

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Mapování vybraných sekvencí metodou TSA-FISH  
u pavouků**

Diplomová práce

**Monika Šťacková**

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

Školitel specialista: Dr. Leonela Z. Carabajal Paladino

**České Budějovice 2018**

Šťacková (2018) Mapování vybraných sekvencí metodou TSA-FISH u pavouků [Gene mapping of selected sequences by TSA-FISH in spiders. Mgr. Thesis, in Czech] – p. 31, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

This study is focused on optimizing TSA-FISH protocol for mapping of selected sequences in a tarantula *Grammostola* sp.

**Prohlášení:**

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 podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou] elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 12. 12. 2018

.....

Monika Šťacková

### **Poděkování:**

Ráda bych touto cestou poděkovala F. Marecovi za možnost být součástí tak skvělé laboratoře a jejího kolektivu. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli Petrovi, Nguyenovi za trpělivost a podnětné připomínky k mé práci. Nesmím opomenout ani Leo. *Thank you, Leito, for showing me al the secrets of this „magic“.* Chci vlastně poděkovat všem členům laboratoře, kteří se stali mými přáteli. Martině Dalíkové, která si vždy našla čas mi s čímkoliv poradit a pomoci, Aničce a Lafi za psychickou podporu, Monče, Áje s Dášou, Irence, Sanderovi, Magdě a Jindře za to, že mě vždy vyslechli. Dále pak mým kamarádkám-spolužačkám Markétě Stráské za spolupráci po celou dobu studia, a hlavně Páje Kočové, za dlouhé hovory nad kávou.

Na závěr to nejdůležitější. Chci poděkovat své rodině a partnerovi. Rodičům za to, že mě celou dobu podporovali a věřili, že to dokážu. Obzvláště pak mamince za vše, co pro mě po dobu studií dělala. A Lukášovi za zapůjčení počítače, na kterém byla práce napsána, a především za to, že mě v posledních měsících nezabil.

# Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Cytogenetika pavouků .....	1
1.2	Karyotypová evoluce u pavouků .....	4
1.2.1	Pohlavní chromosomy .....	5
1.2.2	Pohlavní chromosomy u pavouků .....	5
1.3	Modelový organismus.....	6
2	Cíle práce.....	9
3	Materiál a metody.....	10
3.1	Materiál.....	10
3.2	Příprava chromosomálních preparátů .....	10
3.3	Extrakce DNA.....	10
3.4	Příprava cDNA z RNA .....	11
3.5	Ověření druhové příslušnosti .....	11
3.6	PCR amplifikace sond pro TSA-FISH.....	12
3.7	Značení sond pro TSA FISH .....	13
3.8	Barvení Giemsou a odbarvení.....	14
3.9	TSA-FISH.....	14
4	Výsledky.....	17
4.1	Fylogenetická analýza.....	18
4.2	Optimalizace protokolu pro TSA-FISH.....	18
4.3	Výsledky TSA-FISH.....	21
5	Diskuze .....	24
5.1	Fylogenetická analýza.....	24
5.2	Optimalizace TSA-FISH.....	24
5.3	Mapování genových rodin .....	24
6	Souhrn.....	26
7	Přehled použité literatury.....	27

# 1 Úvod

## 1.1 Cytogenetika pavouků

První cytogenetické studie u pavouků byly provedeny již r. 1885, kdy Carnoy parafinové řezy z gonád obarvil hematoxylinem. Vizualizace chromosomů a interpretace této analýzy však byla značně obtížná. Až roku 1959 Sharma a kol. dokázali získat pavoučí chromosomy z roztakových preparátů barvených orceinem nebo karmínem (citováno v Araujo a kol. 2012).

Dalším krokem bylo použití kolchicinu, který byl již dříve použit u rostlin (Nebel a Ruttle 1938). U pavouků ho testovali Pinter a Walters (1971) a to pro preparáty z testes i ovarii. Kolchicin je buněčný jed, který způsobuje zastavení buněčného dělení v mitotické i meiotické metafázi svým působením na dělicí vřeténko. Pomáhá tak zvýšit množství jader nacházejících se v tomto stádiu. Autoři nicméně konstatovali, že počet mitóz nebyl podáním kolchicinu signifikantně zvýšen.

Co se týče barvení chromosomů, testovali kromě již dříve zmíněných způsobů i barvení Giemsou, kterou ale neshledali dostatečně účinnou. Přesto bylo později toto barvivo úspěšně použito v kombinaci s C-proužkováním ke studiu heterochromatinu na chromosomech *Lycosa malintosa* (Lycosidae) (Brum-Zorrilla a Cazenave 1974). C-proužkování zvýrazňuje především CG bohatý centromerický heterochromatin. Proužkování je specifické pro jednotlivé chromosomy, což umožňuje jejich identifikaci. Metoda je využívána i v novějších pracích. Většina prací zabývajících se karyotypováním pavouků je založená buď na výše zmíněné metodě C-proužkování nebo na prostém barvení chromosomů Giemsou doplněnými morfometrickou analýzou chromozomů (Levan a kol. 1964).

Zároveň jsou tyto metody doplňovány dalšími technikami, jako je například barvení organizátoru jadérka (NOR) dusičnanem stříbrným, které bylo použito například v cytogenetické studii mnohočetných pohlavních chromosomů u pavouků, kde se prokázalo, že terminální oblast  $X_2$  nese u rodiny Tetragnathidae NOR (Kráal a kol. 2011). Barvení dusičnanem stříbrným ale zvýrazní jen aktivní NOR, čili NOR transkribované v předchozím buněčném cyklu (Olert a kol. 1979; Araujo a kol. 2014). Barvení stříbrem navíc kromě NOR označuje také kinetochory, meiotické pohlavní chromosomy samců a u Mygalomorphae také meiotické bivalenty (Kráal a kol. 2011). Proto je pro detekci NOR vhodnější fluorescenční in situ hybridizace (dále jen FISH) (Forman a kol. 2013).

Metoda florescenční in situ hybridizace začala být ve větší míře používána již v 90. letech minulého století (shrnuto v Levsky 2003). Na rozdíl od jiných, nespecifických

detekčních metod používaných v cytogenetice, jako je například již výše zmíněné C-proužkování, spočívá FISH v lokalizaci specifické nukleotidové sekvence (Trask 1991). Můžeme tak pomocí různých markerů rozlišit některé chromosomy nebo odhalit změny v organizaci genomu. Z těchto změn lze poté rekonstruovat evoluční historii zkoumaného organismu (Nguyen a kol. 2010).

Ačkoliv základní princip *in situ* hybridizace zůstává stejný, různé modifikace metody lze použít k různým účelům. Například genomová *in situ* hybridizace (GISH) spočívá ve využití celogenomové sondy, umožňující porovnat genom zkoumaného organismu s genomem příbuzného organismu zastoupeného v nadbytku ve formě neznačené kompetitivní DNA. Metoda byla použita u rostlin, kde pomohla detekovat polyploidizace (Bennett a kol. 1992) i živočichů, například k analýze mezidruhových hybridů u žab (Zalešna a kol. 2011). Dále pak našla využití i při studiu pohlavních chromosomů motýlů (Šíchová a kol. 2016). Podobnou modifikací FISH je i komparativní genová hybridizace (CGH). Ta spočívá ve srovnání dvou rozdílně značených celogenomových sond a byla taktéž použita u motýlů pro studium evoluce chromosomu W (Dalíková a kol. 2017). Mezi univerzální cytogenetické markery pro FISH můžeme zařadit konzervované genové rodiny uspořádané v tandemových opakováních. Mezi nejčastěji používané markery se řadí geny pro hlavní ribozomální RNA (rRNA), 5S rRNA a histonové geny (Hladová 2015). Geny pro hlavní ribosomální RNA (rDNA) se nacházejí v již zmíněných organizátorech jádérka. U většiny organismů sestávají ze základní opakující se jednotky tvořené netranslatovanou oblastí (NTS) a geny pro 18S, 5,8S a 28S rRNA. Jsou prepisovány společně jako transkripční jednotka kódující 45S rRNA a následně rozděleny na jednotlivé rRNA komponenty. Počet kopií rRNA je variabilní. Například *Caenorhabditis elegans* má jen 55 kopií rRNA genů, kdežto obojživelníci rodu *Triturus* vykazují opačný extrém, až 5490 kopií rRNA genů (Sumner 2003). Kromě toho, že jsou geny pro hlavní rRNA uspořádány tandemově a jsou tedy snadno detekovatelné, jsou také vysoce konzervované (Hladová 2015). Obě vlastnosti z těchto sekvencí dělají vhodné cytogenetické markery. Přesto u pavouků byly geny pro rRNA dosud mapovány pouze ve třech případech. V práci zaměřené na evoluci pohlavních chromosomů a meiózu u mygalomorfních pavouků byla použita sonda pro 18SrDNA pro detekci NOR. U studovaných pavouků byly lokalizovány jeden nebo dva páry NOR, obvykle na konci ramének autosomů (Kráal a kol. 2013). Práce zabývající se párováním pohlavních chromosomů a polymorfismem NOR u *Wadicosa fidelis* kombinovala metodu barvení dusičnanem stříbrným a FISH se

sondou pro 18S rRNA. Odhalila prudké rozšíření NOR v karyotypu, které je podle autorů způsobeno ektopickou rekombinací a následným křížením jedinců s rozdílnými NOR, čímž vznikají heterozygoti (Forman a kol. 2013). Nejnověji byla sonda pro 18S rRNA použita u pěti druhů č. Ctenidae. 18S rDNA byla u čtyřech z pěti druhů detekována na jednom bivalentu a u *P. nigrinventer* pak na třech bivalentech (Rincão a kol. 2017).

