kol., 1985). Jejich objevení bylo prvním krokem k formulování „teorie isochorů“, v níž jsou genomy „teplokrevných živočichů“ (savců a ptáků) charakterizovány jako mozaika dlouhých isochorických regionů složených převážně z GC bohatých oblastí. Na druhou stranu „chladnokrevní živočichové“ (ryby, krokodýli a obojživelníci) se vyznačují nízkým obsahem GC bohatých isochor (Bernardi a kol., 1985; Cuny a kol., 1981; Oliver a kol., 2001). Během následujících třiceti let vzbudila tato teorie vlnu živého zájmu. Využitím studie reasociační kinetiky metodou hydroxyapatitové chromatografie bylo odhaleno, že množství unikátních DNA sekvencí klesá a množství středně repetitivních sekvencí stoupá od GC chudých po GC bohaté regiony vykazující různé vzorce rozložení (Cuny a kol., 1981; Bernardi G., 1989). Tyto výsledky nejsou nekonzistentní se studií prokazující souvislost mezi stoupajícím výskytem genů v GC bohatých isochorech, protože geny představují pouze malou část unikátních sekvencí DNA (Bernardi G., 1989; Saccone a kol., 1993). Souvislost mezi isochory a chromatinem však dosud nebyla prokázána (Bernardi a kol., 1989). Avšak později Varriale a Bernardi (2010) prokázali souvislost mezi isochory a tzv. „CpG ostrůvky“ u teplokrevných živočichů. CpG ostrůvky jsou 0,5 – 2 kb sekvence bohaté na GC a nemetylované CpG dublety, které se obecně nachází v blízkosti genových promotorů. Varriale a Bernardi. (2010) poukazují na snížený výskyt až absenci CpG ostrůvků u studenokrevných živočichů a vysokou hustotou oblastí CpG ostrůvků u živočichů teplokrevných, které je téměř souběžné s genově hustými

isochory se stoupajícím GC. (Aïssani a kol., 1991; Jabbari a kol., 1998; Varriale a Bernardi 2010; Yamada a kol., 2004).

1.2. Repetitivní sekvence a jejich studium

Oproti unikátní DNA bylo na repetitivní DNA dříve nahlíženo jako na zbytečnou, „junk DNA“ nebo „parazitickou DNA“, která genomu nepřináší žádný užitek. Nyní vyplývá důležitost repetitivních sekvencí z nově nabytých poznatků o jejich roli v genomu. Průlomem ve studiu repetitivní DNA byla predikce samotných mobilních elementů Barbarou McClintock založená na pozorování na úrovni fenotypu u kukuřice *Zea mays* (McClintock, 1950). K podrobnějšímu zkoumání takových sekvencí následně poskytl příležitost objev vlastní struktury DNA (Watson a Crick, 1953).

Repetitivními sekvencemi rozumíme úseky DNA složené z mnohonásobně opakovaných sekvenčních motivů (Tab. 1). Často se nachází v charakteristických regionech chromosomu jako například v oblasti centromer, v satelitech a na telomerách. Repetitivní sekvence jsou reprezentovány „kódujícími“ genovými rodinami např. rRNA a histonových genů stejně jako „nekódujícími“ sekvencemi, kterými rozumíme po genomu volně rozptýlené transpozibilní elementy a tandemově opakované repetice různých délek, tzv. „satelity“.

Transponovatelné sekvence, neboli „mobilní elementy“ rozlišujeme dle jejich schopnosti přesouvat se v rámci genomu na transpozony replikativní, při jejichž přenosu dochází k nárůstu počtu jejich kopií v genomu, a transpozony konzervativní zachovávající počet svých kopií, někdy též nazývané „cut and paste“. Třetí třídou mobilních elementů jsou retrotranspozony, u nichž též dochází ke zvýšení počtu kopií v genomu a liší se svým mechanismem přenosu. Retrotranspozony se nejprve přepisují do RNA a následně využívají reverzní transkriptázu pro zpětný přepis z RNA do DNA. Ta se potom může integrovat zpět do genomu. Retrotranspozony jsou velmi rozšířené v genomech všech organismů.

Z tandemově opakovaných repetice nejkratší „mikrosatelity“, několikabazové repetice volně rozptýlené po genomu, se proslavily svým využitím jako markery pro populační studie a klinické nebo forenzní účely („DNA fingerprinting“). Řádově deseti až tisícibazové opakované úseky, „minisatelity“, se nacházejí charakteristicky v telomerické a subtelomerické oblasti chromosomů. „Satelitní DNA“ je vysoce repetitivní centromerická DNA tvořená mnohočetným tandemovým opakováním sto - až desetitisíc – bazového sekvenčního motivu. (Brown, 1999)

Tab. 1: Stručné rozdělení repetitivních sekvencí (Brown, 1999).

druhy repetice podle jejich výskytu v genomu	třídy repetice dle jejich velikosti nebo způsobu transpozice	ukázky zástupců tříd
tandemové repetice	mikrosatelity (1-6 bp) minisatelity (7-100 bp) satelity (stovky bp)	
mobilní elementy	Transposony Retrotransposony Non-LTR Retrotransposony Retroviry	Mariner, hAT, MITE,... LTR retrotransposony (Copia, Gypsy,...) SINE, LINE

Jednou z metod studia unikátních a opakovaných úseků DNA je analýza reasociační kinetiky, tzv. „C0t analýza“, která představuje osvědčený způsob zkoumání složení genomů (Britten a kol., 1974; Gage a kol., 1974; Rasch a kol., 1974). C0t analýza bývá užívána k charakterizaci genomů jednotlivých druhů organismů (Britten a kol., 1974; Gage a kol., 1974; Peterson a kol., 1998; Hřibová a kol., 2007; Zhu a kol., 2011), určování příbuznosti mezi druhy (Rimpau a kol., 1978, Rimpau a kol., 1980) a ke studiu diverzity DNA organismů z environmentálních vzorků (Torsvik a kol., 1990; Sandaa a kol., 1999).

Reasociační kinetika DNA nám poskytuje informace jak o velikosti genomu, tak i o podílu unikátních sekvencí a repetitivních sekvencí a komplexitě genomových komponent (Gage a kol., 1974). C0t analýzou lze také ve spojení s hydroxyapatitovou chromatografií získat jednotlivé různě opakované frakce DNA využitelné pro vytváření knihoven (Peterson a kol., 2002), pro sekvenování (Hřibová a kol., 2007) nebo na hybridizační experimenty (Peterson a kol., 1998). Samotnou repetitivní frakci DNA lze využít jako kompetitora významně zvyšující účinnost hybridizačních metod tím způsobem, že zabrání nespecifické hybridizaci sond na preparátech navázáním této repetitivní tzv. C0t-1 frakce, čímž dojde ke snížení pozadí a zvýraznění signálu.

Metoda C0t analýzy je založena na DNA-DNA hybridizaci, denaturaci a renaturaci DNA dvoušroubovice. Při zahřátí dvoušroubovice DNA na 95°C dochází k rozvolnění vodíkových můstků mezi komplementárními řetězci za vzniku jednořetězcových DNA molekul. Následné ochlazení opět tyto řetězce spojí. Vzorek reasociovaný na požadovanou C0t hodnotu je okamžitě nanesen na hydroxyapatitovou kolonu, kde dojde k rozdělení na

jednořetězcovou a dvouřetězcovou DNA vymýváním sodium-fosfátovým pufrům různých koncentrací při stejné teplotě. C_0t hodnota vzorku představuje součin koncentrace nukleotidů v molech na litr, doby reasociace v sekundách a faktoru odpovídajícího koncentraci kationtů v použitém pufru (Britten a kol., 1974). Vynesáním logaritmu C_0t hodnoty na graf oproti odpovídajícímu procentuálnímu podílu jednovláknové DNA ve zkoumaném vzorku získáme C_0t bod. Graf C_0t bodů rozpínající se od minimální až nulové reasociace po téměř stoprocentní reasociaci DNA nazýváme C_0t křivkou. DNA sekvence hojně přítomné (repetitivní DNA) v genomu renaturují úměrně rychleji oproti sekvencím unikátním. Rozborem C_0t křivky můžeme získat informaci o velikosti genomu, poměru unikátních a repetitivních DNA sekvencí, o rozsahu části genomu s určitou frakcí a o komplexitě sekvencí v jednotlivých frakcích (Peterson a kol., 1998).

1.3. Genomy motýlů

Motýli se vyznačují hned několika genetickými zvláštnostmi. Samice motýlů jsou heterogametické s pohlavními chromosomy WZ a samci homogametičtí s pohlavními chromosomy ZZ (Abe a kol., 2002). Chromosomy motýlů jsou holokinetické, postrádají tedy centromeru a mikrotubuly dělicího vřeténka se připojují ke kinetochorové destičce, pokrývající značnou část povrchu chromosomu (Murakami a Imai, 1974; Wolf, 1996). Roztroušený heterochromatin u holocentrických chromosomů neumožňuje identifikaci jednotlivých chromosomů proužkovacími technikami, pouze je rozdělit do tříd dle velikosti (Fuková a kol., 2005).

