

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:

Speciální chemicko-biologické obory



Martina Frenclová

Metoda FISH a její využití v protistologii
FISH method and its use in protistology

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 8. 2015

.....
Martina Frenclová

Poděkování:

Chtěla bych moc poděkovat svému školiteli Doc. Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph.D. za odborné konzultace a trpělivost při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat svému dobrému kamarádovi Lukáši Landsmannovi za podporu nejen při psaní této práce, ale během celého studia a především svojí rodině a příteli za umožnění studia.

Abstrakt

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v DNA, popřípadě RNA, které jsou pak následně viditelné pod mikroskopem. FISH spočívá nejprve v denaturaci dané nukleové kyseliny, a to buď vysokými teplotami nebo působením denaturačních činidel jako je například formamid, čímž dojde k oddělení řetězců. Po následném navození reasociačních podmínek dojde podle pravidel komplementarity k navázání značené krátké próby na vyšetřované vlákno DNA či RNA, tento proces se nazývá hybridizace. K hybridizaci dochází *in situ*, tedy přímo ve vyšetřovaném vzorku. Próby mohou být značeny buď přímo pomocí fluorescenčních barviček a nebo nepřímo, kdy je próba značena haptenem, který je následně detekována pomocí značených protilátek nebo streptavidinu. FISH má velké množství aplikací v molekulární biologii a lékařské vědě. V laboratorním výzkumu v protistologii může být FISH využita například k mapování chromozomálních genů, ke studiu evoluce genomu, analýze jaderné organizace nebo pro potvrzení původu sekvence DNA.

Klíčová slova: FISH, fluorescence, sonda, identifikace buněk, environmentální studie

Abstract

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a technique that allows the localization and identification of specific sequences of nucleotides in DNA or RNA, which is subsequently visible under the microscope. FISH involves first denaturing the nucleic acids, either using high temperatures or by treatment with denaturing agents such as formamide. After subsequent induction of reassociation, the examined DNA or RNA pairs according to the complementarity rules with the short molecule called the probe, this process is called hybridization. Hybridization occurs *in situ*, that is within the examined specimen. Probes can be labeled either directly using fluorophores, or indirectly with a hapten, which is a substance having antigenic properties, which is subsequently detected using labeled antibodies or streptavidine. FISH has a large number of applications in molecular biology and medical science. In laboratory research in protistology FISH can be used for example to map the chromosomal genes to study the evolution of genome, analysis of nuclear organization or to confirmation of the origin of DNA sequence.

Key words: FISH, fluorescence, probe, cell identification, environmental studies

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. PROTISTOLOGIE.....	9
3. FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION.....	9
3.1. ÚVOD.....	9
3.2. HISTORIE METODY FISH.....	10
3.3. ZÁKLADNÍ PRINCIPY METODY FISH.....	11
3.3.1. FIXACE.....	12
3.3.2. PŘÍPRAVA VZORKU.....	13
3.3.3. HYBRIDIZACE.....	13
3.3.4. PRÓBY A ZNAČENÍ.....	13
3.3.5. FLUORESCENČNÍ BARVIVA.....	14
3.3.5.1. FITC.....	15
3.3.5.2. TRITC.....	15
3.3.5.3. CYANINY.....	15
3.3.5.4. DIGOXYGENIN A BIOTIN.....	15
3.4. SCHÉMA FISH.....	16
3.5. PROBLÉMY S FISH.....	16
3.6. VYUŽITÍ METODY FISH.....	17
4. VYUŽITÍ METODY FISH V PROTISTOLOGII.....	18
4.1. MAPOVÁNÍ A LOKALIZACE GENŮ.....	18
4.2. ORGANIZACE NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	20
4.3. IDENTIFIKACE PŮVODU ENVIROMENTÁLNÍCH SEKVENCÍ.....	20
4.4. STUDIUM VZÁJEMNÝCH VZTAHŮ ORGANISMŮ.....	22
4.5. VYŠETŘENÍ POTRAVY PROTIST.....	23
5. ZÁVĚR.....	24
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	25

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

FISH	Fluorescence in situ hybridization
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
AT1-6L	specifické sekvence primerů
AT2-10L	specifické sekvence primerů
18S rRNA	18S eukaryotická ribozomální podjednotka
16S rRNA	16S prokaryotická ribozomální podjednotka
PCR	polymerázová řetězová reakce
MAC	makronukleus
MIC	mikronukleus
TRITC	tetramethylrhodamin-5 (a 6) -isothiocyanate
FITC	Fluorescein isothiokyanát

ÚVOD

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je technika, která nám umožňuje lokalizaci a identifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin v DNA, popřípadě RNA. Jedná se o techniku, která využívá procesu denaturace a následné reasociace DNA (RNA). Spočívá v hybridizaci próby a cílové DNA nebo RNA sekvence (Volpi & Bridger, 2008). Próby mohou být značeny přímo nebo nepřímo. Přímé značení ve stručnosti zahrnuje fixaci vzorku, následovanou permeabilizací buněčné stěny a membrán pomocí enzymů nebo detergentů k usnadnění vstupu próby nebo detekčních činidel; značení próby; hybridizace mezi značenou proubou, což v případě přímého značení bývá fluorescenční barvivo, a cílovou sekvencí vyšetřovaného vzorku, poté následuje promývání, montáž a pozorování ihned po skončení hybridizace (Spear, Li, Nordheimb, & Andrews, 1999). Co se týče nepřímého značení, je proces v podstatě stejný, rozdíl je v tom, že místo fluorescenčního barviva je próba značená haptinem, tedy látkou s antigenními vlastnostmi (například digoxigenin nebo biotin), který je následně vizualizován pomocí značených protilátek (Trask, 2002). Nepřímé značení je v tomto případě komplikovanější, ale jednou z výhod je potenciál k zesílení signálu, což v případě přímého značení není možné.

Jako vyšetřované vzorky mohou být použity metafázní chromozomy, interfázní jádra, ale i celé buňky. FISH má velké množství aplikací v molekulární biologii a lékařské vědě, včetně genového mapování, diagnostiky chromozomálních abnormalit a studia buněčných struktur. V klinickém výzkumu, může být FISH použita pro prenatální diagnostiku chromozomálních aberací, diagnostiku infekčních onemocnění nebo také nádorových cytogenetických diagnostik. V laboratorním výzkumu má FISH uplatnění při mapování chromozomálních genů, analýzy jaderné organizaci, vizualizaci chromozomálních teritorií a chromatinu v interfázi buňkách a ke studiu biologie nádorů. ("Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) - Probes, Dna, Sequences, and Chromosomes - JRank Articles," n.d.)

FISH je metoda, která se průběžně rozvíjí a jsou popisovány stále další postupy ke zlepšení citlivosti v různých polích výzkumu.

Cílem této práce bylo podat ucelený přehled poznatků o možném využití metody FISH ve studiu protist.

1. PROTISTOLOGIE

Protistologie je věda, která se zaměřuje na výzkum protist, tedy eukaryotických mikroorganismů. Její jednotlivé části jsou známy také jako algologie (studium řas) a protozoologie (studium heterotrofních prvoků). Protistologie je úzce spojena s výzkumem evoluce eukaryotické buňky, dynamiky eukaryotických genomů nebo také s molekulární ekologií, což je v podstatě aplikovaná populační genetika. Výzkum diverzity protist je založen především na molekulárních metodách, pokročilých zobrazovacích technikách a statistickém zpracování dat. Mezi hlavní obory zájmu protistologie patří diverzita eukaryotických organismů a vznik a vývoj mnohobuněčnosti. Protistní organismy mají obrovský globální význam jako součást fytoplanktonu nebo v geologických procesech sedimentace. Mohou být také významní producenti toxinů, které způsobují například ciguateru, která patří mezi jedno z nejrozšířenějších onemocnění způsobené mořskými toxiny. Někteří prvoci jsou významnými patogeny zvířat, rostlin i lidí a mají na svědomí tisíce lidských životů ročně.

2. FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION

2.1. ÚVOD

Fluorescence *in situ* hybridization je technika, která umožňuje vizualizaci, identifikaci a lokalizaci jednotlivých mikrobiálních buněk. FISH se uplatňuje v mnoha aplikacích na poli mikrobiologie. (Moter & Göbel, 2000)

FISH je technika spočívající v hybridizaci DNA próby k její komplementární sekvenci na preparátech předtím fixovaných na sklíčku (Volpi & Bridger, 2008) a umožňuje lokalizaci specifické sekvence nukleotidů (Levsky & Singer, 2003). Próby (též sondy) jsou značeny buď přímo zabudováním fluorescenčních nukleotidů anebo nepřímo zabudováním reportérových molekul, které jsou následně detekovány fluorescenčními protilátkami nebo jinými afinitními molekulami. Próby jsou nakonec vizualizovány *in situ* pomocí fluorescenčního mikroskopu. (Volpi & Bridger, 2008)

Zavedení metody FISH znamenalo počátek nové éry pro studium struktury a funkce chromozomů. (Volpi & Bridger, 2008)

FISH je přes 30let stará technologie, která se průběžně rozvíjí. Během jejího vývoje se zaváděly různé metodiky a modifikace na optimalizaci detekce DNA a RNA. Ačkoli základní princip metody FISH zůstal nezměněn, tak dochází k vývoji různým modifikací této metody, vedoucí ke zvýšení citlivosti a specifity detekce cílových sekvencí.

2.2. HISTORIE METODY FISH

Dřívější histochemické techniky spočívali v použití různých typů přírodních a syntetických barviv pro barvení buněčných struktur. Tyto směsi byly obecně nespecifické, protože měli afinitu pro určité obecné kategorie molekul, ať už se jedná o základní proteiny, nukleové kyseliny, lipidy nebo uhlovodíky. Dokonce i specifičtější barvení buněčných akumulací a makromolekulárních komplexů jako je hemosiderin, amyloid, elastin a retikulární vlákna nebyly obecně použitelné k vyšetření všech biomolekul, kterých bylo potřeba (Levsky & Singer, 2003). *In situ* hybridizace (ISH) byla vyvinuta nezávisle na sobě v roce 1969, dvěma výzkumnými skupinami, jednu z nich tvořil Pardue a Gall a druhou H. John a jeho výzkumný tým (Moter & Göbel, 2000). Schopnost detekovat specifické molekulární identity byla poprvé demonstrována užitím interakce antigen-protilátka. První protilátka podmíněná fluorescenční detekcí hybridů nukleových kyselin byla popsána v roce 1977 (Rudkin & Stollar, 1977). Nicméně tato technologie byla brzy nahrazena příchodem fluorescenčních prób nukleových kyselin. První *in situ* hybridizace představená ke konci 60.let nebyly tak docela fluorescenční, ale spíše se používaly próby značené radioizotopy (Levsky & Singer, 2003). Radioznačené DNA nebo 28S RNA byly hybridizovány na cytologických preparátech z oocytů *Xenopus* a detekovány pomocí microautoradiografie. Tato technika umožňovala zkoumání sekvencí nukleových kyselin uvnitř buňky beze změny buněčné morfologie nebo integrity jejich kompartmentů. Od té doby se začala ISH modifikovat pro studium chromozomální evoluce, chromozomální analýzy nádorů a leukémií a cytogenetických studií. (Moter & Göbel, 2000)

Metody isotopických detekcí využívali na začátku nespecifické strategie značení, jako je náhodné začlenění radioaktivně modifikované báze do rostoucí buňky, následované autoradiografií. Několik nevýhod isotopické hybridizace inspirovalo rozvoj nových technik. Zaprvé, samotná podstata radioaktivního materiálu znamená, že próba je nestabilní; isotop se rozkládá v průběhu času a tak specifická aktivita próby není konstantní. Zadruhé, ačkoli citlivost radiografie je obecně vysoká, rozlišení je omezené. Zatřetí, dlouhé doby expozice potřebné k tomu, aby vyvolaly znatelné signály na radiografickém záznamu zpomalují výsledky testu. Začtvrté, radioaktivně značená próba je relativně nákladná a nebezpečná a musí být přepravována, skladována, manipulována a likvidována v souladu s platnými předpisy (Levsky & Singer, 2003).

Nová metoda pro detekci *in situ* hybridizace popsána v roce 1980 Baumanem a spol, byla založená na kovalentním navázání komerčně dostupných fluorochromů na 3' konec RNA

(Bauman, Wiegant, Borst, & van Duijn, 1980). Výhoda přímého značení pomocí fluorochromů je, že nejsou potřeba žádné další vizualizační postupy, jak je tomu u nepřímého značení. Nicméně obecné nevýhody popsanych přímých metod je, že jsou pravděpodobně méně citlivé než nepřímé metody používající biotin-, digoxigenin- nebo jiné hapten modifikované próby. Kombinace biotin- a digoxigenin značení, je mnohem specifičtější a citlivější (Wiegant et al., 1991).

V roce 1988 byla poprvé použita radioaktivně značená oligonukleotidová 16S rRNA próba k detekci bakterií. (Giovannoni, DeLong, Olsen, & Pace, 1988). V roce 1989, DeLong poprvé použil fluorescentně značené oligonukleotidy k detekci jednotlivých mikrobiálních buněk. Fluorescenční próby mohou být značeny barvivy s odlišnými emisními vlnovými délkami, což umožňuje detekci několika cílových sekvencí v rámci jednoho hybridizačního kroku. (Moter & Göbel, 2000)

Je dobře prokázáno, že rozlišení fluorescenční *in situ* hybridizace FISH je omezeno rozlišovací schopností mikroskopu a determinováno stavem kondenzace chromatinu (Raap, 1998).

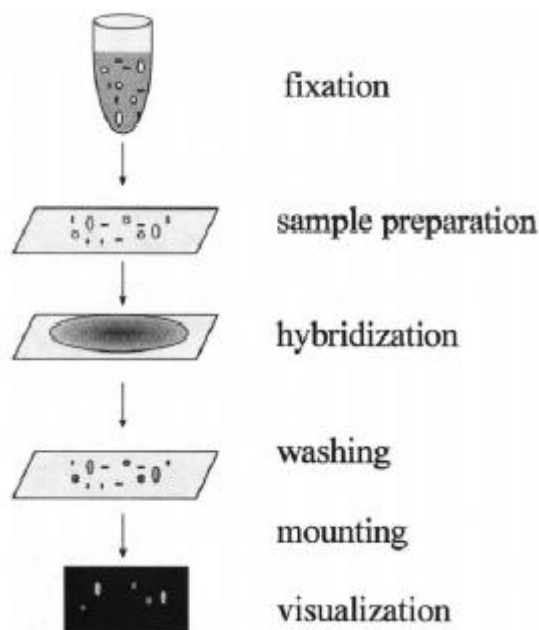
Specifické próby byly komerčně dostupné pro každý z lidských chromozomů již od roku 1991. ("Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) - Probes, Dna, Sequences, and Chromosomes - JRank Articles," n.d.).

Vzhledem k velkému počtu nově vzniklých modifikací této metody, dochází ke zvýšení citlivosti a specifčnosti detekovaných cílových molekul a tím rozšíření působnosti této metody do nejrůznějších polí výzkumu.