Také geny pro 5S rRNA jsou často uspořádány tandemově v různém počtu opakování. Toto uspořádání však není pravidlem. Repetice mohou být rovněž rozptýleny po genomu. Geny pro 5S rRNA jsou často vázány k jiným genovým rodinám. U některých organismů byly nalezeny ve spojení s jinou nekódující RNA, jako např. snRNA, případně s geny kódujícími histony (Vierna a kol. 2013). Co se týká FISH u pavouků, byla zatím tato sonda použita pouze jednou, u *Oxyopes sertatus*, kde byly lokalizovány čtyři signály na dvou různých párech chromosomů. Navíc byla objevena vnitrodruhová variabilita, kdy se na více než 50% metafází objevoval ještě intersticiální signál na dalším chromosomu nebo páru chromosomů (Suzuki a Kubota 2011). Histonové geny kódují proteiny účastníci se organizace chromatinu a regulace genové exprese. U bezobratlých jsou typicky uspořádány v tandemově se opakujících klastrech po čtyřech (H2A, H2B, H3 a H4) nebo pěti (H2A, H2B, H3, H4 a H1) genech (Roehrdanz a kol. 2010). Gen pro histon H3 byl použit jako cytogenetický marker například u motýlů, kde potvrdil dynamickou karyotypovou evoluci u bělásků r. *Leptidea* (Šíchová a kol. 2016). U pavouků dosud histonové geny nebyly použity, avšak bylo zjištěno spojení 5S rRNA a H2B genu u *Oxyopes sertatus* (Suzuki a Kubota 2011). Pro mapování jednotlivých genů je, na rozdíl od mapování genových rodin popsaného výše, vhodnější FISH s dlouhými sondami odvozenými z genomových knihoven nebo FISH s tyramidovou amplifikací signálu. Pro FISH s bakteriálními umělými chromosomy (BAC) musíme nejdříve disponovat genomovou knihovnou BAC. Jde o soubor bakteriálních klonů nesoucí plasmidy s inzertem velkým až 300kbp. Původně tyto knihovny sloužily k sekvenování genomů a stále zde slouží jako doplňková metoda (Adams 2000). Hybridizací nebo pomocí polymerázové řetězové reakce je však možné z BAC knihovny vybrat klon obsahující cílovou sekvenci, např. zájmový gen. Následně je plasmidová DNA použita jako sonda pro tzv. BAC-FISH. Genomové BAC knihovny jsou dostupné pro některé zástupce řádu Lepidoptera, konkrétně např. pro bource morušového a lišaje tabákového, a BAC-FISH byla pak využita např. pro analýzu struktury pohlavního chromosomu W (Dalíková 2009). Tato metoda umožňuje díky dostatečně dlouhým sondám snadnou lokalizaci na chromozomech. Přesto nebyla u pavouků

dosud aplikována. Důvod je prostý, vytvoření genomové knihovny BAC je finančně i časově velmi náročné. Pavouci navíc mají rozsáhlé genomy (Sanggaard a kol. 2014), což náročnost ještě umocňuje. Genomová knihovna BAC tedy není pro pavouky dostupná.

Na podobném principu jako BAC-FISH je založená i fosmidová FISH. Zde jsou jako sondy použity tzv. fosmidy, což jsou vektory využívající replikační počátek F-plasmidu a jeho replikační mechanismy pro zaklonování rozsáhlých DNA fragmentů (až 40kb) (Hall 2004). Tento druh FISH byl již u pavouků použit pro mapování genů produkce hedvábí. Konkrétně dvou genů kódujících strukturní proteiny MaSP1 a MaSp2 tvořící vlákno rámu pavučiny, který je následně vyplétán dalšími typy hedvábí (Hinman a kol. 2000; Zhao a kol. 2010).

Další modifikace FISH pro detekci krátkých sekvencí je FISH s tyramidovou amplifikací signálu („tyramide signal amplification“, TSA) neboli TSA-FISH, která je hlavní náplní této práce, jde o FISH s tzv. nepřímou detekcí. Na naznačenou sondu je připojena protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, která aktivuje tyramid, ten se kovalentně váže na rezidua okolních proteinů. Výhoda této metody tedy spočívá v tom, že dokáže detekovat i krátké sondy, které by při přímé FISH neměly dostatečnou svítivost. Byla použita například pro mapování genů u obaleče jablečného, a umožňuje detekci sekvencí dlouhých cca. 1300 bp (Carabajal Paladino a kol. 2014).

## 1.2 Karyotypová evoluce u pavouků

V databázi pavouků (Araujo 2018) jsou v současné době zaznamenána cytogenetická data o 842 z 47 648 popsaných druhů pavouků. Nejprozkoumanější skupinou z hlediska cytogenetiky jsou entelegynní pavouci (Araneomorphae) (Forman a kol. 2013). Skupina Mygalomorphae je oproti tomu prozkoumaná velmi málo (Araujo, 2018) (klasifikace pavouků na Obr. 1).

Pavoučí chromosomy jsou převážně dvouramenné (metacentrické/submetacentrické) (Král a kol. 2006) a skupina Mygalomorphae není výjimkou (Řezáč a kol. 2006). Král (2013) uvádí, že tato konstituce chromosomů byla nalezena i u bazálních Araneomorphae. V kontrastu s tím Mesothelae mají chromosomy akrocentrické, což by naznačovalo, že dvouramenné chromosomy jsou původní znak Opisthothelae (Král a kol. 2013). Vzácně můžeme u Araneae najít i skupiny s holocentrickými chromosomy, a to konkrétně u haplogynní nadčeledi Dysderoidea. Jde o chromosomy, které postrádají lokalizovanou



centromeru, tj. k připojení mikrotubulů dochází po celé délce chromosomu (Král a kol. 2013; Melters a kol. 2012).

Diploidní počty chromosomů ( $2n$ ) pavouků mají široký rozsah. U bazálních Araenomorphae se pohybují od  $2n=7$  až po  $2n=38$ , u Mygalomorphae dokonce v rozsahu  $2n=14$  až  $2n=128$  (Král a kol. 2006, 2013). Co je ale u pavouků velice zajímavé, jsou neobvyklé počty pohlavních chromosomů.

### 1.2.1 Pohlavní chromosomy

U většiny živočichů nalezneme strukturně rozlišené pohlavní chromosomy, ty se vyvinuly mnohokrát nezávisle u různých skupin organismů. Nejčastější je samčí heterogamie, tj. samčí pohlaví určené chromosomální konstitucí XY a samičí XX. Druhým typem je samičí heterogamie, kdy konstituce WZ určuje samičí a ZZ samčí pohlaví (Charlesworth 1991). Předpokládá se, že pohlavní chromosomy vznikly z páru autozomů, který získal faktor určující pohlaví a přestal rekombinovat. K tomu může dojít více způsoby: inverzí, akumulací heterochromatinu, delecí heterochromatinu, supresí meiotické rekombinace v důsledku interference apod. Na pohlavních chromosomech následně dojde k hromadění sexuálně antagonistických genů výhodných pouze pro jedno pohlaví, což má vést k rozšíření restrikce rekombinace. Chromosom přítomný v heterogametickém pohlaví (tzn. Y a W) postupně ztrácí většinu svých aktivních genů a stále se zmenšuje (Bachtrog 2006). Může se dokonce i zcela ztratit, jako například u Y chromozomu slepušek (*Ellobius*) (Bagheri-Fam a kol. 2012). Tento jev ale nemusí nutně nastat hned, zejména mladé pohlavní chromosomy Y a W se mohou zvětšovat činností transpozonů a akumulací repetitivních DNA (Schartl a kol. 2016). U samic může X stále rekombinovat, a tak si původní geny udržet (Bachtrog 2006; Bagheri-Fam a kol. 2012).

### 1.2.2 Pohlavní chromosomy u pavouků

U pavouků ale nacházíme pohlavní chromosomy mnohočetné. První práce popisující tento systém pohlavních chromosomů  $X_1X_20$  ( $\text{♂}X_1X_2/\text{♀}X_1X_1X_2X_2$ ) byly provedeny již počátkem 20. století. Identifikovaly pohlavní chromosomy na základě jejich intenzivnějšího barvení ve srovnání s autosomy, které souvisí s mírou kondenzace chromatinu (White 1940). Tato tzv. pozitivní heteropyknóza je typická pro pohlavní chromozomy pavouků a stále slouží jako jedno z kritérií pro jejich identifikaci (Král 2006, 2007, 2011). U pavouků nejsou mnohočetné chromosomy X neobvyklé a za původní systém pohlavních chromosomů se považuje již výše

uvedená konstituce  $X_1X_20$ , který byla nalezena i u bazální skupiny Mesothelae (Suzuki 1954, citováno v Araujo a kol. 2012).

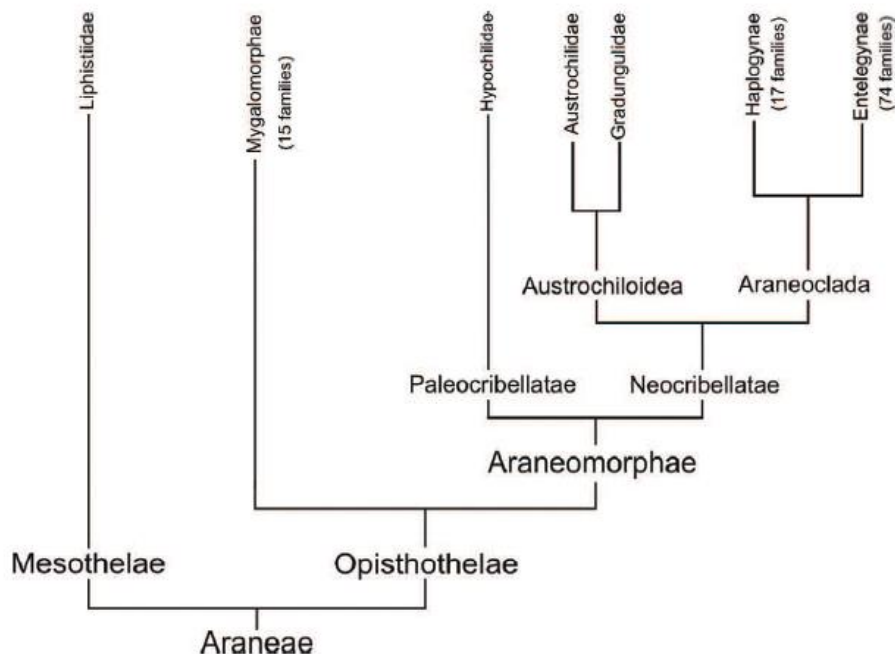
Hypotéz o vzniku pohlavních chromosomů pavouků je několik. První říká, že došlo k rozpadu metacentrického X na dva akrocentrické (Gowda 1950, citováno v Král a kol. 2013). Další hypotéza tvrdí, že došlo k nondisjunkci původního pohlavního chromosomu a následné diferenciaci takto vzniklého  $X_2$  (Postiglioni a Brum-Zorrilla, 1981; Kořínková, 2013). Vznik nondisjunkcí předpokládá také Král a kol. (2013) avšak z nediferencovaného páru gonozomů XY, tzv. páru pohlavních chromosomů (SCP). Jeho přítomnost dokládá zvláštním chováním těchto chromosomů během samičí meiózy. V profázi I jsou pohlavní chromosomy X inaktivované a páry pohlavních chromosomů X spolu asociují. V metafázi I tak u těchto chromozomů dochází k dřívější separaci chromatid, v metafázi II pak k lehce slabší spiralizaci (Král a kol. 2013).