Motýlí genomy obsahují vysoké procento podílu repetitivních DNA sekvencí, jak již v 70. letech ukázaly výsledky C_0t analýz. Využitím reasociační kinetiky byl zjištěn 45% podíl repetitivní DNA v genomu bource morušového a byla stanovena velikost haploidního genomu *B. mori* $0,53 \pm 0,02$ pg DNA (Gage a kol., 1974), při čemž non-LTR retrotransposony BMC1, L1Bm a Bm1 spolu s DNA transposonem mariner představují 16% genomu (Mita a kol., 2004). Tento výsledek je konzistentní s určením velikosti genomu bource pomocí Feulgenova barvení DNA. Touto metodou byl změřen haploidní genom samce bource $0,52 \pm 0,01$ pg DNA (Rasch a kol., 1974). Studie složení genomu martináče *Antheraea pernyi* pomocí reasociační kinetiky odhaluje, že velkou část tvoří repetitivní DNA, zejména rozptýlené repetice, a stanovuje velikost genomu na $1C = 1$ pg (Efstratiadis a kol., 1976). Cherepenko a kol. pomocí reasociační kinetiky izolovali repetitivní části genomu zavíječe voskového, *Galleria mellonella*, a určili, že velikost jeho genomu odpovídá 0,5 pg DNA (Cherepenko a kol., 1985). Od té doby byly motýlí genomy z hlediska obsahu repetitivních sekvencí

zkoumány řadou technik, zejména druhy již osekvenované. Papa a kol. (2008) vysvětlují rozdíly ve velikostech dvou blízce příbuzných motýlů *Heliconius erato* a *H. melpomene*, kde genom prvního zmíněného je o 30 % větší, insercí a následnou expanzí repetice, při čemž rozdíl velikostí genomů zhruba odpovídá rozsahu absence sekvencí u *H. melpomene* oproti *H. erato*. U motýla *Danaus plexippus*, jehož genom o velikosti 273 Mb byl již také osekvenován, bylo zjištěno 13,1 % repetitivních sekvencí (Zhan a kol., 2011), jejichž charakteristika však zatím nebyla prozkoumána. Četné současné studie potvrzují vysoký obsah repetitivní DNA v genomech motýlů, zejména pak poukazují na mobilní elementy akumulované na chromosomu W (Sahara a kol., 2003; Abe a kol., 2005; Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007). Ze známých údajů o velikostech genomů motýlů vyplývá, že mezi jednotlivými druhy mohou existovat značné rozdíly (Tab. 2), což bude zřejmě způsobeno právě rozdíly v množství repetitivních sekvencí DNA.

Tab. 2: Srovnání velikostí genomů motýlů (Gregory a kol., 2003).

druh motýla	velikost genomu odpovídající 1 C
<i>Euchlaena irraria</i> – největší genom	1,94 pg
<i>Danaus plexippus</i> - nejmenší genom	0,29 pg
průměr genomů všech zahrnutých druhů motýlů	0,66 ± 0,04 pg

Osekvenování genomu bource morušového a jeho zveřejnění v roce 2004 (Mita a kol., 2004; Xia a kol., 2004) otevřelo dveře srovnávacímu mapování genomů jiných druhů motýlů. S využitím fluorescenční in-situ hybridizace umělých bakteriálních chromosomů, tzv. „BAC-FISH“ o rok později Yoshida a kol. (2005) sestavili karyotyp bource, v němž každý chromosom identifikovali podle specifických hybridizačních signálů vybraných BAC klonů. Znalost fyzické i genetické mapy (Yasukochi, 1998) genomu bource morušového umožnilo přiřazení vazebných skupin ke konkrétním chromosomům a následné porovnávání map genomů druhů motýlů (Jiggins a kol., 2005; Yasukochi a kol., 2006; Pringle a kol., 2007; Beldade a kol., 2009; d'Alençon a kol., 2010). Conceição a kol. (2011) využili BAC knihoven pro studium repetitivních sekvencí DNA okáže *Bicyclus anynana* a identifikaci transponovatelných elementů ve zkoumaných sekvencích. V analyzovaných sekvencích bylo zjištěno okolo 2,73% repetice, což je nižší procento než u motýlů rodu *Heliconius*, kde bývá přes 20% repetitivních sekvencí v genomu (Papa a kol., 2008). U motýla *Danaus plexippus*,

jehož genom byl již také osekvenován (Zhan a kol., 2011), dosud nebyla povaha repetitivních sekvencí charakterizována.

1.4. Obaleč jablečný *Cydia pomonella*

V této diplomové práci se zabývám modelovým organismem obalečem jablečným, *Cydia pomonella* (Tortricidae, Lepidoptera). Obaleč jablečný je klíčový škůdce na plodech jabloní, hrušní, kdoulí a vlašských ořechů (Barnes, 1991). Zvýšená míra jeho škodlivosti spočívá zejména v jeho úspěšné adaptaci na nové prostředí (Timm a kol., 2006), reprodukční kapacitě, dynamice jeho populací a rezistenci k insekticidům (např. Sauphanor a kol., 1998; Stará a Kocourek, 2007; další citace v práci Sýkorová, 2011).

Genomová velikost haploidního genomu obaleče jablečného byla určena pomocí průtokové cytometrie je $1C = 0,75$ pg u samic a $0,71$ pg u samců (Nguyen, nepublikované výsledky), patří tedy mezi motýly ke genomům velikostně nadprůměrným například oproti genomu zavíječe *Ephestia kuehniella*, u kterého velikost haploidního genomu $1C \text{ DNA} = 0,45$ pg (Buntrock L., 2012), nebo dokonce ve srovnání s nejmenším známým motýlím genomem *Danaus plexippus* $0,29$ pg (Zhan a kol., 2011).

Karyotyp *C. pomonella* se skládá z 56 holokinetických chromosomů podobné velikosti. Fuková a kol. (2005) rozdělili tyto chromosomy do pěti velikostních tříd. Nepodařilo se ale identifikovat individuální chromosomy kvůli absenci proužkovacích technik vhodných pro Lepidoptera. Jednoznačně rozpoznatelné v karyotypu *C. pomonella* jsou pouze pohlavní chromosomy W a Z díky jejich velikosti. Chromosom W je podobně jako chromosom Y savců tvořen převážně heterochromatinem, obsahujícím zejména repetitivní DNA (Fuková a kol., 2007). V interfázních jádrech somatických buněk tvoří heterochromatinové tělísko, tzv. „sex chromatin“, snadno viditelné v mikroskopu i při malém zvětšení (Fuková a kol., 2005).

Nápadně velké pohlavní chromosomy charakteristické pro všechny cytogeneticky prostudované zástupce čeledi Tortricidae (Emelianov a kol. 2004, Fuková a kol. 2005) vedly k domněnce, že se na pohlavní chromosom Z translokovala část nebo dokonce celý autosom. Fúzi jednoho z autosomů, konkrétně autosomu odpovídajícímu chromosomu 15 bource morušového, s pohlavním chromosomem Z u obaleče jablečného vůbec poprvé potvrdila Sýkorová (2011). Osud homologního autosomu však zůstával neobjasněn. Jednou z možností je fúze tohoto autosomu s pohlavním chromosomem W (Nguyen a kol., v oponentním řízení).

Při výzkumu pohlavních chromosomů i autosomů obaleče jablečného (a i jiných motýlů) metodami molekulární cytogenetiky se naše laboratoř potýká s problémem nedostatečné specifity malovacích a jiných sond. Například malovací sonda připravená DOP-PCR amplifikací DNA chromosomů Z, získaných laserovou mikrodisekcí hybridizovala ke všem chromosomům a dokonce zvýraznila chromosom W místo Z (Šíchová J., 2009). Podobně při srovnávání míry divergence pohlavních chromosomů a autosomů u vybraných zástupců čeledi Tortricidae metodou Zoo-FISH nebylo možné použít celochromosomové malovací sondy z pohlavního chromosomu Z a jednoho autosomu obaleče jablečného kvůli nedostatečné specifitě hybridizace (Šíchová J., 2011). Evidentní příčinou těchto neúspěšných aplikací FISH je vysoký obsah obecných abundantních repetitiv, jež jsou rozptýleny po celém genomu a zároveň i v připravených sondách. Sondy pak hybridizují víceméně rovnoměrně po celém genomu, což má za následek nevýrazný signál v poměru k jeho pozadí. Použití vhodného kompetitora s vysokým obsahem těchto repetitiv, například C0t-1 frakce DNA, by tak s velkou pravděpodobností významně snížilo pozadí a zvýraznilo specifické hybridizační signály. Například u rostlin, jejichž DNA je plná rozptýlených repetitiv, použití C0t-1 DNA umožňuje úspěšně provádět mezidruhové hybridizace (Peterson a kol., 1998; Hřibová a kol., 2007; Zhu a kol., 2011)

2. Cíle práce

Hlavním cílem mé práce bylo charakterizovat genom obaleče jablečného, modelového druhu naší laboratoře, pomocí metod reasociační kinetiky a přispět tak k poznání molekulárního složení a struktury genomů motýlů (Lepidoptera), největší skupiny živočichů s holokinetickými chromosomy a chromosomálním určením pohlaví typu WZ/ZZ, kde heterogametickým pohlavím jsou samice. Dílčími cíli práce bylo zavedení metody C0t analýzy k charakterizaci podílu repetitivní DNA a jejích typů v genomu motýlů, následné vyizolování vysoce repetitivní frakce a unikátní frakce DNA obaleče jablečného a využití těchto frakcí jako sond pro fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a u vysoce repetitivní frakce porovnání její účinnosti jako specifického kompetitora pro FISH s kompetitorem rutinně používaným v naší laboratoři, tj. sonikovanou celogenomovou DNA daného druhu.