2.3. ZÁKLADNÍ PRINCIP METODY FISH

FISH je technika založená na komplementárním párování značené próby a cílové sekvence nukleotidů. Základní princip v podstatě spočívá v procesu denaturace a reasociace nukleových kyselin.

Fluorescenční *in situ* hybridizace detekuje sekvence nukleových kyselin pomocí fluorescenčně značených prób, které se specificky hybridizují k jejich komplementární cílové sekvenci v buňce (Moter & Göbel, 2000). Tento proces zahrnuje následující kroky: (i) fixace vzorku na mikroskopické sklíčko; (ii) příprava vzorku; (iii) hybridizace příslušnou proubou k detekci příslušné cílové sekvence; (iv) promývací kroky k odstranění nenačtené próby; (v) montáž, vizualizace pod fluorescenčním mikroskopem s využitím specializovaného počítačového programu a následné vyhodnocení výsledků. Stručný princip je znázorněn na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Stručné schéma metody FISH (převzato z Moter & Göbel, 2000)

Pozorování hybridizovaných prób se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu. Bílé světlo ze zdroje lampy je filtrováno tak, aby pouze příslušné vlnové délky pro excitaci fluorescentních molekul dosáhly vzorku. Světlo vyzařované fluorochromy je vždy větších vlnových délek, což umožňuje rozlišení mezi excitačním a emisním světlem pomocí druhého optického filtru. Z tohoto důvodu je možné vidět jasné barevné signály na tmavém pozadí. Je také možné rozlišit mezi několika excitačními a emisními proužky, tedy mezi několika fluorochromy, které umožňují pozorování mnoha různých prób na stejném cíli. (“Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) - Probes, Dna, Sequences, and Chromosomes - JRank Articles,” n.d.).

2.3.1. FIXACE

Prioritní pro hybridizaci je to, že mikroorganismy musí být fixovány a permeabilizovány pro penetraci fluorescentní próby dovnitř buňky a aby se zabránilo degradaci RNA endogenními RNAsami. Fixace může využít urychlovacích činidel jako je etanol nebo metanol. Fixační podmínky se mohou lišit v závislosti na cílovém organismu a typu vzorku nebo tkáně. Efektivní fixace je rozhodující pro uspokojivý výsledek. Optimální fixace by měla vést k dobrému vníání sondy, zachování maximální hladiny cílové RNA, a udržování buněčné integrity a morfologických detailů. (Moter & Göbel, 2000)

2.3.2. PŘÍPRAVA VZORKU

Pro lepší přichycení vzorků na sklička, se doporučuje nejprve ošetřit povrch s vrchní vrstvou činidla. Chemické látky, které byly úspěšně použity, zahrnují gelatin, poly-L-lysin, nebo silanizační činidla. Jestliže buněčná je suspenze vyšetřená a mikroorganismy jsou fixovány v suspenzi, nanosou se na mikroskopická sklička, suší se na vzduchu a dehydratují v etanolové řadě (Moter & Göbel, 2000).

2.3.3. HYBRIDIZACE

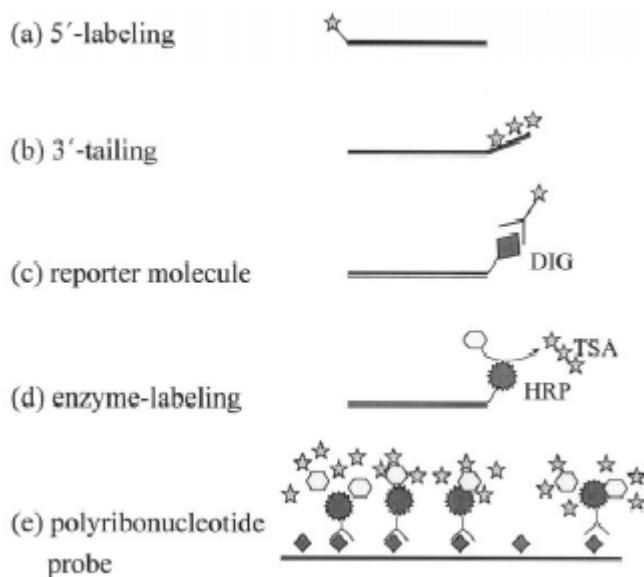
Hybridizace se musí provádět za přísných podmínek pro správné nasedání próby na ílovou sekvenci. Pro tento klíčový krok se aplikuje na vzorek přehřátý hybridizační pufr, který obsahuje fluorescenčně značené próby komplementární k cílové sekvenci. Přesnost lze upravit buď změnou koncentrace formamidu nebo hybridizační teplotou. Formamid snižuje teplotu tání oslabením vodíkové vazby.

Hybridizace probíhá v tmavé komoře, obvykle při teplotách mezi 37°C a 50°C. Doba hybridizace se pohybuje mezi 30 min až několika hodinami. Poté jsou sklička krátce opláchnuta destilovanou vodou, aby se odstranili nenavázané próby. Nakonec se sklička promyje znovu vodou, vysuší se a zakryjí podložním sklíčkem. (Moter & Göbel, 2000)

2.3.4. PRÓBY A ZNAČENÍ

Próba je uměle připravený, obvykle oligo- nebo polynukleotidový řetězec, který se naváže na cílovou DNA. Jde o úsek DNA amplifikované pomocí PCR. Typické oligonukleotidové próby jsou v rozmezí mezi 15 a 30 bp, kratší próby mají snadnější vstup k cílům, ale zase nesou menší značení. Existují různé metody značení prób. Přímé fluorescenční značení je běžněji používané a také rychlejší, levnější a jednodušší, protože nevyžaduje žádné další kroky detekce po hybridizaci. Jeden nebo více fluorescenčně obarvených molekul jsou přímo navázány na oligonukleotid buď chemicky během syntézy skrze spojku "amino linker" na 5'konci próby (obrázek 2a) nebo enzymaticky použitím terminální transferázy k připojení fluorescenčně značených oligonukleotidů na 3'konci (obrázek 2b). Aby bylo u nepřímé detekce možné pozorovat hybridizační signál, musí být sonda značená haptenem, což je látka s antigenními vlastnostmi, jako je například biotin nebo digoxigenin, které jsou následně značené pomocí protilátek. Po denuraci (většinou při zvýšené teplotě nebo použitím chemických sloučenin jako je například formamid) si je próba schopná najít její komplement na chromozomální DNA, a tato místa jsou pak označena fluorescenčními činidly (Trask, 2002), jak je znázorněno na obrázku 2c. Citlivost signálu by mohla být také zvýšena použitím

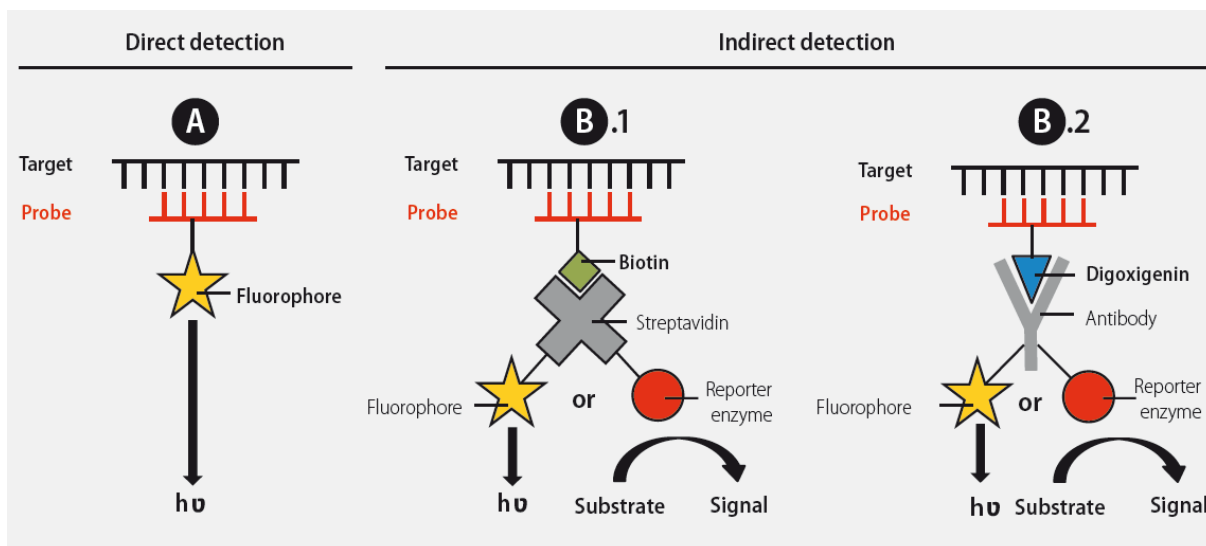
enzymatického zesílení signálu (obrázek 2d), citlivost FISH byla v tomto případě podstatně zvýšena použitím. Nejcitlivější přístup je pravděpodobně kombinace použití polyribonukleotidové próby, vnitřně značené digoxigeninem a systémem zesílení tyramidinového signálu (obrázek 2e). (Moter & Göbel, 2000)