Od základní konstituce pohlavních chromosomů jsou odvozovány další pozorované početní varianty. Systém pohlavních chromosomů  $X0$  vznikl pravděpodobně fúzí  $X_1$  a  $X_2$  a byl nalezen převážně u entelegynních a haplogynních druhů. Dalšími systémy jsou  $X_1X_2X_30$  a  $X_1X_2X_3X_40$ , které vznikly nejspíše nondisjunkcí a diferenciací gonozomů (Kořínková 2013). Systémy s ještě vyšším počtem chromosomů jsou typické pro skupinu Mygalomorphae, například  $X_1X_2X_3X_4X_5X_60$  u *Linothele megatheloides* (Dipluridae) nebo rekordní počet  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}0$  u *Macrothele gigas* (Hexathelidae) (Král a kol. 2013).

### 1.3 Modelový organismus

Řád Araneae je jedním z nejrozmanitějších řádů živočichů a zahrnuje tři primární linie: Araneomorphae, Mesothelae a Mygalomorphae. Fylogenetický vztah těchto linií je znázorněn na Obr. 1 (Araujo a kol. 2012).

Má práce se zaměřuje na skupinu Mygalomorphae, konkrétně na zástupce rodu *Grammostola*. Tento rod je endemický v Jižní Americe, především v Argentině, Bolívii, Chile a Uruguayi (Montes de Oca, D'Elía a Pérez-Miles, 2016). Centrum diverzity rodu se však nachází v Argentině (Ferretti a kol. 2008). Rod patrně zahrnuje množství dosud nepopsaných druhů. Fylogenetická studie založená na sekvenci genu pro cytochrom oxidázu I popsala nový druh *Grammostola quirogai*. V téže práci také bylo zjištěno, že barevné formy *G. anthracina* ve skutečnosti nepředstavují ani sesterské skupiny (Montes de Oca, D'Elía a Pérez-Miles, 2016).



Obrázek 1: Fylogenetické vztahy v rámci ř. Araneae. Pavouci se dělí do tří hlavních linií, Mesothelae, Araneomorphae a Mygalomorphae. Podřád Mesothelae zahrnuje jedinou čeleď Liphistidae, nejbazálnější skupinu pavouků, rozšířenou v Japonsku, Číně a JV Asii. Podřád Opisthothelae je tvořen dvěma infrařády. Araneomorphae, někdy též nazýván „praví pavouci“, se vyznačuje mnohonásobně větší diverzitou než infrařád Mygalomorphae (Araujo a kol. 2012).

*Grammostola rosea* obývá aridní a semiaridní oblasti severního Chile, tzn. habitaty charakteristické studenými vlhkými zimami a horkými suchými léty. Buduje si hnízdo až 45 cm pod zemí. Samci jsou menší než samice, což pravděpodobně souvisí s jejich sexuálním chováním. Samci opouštějí své hnízdo a aktivně vyhledávají samice, přičemž jsou pro ně menší tělo a delší nohy energeticky výhodnější. Oproti tomu samice se od hnízda nevzdalují. U druhu byl pozorován i sexuální kanibalismus (Ferretti a kol. 2008; Grossi a kol. 2016).

Karyotyp samce sestává z  $2n=72$  chromosomů a konstituce pohlavních chromosomů je  $X_1X_20$ . Nicméně se pravděpodobně nejedná o karyotyp původní. Pro pavouky infrařádu Mygalomorphae jsou typické mnohočetné chromosomy X. Není výjimkou ani šest X chromosomů, a dokonce se zde vyskytuje i již výše zmíněný *Macrothele gigas* (Hexathelidae) s rekordním počtem třinácti X. Je tedy pravděpodobné, že u *G. rosea* došlo během evoluce k fúzím pohlavních chromosomů, čímž se jejich počet snížil (Král a kol. 2011; Kořínková 2013). V karyotypu byly navíc identifikovány dva páry SCP. Na rozdíl od ostatních

haplogynních pavouků, u kterých byly pozorovány dva páry metacentrických SCP, je jeden SCP *G. rosea* velký metacentrický a druhý submetacentrický střední velikosti (Kráal a kol. 2011). U tohoto druhu bylo pomocí qPCR identifikováno 16 pohlavně vázaných genů (Pechová 2018) avšak nevíme, na kterých elementech komplexního systému pohlavních chromosomů se nacházejí. To může pomoci vyřešit zamapování těchto elementů pomocí TSA-FISH.

## 2 Cíle práce

Předložená práce je částí většího projektu zabývajícího se vznikem a evolucí pohlavních chromosomů pavouků na modelu *G. rosea*. Dílčím cílem práce bylo ověřit druhovou příslušnost získaného materiálu. Hlavním cílem práce však bylo optimalizovat protokol pro FISH s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH) pro detekci pohlavně vázaných genů identifikovaných Pechovou (2018) na chromosomech *G. rosea*. Pro optimalizaci TSA-FISH byly nejprve použity sondy pro tandemově uspořádané univerzální cytogenetické markery, jmenovitě geny pro 18S rRNA, 5S rRNA a histon H3 a poté sonda pro unikátní gen pro elongační faktor 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ).

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Pro tuto práci byli použiti jedinci *Grammostola* sp. (Mygalomorphae) pocházející z různých populací ze severního Chile. Materiál byl poskytnut laboratoří Jiřího Krále (Přf UK, Praha) a chován při teplotě 22 °C a světelném režimu 12 h světla a 12 h tmy. Pavouci byli krmeni živými cvrčky. Z jedinců byly připraveny chromosomální preparáty pro TSA-FISH. Rovněž byla extrahována DNA pro ověření druhové příslušnosti a přípravu sond pro TSA-FISH.

### 3.2 Příprava chromosomálních preparátů

Preparáty byly připraveny podle Mediouni a kol. (2004). Technika spočívá ve vypitvání testes ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl<sub>2</sub>, 0,02% NaHCO<sub>3</sub>; Lockwood, 1961), hypotonizaci v 75 mM roztoku KCl a následné fixaci pomocí fixáže ethanol: chloroform: kys. octová (6: 3: 1). Fixace probíhala po dobu 10 minut. Následně byla fixovaná tkáň přenesena do kapky kyseliny octové (60%) na podložním skle předem vyčištěném kyselým etanolem (1% HCl v 96% etanolu). Tkáň byla v kyselině octové homogenizována wolframovými jehlami. Podložní sklo bylo poté vloženo na histologickou plotýnku o teplotě 45 °C a kapka byla tažena po skle do doby, než se téměř odpařila. Takto připravené preparáty byly na závěr dehydratovány alkoholovou řadou (70%, 80%, 100% etanol, každý po dobu 30 sekund) a skladovány při -20 °C pro brzké použití nebo v -80 °C pro použití pozdější.

Část preparátů byla poskytnuta laboratoří Jiřího Krále (Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha). Tyto preparáty byly připravovány dle modifikovaného protokolu. Vypitvané gonády byly inkubovány v hypotonickém roztoku 75 mM KCl 20-30 minut. Následná fixace byla prováděna dvěma způsoby: (i) ve směsi ethanol: chloroform: kys. octová (6: 3: 1) a (ii) fixáží methanol: kys. octová (3: 1) po dobu 10 a 20 minut (Dolejš a kol. 2011).

### 3.3 Extrakce DNA

Materiál pro extrakci byl uchováván v absolutním ethanolu, samotné extrakci tak předcházelo vyjmutí tkáně z nohy pavouka a odpaření ethanolu v otevřené zkumavce při 37 °C. Doba potřebná pro úplné odpaření ethanolu se odvíjela od množství tkáně.

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL) dle standardního postupu pro extrakci DNA z živočišných tkání a buněčných kultur doporučeného výrobcem s následujícími drobnými úpravami. Pro zvýšení výtěžnosti byla

délka inkubace s T1 pufrům a proteinázou K při 56 °C a stálém třepání prodloužena na 16 hodin. Koncentrace a čistota izolované DNA byly ověřeny na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.4 Příprava cDNA z RNA

Vzhledem k přítomnosti intronu v amplifikované genové oblasti byla sonda pro *EF-1 $\alpha$*  připravena z cDNA. RNA pro přípravu cDNA byla poskytnuta Petrem Nguyenem (Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích). Byla izolována pomocí RNA Blue z chelicer pavouků.

Syntéza prvního vlákna cDNA byla provedena ProtoScript II First strand synthesis kit (Biolab) dle protokolu výrobce s jednou úpravou. V prvním kroku bylo do reakce přidáno 8 U Rnasin Plus RNase inhibitor (8U/reakce; Promega). Teplota následné inkubace byla zvýšena na 46 °C, doba byla zachována (60 minut). Inaktivace enzymu byl provedena za teploty 65 °C po dobu 20 minut. Takto syntetizovaná cDNA byla uchována pro další použití při -20 °C.