3. Materiál a metody

3.1. Hmyz

V práci jsem použila laboratorní kmen Krym-61 obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Původ kmene a metoda jeho chovu včetně přípravy a složení umělé diety jsou detailně uvedeny v práci Fuková a kol. (2005).

3.2. Extrakce DNA

Extrakce celogenomové DNA (gDNA) byla provedena standardní fenol-chloroform-izoamylalkoholovou extrakcí. Dospělé jedince *C. pomonella* samčího nebo samičího pohlaví jsem zpracovávala zvlášť. Tkáň jsem homogenizovala v předchlazené třecí misce s tekutým dusíkem. Zhruba 0,3 g homogenátu jsem přenesla do 10 ml extrakčního pufru o následujícím složení: 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 100 µg/mL proteináza K, 0,5% Sarkosylu a 10 mM Tris-HCl, pH 8. Směs jsem za pomalého míchání inkubovala přes noc ve vodní lázni při 37°C. Druhého dne jsem přidala RNázu A o konečné koncentraci 10 µg/mL extrakčního roztoku a směs inkubovala další hodinu při stejné teplotě.

Po zchlazení směsi na pokojovou teplotu jsem provedla fenol-chloroformovou extrakci. Klubko gDNA vysrážené v 0,1 objemu 3M Na acetátu a 0,7 objemu isopropanolu jsem rozpustila v příslušném množství vody nebo 1x TE pufru.

Kontrolu kvality izolované DNA jsem provedla štěpením restrikcími enzymy a koncentraci DNA stanovila na fluorometru Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

3.3. Fragmentace DNA

Získanou vysokomolekulární gDNA jsem fragmentovala opakovanou ultrasonikací homogenizerem Bandelin Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlín, Německo) plnými pulsy ve třicetisekundových intervalech, mezi kterými jsem roztok DNA chladila na ledu. Cílem bylo fragmentovat vysokomolekulární DNA na sekvence o průměrné velikosti kolem 350 bp. Velikost výsledných fragmentů byla kontrolována gelovou elektroforézou.

3.4. Určení teploty tání DNA (T_m)

Teplota tání (T_m) zkoumané DNA byla určena pomocí CD spektroskopie. Spektra byla měřena na Oddělení fotosyntézy Ústavu molekulární biologie rostlin BC AV ČR na přístroji Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japonsko). Vzorek roztoku DNA v 0,12 M SPB pufru byl umístěn v parafilmem uzavřené centimetrové „quartz“ kyvetě do komůrky vyhřívané nebo chlazené vodní lázni na požadovanou teplotu. Roztok DNA byl změřen za

teplot od 10°C do 70°C. Z hodnot naměřených na absorpčním maximu DNA za různých teplot byla získána T_m (°C) z první derivace naměřené hodnoty za dané teploty.

3.5. Reasociace DNA

DNA zatavená ve skleněných ampulích byla denaturována ve vodní lázni při teplotě 95°C po dobu 10 minut. Následně byly tyto ampule po dobu renaturace umístěny ve vodní lázni o teplotě 60°C. Po ukončení renaturace byla DNA ihned stonásobně naředěna 0,03 M sodium fosfátovým pufrům (SBP) o teplotě 60°C a nanesena na chromatografickou kolonu.

3.6. Chromatografická separace

Chromatografická separace byla provedena dle protokolu Petersona a kol. (1998). Chromatografickou kolonu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) s Bio-Rad průtokovým adaptérem napojeným na peristaltickou pumpu Gilson Minipuls 3 (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA), udržující konstantní průtok 0,75 ml/min. a cirkulujícím oběhem vody zajišťujícím v koloně stálou teplotu 60°C, jsem naplnila 0,32 g hydroxyapatitu (Bio-Rad) a postupně promývala 0,12 M a následně 0,48 M SPB. Zatímco nízká koncentrace SPB vymývá jednovláknovou DNA, vysoká koncentrace SPB vymývá DNA dvouvláknovou. Množství DNA jednotlivých frakcí byla změřena na UV spektrofotometru při vlnové délce 260 nm (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.7. Analýza dat: CotQuest

Tzv. „C0t křivka“, tedy grafické vynesení naměřených hodnot množství ssDNA za určité DNA koncentrace a doby renaturace, byla vyhodnocena pomocí programu CotQuest, který byl navržen pro automatickou nelineární regresní analýzu dat z DNA reasociační kinetiky (Bunge a kol., 2009). Byl použit algoritmus „Gauss Newton“ a z výsledných matematických modelů vybrán model „2F“ na základě nejnižší AICc hodnoty a na základě nepřekrývání DNA frakcí daného modelu (Bunge a kol., 2009). Programem CotQuest byly také navrženy C0t hodnoty nutné pro izolaci frakcí vysoce repetitivní DNA (HR DNA) a unikátní neboli „single copy“ DNA (SC DNA).

3.8. Dialýza

Frakce DNA v SPB pufru jsem přečistila pomocí dialýzy v 1x TAE pufru přes noc. Druhý den byla DNA přesrážena směsí - 3M Na acetátu a isopropanolu. Vzhledem ke značným ztrátám při srážení repetitivní frakce byla unikátní frakce DNA vysrážena přidáním 250 ng glykogenu. Vysrážený pelet DNA jsem rozpustila ve vodě. Koncentrace získané DNA byla měřena na nanodropu (Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.9. Příprava chromosomálních preparátů

Chromosomální preparáty jsem připravovala z testes a ovárií larev, respektive kukel, obaleče jablečného za využití tzv. „spreading“ techniky (Traut, 1976). Po vypitvání tkáně ve fyziologickém roztoku jsem materiál 10 minut hypotonizovala v 0,075 M KCl a následně fixovala 10 minut ve fixáži podle Carnoye (6 dílů etanolu : 3 díly chloroformu : 1 díl kyseliny octové). V případě ovárií jsem vynechala hypotonizaci a rovnou tkáň přenesla do fixáže. Následně jsem fixovaný materiál přenesla do kapky 60% kyseliny octové na podložním skle předem vyčištěném kyselým etanolem (96% etanol s 1% HCl), kde jsem tkáň rozmacerovala wolframovou jehlou. Kapku kyseliny octové jsem odpařila přemístěním sklíčka na teplou plotnu o 45°C. Nakonec jsem preparáty pro dlouhodobé uchování odvodnila v etanolové řadě, tedy jednu minutu v 70 %, 80 % a 100 % etanolu a uložila do – 80°C.

3.10. Příprava kompetitorů a značení sond pro *in situ* hybridizace

Byly použity tři druhy kompetitorů, standardně používaná sonikovaná samčí gDNA (Vítková a kol., 2007) a vysoce repetitivní frakce DNA a C0t-1 frakce DNA získané hydroxyapatitovou chromatografickou separací. Jako sondy pro hybridizaci byly použity značená unikátní frakce DNA, značená repetitivní frakce DNA a BAC sonda odvozená z pohlavního chromosomu obaleče, BAC W (27-1) (Dalíková, 2009).

Repetitivní DNA jsem amplifikovala soupravou WGA4 GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a po namnožení přečistila pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Všechny kroky jsem provedla dle pokynů výrobce. Unikátní DNA jsem v dalším kroku naznačila fluorochromem, pomocí soupravy WGA3 GenomePlex WGA Reamplification Kit (Sigma-Aldrich) s drobnou úpravou v protokolu, tedy se změněnou koncentrací jednotlivých nukleotidů. Reakce obsahovala 10 mM dCTP, dATP, dGTP, 8,4 mM dTTP a 1 mM Cy3-dUTP (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Kromě této změny jsem postupovala podle pokynů uvedených v protokolu výrobce.

BAC sondy byly značeny metodou nick translace soupravou Nick Translation Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) s použitím značených nukleotidů Cy3-dUTP (GE Healthcare, Milwaukee, USA). Značící reakce probíhala 4 hodiny při 16°C. Postup, který jsem použila, je popsán v protokolu výrobce.

3.11. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Samotná FISH byla provedena podle Yoshido a kol. (2005a). Ve stručnosti, chromosomální preparáty byly nejprve odvodněny v ethanolové řadě (70%, 80% a 100%

ethanol po 1 minutě) a po oschnutí denaturovány 3,5 minuty při 68°C v 70% formamidu v 2x SSC. Hybridizační směs pro jedno sklíčko obsahovala fluorescenčně značené sondy, kompetitora (viz Tab. 3) a 2,5 µg neznačené sonikované samčí gDNA lososa jako nespecifického hybridizačního kompetitora v 10 µL 50% formamidu a 10% dextransulfátu v 2x SSC. Skla byla inkubována s denaturovanou hybridizační směsí (denaturace 5 minut při 90°C) tři dny při 37°C a následně promyta v 0,1x SSC s 1% Tritonem X-100. Preparáty byly zakápnuty médiem Vectashield Mounting Medium obsahujícím DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Preparáty byly vyhodnoceny a zdokumentovány na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo) vybaveném chlazenou CCD kamerou s pomocí programu Analysis Software, verze 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, SRN). Fotografie preparátů barvených DAPI a Cy3 jsem snímala pro každou barvu zvlášť. Snímky jsem poté obarvila a dále zpracovala pomocí programu Adobe Photoshop, verze 6.0.

