

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



**Analýza vybraných genomových oblastí s dominantními supresory  
*adgf-a* mutantního fenotypu u *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Vypracovala: Jana Kadlecová  
Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

České Budějovice, 2008

Kadlecová J., 2008: Analýza vybraných genomových oblastí s dominantními supresory *adgf-a* mutantního fenotypu u *Drosophila melanogaster* [Analysis of selected genomic regions with dominant suppressors of the *adgf-a* mutant phenotype in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech] - 40p, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Adenosin je důležitou signální molekulou v mnoha fyziologických procesech u mnoha rozličných organismů. Aberantní regulace hladiny této molekuly vede k nejrůznějším patologickým efektům, jako je například těžká imunodeficiencie u člověka. V minulých letech byl vytvořen genetický model pro zkoumání účinků adenosinu na octomilce (*Drosophila melanogaster*) a pomocí tohoto modelu byl započat rozsáhlý genetický skrínig na geny, modifikující odpověď na vysokou hladinu adenosinu. V této práci jsou prezentovány dílčí úkoly v rámci tohoto skrínigu, které zahrnují detailnější analýzu vybraných oblastí, které byly identifikovány tímto skrínigem jako oblasti obsahující dominantní supresory fenotypu spojeného se zvýšenou hladinou adenosinu. Prvním úkolem bylo vytvoření kratší, molekulárně definované delece v rámci původně objevené větší delece. Druhým úkolem bylo otestování supresorových účinků již existující kratší delece. Třetím úkolem bylo prověření úlohy potenciálního supresoru, což zahrnovalo ověření pozic P-elementů, které tento gen zasáhly a otestování účinků těchto inzercí. Posledním úkolem pak bylo zaklonování sekvence pro tvorbu próby, která by měla být využita pro charakterizaci exprese tohoto genu.

Adenosine is an important signaling molecule in various physiological processes in many different organisms. Dysregulation of the level of this molecule leads to many pathological consequences as Severe Combined Immunodeficiency in humans. Recently a genetic model using fruit fly *Drosophila melanogaster* was established to study effects of adenosine in this organism and a genetic screen for genes modifying the effects of heightened adenosine was started. This work presents partial tasks in this screen which include detailed characterization of selected regions which were identified as dominant suppressors of the phenotype associated with heightened adenosine. First task was to produce a smaller, molecularly defined deletion in range of originally identified bigger deletion. Second task included a testing of already existing smaller deletion for the suppressing effects. In the third task, a role of potential suppressor was further analyzed which included a verification of P-element insertions in this gene and their testing for suppressing effects. In the last task, the sequence for making a probe to characterize the expression of this gene was cloned.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR, číslo grantu 31-0814. (This thesis has been supported by Grant Agency of Czech republic, Grant No. 31-0814.)

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

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

v Českých Budějovicích dne 28. 4. 2008

.....  
Jana Kadlecová

## Poděkování

Nejdříve bych ráda poděkovala svému školiteli Tomáši Doležalovi za spoustu rad, nápadů a velmi ochotnou pomoc při práci v laboratoři i psaní mé bakalářské práce. Za velkou pomoc také děkuji Monice Žuberové, která mě zasvětila do veškerých postupů, a všem ostatním členům naší laboratoře za cenné rady.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich trpělivost a psychickou podporu, díky které jsem měla sílu pokračovat.

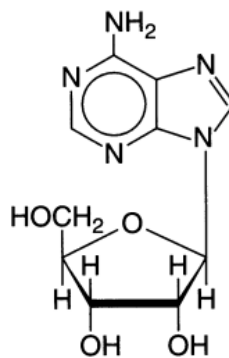
## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Adenosin. ....	1
1.2. Adenosin deamináza a důsledky její ztráty .....	2
1.3. ADGFs (Adenosine Deaminase Related Growth Factors) .....	3
1.3.1 <i>adgf-a</i> mutantní fenotyp .....	3
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>5</b>
<b>3. METODICKÝ PŘÍSTUP</b> .....	<b>6</b>
<b>4. POUŽITÉ METODY A VÝSLEDKY</b> .....	<b>9</b>
4.1. Vytvoření molekulárně definované delece, která se částečně překrývá s původně nalezenou supresorovou delecí <i>Df(1)Exel6239</i> .....	9
4.2. Použití menší, molekulárně definované delece nacházející se ve zkoumané oblasti (deleci) .....	12
4.3. Testování namapovaných P-elementových inzercí v genu CG14478 .....	18
4.3.1. Ověření místa inserce P-elementů P{RS3}CB-6372-3 ve stocku CB-6372-3, P{Epgy2}CG14478 <sup>[EY02186]</sup> ve stocku Bl15557 a P{SUPorP}CG14478 <sup>[KG00627]</sup> ve stocku Bl14074 .....	19
4.3.2. Testování supresorových účinků inzercí P-elementů P{RS3}CB-6372-3 a P{Epgy2}CG14478 <sup>[EY02186]</sup> v oblasti supresorové delece <i>Df(2R)robl-c</i> .....	23
4.4. Příprava próby pro analýzu exprese genu CG14478 pomocí in-situ hybridizace. ....	26
4.4.1. PCR amplifikace sekvence pro přípravu próby .....	27
4.4.2. Ligace a transformace .....	28
4.4.2.1. Ligace .....	28
4.4.2.2. Transformace .....	29
4.4.2.3. Ověření přítomnosti a orientace fragmentu DNA .....	30
4.4.3. Izolace plazmidu a restriční štěpení .....	31
<b>5. SHRUTÍ VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR</b> .....	<b>34</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>36</b>