### 3.5 Ověření druhové příslušnosti

U studovaného materiálu byl sekvenován lokus cytochrom c oxidáza I (*COI*). Pro PCR byly použity primery LCO (GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G) a HCO (TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA) (Yao a kol. 2010). Délka amplifikovaného lokusu odpovídala 709 bp. Složení PCR reakce o objemu 20  $\mu$ l bylo následující: min. 40ng DNA, 0,5 U ExTaq polymerázy (TaKaRa), 1x TaKaRa ExTaq pufr, 0,2mM dATP, 0,2mM dCTP, 0,2mM dAGP, 0,2mM dTTP a 2,5mM primery LCO a HCO. PCR profil byl následující: úvodní denaturace při 94 °C po dobu 2 minut, 35x cyklus: denaturace při 94 °C po 30 sekund, nasedání primerů při 47 °C po 1 minutu a elongace při 72 °C 1 minutu. Po dokončení 35. cyklu následovala závěrečná elongace při 72 °C po dobu 5 minut. Produkty získané polymerázovou řetězovou reakcí byly vkládány do vektoru pomocí dvou souprav, Promega pGEM T Easy Vector (Promega) a CloneJET PCR cloning kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC). V obou případech byl následován návod výrobce. Vektor byl vložen do chemicky kompetentních bakterií *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ . Plazmidy byly z bakterií izolovány soupravou NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) dle přiloženého návodu.

Sekvenování vzorků bylo provedeno společností Seqme (SEQme s.r.o.). Vzorky byly připraveny dle požadavků společnosti. Získané sekvence byly zpracovány v programu BioEdit

(Hall TA 1999) a jejich správnost byla zkontrolována pomocí nástroje blastn (Altschul a kol. 1990).

Ze získaných sekvencí byl v programu MEGA ver. 10 (Kumar a kol. 2018) vytvořen fylogenetický strom dle protokolu Hall (2013). Byly použity sekvence lokusu *COI* získané z celkem 18 jedinců *Grammostola*. Jako referenční sekvence byly použity: *Missulena* sp. (GenBank přístupové číslo (č.) KC708093.1), *Conothele* sp. (č. KC708090.1), *Aphonopelma anax* (č. JF803319.1), *Aphonopelma hentzi* (č. JF803357.1), *Aphonopelma moderatum* (č. JF803409.1), *Coremiocnemis cunicularia* (č. JN018198.1), *Cyriopagopus schioedtei* (č. JN018126.1), *Lasiadora parahybana* (č. JN018128.1), *Grammostola* sp. (č. KT022078.1), *G.rosea/cala* (č. KT022081.1), *G.rosea/cala* (č. KT022082.1), *Grammostola porteri* (č. KT022080.1), *Moggridgea tingle* (č. JF749916.1) *Grammostola quirogai* (č. KT965269.1, KT965265.1, KT965273.1, KT965251.1, KT965252.1, KT965253.1, KT965275.1), *Grammostola anthracina* (č. KT965250.1, KT965245.1, KT965237.1, KT965236.1, KT965263.1), *Grammostola rosea* (č. KT965261.1, KT965259.1, KT965260.1, KT965257.1, KT965262.1), *Grammostola pulchra* (č. KT965209.1, KT965208.1, KT965211.1, KT965207.1, KT965206.1, KT965210.1) a *Loxosceles caribbaea* (č. MF601280.1). Sekvence byly vzájemně přiřazeny v programu BioEdit a zkráceny na stejnou délku. Byl vypočítán nejvhodnější model pro dané sekvence, který byl použit pro tvorbu fylogenetického stromu metodou „maximum likelihood“. Jako outgroup byla použita sekvence *Loxosceles caribbaea*, k níž je strom zakořeněn. Na závěr byla použita možnost vypočítání kondenzovaného stromu s nastavením možnosti „cut off“ na 50%.

### 3.6 PCR amplifikace sond pro TSA-FISH

Pro fluorescenční in situ hybridizaci s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH) byly vybrány a pomocí PCR amplifikovány následující geny: 18S rRNA, 5S rRNA, histon H3 a specifická sonda pro elongační faktor 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ). Primery použité pro syntézu těchto lokusů jsou uvedeny v tabulce 1.

Ve směsi pro 30  $\mu$ l PRC reakci bylo obsaženo: min. 40 ng gDNA nebo cDNA (Tabulka 1), 0,75 U ExTaq polymerázy (TaKaRa), 1x ExTaq pufr, 0,2mM dATP, 0,2mM dCTP, 0,2mM dAGP, 0,2mM dTTP a oba 2,5mM primery.

Samotná reakce v termocykléru probíhala následovně. Úvodní denaturace při 94 °C po dobu 2 minut, 35x cyklus: 94 °C po dobu 30 sekund, nasedání primerů za teploty odpovídající jejich složení (viz Tabulka 1) po dobu 30 sekund, elongace při 72 °C po dobu



odpovídající délce syntetizovaného úseku (30 sekund pro každých 500bp), po dokončení posledního cyklu byla provedena závěrečná elongace při 72 °C po dobu 2-5 minut v závislosti na délce úseku. Výsledné produkty byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Získané produkty byly před značením pro TSA-FISH zaklonovány a sekvenovány stejným postupem, jako je uvedeno v předchozí kapitole.

Tabulka 1: Přehled použitých primerů pro jednotlivé lokusy a teploty nasedání primerů

Lokus	„Forward“ primer	„Reverse“ primer	T <sub>A</sub> (°C)	DNA	Velikost produktu
18S rRNA	CGAGCGCTTTTATTAGACCA	GGTTCACCTACGGAAACCTT	55	gDNA	1600 bp
5S rRNA	GCCAACGTCCATACCA YGYTGA	AAGCCAACGNCACGYGGT	50-60	gDNA	<200 bp
H3	ATGGCNCGTACNAARCARAC	TANGCACGYTCNCCNCGGAT	50-60	gDNA	400 bp
<i>EF-1α</i>	CAAGTCTGGTGG AATAGACA	ACCTTACCACCTGAAACATC	60	cDNA	1250 bp

T<sub>A</sub> – teplota nasedání primerů

### 3.7 Značení sond pro TSA FISH

Sondy byly v závislosti na své délce značeny pomocí soupravy Nick Translation Kit (Abbott Molecular) nebo PCR. Značení sondy pro geny pro 18S rRNA bylo pomocí „nick translace“ s výjimkou použité nukleotidové směsi provedeno dle doporučení výrobce. Finální koncentrace nukleotidů v reakci byly 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,072 mM dTTP a 0,128 mM Fluorescein-12-dUTP (PerkinElmer). Značení probíhalo při teplotě 15 °C po dobu 1 hodiny a 45 minut. Následně byl enzym inaktivován při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.

Značení pomocí PCR bylo použito pro sondy pro 5S rRNA a histon H3. Reakce o celkovém objemu 20 µl obsahovala 1-10 ng plasmidu, 1x ExTaq pufr, 0,5 U ExTaq polymeráza (TaKaRa), 0,5 µM „forward“ a „reverse“ primeru, 0,1 mM dATP, 0,1 mM dCTP, 0,1 mM dGTP, 30 µM dTTP, 20 µM značených nukleotidů Fluorescein-12-dUTP (PerkinElmer). PCR probíhala za následujících podmínek: úvodní denaturace 94 °C po dobu 2 min, 40x cyklus: denaturace 94 °C, 30 sekund; nasedání primerů: teplota odpovídající složení primerů (viz Tabulka 1), 1 min; elongace 72 °C, 4 minuty, po dokončení 40. cyklu závěrečná elongace při 72 °C po dobu 10 minut.

Po značení byly sondy přečištěny pomocí gelové filtrace na kolonkách Sephadexu G-50 (GE Healthcare).

### 3.8 Barvení Giemsou a odbarvení

Část preparátů byla, za účelem zlepšení kvality získaných obrázků před samotnou TSA-FISH, obarvena pomocí 5% roztoku Giemsova činidla v Sørensenově pufru (Král a kol. 2006). Barvení probíhalo při pokojové teplotě po dobu 25 minut, následně byly preparáty omyty destilovanou vodou a ponechány oschnout na vzduchu. Takto obarvené preparáty byly zdokumentovány na mikroskopu Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Německo), pomocí kamery Olympus CCD XM10 s programem cellSens 1.9 (Olympus, Německo). Pozice jader na preparátu byly zapsány, aby mohli být po TSA-FISH znovu nalezeny. Po dokumentaci z nich byl promytím v xylenu (1 min, pokojová teplota) a benzenu (1 minuta, pokojová teplota) odstraněn imerzní olej. Následovalo odbarvení Giemsy pomocí fixačního roztoku methanolu s kys. octovou (3: 1) po dobu 3 minut. Takto odbarvené preparáty byly připraveny pro TSA-FISH.

### 3.9 TSA-FISH

TSA-FISH je metoda, která umožňuje mapování krátkých sekvencí díky enzymatické amplifikaci signálu. Metoda byla prováděna na základě protokolu Carabajal Paladino a kol. (2014).

Preparáty byly dehydratovány ethanolovou řadou (viz výše) a byla provedena řada předpůsobení, která měla omezit nespecifickou hybridizaci a snížit pozadí. Před započítím samotné TSA-FISH byly některé preparáty zapečeny na 65 °C po dobu 30 minut. Mezi jednotlivými předpůsobeními byly preparáty třikrát promývány v 1x PBS.

Nejprve byla na každé sklo aplikována RNáza A v 1x PBS (0,1μg/μl RNase A v 1xPBS), preparát byl překryt krycím sklem a inkubován 60 minut ve vlhké komůrce při 37 °C. Následně na ně byl aplikován roztok pepsinu (50 μg/ml pepsinu v 0,01M HCl, 37 °C) za účelem odstranění zbytků cytoplazmy. Preparáty byly dále fixovány v 2% paraformaldehydu v 1xPBS (pH 8) po dobu 10 minut. Pro zablokování endogenní peroxidázové aktivity byly preparáty promyty v roztoku 1% peroxidu vodíku v PBS po dobu 30 minut. U většiny preparátů byl po dobu 30 minut a při teplotě 37 °C aplikován 5x Denhardtův roztok (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400). V případě, že nebyl použit Denhardtův roztok, byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou a následně dehydratovány alkoholovou řadou, tentokrát však 3 minuty pro každou koncentraci (70%, 80% a 100%) za současného třepání.