Tab. 3: Použité hybridizační směsi pro FISH na preparátech obaleče jablečného.

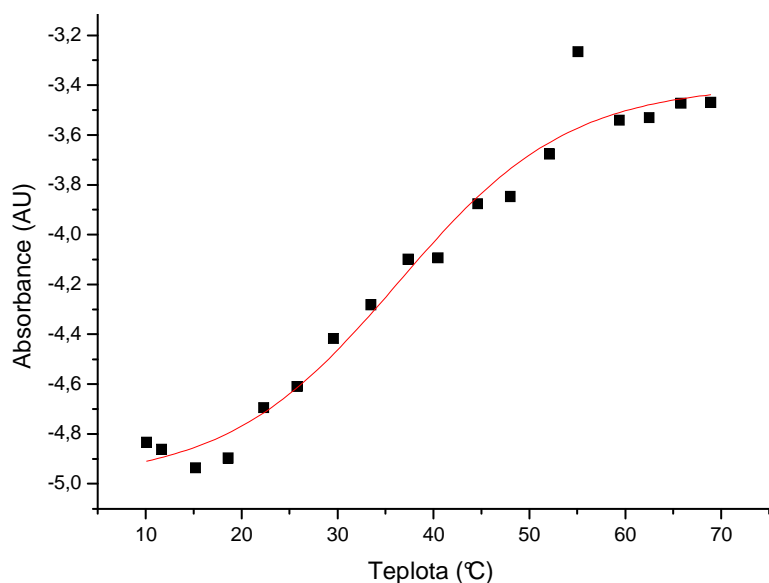
Preparát	Sonda	Cy3	Kompetitor
Cp ♀	značená unikátní frakce DNA z HAP chromatografie	500 ng	-
Cp ♀	značená vysoce repetitivní frakce DNA z HAP chromatografie	500 ng	-
Cp ♀	BAC W (27-1)	160 ng	3 µg HR DNA
Cp ♀	BAC W (27-1)	160 ng	3 µg C0t-1 DNA
Cp ♀	BAC W (27-1)	160 ng	3 µg gDNA

Cp - *Cydia pomonella*, ♀ - samice, HR – vysoce repetitivní frakce DNA

4. Výsledky

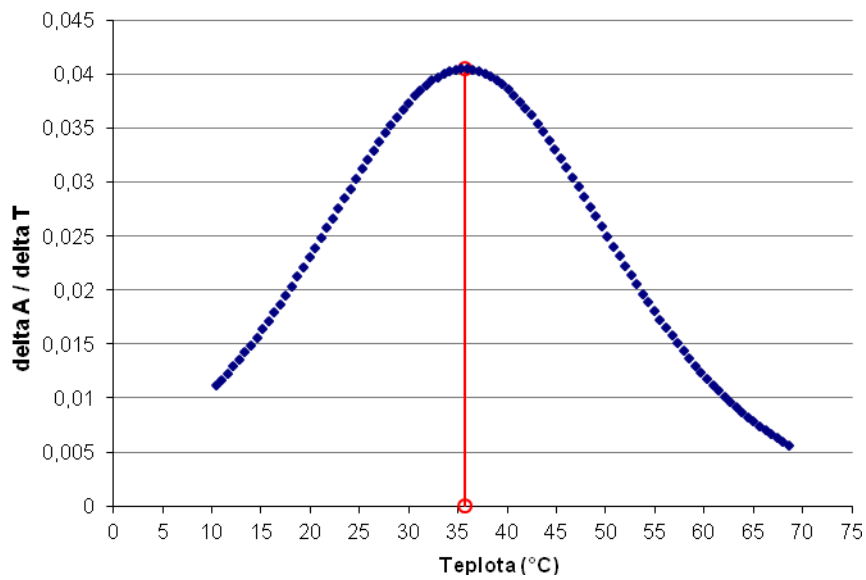
4.1. Měření cirkulárního dichroismu vzorku fragmentované DNA *C. pomonella*

Pomocí měření cirkulárního dichroismu (CD) DNA *C. pomonella* v 0,12 M SPB pufru jsem určila teplotu tání DNA. Z hodnot naměřených za teplot 10 - 70°C (Obr. 1) byla derivační metodou určena teplota tání daného vzorku DNA na 35°C (Obr. 2). Ve srovnání s teplotou tání očekávanou podle teploty tání DNA bource morušového ve stejném pufru (Gage a kol., 1974) je tato příliš nízká. To může být způsobeno nedokonalým uzavřením kyvety a následným odparem se změnou koncentrace pufru nebo celkově nevhodně zvolenou metodikou zjišťování teploty tání. Aparatura s vodní lázní bohužel neumožnila zvýšit teplotu v komůrce ukrývající kyvetu nad 70°C, při čemž teplota tání zkoumané DNA může 70°C převyšovat. Pro samotnou reasociaci byla tedy použita teplota tání DNA bource morušového z literatury, tj. 80°C (Gage a kol., 1974).



Obr. 1: Graf hodnot naměřených pomocí CD za různých teplot. Černé body jsou naměřené hodnoty. Červená křivka zobrazuje Boltzmannovu křivku optimálního proložení.

teplota tání DNA - derivační diagram



Obr. 2: Derivační diagram znázorňující derivaci rozdílů absorbance podle rozdílů teploty na teplotních bodech. Červeně je vyznačená výsledná teplota tání DNA.

4.2. Reasociace genomové DNA *Cydia pomonella*

Hodnoty získané reasociační analýzou genomové DNA *Cydia pomonella* byly zpracovány pomocí programu C0tQuest (Peterson D.G., 2009), jenž proložil těmito body C0t – křivku (Obr. 3), tedy křivku optimálního proložení naměřených bodů naznačující trend rozsahu renaturace DNA v C0t bodech o konkrétní koncentraci DNA a době renaturace (Tab. 4).

Tab. 4: Přehled naměřených C0t hodnot, které byly použity pro sestavení C0t - křivky.

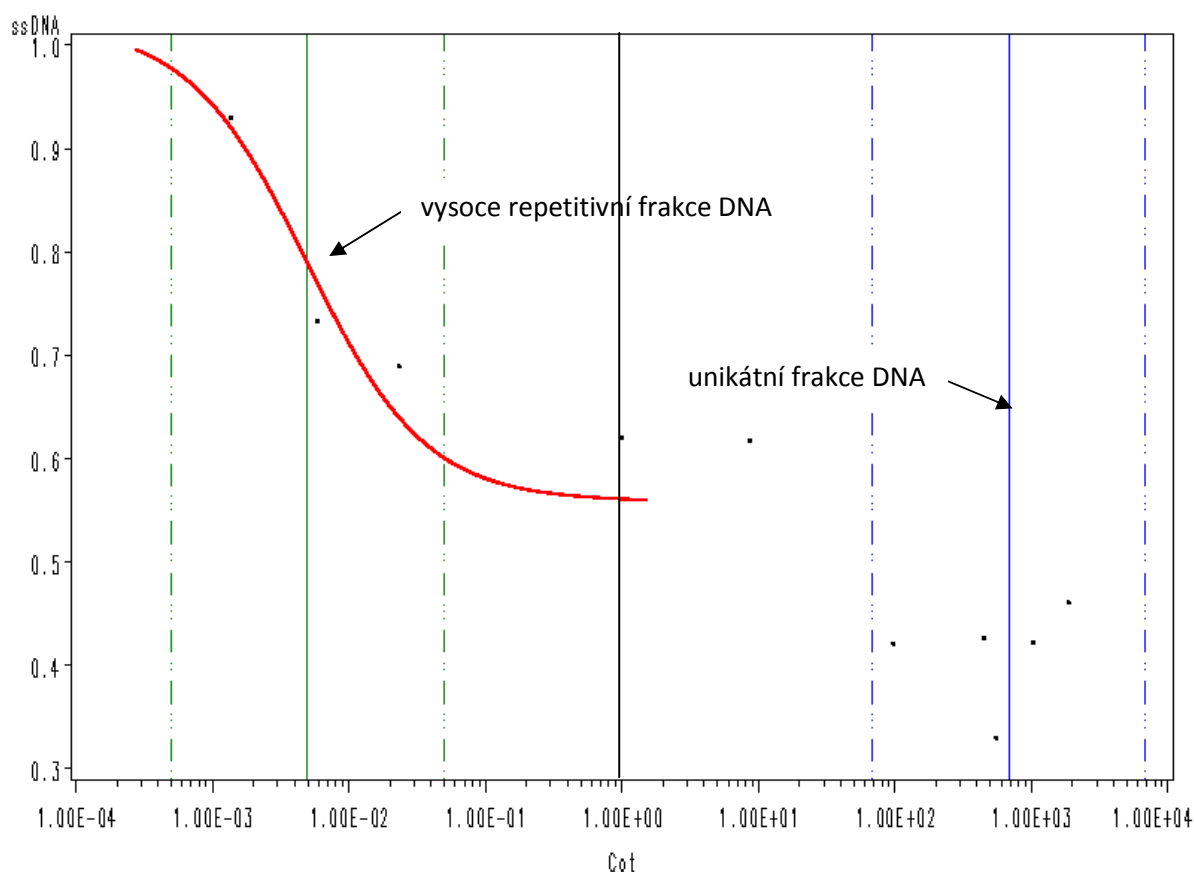
% ss DNA	C0t hodnoty	počáteční koncentrace C0 (mol/L)	čas renaturace t (s)
93,05	0,0014	$1,384 * 10^{-4}$	10,00
73,37	0,0059	$3,460 * 10^{-4}$	17,00
68,92	0,0235	$1,384 * 10^{-3}$	17,00
62,08	1,0000	$1,384 * 10^{-3}$	$72,27 * 10^1$
61,77	8,7178	$1,384 * 10^{-3}$	$63,00 * 10^2$
42,13	98,3868	$1,384 * 10^{-3}$	$71,10 * 10^3$
42,70	451,1123	$1,384 * 10^{-3}$	$32,60 * 10^4$
33,03	555,4493	$1,384 * 10^{-3}$	$40,14 * 10^4$
42,26	1036,4235	$1,384 * 10^{-3}$	$74,90 * 10^4$
46,07	1871,8392	$1,384 * 10^{-3}$	$13,53 * 10^5$