Obrázek 2: FISH přímé značení (a,b) a nepřímé značení (c-e) (převzato z Moter & Göbel, 2000)

2.3.5. FLUORESCENČNÍ BARVIVA

Nejčastěji používané značení pro hybridizační sondy jsou fluorofory a hapteny. Klasická barviva pro přímé značení jsou deriváty fluoresceinu (FITC; FluoX), deriváty rhodaminu (TRITC, Texas Red) a také cyanin (Cy3, Cy5). Fluorescenční sondy jsou detekovány bezprostředně po začlenění pomocí fluorescenčního mikroskopu (obrázek 3a). V případě nepřímého značení jsou nejčastěji používané reportérové molekuly biotin a digoxigenin, patřící do skupiny haptenu, na které jsou schopné se navázat příslušné protilátky či streptavidin. Na rozdíl od fluoroforů, biotin a digoxigenin jsou nepřímé značky, protože jejich vizualizace vyžaduje sekundární reportérové molekuly (obrázek 3b).



Obrázek 3: Fluorescenčně značené próby: (a) přímá detekce; (b) nepřímá detekce (převzato z ("Non-radioactive Labeling of DNA and RNA," n.d.)

2.3.5.1. FITC

Fluorescein isothiokyanát (FITC) je organické fluorescenční barvivo používané v imunofluorescenci a průtokové cytometrii. Pomocí jeho reaktivní isothiokyanátové skupiny může být spojen s odlišnými protilátkami. Jedná se o derivát fluoresceinu. (Greb, 2012)

2.3.5.2. TRITC

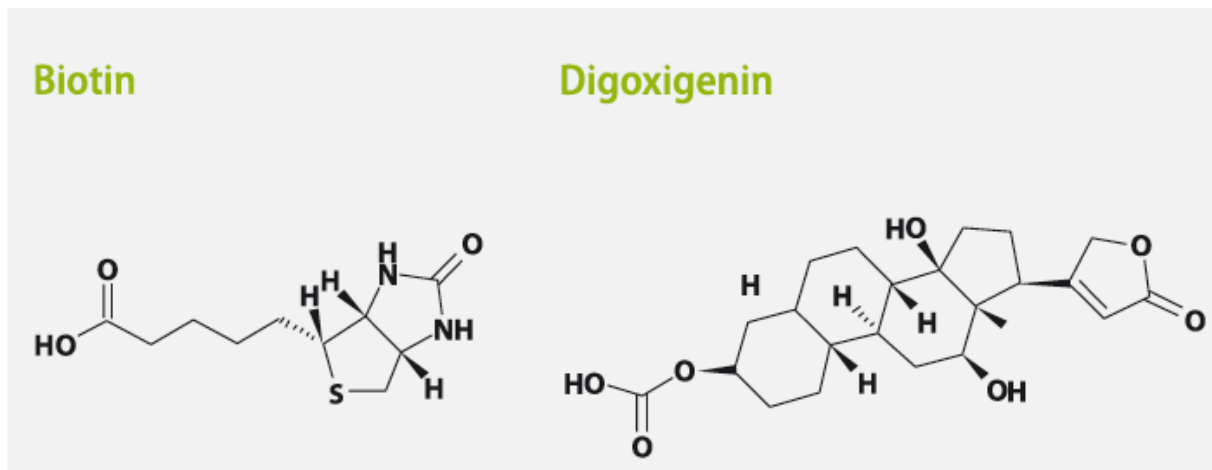
TRITC (tetramethylrhodamin-5 (a 6) -isothiocyanate) je derivát rodiny rhodaminu. Rhodaminy mají velkou konjugovaný aromatický elektronový systém, což vede k jejich fluorescenčnímu chování. (Greb, 2012)

2.3.5.3. Cyaniny

Patří sem Cy2, Cy3, Cy5 a Cy7 a všechny z nich mohou být spojeny s nukleovými kyselinami nebo proteiny prostřednictvím svých reaktivních skupin. (Greb, 2012)

2.3.5.4. Digoxigenin a Biotin

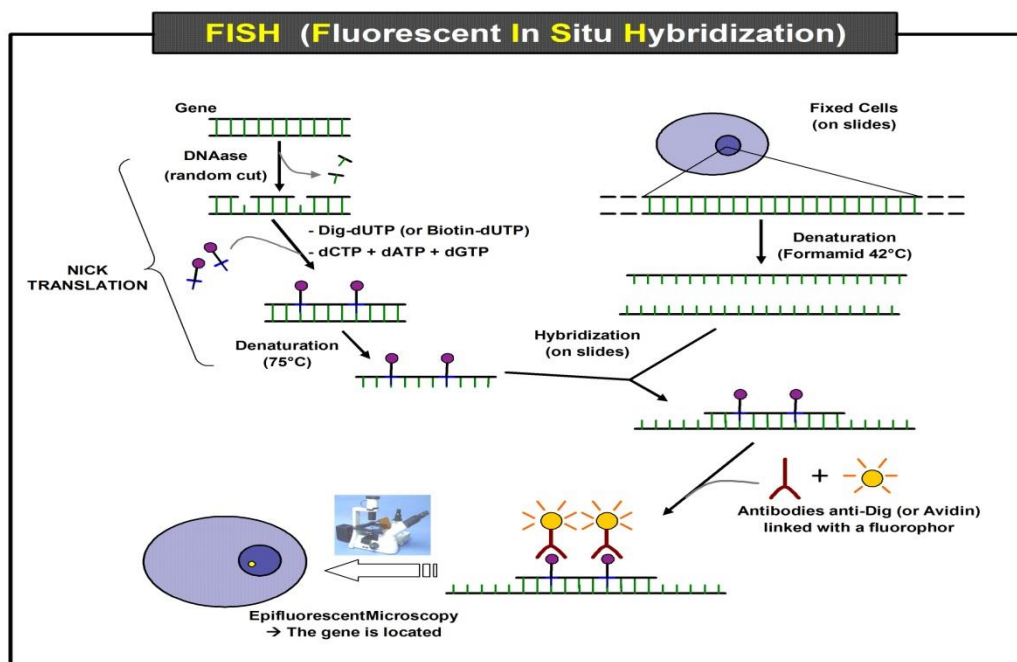
Vzhledem k bezpečnosti, stabilitě a komfortu, hapteny biotin a digoxigenin (obrázek 4) patří mezi nejčastější používané značení pro generování práb nukleových kyselin pro *in situ* hybridizace. ("RNA Labeling, RNA/cRNA Labeling, Probes, Products & Ordering, Jena Bioscience," n.d.)