Hybridizační roztok obsahoval v 50  $\mu$ L nejméně 15 ng (v případě genu pro 18S rRNA) nebo 30 ng (ostatní) přečištěné sondy, 50% deionizovaný formamid a 10% dextransulfát ve 2x SSC. Hybridizační směs byla aplikována na preparáty, které byly následně denaturovány v při 70 °C po dobu 3 minut. Po denuraci byly přeneseny do vlhké komůrky a inkubovány přes noc při 37 °C.

Následující den byly preparáty promývány nejprve 3x 5 minut v 50% roztoku formamidu v 2xSSC při 46 °C, poté 3x 5 minut roztokem 0,1x SSC při 62 °C, a nakonec v 1x TNT pufru (0,1 M Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,05% tween-20). Na každé sklo byl aplikován 1 ml TNB blokovacího pufru (0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5% blocking reagent) a preparáty inkubovány 30 minut ve vlhké komůrce za pokojové teploty. Poté byl blokovací pufr odstraněn a bylo aplikováno 200  $\mu$ l protilátky proti fluoresceinu konjugované s křenovou peroxidázou (PerkinElmer) ředěné TNB pufrům v poměru 1:1000 nebo 1:2000. Preparáty byly překryty krycím sklem a inkubovány v komůrce 60 minut při 37 °C. Preparáty byly následně 3x promyty 5 minut v TNT pufru za pokojové teploty. Za účelem amplifikace signálu byl aplikován roztok tyramidu konjugovaného s fluoresceinem (TSA Plus Fluorescein system, PerkinElmer), případně Cy3 (TSA Cyanine 3 Tyramide systém, PerkinElmer), ředěný dle doporučení výrobce. Inkubace s tyramidem probíhala za pokojové teploty. Doba inkubace byla 5 minut pro sondu pro 18S rRNA gen a 10 minut pro sondy pro 5S rRNA gen a histon H3. Po inkubaci bylo opět provedeno promytí 3x 5 minut v roztoku TNT.

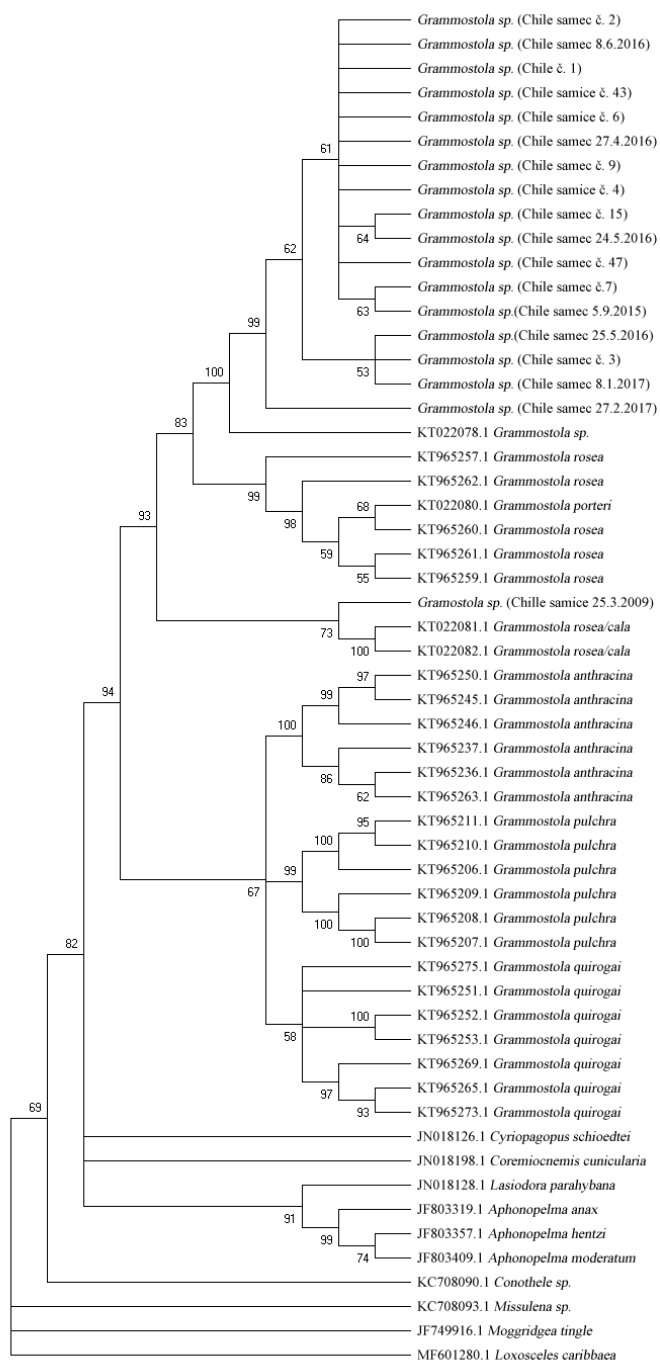
Následovalo barvení pomocí DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich), které probíhalo dvěma různými způsoby: (i) v barvicích nádobách nebo (ii) přímo aplikací DAPI v DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma-Aldrich) na preparát.

Pro barvení v kyvetách byly preparáty umístěny na 3 minuty do 1% Tritonu X-100 v 2x SSC při 25 °C, následně barveny 0,05% roztokem DAPI (0,1  $\mu$ g/ml) v 1% Tritonu X-100 v 2x SSC, 25 °C. Po promytí 3 minuty v 1% Tritonu X-100 v 2x SSC při 25 °C byla sklíčka opláchnuta ještě 1 minutu v roztoku smáčedla 1% Kodak PhotoFlo (Kodak). Po vyjmutí preparátů a odsátí přebytečné tekutiny bylo na preparáty nanášeno 25  $\mu$ l nebo 30  $\mu$ l DABCO (Sigma-Aldrich), podle velikosti krycího skla. Preparát byl překryt krycím sklem (24x40 mm nebo 24x50 mm), jehož okraje byly uzavřeny lakem na nehty, aby nedošlo k vysychání preparátu.

Pro barvení přímo na preparátu byla skla vložena na 1 minutu do roztoku 1% Kodak PhotoFlo/miliQ (Kodak). Po vyjmutí preparátů a odstranění přebytečné tekutiny bylo naneseno 25  $\mu$ l DAPI v DABCO (200  $\mu$ g/ml). Preparát byl opět překryt krycím sklem.

Po provedeném experimentu byly preparáty opět pozorovány pod mikroskopem Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Německo) s kamerou Olympus CCD XM10 vybavenou programem cellSens 1.9 (Olympus, Německo). Pořízené černobílé obrázky byly upraveny pomocí Adobe Photoshop CS5, verze 12.1.

## 4 Výsledky



Obrázek 2: Fylogenetický strom vytvořený metodou „Maximum likelihood“. Čísla pod uzly označují procento výskytu daného větvení po „bootstrapu“, jedinci analyzovaní v této práci označeni červeně

#### 4.1 Fylogenetická analýza

Byly analyzovány sekvence *COI* z celkem 18 jedinců importovaných ze severního Chile, kteří byli použiti v rámci celého projektu zaměřeného na vznik a evoluci pohlavních chromosomů pavouků na modelu *G. rosea* (Obr. 2). *G. anthracina* a *G. pulchra* vyšly v souladu s výsledky Montes de Oca a kol. (2016) jako monofyletické skupiny. Nerozlišené vztahy v rámci *G. quirogai* popsaném Montes de Oca a kol. (2016) jsou způsobeny zredukovaným vzorkem tohoto populačně značně strukturovaného druhu. S výjimkou jedné samice tvoří analyzovaní jedinci z Chile monofyletickou skupinu strukturovanou do tří linií, sesterskou kládu *G. rosea*.

#### 4.2 Optimalizace protokolu pro TSA-FISH

Během celé studie byla na preparátech vyzkoušena řada přizpůsobení. Jako první bylo cílem vyladit intenzitu signálu, která závisí na několika faktorech: (i) množství sondy dané její délkou a počtem opakování, (ii) ředění protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a délka inkubace s protilátkou a (iii) koncentrace tyramidu.

I. Jednotlivé sekvence se liší délkou a počtem kopií. Čím větší délka a počet kopií, tím snadnější detekce. Bylo proto postupováno od nejdelsí sondy s větším počtem opakování přes kratší sondy až k unikátní sekvenci genu *EF-1a*. Optimální množství sondy bylo určeno jako 15 ng pro 18S rDNA a 30 ng pro ostatní markery.

II. Pro všechny sondy bylo testováno jak ředění protilátky 1:1000 tak 1:2000. Bylo zjištěno, že pro sondy 18S rDNA, 5S rDNA i histon H3 je vyhovující ředění 1:2000.

III. Délka inkubace s tyramidem pak byla nejprve testována pro všechny sondy 5 minut (doporučení pro geny s mnoha kopiemi). Pro 18S rDNA tento čas vyhovoval, pro 5S a H3 nikoliv. Byl proto pro tyto dvě sondy prodloužen na 10 minut doporučený pro unikátní sekvence. Tento čas již byl dostačující. Sonda pro EF neměla uspokojivou svítivost při žádném z výše uvedených protokolů (neukázáno).

Velká část preparátů obsahovala po TSA-FISH artefakty, které překrývaly chromosomy a bránily tak analýzám pořízených obrázků (Obrázek 3). Bylo otestováno několik přizpůsobení za účelem zbavit se tohoto problému. Nejdříve byl vynechán krok fixace pomocí paraformaldehydu. Ukázalo se, že to na artefakty nemá vliv, ale zároveň toto

zjednodušení protokolu ani nezhoršilo kvalitu pořizovaných obrázků. Proto bylo od tohoto kroku ustoupeno.