C0t analýza vymeziła vysoce repetitivní komponentu DNA a unikátní komponentu DNA na očekávaných C0t hodnotách (Gage a kol., 1974; Peterson a kol., 1998). Na základě reasociační kinetiky bource morušového mezi těmito frakcemi očekáváme také frakci středně repetitivní (Gage a kol., 1974), kterou program C0tQuest nedokázal popsat z důvodu překryvu s vysoce repetitivní frakcí. Tzv. „C0t-1 frakci“ odpovídá oblast křivky s C0t hodnotou 1 (Obr. 3). Tuto frakci lze získat za 722, 66 s od zahájení renaturace při koncentraci DNA $1,384 * 10^{-3}$ mol/L.

C0tQuest na části grafu vygeneroval křivku optimálního proložení, která však nedosahuje vyšších C0t hodnot. Při těchto vyšších hodnotách již došlo k jistým odchylkám od předpokládaného trendu hodnot, díky čemuž program matematickou chybou neumožnil stanovit další průběh křivky optimálního proložení. K větším odchylkám na takto vysokých

C0t hodnotách patrně došlo z důvodu degradace DNA při renaturaci za teploty 60°C v dlouhých denaturačních časech (řádově dny).

CotQuest na základě této C0t – křivky navrhl hodnoty vhodné pro získání jednotlivých různě repetitivních komponent DNA a jejich poměrný obsah v genomu. Vysoce repetitivní DNA byla vyizolována na C0t 1/2 = 0,005 a unikátní frakce DNA byla vyizolována na C0t 1/2 = 680,272. Podíl vysoce a středně repetitivní DNA v genomu *C. pomonella* je 46,1% a unikátní DNA 25,57 %, p30,36 % tvoří nezreasociovaná DNA. V každé C0t analýze se vyskytne jistá část poškozené DNA, která již není schopna reasociace a navázání na HAP kolonu (Peterson a kol., 1998). Za předpokladu, že tato nezreasociovaná DNA sekvencemi i jejich zastoupením odpovídá získané vysoce repetitivní a unikátní frakci, se skutečné zastoupení DNA komponentů rovná jejich podílu v reasocioované DNA (Peterson a kol. 1998). Odečteme-li takto od celkové hodnoty nezreasociovanou část DNA, potom vysoce repetitivní frakce DNA tvoří 66,20 % a unikátní frakce DNA 36,72 %.

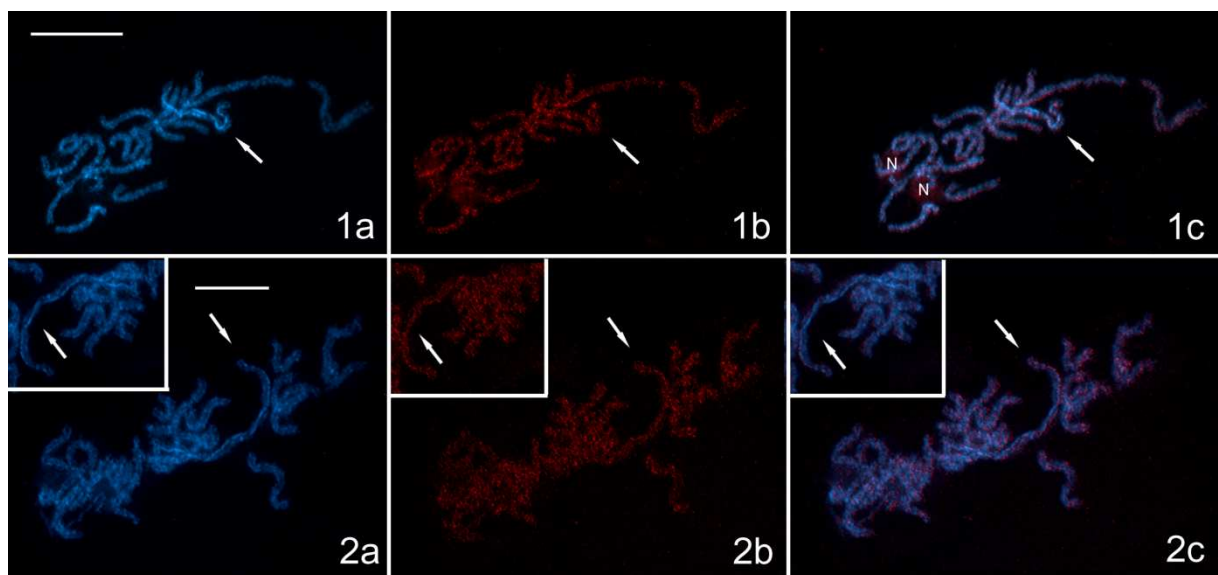


Obr. 3: C0t křivka genomové DNA *Cydia pomonella*. Plné svislé čáry naznačují C0t hodnoty vhodné pro izolaci jednotlivých frakcí genomu, zelená čára značí frakci vysoce repetitivní a modrá frakci unikátní, jak je naznačeno šipkami. Přerušovaná svislá čára naznačuje přibližné

rozmezí frakcí. Černá svíslá čára znázorňuje C0t hodnotu, kde by mohla být vyizolována tzv. „C0t-1 frakce“. Červená křivka naznačuje optimální proložení naměřených hodnot C0t znázorněných černými tečkami.