Obrázek 4: Chemické struktury biotinu a digoxigeninu (převzato z ("RNA Labeling, RNA/cRNA Labeling, Probes, Products & Ordering, Jena Bioscience," n.d.)

2.4. SCHÉMA FISH

Celý princip techniky FISH je popsán již výše. Obrázek 5 ukazuje ucelený souhrn všech kroků týkajících se této techniky. Zahrnující přípravu próby na levé straně schématu využitím nick translace a přípravu vzorku na pravé straně schématu. Následuje hybridizace a spojení cílové sekvence se značenou próbou, v tomto případě se jedná o nepřímé značení.



Obrázek 5: Princip metody FISH (převzato od MrMatze, 2007)

2.5. PROBLÉMY S FISH

Problémy mohou nastat buď v případě falešných pozitivních výsledků, které mohou být způsobeny například autofluorescencí nebo nedostatečnou specifitou použité próby. Co se týče autofluorescence, FISH má značné limitace pokud se jedná o autofluorescenční materiál.

Největší problém je autofluorescence mikroorganismů samotných, ale může se samozřejmě vyskytovat u materiálu obklopující vyšetřované buňky. Například třeba i tkáně obsahující elastin a kolagen vykazují jasnou autofluorescenci. Přesnost a spolehlivost FISH je samozřejmě vysoce závislá na specifčnosti oligonukleotidové próby, pečlivé navržení a kritické zhodnocení nových práb je velice nezbytné.

Další problém může nastat naopak v případě falešných negativních kontrol, kde se můžeme setkat s nedostatečnou penetrací skrze buněčnou stěnu nebo membrány, kdy může následně docházet k nízké intenzitě signálu. U rRNA může docházet, vzhledem k jeho třírozměrné sekundární struktuře, že ne všechny sekvence jsou stejně přístupné pro próby, stejně tak interakce rRNA-protein brání hybridizaci a vede k odlišné citlivosti oligonukleotidových práb. Další problém je, že mnoho fluoroforů se rychle vysvěcuje ihned po excitaci. (Moter & Göbel, 2000)

2.6. VYUŽITÍ METODY FISH

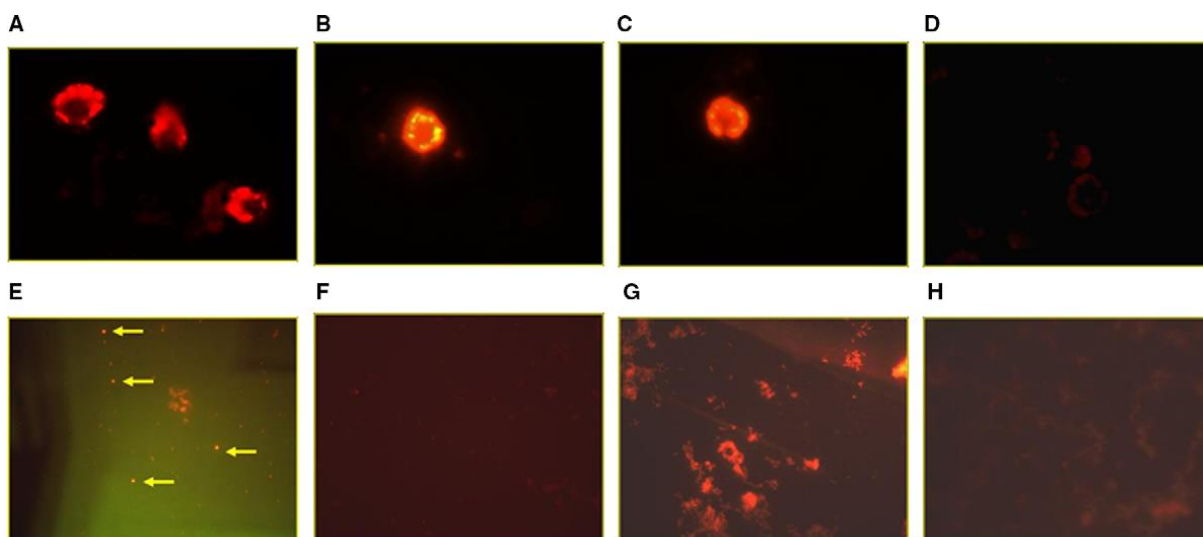
FISH má velký počet aplikací v molekulární biologii a lékařské vědě, včetně genetického mapování, diagnostiky chromozomálních abnormalit a studie buněčných struktur a funkcí. FISH může být použita pro prenatální diagnostiku dědičných chromozomálních odchylek, postnatální diagnózy nosičů genetických nemocí, diagnóza infekčních nemocí, virových a bakteriálních nemocí, nádorovou cytogenetickou diagnostiku a detekci abnormální genové exprese. V laboratorním výzkumu může být FISH využita k mapování chromozomálních genů, ke studiu evoluce genomu, analýze jaderné organizace, vizualizace chromozomálních teritorií a chromatinu v interfázních buňkách, k analýze dynamických jaderných pochodů, replikace somatické hybridní buňky. Může být také použita ve vývojové biologii ke studiu dočasné exprese genů během diferenciaci a vývoje. ("Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) - Probes, Dna, Sequences, and Chromosomes - JRank Articles," n.d.)

Různé aplikace a testy založené na FISH diagnostice se rozvíjeli v odlišných oborech, zahrnující klinickou genetiku, neurovědu, reprodukční medicínu, toxikologii, mikrobiální ekologii, evoluční biologii, srovnávací genomiku, buněčnou genomiku a chromozomální biologii. (Volpi & Bridger, 2008)

3. VYUŽITÍ METODY FISH V PROTISTOLOGII

4.1. Mapování a lokalizace genů

Karenia brevis je toxická mořská obrněnka endemicky žijící v Mexickém zálivu, kde způsobuje úmrtí ryb, úhyny mořských savců a neurotoxické otravy měkkýšů. Je to zapříčiněno neurotoxickým brevetoxinem, který reprezentuje velkou rodinu polyketinových toxinů pocházejících z obrněnek a které představují hrozbu pro lidské zdraví konzumací zkažených mořských plodů. Metoda FISH byla v tomto případě použita k lokalizaci genů kódujících polyketid syntázu (PKS), přičemž bylo zjištěno, že dva geny byly lokalizovány výhradně v buňkách *K. brevis*, zatímco třetí byl lokalizován v buňkách *K. brevis* a v buňkách s ní asociovaných bakteriích, což prokazuje, že geny kódující PKS jsou přítomny ve všech buňkách obrněnek. (Snyder et al., 2005).