Další testovanou možností bylo, že artefakty jsou způsobeny samotným barvením, protože nejvýraznější byly pod fluorescenčním mikroskopem právě při pohledu přes filtr pro DAPI. Bylo proto vyzkoušeno barvení v kyvetách, místo původní aplikace DAPI v DABCO přímo na preparát. Byly kombinovány různé koncentrace DAPI a různé doby inkubace, viz Tabulka 2.

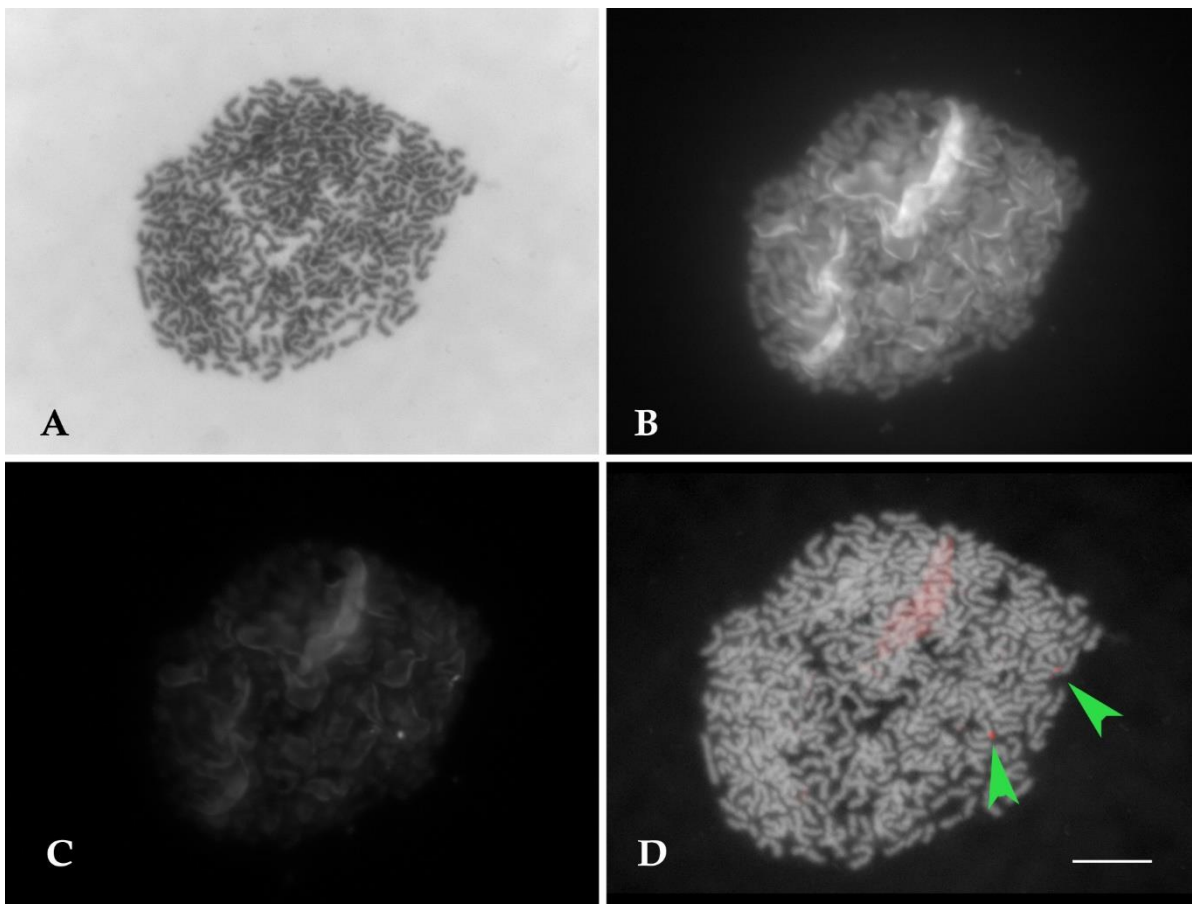
Tabulka 2: Kombinace časů a koncentrací DAPI při barvení v kyvetách

čas \ DAPI	15 min	10 min	5 min
0,5 $\mu$ l/ml	+	+	+/-
0,25 $\mu$ l/ml	+	+/-	-
0,125 $\mu$ l/ml	+/-	-	-

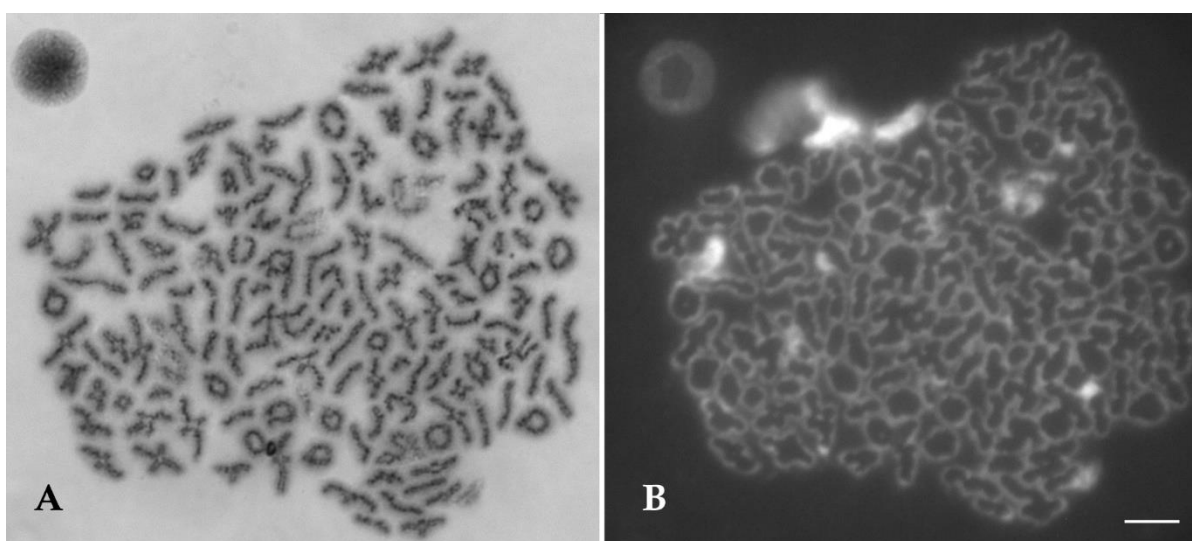
Viditelnost jader pod fluorescenčním mikroskopem: + dobře viditelné, +/- hůře viditelné, - téměř nebo zcela neviditelné.

Bylo zjištěno, že koncentrace DAPI ani čas inkubace nemá na artefakty vliv, nicméně byly tímto stanoveny optimální podmínky barvení chromozomů *G. rosea* v kyvetách, tj. čas barvení 10 minut při koncentraci DAPI 0,5  $\mu$ l/ml. Posledním krokem k řešení problému s artefakty bylo přistoupení k barvení pomocí Giemsey. Chromosomy byly obarveny Giemsou a zdokumentovány před samotným provedením TSA-FISH. Po TSA-FISH byly chromosomy opět zdokumentovány tentokrát pod fluorescenčním mikroskopem. Byly tedy získány celkem 3 fotografie: chromosomy obarvené Giemsou, chromosomy obarvené DAPI a chromosomy nesoucí signál. Tyto fotografie byly následně upraveny a složeny v programu Adobe Photoshop CS5, verze 12.1. Vrstva s chromozomy obarvenými DAPI byla odstraněna a signály byly promítnuty přímo na Giemsou barvené chromozomy (Obrázek 3).

Dalším problémem byly artefakty způsobené patrně odmytím chromozomů v průběhu FISH (Obrázek 4). Tento problém byl částečně vyřešen zapékáním preparátů před TSA-FISH pro lepší fixaci chromozomů. Došlo ke zlepšení, avšak u některých preparátů se tento problém v menší míře stále vyskytoval.



Obrázek 3: Příklad artefaktů po TSA-FISH se sondou pro 5S rDNA na samčím metafázním jádře *Grammostola* sp. A: chromosomy obarvené Giemsou; B, C: chromosomy po TSA-FISH; B: chromozomy barvené DAPI, C: signály sondy pro 5S rDNA, D: výsledný obrázek po spojení jednotlivých vrstev a odstranění vrstvy s artefakty (DAPI), signály označeny hroty šipek, měřítko 10 $\mu$ m.



Obrázek 4: Artefakty objevující se po barevné Giemsou a následné TSA-FISH chromosomy po TSA-FISH. A: chromosomy obarvené Giemsou připravené pro TSA-FISH, B: chromosomy po TSA-FISH barvené DAPI, měřítko 10 $\mu$ m