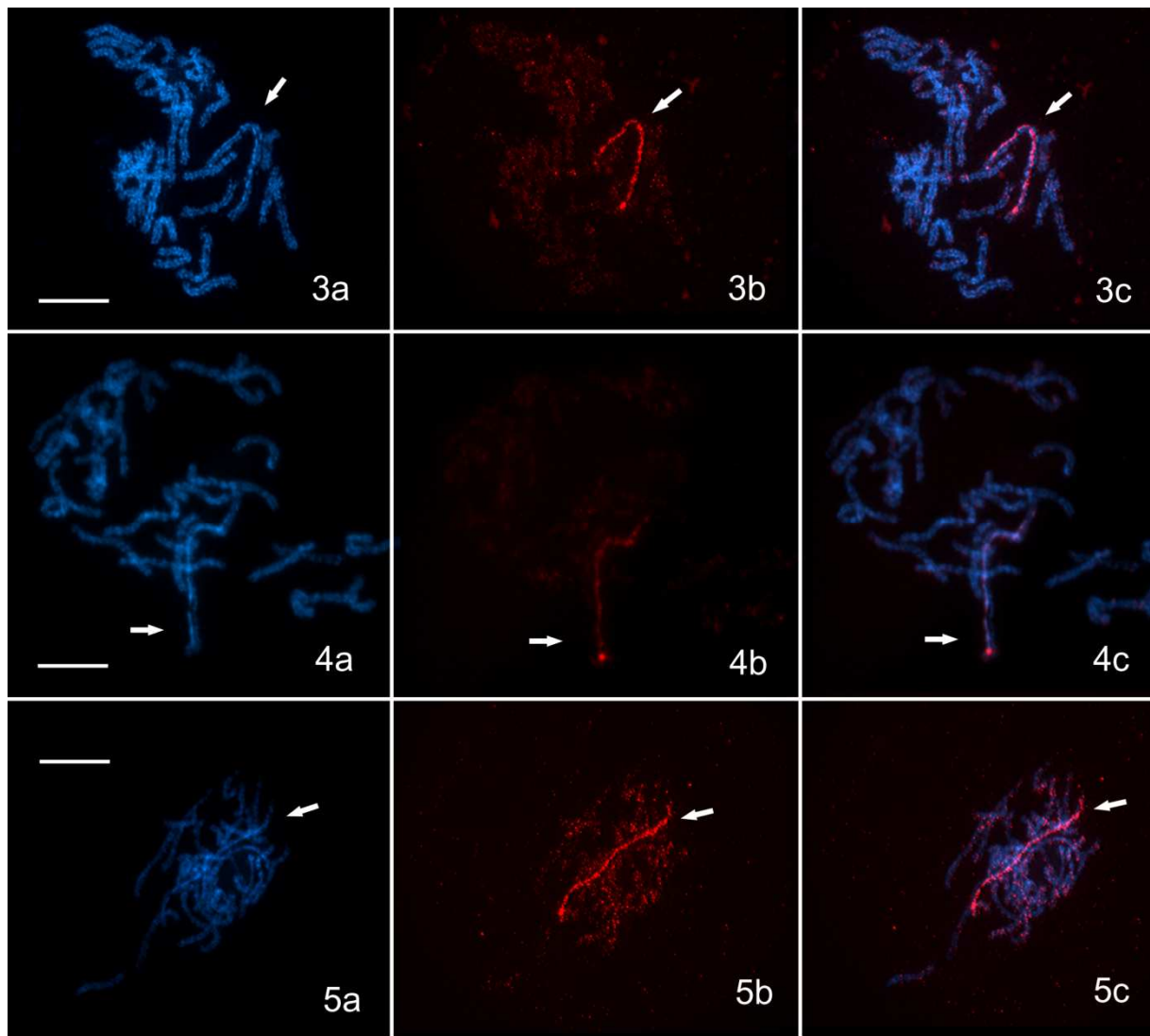
4.3. Hybridizační experimenty

Značené unikátní a repetitivní frakce DNA jsem využila jako sondy pro FISH a provedla srovnání účinnosti repetitivních frakcí získaných HAP chromatografií se standardně používaným kompetitorem pro FISH (viz. Tab. 3). Unikátní frakce DNA vykazovala rovnoměrnou distribuci po celém genomu se střídavě slabšími a silnějšími roztroušenými hybridizačními signály (Obr. 4, 1a-c). Kromě chromatinu bivalentů označila i jadérka na koncích obou NOR-bivalentů (Obr. 4, 1c). Hybridizační signály vysoce repetitivní frakce DNA byly též rovnoměrně rozptýleny po celém genomu, na rozdíl od unikátní frakce však téměř chyběly v oblasti jadérek a naopak zvýraznily přibližně polovinu délky vlákna chromosomu W v pohlavním bivalentu WZ (Obr. 4, 2a-c), což je v souladu s dřívějšími poznatky o heterochromatinovém složení a repetitivním obsahu tohoto chromosomu (Fuková a kol., 2005, 2007).



Obr. 4: **1 (a, b, c)** – Distribuce unikátních sekvencí v genomu *C. pomonella*. Fluorescenční *in situ* hybridizace unikátní frakce DNA získané HAP chromatografií na pachytenní bivalenty samice *C. pomonella*. Chromosomy byly podbarvené DAPI (modrá), sonda značená Cy3-dUTP (červená). **1a** – chromosomy; **1b** – hybridizační signály unikátní frakce; **1c** – složený obrázek zobrazuje rovnoměrné rozložení unikátních sekvencí po celém genomu včetně jadérek (N, nucleolus). Signál unikátní frakce DNA byl velice slabý, bylo proto potřeba použít dvojnásobné expoziční časy při focení než u ostatních obrázků. Na všech obrázcích

šipka ukazuje na chromosom W, jež je součástí bivalentu WZ. Měřítko = 20 μm . **2 (a, b, c)** – Distribuce vysoce repetitivních sekvencí v genomu *C. pomonella*. Fluorescenční *in situ* hybridizace vysoce repetitivní frakce DNA získané HAP chromatografií na pachytenní bivalenty samice *C. pomonella*. Chromosomy byly podbarvené DAPI (modrá), sonda značená Cy3-dUTP (červená). **2a** – chromosomy; **2b** – hybridizační signály vysoce repetitivní frakce; **2c** – složený obrázek zobrazuje rovnoměrné rozložení vysoce repetitivních sekvencí po celém genomu kromě chromosomu W, který vykazuje akumulaci signálů. Detail zobrazuje chromosom W, jehož horní část je hustěji značena než spodní. Tato více značená část by mohla odpovídat původnímu ancestrální chromosomu W, který zfúzoval s autosomem, jehož obsah postupně zdegeneroval. Na všech obrázcích šipka ukazuje na chromosom W, jež je součástí bivalentu WZ. Měřítko = 10 μm .



Obr. 5: Srovnání účinnosti tří kompetitorů fluorescenční *in situ* hybridizací BAC W (27-1) sondy značené Cy3-dUTP (červená) na pachytenní bivalentech oocytů *Cydia pomonella*.

Chromosomy byly podbarvené DAPI (modrá). a – chromosomy; b – hybridizační signály; c – složený obrázek. **3 (a, b, c)** – standardně používaná fragmentované gDNA samce *C. pomonella*, **4 (a, b, c)** – C0t-1 frakce DNA samice *C. pomonella* získaná HAP chromatografií. **5 (a, b, c)** – vysoce repetitivní frakce DNA samce *C. pomonella* získaná HAP chromatografií. **3b** – BAC W (27-1) sonda poskytla roztroušené signály na všech chromosomech díky obsahu obecných repetit a výrazně obarvila celý chromosom W, což svědčí o uniformní akumulaci těchto repetit na W. **4b** – slabší signály se zvýrazněním terminálního segmentu na W chromosomu (pravděpodobně místo původu BAC klonu) poukazují na vysokou účinnost kompetitora. **5b** – výrazné signály na všech chromosomech svědčí o nedostatečné účinnosti vysoce repetitivní frakce DNA jako kompetitora. Šipky značí chromosom W. Měřítko = 10 μm .

Porovnání účinnosti různých kompetitorů na distribuci hybridizačních signálů BAC W (27-1) klonu na pachytenních bivalentech samic obaleče jablečného (Obr. 5) ukazuje na vysokou účinnost C0t-1 frakce DNA získané HAP chromatografií jako kompetitora (Obr. 5, 4a-c) oproti standardně používaná fragmentované gDNA samců obaleče (Obr. 5, 3a-c). C0t-1 frakce významně snížila signály na všech chromosomů včetně heterochromatinem tvořeného chromosomu W a zvýraznila místo na chromosomu W, které je s největší pravděpodobností místem původu tohoto BAC klonu (Obr. 5, 4b,c). Naopak vysoce repetitivní frakce DNA měla na distribuci hybridizačních signálů malý nebo neměla žádný vliv (Obr. 5, 5b,c), a tudíž se jako kompetitor neosvědčila.

5. Diskuze

Cílem této práce bylo zavedení metody C0t analýzy k charakterizaci genomu motýlů a izolace repetitivní frakce DNA obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, která by byla účinným kompetitorem pro hybridizační metody oproti hybridizačnímu kompetitorovi současně užívanému v naší laboratoři.

Provedla jsem analýzu reasociační kinetiky DNA obaleče jablečného, při které byly zjištěny C0t hodnoty potřebné pro izolaci vysoce repetitivní a unikátní frakce DNA. Po reasociaci na odpovídající C0t hodnoty byly tyto komponenty DNA získány oddělením na hydroxyapatitové koloně. Přečištěné frakce byly použity pro hybridizační experimenty. Každá frakce byla naznačena fluorochromem Cy3-dUTP a hybridizována na preparáty pachytenních chromosomů *C.pomonella*. Vysoce repetitivní frakce DNA a C0t-1 frakce stejným postupem získaná na HAP koloně byly použity jako kompetitoři a jejich účinnost snížení nespecifické hybridizace sondy byla srovnána se standardně používaným kompetitorem sonikované genomové DNA (gDNA) opačného pohlaví, než ze kterého byly připraveny chromosomální preparáty.

Ze srovnání výsledků C0t analýzy s bourcem morušovým, *Bombyx mori* (Gage a kol., 1974) a martináčem *Antherea pernyi* (Efstratiadis a kol., 1976) je patrné, že tvar získané C0t – křivky u *C. pomonella*, její rozmezí i C0t ½ hodnoty různě opakovaných frakcí DNA řádově odpovídají dvěma dříve analyzovaným motýlům. Mnou získané C0t ½ hodnoty DNA *C. pomonella* jsou pro vysoce repetitivní DNA C0t ½ = 0,005 a pro unikátní frakci DNA C0t ½ = 680,272. Hodnoty DNA *B. mori* jsou pro vysoce repetitivní C0t ½ = 0,015, středně repetitivní C0t ½ = 1,5, což by zhruba odpovídalo naší C0t-1 frakci, a unikátní na C0t ½ = 800 (Gage a kol., 1974). U *A. pernyi* nejsou hodnoty C0t ½ uvedeny, kromě toho DNA *Antherea pernyi* dle analýzy reasociační kinetiky zahrnuje frakce čtyři – unikátní, málo repetitivní (pomalu reasociující), středně repetitivní a vysoce repetitivní (Efstratiadis a kol., 1976). Srovnání všech tří c0t – křivek však vykazuje podobné hodnoty, tj. setiny/tisíciny pro vysoce repetitivní frakci DNA a stovky pro unikátní frakci DNA.