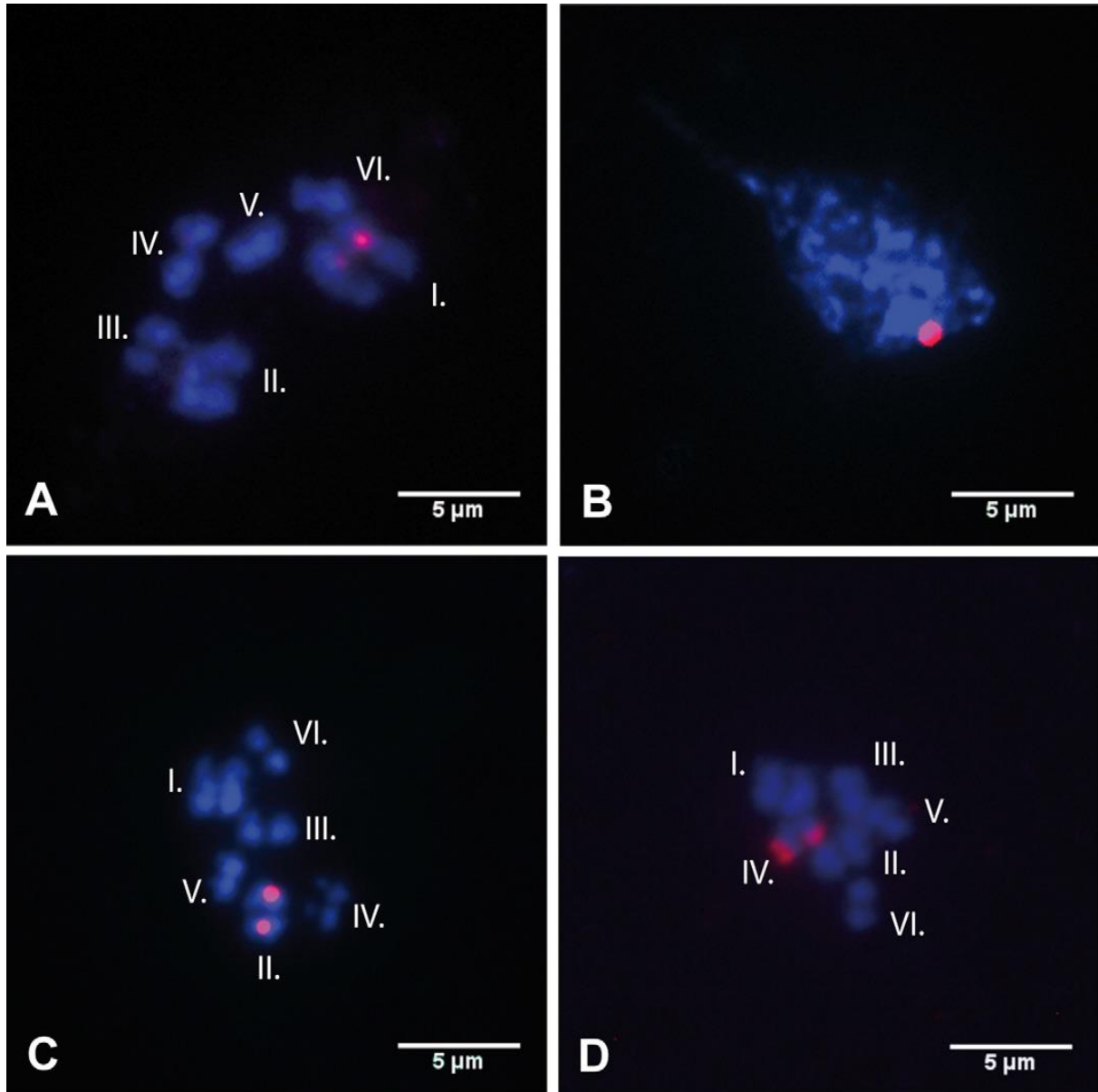
Obrázek 6: FISH *K. brevis* a její bakteriální frakce. (převzato z Snyder et al., 2005) Fluorescenční značení prób: (A) sekvence genu AT1-6L PKS; (B) sekvence genu AT2-10L PKS ; (C) univerzální eukaryotická sekvence 18S rRNA a (D) negativní kontrola a v případě asociované bakteriální populace byly použity fluorescentní oligonukleotidové próby pro: (E) AT1-6L PKS gen ; (F) AT2-10L gen; (G) univerzální bakteriální 16S rRNA a (H) negativní kontrola.

Negativní kontroly ukazují, že tento signál nevzniká čistě kvůli fyzikálním vlastnostem fixovaných buněk nebo vinou nespecifického zachycení próby. (Snyder et al., 2005).

V případě parazita *Trichomonas vaginalis* byla použita speciální FISH metoda citlivá k detekci jednotlivých kopií genů na metafázních chromozomech. Citlivost běžné FISH, která neumožňuje detekci jednotlivých kopií genů na *T. vaginalis* byla zvýšena pomocí

tyramidinového zesílení signálu. Takto zavedený protokol poskytuje přístupný nástroj pro fyzické mapování genomu *T. vaginalis*.

Vysoká citlivost TSA-FISH umožnila úspěšnou vizualizaci jednotlivých kopií genů v karyotypu *T. vaginalis* s minimálním pozadím (Zubáčová, Krylov, & Tachezy, 2011).



Obrázek 7: Mapování genů na *T. vaginalis* pomocí TSA-FISH (převzato z (Zubáčová et al., 2011)). (A) metafázní chromozomy s červeným signálem z próby hybridizované na na gen pro serin palmitoyl transferázu na chromozomu I; (B) vizualizace genu serinpalmitoyl transferázy na interfázním jádře; (C) Próba hybridizovaná na gen pro tryptofanázu na metafázním chromozomu II; (D) pozitivní kontrola

Další příklad použití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je mapování mikrosatelitních lokusů na šesti chromozomech, které tvoří genom *T. vaginalis*, aby se zjistilo, zda polymorfní mikrosatelitní lokusy byly rozděleny v celém genomu *T. vaginalis* a nejsou

lokalizovány na jedné nebo dvou oblastech chromozómů (Conrad et al., 2011).

4.2. Organizace nukleových kyselin

Dalším možným použitím FISH je k vyšetřování organizace nukleových kyselin a chromozómů. Toho bylo využito například u obrněnek rodu *Alexandrium*, kde byla konkrétně vyšetřována organizace jaderných organizačních regionů a její možný vztah k velikosti genom druhů obrněnek z rodu *Alexandrium*. (Figuroa, Cuadrado, Stüken, Rodríguez, & Fraga, 2014)

FISH poskytuje i možnost vizualizovat organizaci a párování meiotických chromozómů. Toho bylo využito například u nálevníka *Tetrahymena thermophila*, který má aneuploidní makronukleus (MAC) a diploidní mikronukleus (MIC). Během meiotické profáze se mikronukleus dramaticky prodlužuje a formuje do pŕlměsíčků. I zde byla použita fluorescence *in situ* hybridizace. Výsledky zde ukazují, že chromozomy jsou uspořádané jako paralelní svazky v rámci pŕlměsíčků a fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) telomer, bylo zjištěno, že většina, ne-li všechny telomery, jsou sestaveny v blízkosti jednoho konce vyvíjejícího se pŕlměsíčku. Bylo prokázáno, že chromozomy zaujímají polarizované uspořádání uvnitř pŕlměsíčky, patrně se podobají klasickému kyticovému uspořádání.

Zkoumali zde také, které etapy meiotické profáze odpovídají různým konformacím MIC a jak jsou v něm uspořádané chromozómy. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byla použita pro určení fáze, ve kterém chromozomové páry byly zjištěny uvnitř MIC.