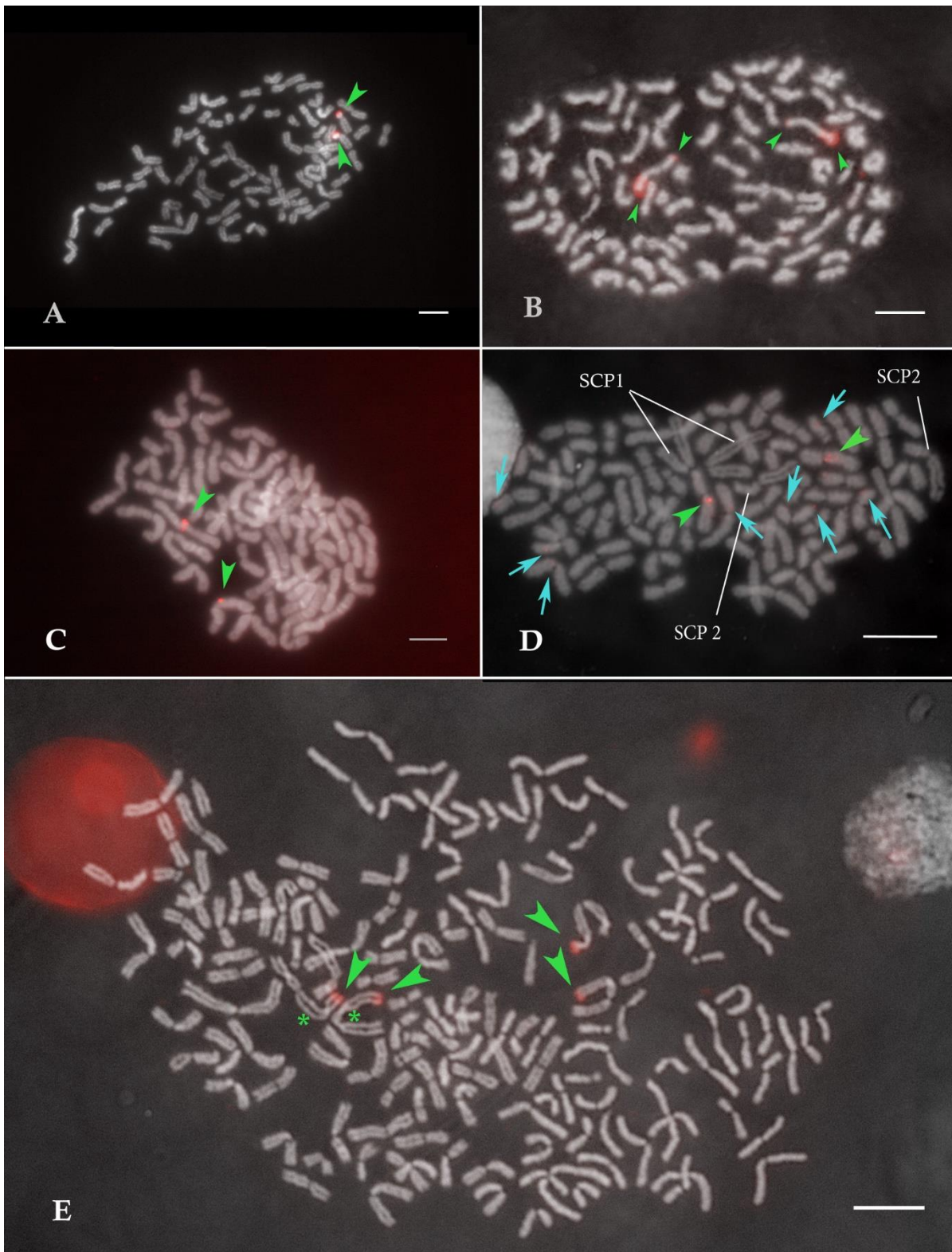


### 4.3 Výsledky TSA-FISH

Shodně s již publikovanými údaji pro *G. rosea* (Král a kol. 2011; Kořínková, 2013) sestává samčí diploidní karyotyp studovaného *Grammostola* sp.  $2n=72$  chromosomů (Obrázek 5) s konstitucí pohlavních chromosomů  $X_1X_20$  (neukázáno). Potvrzena byla i přítomnost dvou párů SCP (Obrázek 5 E). Sonda pro 18S rDNA vykazuje dva různé vzory. V obou případech jde o terminální signály. Zatímco u některých jedinců jde pouze o jeden velký terminální signál na krátkém raménku submetacentrického páru chromosomů (Obrázek 5A), u jiných byly detekovány také malé terminální signály na opačných koncích chromozomů (Obrázek 5 B).

Sonda pro 5S rDNA detekuje stabilně 2 pericentrické intersticiální signály na páru metacentrických chromosomů (Obrázek 5 C, D), nicméně při použití tyramidu konjugovaného s Cy3 namísto tyramidu konjugovaného s fluoresceinem bylo možné detekovat další slabé signály. jejich detailní analýza však ukázala, že neleží na homologních chromosomech a může tak jít jen o nespecifickou hybridizaci.

TSA-FISH se sondou pro histon H3 detekovala terminální signály na dvou metacentrických párech chromosomů. Přitom separace chromatid u jednoho páru naznačuje, že jde o metacentrický SCP. Druhý pár nesoucí histonový signál je autozomální (Obrázek 5 E).



Obrázek 5: Výsledky TSA-FISH pro jednotlivé použité sondy. TSA-FISH na samčích chromosomech *Grammostola* sp. Chromosomy obarveny Giemsou (A, B, D, E) nebo DAPI (C). Signály detekovány tyramidem konjugovaným s fluoresceinem (A, B, C, E) nebo Cy3 (D), oboje obarveno červeně; A, B Lokalizace genů pro 18S rDNA, signály označeny hroty

šipek, A metafáze I, B diplotene; C, D Lokalizace genů pro 5S rDNA na samčích metafázních chromosomech. Velké signály označeny hroty šipek, další slabé signály označeny šipkami. SCP označeny popiskem, SCP1 velký metacentrický SCP, SCP2 středně velký, submetacentrický SCP; E Lokalizace genu pro histon H3 na samčím metafázním jádru, signály označeny na hroty šipek. SCP označen hvězdičkou, měřítko 10 $\mu$ m.

## 5 Diskuze

Dílčím cílem předložené práce bylo určení druhové příslušnosti jedinců rodu *Grammostola* pocházejícího ze severního Chile a použitého pro detailní studium vzniku a evoluce pohlavních chromosomů pavouků. Hlavním úkolem pak byla optimalizace protokolu pro TSA-FISH u pavouků nejprve pro detekci sond pro tandemově uspořádané markery, tj. 18S rDNA, 5S rDNA a histonu H3, a posléze pro detekci unikátních sekvencí reprezentovaných v této práci genem pro elongační faktor 1 alfa (*EF-1 $\alpha$* ).

### 5.1 Fylogenetická analýza

Výsledek fylogenetické analýzy postavené na sekvenci mitochondriálního genu *COI* potvrzuje, že s výjimkou jedné samice nezávislého původu, veškerý použitý materiál ze severního Chile tvoří jednu monofyletickou skupinu. Spolu s referenční sekvencí KT022078.1 vedenou v práci Mieres a kol. (nepublikováno) jako nový druh *G. brunneis* sp. nov. jsou pak sesterskou linií ke kládu tvořenému jedinci *G. rosea*. Nicméně tato linie zahrnuje také jedince určeného v dosud nepublikované práci Mieres a kol. jako *G. porteri*, což vrhá pochyby na závěry autorů a možný nový druhový status studovaného materiálu. Ten je tak v této práci označován jako *Grammostola* sp. a k jeho druhovému určení bude zapotřebí detailní taxonomické revize celého rodu zahrnující vzorky z celého areálu výskytu.

### 5.2 Optimalizace TSA-FISH

Protokol pro TSA-FISH u pavouků byl úspěšně optimalizován pro markery 18S rDNA, 5S rDNA a histon H3. Byly zavedeny následující změny protokolu dle Carabajal Paladino a kol. (2014). Byla vynechána fixace pomocí paraformaldehydu, protože se ukázalo, že nemá významný vliv na kvalitu získaných obrázků. Namísto toho byly preparáty zepékány při 65 °C, což částečně eliminovalo vznik artefaktů při barvení DAPI. Protože se artefakty nepodařilo zcela odstranit, byly chromosomy před samotnou TSA-FISH barveny Giemsou. Délka inkubace s tyramidem byla pro kratší sondy, tj. 5S rDNA a histon H3, stanovena na 10 minut. Po úspěšné optimalizaci protokolu pro detekci genových rodin byl mapován také gen pro *EF-1 $\alpha$* , který se ale bohužel zatím lokalizovat nepodařilo.

### 5.3 Mapování genových rodin

Výsledky této práce představují první detailní analýzu distribuce všech tří běžně využívaných cytogenetických markerů 18S rDNA, 5S rDNA a histonu H3 (Obrázek 5). Prvním testovaným markerem byla 18S rDNA. Šlo o nejdelší z testovaných sond s největším počtem repetic, což

znamená, že ze zvolených sond byla nejsnáze detekovatelná. Překvapivě bylo zjištěno, že je tento marker v rámci zkoumaného druhu polymorfní. TSA-FISH s 18S rDNA sondou detekovala terminální lokus na krátkém raménku submetacentrického páru chromosomů (Obrázek 5A). To je v souladu s výsledky barvení NOR dusičnanem stříbrným u dalších studovaných mygalomorfních pavouků, kteří mají typicky jen jeden nebo dva páry poměrně velkých rDNA lokusů na koncích autosomů (Král a kol. 2013). Pouze u *Iberesia machadoi* byl NOR detekován na SCP (Král a kol. 2013). U některých jedinců však TSA-FISH také odhalila slabší signály na opačných koncích chromosomů (Obrázek 5B). Polymorphismus ve velikosti a počtu rDNA klastrů byl u pavouků pozorován již dříve u *Wadicosa fidelis* nesoucí rDNA lokusy na 8 až 10 párech chromosomů (Forman a kol. 2013).

Výše zmiňovaný polymorfismus byl u pavouků objeven i v případě 5S rDNA u *Oxyopes Sertatus* (Suzuki a Kubota 2011). Sonda pro 5S rDNA použitá v této práci detekovala u *Grammostola* sp. stabilně dva pericentrické signály nacházející se na dlouhém raménku submetacentrického chromosomu (Obrázek 5 C). Při použití tyramidu konjugovaného se Cy3 byly detekovány další slabé signály na nehomologních chromosomech (Obrázek 5 D). Bohužel není možné na základě dostupných dat říci, zda jde o úspěšnou detekci malých klastrů či nespecifickou hybridizaci.

Posledním úspěšně detekovaným markerem byl histon H3, který byl v této práci u pavouků použit vůbec poprvé. Sonda pro histon H3 odhalila čtyři histonové klastry na koncích dlouhých ramének dvou párů metacentrických chromosomů. Na základě separovaných chromatid byl jeden z těchto párů identifikován jako velký metacentrický SCP. Histonové geny jsou obecně ve srovnání s geny pro rRNA evolučně mnohem konzervativnější (Hladová 2015) a mohly by tak představovat užitečné markery pro studium přítomnosti a evoluce SCP u pavouků. Zda je vazba histonů na SCP u mygalomorfních pavouků výjimkou podobně jako přítomnost NOR na SCP u *Iberesia machadoi* (Král a kol. 2013) nebo pravidlem je třeba teprve ověřit srovnávacím mapováním těchto genů u dalších druhů.