U bource morušového byl metodou reasociační kinetiky zjištěn 45% podíl repetitivních sekvencí v genomu o velikosti $0,53 \pm 0,02$ pg DNA (Gage a kol., 1974). Genomová velikost obaleče jablečného $1C = 0,75$ pg u samic a $0,71$ pg u samců (P. Nguyen, nepublikované výsledky) je o třetinu větší než u bource a lze tedy předpokládat, že větší velikost genomu může souviset s expanzí repetitivních v průběhu evoluce tohoto druhu. Papa a kol. (2008) tímto způsobem vysvětlují rozdíly ve velikostech dvou blízkých příbuzných motýlů,

Heliconius erato a *H. melpomene*. Genom *H. erato* je o 30 % větší než *H. melpomene*. Papa a kol. (2008) zdůvodňují rozdíl velikostí genomů insercí a následnou expanzí repetic a dokládají ji shodným rozsahem chybějících sekvencí u *H. melpomene* oproti *H. erato* s rozdílem velikostí genomů. Vezmeme-li nejmenší dodnes změřený motýlí genom motýla *Danaus plexippus* o velikosti $1C = 0,29$ pg (Zhan a kol., 2011) jako minimální genom motýla, jeho množství unikátních sekvencí by mohlo být přibližně stejné i u ostatních motýlů. Zhan a kol. (2011) uvedli 13,1 % obsah repetic v genomu *D. plexippus*. Při velikosti jeho genomu 273 Mbp můžeme unikátní frakci stanovit na přibližně 237,5 Mbp. Z hodnot poskytnutých C0tQuestem lze vyvodit, že v genomu *Cydia pomonella* se nachází 36,72 % unikátních sekvencí, což odpovídá 251,57 Mbp. Srovnatelnost velikostí unikátních částí genomů *C. pomonella* a *D. plexippus* odpovídá hypotéze Papa a kol. (2008) a podporuje správnost mnou stanovené reasociační křivky.

Následná hybridizace značené unikátní frakce DNA na chromosomální preparáty *C. pomonella* ukázala rovnoměrné rozmístění unikátních sekvencí po celém genomu. Viditelně naznačen byl i chromosom W, o kterém se předpokládá, že se skládá téměř výhradně z repetic. Tento výsledek koreluje s prací Fukové a kol. (2007), odhalující, že chromosom W obsahuje kromě repetic i unikátní sekvence. Dále je nutné vzít v potaz, že unikátní frakce genomu neobsahuje pouze geny, ale málo opakované sekvence různých druhů (Bernardi G., 1989). Signál této frakce byl velice slabý, bylo proto potřeba použít dvojnásobné expoziční časy při focení než u ostatních obrázků. To naznačuje relativně menší zastoupení unikátních sekvencí v genomu obaleče jablečného.

d'Alençon a kol. (2010) na základě podrobné analýzy BAC klonů u dvou druhů můr čeledi Noctuidae dospěli k názoru, že repetice jsou v genomu motýlů rovnoměrně rozptýleny. Výsledky získané v této práci tuto hypotézu potvrzují a společně naznačují, že právě rovnoměrná distribuce repetitivních sekvencí může být zodpovědná za selhání proužkovacích technik klasické cytogenetiky při analýze karyotypů motýlů. Rovnoměrná distribuce repetic v genomu může souviset též s holokinetickým charakterem motýlích chromosomů. Holokinetické (holocentrické) chromosomy nemají centromeru v pravém slova smyslu (tj. nemají primární konstrikci), na jejíž striktně lokalizovaný kinetochor by se upínaly mikrotubuly dělicího vřeténka zajišťující stabilitu a bezchybnou segregaci chromosomů. Místo toho je kinetochorová destička, na niž se upínají mikrotubuly, rozmístěna po velké části povrchu chromosomu. Kinetochor, jakožto vícevrstvý nukleoproteinový komplex z velké části zodpovědný za pohyb chromosomů k pólům vřeténka během anafáze, je u druhů

s monocentrickými chromosomy tvořen repetitivními sekvencemi, které jsou běžně zastoupeny v centromerickém heterochromatinu (Santaguida a Musacchio, 2009). Lze tedy předpokládat, že u druhů s holokinetickými chromosomy a tedy i u motýlů, budou tyto repetice rovnoměrně rozloženy po délce chromosomů (Heckmann a kol., 2012).

Ani známé domény bohaté na repetitivní sekvence jako jsou organizátory jadérka (NOR) nebo telomery nebyly mnou izolovanou vysoce repetitivní frakcí výrazněji značené ve FISH experimentech. Možné vysvětlení je, že vysoce repetitivní frakce obaleče jablečného obsahuje především repetice rozptýlené ve velkém počtu po celém genomu. Pro ověření této hypotézy by v budoucnu byla vhodná hybridizace C0t-1 frakce, která obsahuje (oproti naší vysoce repetitivní DNA) i středně repetitivní sekvence DNA a měla by tedy zvýraznit oblasti bohaté na transposony (např. subtelomerické segmenty chromosomů) a oblasti NOR, čili klastry rRNA genů. Zhruba polovina chromosomu W byla vysoce repetitivní frakcí zvýrazněna. Dle recentních poznatků naší laboratoře by se mohlo jednat o původní (ancestrální) část chromosomu W, zatímco nezvýrazněná část by mohla představovat oblast původního autosomu, který s ancestrálním chromosomem W fúzoval u společného předka hlavních skupin čeledi Tortricidae a v důsledku absence rekombinace u smaic motýlů jeho obsah postupně degeneroval (Nguyen P., 2009; Nguyen a kol., v recenzním řízení).

Pro hybridizační experimenty srovnávající účinnost tří kompetitorů byl zvolen BAC W (27-1) obsahující repetice, které se vyskytují po celém genomu, ale ve větší míře jsou akumulovány na chromosomu W, čemuž odpovídají získaná data, zejména vysoká afinita sondy BAC W (27-1) k celému chromosomu W, přestože tento klon pochází jen z jednoho úsece vymezeného místa chromosomu W, pravděpodobně rozeznatelného dle výraznějších hybridizačních signálů u jednoho z jeho konců. Výrazné oslabení hybridizačních signálů sondy BAC W (27-1) při použití C0t-1 jasně ukázalo na vysokou účinnost C0t-1 frakce jako kompetitora. C0t-1 frakce i výrazně oslabila signály podél chromosomu W a tím relativně zvýraznila terminální signál na W. Tato C0t-1 frakce byla připravena ze samičí DNA a lépe tedy blokovala W-specifické nebo W-obohacené repetice (viz Fuková a kol., 2007) na chromosomu W. Naopak vysoce repetitivní DNA se jako kompetitor příliš neosvědčila. Tato frakce byla připravena ze samčí DNA, a tedy měla jen malý vliv na W-specifické nebo W-obohacené repetice. Při hodnocení rozdílů mezi frakcemi je třeba vzít v úvahu též skutečnost, že určitá C0t frakce může obsahovat jen určité typy sekvencí DNA s konkrétním opakováním a nemusí nutně zahrnovat veškeré vysoce repetitivní nebo naopak unikátní sekvence DNA.

6. Souhrn

V této práci jsem se zabývala analýzou reasociační kinetiky, tzv. C0t analýzou obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, charakterizující genom tohoto druhu motýla z hlediska zastoupení unikátních a repetitivních sekvencí. Byla získána C0t – křivka poskytující informace o kompozici genomu. Tvar křivky, její rozmezí i C0t_{1/2} hodnoty různě opakovaných frakcí DNA řádově odpovídají výsledkům reasociační kinetiky využívající HAP chromatografie u *Bombyx mori* a *Antherea pernyi*. Z C0t – křivky bylo vypočítáno množství unikátních sekvencí v genomu *Cydia pomonella*, 251,57 Mbp, které je srovnatelné s množstvím unikátních částí genomu *Danaus plexippus*. To potvrzuje, že zvětšování genomů motýlů je způsobeno především expanzí repetitivních sekvencí.

Pomocí HAP chromatografie byly vyzolovány vysoce repetitivní a C0t-1 frakce za účelem získání účinného kompetitora pro hybridizační experimenty. Fluorescenční *in situ* hybridizace BAC W klonu na pachytenní preparáty *Cydia pomonella* ukázala, že nejúčinnějším kompetitorem je C0t-1 frakce. Dále byly značené vysoce repetitivní a unikátní frakce získané HAP chromatografií použity jako hybridizační sondy. Vysoce repetitivní frakce značila rovnoměrně celý genom a zvýraznila část chromosomu W. Unikátní frakce DNA obaleče značila slabě a rovnoměrně celý genom včetně W.

Výsledky mé práce významně přispívají k detailnímu poznání molekulárního složení genomu ekonomicky významného motýlího škůdce, obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) a poskytují návod k získání optimálního kompetitora pro hybridizační experimenty.