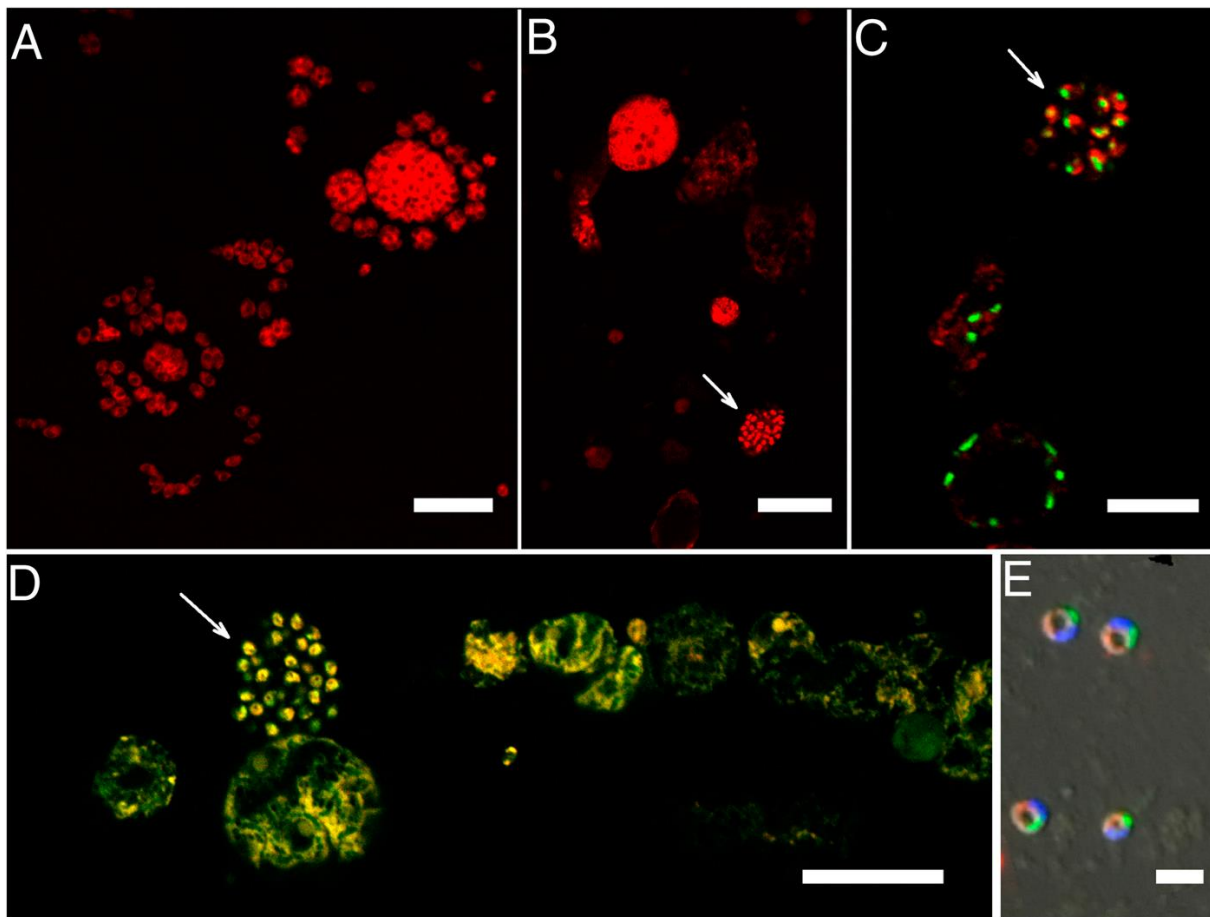
Dále bylo provedeno FISH ke zdůraznění konců chromozómů (Loidl & Scherthan, 2004).

4.3. Identifikace původu environmentálních sekvencí

Metoda FISH může být využita ke studiu fylogenetické příbuznosti. Jako příklad bych uvedla studii o oxymonádách. Kde byla získána sekvence genu pro malou ribozomální podjednotku RNA (SSU rDNA) k vyšetření vztahu mezi třemi rody oxymonád a to *Pyronympha*, *Dinenympha* a *Oxymonas*. FISH zde ukazuje, že *Pyronympha* a *Dinenympha* jsou samostatné rody. Také FISH potvrdila, že všechny tři rody oxymonád zde zmíněné jsou monofyletické. Navzdory jejich podobné morfologii FISH ukázala, že se jasně jedná o odlišné organismy a to použitím specifických prŕb designovaných pro každý fylotyp. (Moriya, Dacks, & Ohkuma, 2003)

Klasifikace rodu *Nephromyces* byla dlouhou dobu nejasná.. Použitím sekvence genu pro

malou ribozomální podjednotku RNA (SSUrDNA) jako klíčový důkaz společně s důkazem, že sekvence pochází z tohoto organismu, získaným pomocí FISH bylo ukázáno, že *Nephromyces*, původně klasifikován jako chytridní houba je vlastně výtrusovec. K vyřešení taxonomických nejasností *Nephromyces* byla sekvenován gen pro malou ribozomální podjednotku RNA (SSU rDNA) z buněk *Nephromyces* izolovaných ze čtyřech druhů pláštěnců rodu *Molgula*. Původ těchto sekvencí byl posléze potvrzen pomocí FISH, specifické próby pro apicomplexa a specifickou SSU rDNA oligonukleotidovou prábou pro *Nephromyces* byly testovány na *Nephromyces* získaných z hostitelů a jako negativní kontrola na toxoplazmě gondii. Výsledky byly dle očekávání a to, že *Toxoplasma* a *Nephromyces* byly označeny specifickými prábami na apicomplexa, ale pouze *Nephromyces* byla označena také prábou specifickou pro ni samotnou (Saffo, McCoy, Rieken, & Slamovits, 2010).



Obrázek 8: FISH pro *Nephromyces* a toxoplazmu s použitím specifických práb: FISH *Nephromyces* a toxoplazmy použitím specifické apicomplexální (Api-L) a *Nephromyces* specifické (Neph-1) SSU rRNA próby. (A) *Toxoplasma*, Api-L; (B) *Nephromyces* z hostitele, Api-L; šipka ukazuje spory nebo bičíkaté buňky. Všechny ostatní buňky jsou nejasná sporangia nebo trofické stádia.; (C) *Nephromyces* z hostitele, Neph-1 (s eubakteriální prábou – zelená), *Toxoplasma* navázala prábou Neph-1; (D) *Nephromyces* z hostitele, Api-L spojená s eukaryotickou prábou (žlutá reprezentuje navázání k obojí Api-L i eukaryotické prábě – zelená); (E) spory *Nephromyces*, Api-L s eubakteriální prábou – zelená a DAPI – modrá (převzato z (Saffo et al., 2010))

4.4. Studium vzájemných vztahů organismů

Ve studiu vzájemných vztahů organismů, ať už jde o symbiózu nebo parazitismus se FISH ukázala jako velmi užitečná metoda. Ukazuje na to například protistní kmen Apicomplexa, který byl po dlouhou dobu definován jako skupina složená výhradně z parazitů a patogenů. FISH ukázala informace i o prospěšnosti některých apicomplex a to jako v případě *Nephromyces* jako endosymbiotní mutualista. (Saffo et al., 2010)

Mnoho bičíkatých prvoků ve střevech termitů poskytuje útočiště ektosymbiotickým bakteriím na jejich buněčném povrchu. Studie Hongoha a kol. (2007) se snaží charakterizovat ektosymbiotické bakterie na protistech žijících ve střevech termitů. Průběh specifická pro R-N74 fylotyp byla použita k detekci odpovídajících bakterií ve střevě termitů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Překvapivě, signály byly zjištěny obzvláště ze štětinovitých "přívěsků" bičíkatých druhů, které patří do rodu *Dinenympha*; tyto "přívěsky" byly považovány za spirochetální ektosymbionty nebo struktury z prvoků. Tato bakterie pravděpodobně reprezentuje nový rod a druh, "*Candidatus Symbiothrix dinenymphae*", fylogeneticky spjata se shlukem tvořeným výlučně z nekultivovaných kmenů z termitích střev. Průběh specifická pro *Bacteroidales* dále odhalila, že tento typ symbiózy existuje také u různých jiných prvoků, včetně parabasálií a oxymonád, a je velmi rozšířený v termitích střevech.