## 6 Souhrn

Fylogenetická analýza potvrdila příslušnost studovaných jedinců rodu *Grammostola* ze severního Chile k jedné monofyletické linii sesterské k druhu *G. rosea*.

TSA-FISH byla u studovaného *Grammostola* sp. úspěšně optimalizována pro detekci cytogenetických markerů 18S rDNA, 5S rDNA a histonu H3. Problém s artefakty překrývajícími chromosomy byl vyřešen pomocí barvení Giemsou. Bylo zjištěno, že markery 18S a 5S rDNA jsou u studovaného druhu *Grammostola* sp. polymorfní. Dále bylo zjištěno, že marker pro histon H3 se u zkoumané skupiny nachází mimo jiné na metacentrickém SCP. Gen *EF-1 $\alpha$*  coby příklad unikátní krátké sekvence se bohužel detekovat nepodařilo.

## 7 Přehled použité literatury

- Adams MD (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* (80- ) 287:2185–2195 . doi: 10.1126/science.287.5461.2185
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, Pennsylvania T, Park U (1990) Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science. *J Mol Biol* 215:403–410 . doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Araujo D, Oliveira EG de, Giroti AM, Mattos VF, Paula-Neto E, Brescovit AD, Schneider MC, Cella DM (2014) Comparative Cytogenetics of Seven Ctenidae Species (Araneae). *Zool Sci* 31:83–88 . doi: 10.2108/zsj.31.83
- Araujo D, Schneider MC, Paula-neto E, Cella DM (2012) Sex Chromosomes and Meiosis in Spiders : A Review. *Meiosis - Mol Mech Cytogenet Divers* 87–108
- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 16:578–585 . doi: 10.1016/j.gde.2006.10.007
- Bagheri-Fam S, Sreenivasan R, Bernard P, Knowler KC, Sekido R, Lovell-Badge R, Just W, Harley VR (2012) Sox9 gene regulation and the loss of the XY/XX sex-determining mechanism in the mole vole *Ellobius lutescens*. *Chromosom Res* 20:191–199 . doi: 10.1007/s10577-011-9269-5
- Bennett ST, Kenton AY, Bennett MD (1992) Genomic in situ hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). *Chromosoma* 101:420–424 . doi: 10.1007/BF00582836
- Brum-Zorrilla N, Cazenave AM (1974) Heterochromatin Localization in the Chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). 81:94–95 . doi: <https://doi.org/10.1007/BF01921621>
- Charlesworth B (1991) Evolution of Sex Chromosomes. *Science* (80- ) 251:1030–1033 . doi: 10.1126/science.1998119
- Dalíková M (2009) Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera : Tortricidae )
- Dalíková M, Zrzavá M, Hladová I (2017) New insights into the evolution of the W

chromosome in Lepidoptera. doi: 10.1093/geronb/gby085/5056426

Dolejš P, Kořínková T, Musilová J, Opatová V, Kubcová L, Buchar J, Král J (2011) Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *Eur J Entomol* 108:1–16 . doi: 10.14411/eje.2011.001

Ferretti NE, Ferrero AA, Journal S, Arachnology J, Sur N Del, Blanca B (2008) Courtship and Mating Behavior of *Grammostola schulzei* ( Schmidt 1994 ) ( Araneae , Theraphosidae ), a Burrowing Tarantula from Argentina content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to incr. *J Arachnol* 36:480–483

Forman M, Nguyen P, Hula V, Král J (2013) Sex Chromosome Pairing and Extensive NOR Polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenet Genome Res* 141:43–49 . doi: 10.1159/000351041

Grossi B, Solis R, Veloso C, Canals M (2016) Consequences of sexual size dimorphism on energetics and locomotor performance of *Grammostola rosea* (Araneae; Teraphosidae). *Physiol Entomol* 41:281–288 . doi: 10.1111/phen.12154

Hall BG (2004) Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nat Rev Microbiol* 2:430–435 . doi: 10.1038/nrmicro888

Hall BG (2013) Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mol Biol Evol* 30:1229–1235 . doi: 10.1093/molbev/mst012

Hinman MB, Jones justin A, Lewis R V. (2000) Synthetic spider silk: a modular fiber. Elsevier Sci Ltd 18:374–379 . doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01481-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01481-5)

Hladová I (2015) Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika karyotypů motýlů

Král J, Kořínková T, Forman M, Krkavcová L (2011) Insights into the Meiotic Behavior and Evolution of Multiple Sex Chromosome Systems in Spiders. *Cytogenet Genome Res* 133:43–66 . doi: 10.1159/000323497

Král J, Kořínková T, Krkavcová L, Musilová J, Forman M, Herrera IMÁ, Haddad CR, Vítková M, Henriques S, Vargas JGP, Hedin M (2013) Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biol J Linn Soc*



109:377–408 . doi: 10.1111/bij.12056

Král J, Musilová J, Št'áhlavský F, Řezáč M, Akan Z, Edwards RL, Coyle FA, Almerje CR (2006) Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosom Res* 14:859–880 . doi: 10.1007/s10577-006-1095-9

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) NOMENCLATURE FOR CENTROMERIC POSITION ON CHROMOSOMES. *Hereditas* 52:201–220 . doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>

Levsky JM (2003) Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* 116:2833–2838 . doi: 10.1242/jcs.00633

Lockwood APM (1961) “Ringer”, solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp Biochem Physiol* 2:241–289 . doi: 10.1016/0010-406X(61)90113-X

Medioumi J, Fuková I, Frydrchová R., Dhouibi M H MF (2004) Karyotype , sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth , *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera : Pyralidae ). *Caryologia Int J Cytol Cytosystematics Cytogenet* 57:184–194 . doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2004.10589391>

Melters DP, Paliulis L V., Korf IF, Chan SWL (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosom Res* 20:579–593 . doi: 10.1007/s10577-012-9292-1

Montes de Oca L, D'Elía G, Pérez-Miles F (2016) An integrative approach for species delimitation in the spider genus *Grammostola* (Theraphosidae, Mygalomorphae). *Zool Scr* 45:322–333 . doi: 10.1111/zsc.12152

Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138:343–354 . doi: 10.1007/s10709-009-9424-5

Olert J, Sawatzki G, Kling H, J G (1979) Cytological and Histochemical Studies on the Mechanism of the Selective Silver Staining of Nucleolus Organizer Regions (NORs). *Histochemistry* 60:91–99 . doi: <https://doi.org/10.1007/BF00495732>

- Pechová A (2018) Srovnávací studium pohlavních chromozomů pavouků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
- Pinter LJ, Walters DM (1971) Karyological Studies. *Cytologia (Tokyo)* 36:183–189 . doi: 10.1508/cytologia.36.183
- Postiglioni A, Brum-Zorrilla N (1981) Karyological studies on Uruguayan spiders II . Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae-Lycosidae). *Genetica* 56:47–53 . doi: <https://doi.org/10.1007/BF00126929>
- Řezáč M, Král J, Musilová J, Pekár S (2006) Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas* 143:123–129 . doi: 10.1111/j.2006.0018-0661.01949.x
- Rincão MP, Chavari JL, Brescovit AD, Dias AL (2017) Cytogenetic analysis of five Ctenidae species (Araneae): detection of heterochromatin and 18S rDNA sites. *Comp Cytogenet* 11:627–639 . doi: 10.3897/CompCytogen.v11i4.10620
- Roehrdanz R, Heilmann L, Senechal P, Sears S, Evenson P (2010) Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. *Insect Mol Biol* 19:463–471 . doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01006.x
- Sanggaard KW, Bechsgaard JS, Fang X, Duan J, Dyrland TF, Gupta V, Jiang X, Cheng L, Fan D, Feng Y, Han L, Huang Z, Wu Z, Liao L, Settepani V, Thøgersen IB, Vanthournout B, Wang T, Zhu Y, Funch P, Enghild JJ, Schauser L, Andersen SU, Villesen P, Schierup MH, Bilde T, Wang J (2014) Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. *Nat Commun* 5:3765 . doi: 10.1038/ncomms4765
- Schartl M, Schmid M, Nanda I (2016) Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma* 125:553–571 . doi: 10.1007/s00412-015-0569-y
- Šichová J, Ohno M, Dincă V, Watanabe M, Sahara K, Marec F (2016) Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biol J Linn Soc* 118:457–471 . doi: 10.1111/bij.12756
- Suzuki G, Kubota S (2011) Regular Article 5S ribosomal DNA cluster of a lynx spider

Oxyopes sertatus includes a histone H2B- like gene in the spacer region ( NTS ).  
Chromosom Sci 14:3–8 . doi: <https://doi.org/10.11352/scr.14.3>

Tereza Kořínková JK (2013) Spider Ecophysiology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin,  
Heidelberg

Trask BJ (1991) Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene  
mapping. Tech Focus 7:149–154 . doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90378-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90378-4)

Vierna J, Wehner S, Höner zu Siederdisen C, Martínez-Lage A, Marz M (2013) Systematic  
analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. Heredity (Edinb) 111:410–  
421 . doi: [10.1038/hdy.2013.63](https://doi.org/10.1038/hdy.2013.63)

Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S (2010) Use  
of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. PLoS One  
5:e13102 . doi: [10.1371/journal.pone.0013102](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102)

Zaleśna A, Choleva L, Ogielska M, Rábová M, Marec F, Ráb P (2011) Evidence for integrity  
of parental genomes in the diploid hybridogenetic water frog pelophylax esculentus by  
genomic in situ hybridization. Cytogenet Genome Res 134:206–212 . doi:  
[10.1159/000327716](https://doi.org/10.1159/000327716)

Zhao Y, Ayoub NA, Hayashi CY (2010) Chromosome Mapping of Dragline Silk Genes in the  
Genomes of Widow Spiders (Araneae, Theridiidae). PLoS One 5:e12804 . doi:  
[10.1371/journal.pone.0012804](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012804)