7. Literatura

- Abe, H., Sugasaki, T., Terada, T., Kanehara, M., Ohbayashi, F., Shimada, T., Kawai, S., Mita, K., Oshiki, T. (2002) Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*. *Insect Mol. Biol.* 11: 307-314.
- 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.
- Aïssani B., Bernardi G. (1991) CpG islands: features and distribution in the genome of vertebrates. *Gene* 106: 173–183, 185–195.
- d'Alençon, Sezutsu H., Legeai F., Permal E., Bernard-Samain S a kol. (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 7680-7685.
- Barnes M. M. (1991) Codling moth occurrence, host race formation, and damage. V: *Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control.* 313–327.
- Beldade P., Saenko S.V., Pul N., Long A.D. (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:e1000366.
- Bernardi G., Olofsson B., Filipski J., Zerial M., Salinas J., Cuny, G.; Meunier-Rotival M., Rodier F. (1985) The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science* 228 (4702): 953–958.
- Bernardi G. (1989) The isochore organization of the human genome. *Annu. Rev. Genet.* 23:637–661.
- Bernardi G. (2000) Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene* 241 (1): 3–17.
- Bernardi G. (2007) The neoselectionist theory of genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 8385–8390.
- Britten R.J., Graham D.E., Neufeld B.R. (1974) Analysis of repeating DNA sequences by reassociation, *Methods Enzymol.* 29: 363–418.
- Britten R.J., Kohne D.E. (1968) Repeated sequences in DNA: Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms, *Science* 161: 529–540.

- Brown T. Genomes 1st ed. Oxford : BIOS, 1999. 472 s. ISBN 1859962017
- Bunge J., Chouvarine P., Peterson D.G. (2009) CotQuest: improved algorithm and software for nonlinear regression analysis of DNA reassociation kinetics data. *Anal Biochem.* 388(2):322-30.
- Buntrock L., Marec F., Traut W. (2012) Organ growth without cell division: somatic polyploidy in a moth, *Ephestia kuehniella*. *Genome* 55(11):755-63.
- Cherepenko E., Lebedev (1985) Characteristics of nuclear DNA of a Lepidoptera, the great wax moth *Galleria mellonella*, using reassociation kinetics. *VR. Mol Biol (Mosk).* 19(3):629-35.
- Conceição I.C., Long A.D., Gruber J.D., Beldade P. (2011) Genomic Sequence around Butterfly Wing Development Genes: Annotation and Comparative Analysis. *PLoS ONE* 6(8): e23778.
- Cuny G., Soriano P., MacAya G., Bernardi G., (1981) The major components of the mouse and human genomes: Preparation, basic properties and compositional heterogeneity. *European Journal of Biochemistry* 115 (2): 227–233.
- Efstratiadis, A., Crain, W. R., Britten, R. J., Davidson, E. H., Kafatos, F. C. (1976) DNA sequence organisation in the lepidopteran *Antheraea pernyi*. *Proc Natl Acad Sci* 73 (7): 2289-2296.
- Emelianov I, Marec F, Mallet J (2004) Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.Sci.* 271: 97-105.
- 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., Vitková M., Nguyen P., Kubicková S., Marec F. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116:135-145.
- Gage L. P. (1974) The *Bombyx mori* genome analysis by DNA reassociation kinetics, *Chromosoma*, 45, 27–42.
- Gregory T.R. a Hebert P.D.N. (2003) Genome size variation in lepidopteran insects. *Canadian Journal of Zoology* 81: 1399-1405.

- Heckmann S., Macas J., Kumke K., Fuchs J., Schubert V., Ma L., Novák P., Neumann P., Taudien S., Platzer M., Houben A. (2012) The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.12054.
- Hřibová E, Doleželová M, Town CD, Macas J, Doležel J (2007) Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome. *Cytogenet. Genome Res.* 119: 268-274.
- Jabbari K., Bernardi G. (1998) CpG doublets, CpG islands and Alu repeats in long human DNA sequences from different isochore families. *Gene* 224: 123–128
- Jiggins C.D., Mavarez J., Beltran M., McMillan W.O., Johnston J.S., Bermingham E. (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171:557-570.
- Kapuscinski J. (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70 (5): 220–33.
- Lohe A.R. a kol. (1993) Mapping Simple Repeated DNA Sequences in Heterochromatin of *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 134 (4): 1149–74.
- McClintock B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36: 344–355.
- Mita K., Kasahara M., Sasaki S. a kol. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* 11:27-35.
- Murakami A. a Imai H. T. (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* 47: 167–178.
- Nguyen P. (2009) Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (L.) metodou BAC-FISH. Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Nguyen P., Sykorova M., Sichova J., Kuta V., Dalikova M., Capkova-Frydrychova R, Neven L.G., Sahara K., Marec F. (v oponentním řízení) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests.

- Oliver J. L., Bernaola-Galván P., Carpena P., Román-Roldán R. (2001) Isochore chromosome maps of eukaryotic genomes. *Gene* 276 (1–2): 47–56.
- Papa R., Morrison C.M., Walters J.R., Counterman B.A., Chen R. a kol. (2008) Highly conserved gene order and numerous novel repetitive elements in genomic regions linked to wing pattern variation in *Heliconius* butterflies. *BMC Genomics* 9: 345.
- Pennisi E. (2012) Encode project writes eulogy for junk DNA. *Science*. 337 (6099): 1159-1161.
- Peterson, D.G., W.R. Pearson, S.M. Stack. (1998) Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. *Genome* 41:346-356.
- Peterson D.G., Schulze S.R., Sciara E.B., Lee A.S., Bowers J.E., Nagel A., Ning Jiang, Tibbitts D.C., Wessler S.R., Paterson A.H. (2002) Integration of Cot Analysis, DNA Cloning, and High-Throughput Sequencing Facilitates Genome Characterization and Gene Discovery. *Genome Res.* 12: 795-807.
- Pringle E.G., Baxter S.W., Webster C.L., Papanicolaou A., Lee S.F., Jiggins C.D. (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* 177: 417-426.
- Rasch E.M. (1974) The DNA content of sperm and hemocyte nuclei of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Chromosoma*. 45(1): 1–26.
- Ray J. H. a Venketeswaran (1978) Constitutive heterochromatin distribution in monocentric and polycentric chromosomes. *Chromosoma* 66: 341 -350.
- Rimpau J., Smith D., Flavell R. (1978) Sequence organisation analysis of the wheat and rye genomes by interspecies DNA/DNA hybridisation, *J. Mol. Biol.* 123: 327–359.
- Rimpau J., Smith D., Flavell R. (1980) Sequence organisation in barley and oats chromosomes revealed by interspecies DNA/DNA hybridisation, *Heredity* 44: 131–149.
- Saccone S., De Sario A., Wiegant J., Raap A. K., Della Valle G., Bernardi G. (1993) Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:11929-11933.

- Saccone S., Federico C., Bernardi G. (2002) Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds. *Journal: Gene*. 300 (1): 169-178
- Sandaa R., Torsvik V., Enger V., Daae F.L., Castberg T., Hahn D. (1999) Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution, *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 237–251.
- Santaguida S, Musacchio A. (2009) The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 28: 2511–2531.
- Sauphanor B., Brosse V., Monier C., Bouvier J. C. (1998) Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 88:247-253.
- Schreck R.R., Distèche C.M. (2001) Chromosome banding techniques. *Current protocols in human genetics / editorial board, Haines J.L. a kol., 4: 4.2.*
- Stará J., Kocourek F. (2007) Insecticidal Resistance and Cross-Resistance in Populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in Central Europe. *J. Econ. Entomol.* 100: 1587-1595.
- Sýkorová M. (2011) Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Šíchová J. (2011) Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae). Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Timm A. E., Geertsema H., Warnich L. (2006) Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) geographic and host populations in South Africa. *J. Econ. Entomol.* 99:341-348.
- Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782–787.
- Traut W., Marec F. (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q. Rev. Biol.* 71:239-256.
- Varriale A., Bernardi G. (2010) Distribution of DNA methylation, CpGs, and CpG islands in human isochores, *Genomics* 95 (1): 25-28.

- Vítková M., Fuková I., Kubíčková S., Marec F. (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res.* 15: 917-930.
- Watson, J. D. a Crick F. H. C. (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18, 123-131.
- White M. J. D. (1973) *The chromosomes* (6th ed.). London: Chapman & Hall. pp. 171.
- Wolf K. W. (1996) The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 37–62.
- Xia Q. Y., Zhou Z. Y., Lu C. a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306:1937-1940.
- Yamada Y., Watanabe H., Miura F., Soejima H., Uchiyama M., Iwasaka T., Mukai T., Sakaki Y., Ito T. (2004) A Comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res.* 14:247–266.
- Yasukochi Y. (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics* 150:1513-1525.
- Yasukochi Y., Ashakumary L. A., Baba K., Yoshido A., Sahara K. (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* 173:1319-1328.
- Yoshido A., Bando H., Yasukochi Y., Sahara K. (2005) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* 170:675-685.
- Zhan S., Merlin C., Boore, J. L., and Reppert S. M. (2011) The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell* 147: 1171-1185.
- Zhu H.P., Lu M.X., Huang Z.H., Gao F.Y., Ma D.M., Zhou l., Gui J. F. (2011) Karyotype analysis of *Oreochromis mossambicus*, *O. urolepis hornorum* and their hybrid based on Cot-1 DNA bands by fluorescence in situ hybridization. *Aquaculture Research* 42 (8): 1178-1185.