Zajímavé je, že FISH použitím próby Bactd-937 odhalila ostatní štětinovité *Bacteroidales* ektosymbionty na povrchu různých bičíkatých prvoků ve střevech termitů; tito symbionti nemohli být detekováni pomocí próby RsN74-645. V oxymonádách protistech *Pyronympha grandis* a dalších druhů pyronymph byly pozorovány buňky podobné *Symbiothrix* spolu s spirochetálními ektosymbionty v uspořádání podobném jako u *Dinenympha*. Podobní ektosymbionti byly také detekovány mezi spirochetálními ektosymbionty protist *Holomastigotes elongatum* (kmen Parabasalia). V dalším prvoku ze skupiny Parabasalia, *Trichonympha agilis* (řád Trichonymphida), byly nalezeny vláknité, štětinovité buňky. Ačkoli tyto bakterie na *T. agilis* byly tvarem podobné buňkám *Symbiothrix*, byly > 20 mm dlouhé a více zvlněné. Na buňkách prvoka *Metadevescovina cuspidata* (řád Trichomonadida, Parabasalia) byli pozorováni štětinovité ektosymbionti jejichž morfologie se liší od *Symbiothrix*. Kromě toho, za použití směsi prób specifických pro spirochéty se podařilo potvrdit, že buňky, které byly zjištěny na *T. agilis* a *M. cuspidata* s proubou Bactd-937 jsou jiné než spirochetální ektosymbionti (Hongoh et al., 2007).

4.5. Vyšetření potravy protist

FISH umožňuje kvalitativní detekci požitých nitrifikačních bakterií v potravních vakuolách nálevníků s použitím kombinace DAPI a FISH barvení. Nálevníci v této studii nevykazovali žádnou významnou selektivní pastvu. Žádná potravní preference pro jakýkoli bakteriální taxon nebo jakékoliv velikostní třídy nebo morfotypy nebyla pozorována. FISH je výkonná metoda pro vyšetřování požitých bakterií, ovšem potravní vakuoly jsou trojrozměrné struktury, a dvourozměrné mikroskopické vyšetření není vždy dostačující pro stanovení počtu požíraných částic.

Výsledky laboratorních experimentů naznačují, že nitrifikační bakterie netvoří základ potravy komunit nálevníků a že nálevníci neovlivňují druhové složení nebo složení morfotypů uvnitř bakteriální komunity. Tato studie ukazuje, že selektivní pastva nemá významný vliv na komunity nitrifikačních bakterií (Neubacher, Prast, Cleven, & Berninger, 2008).

5. ZÁVĚR

Fluorescenční *in situ* hybridizace je výkonná technologie umožňující detekci a vizualizaci vyšetřovaných nukleových kyselin. Mnoho, dokonce většinu jejích modifikací jsem ve své práci nezmínila, protože se v protistologii nepoužívají a jedná se spíše o metody přizpůsobené pro obory genetiky. Avšak věřím, že do budoucna bude vyvinuto i více modifikací, které by mohli přispět i k výzkumu v oboru protistologie.

Ačkoliv je FISH už relativně dlouho běžně používaná technika má stále své nedostatky, na které by se její další rozvoj měl soustředit. Patří sem především proces fixace a permeabilizace buněk, který může vést k vážným fyzickým deformacím buněk a tím, pak vést k nepřesným výsledkům.

V mojí další práci bych se ráda věnovala této dále metodě a vyzkoušela si i prakticky její použití. Ráda bych se zaměřila na výzkum fylogenetické příbuznosti protistních organismů ze střev termitů.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bauman, J. G., Wiegant, J., Borst, P., & van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Experimental Cell Research*, *128*(2), 485–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6157553>
- Bouvier, T., & Del Giorgio, P. a. (2003). Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology*, *44*(1), 3–15. [http://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00461-0](http://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00461-0)
- Conrad, M., Zubacova, Z., Dunn, L. a., Upcroft, J., Sullivan, S. a., Tachezy, J., & Carlton, J. M. (2011). Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *175*(1), 30–38. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.08.006>
- Figuroa, R. I., Cuadrado, A., Stüken, A., Rodríguez, F., & Fraga, S. (2014). Ribosomal DNA Organization Patterns within the Dinoflagellate Genus *Alexandrium* as Revealed by FISH: Life Cycle and Evolutionary Implications. *Protist*, *165*(3), 343–363. <http://doi.org/10.1016/j.protis.2014.04.001>
- Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) - Probes, Dna, Sequences, and Chromosomes - JRank Articles. (n.d.). Retrieved April 21, 2015, from <http://science.jrank.org/pages/2775/Fluorescence-in-Situ-Hybridization-FISH.html>
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., & Pace, N. R. (1988). Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, *170*(2), 720–726.
- Greb, C. (2012). Fluorescent Dyes. Retrieved from <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-dyes/>
- Hongoh, Y., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T., & Ohkuma, M. (2007). Candidatus Symbiothrix dinenymphae: Bristle-like Bacteroidales ectosymbionts of termite gut protists. *Environmental Microbiology*, *9*(10), 2631–2635. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01365.x>
- Levsky, J. M., & Singer, R. H. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 14), 2833–2838. <http://doi.org/10.1242/jcs.00633>
- Loidl, J., & Scherthan, H. (2004). Organization and pairing of meiotic chromosomes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 24), 5791–5801. <http://doi.org/10.1242/jcs.01504>
- Moriya, S., Dacks, J. B., & Ohkuma, M. (2003). Molecular Phylogeny of Three Oxymonad Genera. *50*(3), 190–197.
- Moter, a, & Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *41*(2), 85–112. [http://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00152-4](http://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00152-4)

- Neubacher, E., Prast, M., Cleven, E. J., & Berninger, U. G. (2008). Ciliate grazing on *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira moscoviensis*: Is selectivity a factor for the nitrogen cycle in natural aquatic systems? *Hydrobiologia*, *596*(1), 241–250. <http://doi.org/10.1007/s10750-007-9100-7>
- Non-radioactive Labeling of DNA and RNA. (n.d.). *BioScience*.
- Raap, a K. (1998). Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research*, *400*(1-2), 287–298. [http://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00029-3](http://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00029-3)
- RNA Labeling, RNA/cRNA Labeling, Probes, Products & Ordering, Jena Bioscience. (n.d.). Retrieved August 13, 2015, from http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/2290_rnacrna_labeling.html
- Rudkin, G. T., & Stollar, B. D. (1977). High resolution detection of DNA-RNA hybrids insitu by indirect immunofluorescence. *Nature*, *265*(5593), 472–473. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/401954>
- Saffo, M. B., McCoy, A. M., Rieken, C., & Slamovits, C. H. (2010). Nephromyces, a beneficial apicomplexan symbiont in marine animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(37), 16190–16195. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002335107>
- Snyder, R. V., Guerrero, M. a., Sinigalliano, C. D., Winshell, J., Perez, R., Lopez, J. V., & Rein, K. S. (2005). Localization of polyketide synthase encoding genes to the toxic dinoflagellate *Karenia brevis*. *Phytochemistry*, *66*(15), 1767–1780. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.06.010>
- Spear, R. N., Li, S., Nordheimb, E. V., & Andrews, J. H. (1999). Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence in situ hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Microbiological Methods*, *35*, 101–110. [http://doi.org/10.1016/s0167-7012\(98\)00100-6](http://doi.org/10.1016/s0167-7012(98)00100-6)
- Trask, B. J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews. Genetics*, *3*(10), 769–778. <http://doi.org/10.1038/nrg905>
- Volpi, E. V., & Bridger, J. M. (2008). FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques*, *45*(4), 385–409. <http://doi.org/10.2144/000112811>
- Wiegant, J., Ried, T., Nederlof, P. M., van der Ploeg, M., Tanke, H. J., & Raap, A. K. (1991). In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Research*, *19*(12), 3237–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zubáčová, Z., Krylov, V., & Tachezy, J. (2011). Fluorescence in situ hybridization (FISH) mapping of single copy genes on *Trichomonas vaginalis* chromosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *176*(2), 135–137. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.12.011>