# 1. ÚVOD

## 1.1. Adenosin

Adenosin (Ado) je endogenní purinový nukleosid s mnoha funkcemi v organismu, tvořený adeninem navázaným na cukr ribózu  $\beta$ -N9-glykosidickou vazbou.



Obr. 1: Struktura adenosinu

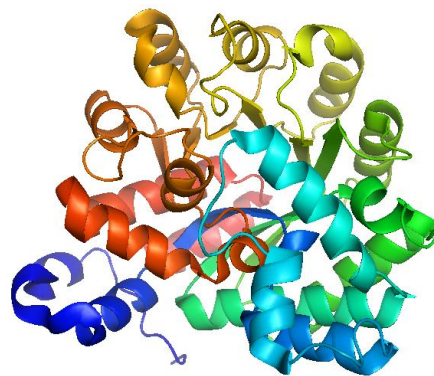
Je stavební složkou nukleových kyselin (intracelulární adenosin) a signální molekulou vně buňky. Ve formě adenosin trifosfátu (ATP) a adenosin difosfátu (ADP) se účastní přenosu energie, cyklický adenosin monofosfát (cAMP) je signální molekulou. Extracelulární adenosin působí významně v regulaci různých procesů, jeho funkce se mění podle místa působení: je neuromodulátorem (Dunwiddie & Masino, 2001), ovlivňuje vazokonstrikci a vazodilataci, srdeční rytmus, funkci iontových kanálů, uvolňování hormonů, podílí se na regulaci homeostáze, buněčného dělení, apoptózy, imunitní odpovědi či zánětu. Také se uplatňuje jako stresový hormon, který je uvolňován v okolí imunitních buněk během systémového i buněčného stresu (Hasko *et al.*, 2002), například při hypoxii (Buck, 2004) nebo v důsledku působení specifických zánětlivých stimulů (Bodin & Burnstock, 1998). Jeho hlavním zdrojem během systémové aktivace stresové odpovědi je sympatická nervová soustava (Sperlagh *et al.*, 2000). Adenosin reguluje buněčné funkce prostřednictvím navázání na receptory spřažené s G-proteiny (u savců A1, A2a, A2b a A3), které regulují koncentraci cAMP v buňce (Latini & Pedata, 2001).

Hlavním zdrojem extracelulárního adenosinu je postupná defosforylace ATP a ADP pomocí enzymu CD39 - NTPDase (The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase), defosforylace vzniklého AMP je stejně jako u AMP uvnitř buňky katalyzovaná 5'nukleotidázou (Latini & Pedata, 2001). Mezi další zdroje patří například degradace nukleových kyselin z buněk, které prodělaly apoptózu, hydrolýza S-adenosylhomocysteinu

(SAH) SAH hydrolázou nebo rozklad cAMP (Hershfield *et al.*, 1985). Současně s tvorbou adenosinu probíhá také jeho přeměna: fosforylace katalyzovaná adenosin kinázou (AK), při které vzniká AMP, a deaminace katalyzovaná adenosin deaminázou (ADA), při které vzniká inosin (Latini & Pedata, 2001). ADA rovněž katalyzuje deaminaci 2'-deoxyadenosinu (dAdo) na 2'-deoxyinosin (Hershfield & Mitchell, 2001). dAdo je produktem rozpadu nukleových kyselin po apoptóze a je cytotoxický.

## 1.2. Adenosin deamináza a důsledky její ztráty

Adenosin deamináza je enzym přítomný ve všech organismech, který katalyzuje ireversibilní deaminaci adenosinu a deoxyadenosinu na inosin, respektive deoxyinosin.



Obr. 2: Struktura adenosin deaminázy

V lidských buňkách se ADA vyskytuje jako monomer v cytosolu, ale také jako „ekto-ADA“ navázaná na membránový glykoprotein CD26/dipeptidyl peptidázu IV - tato forma nejspíš reguluje hladinu extracelulárního adenosinu (Richard *et al.*, 2002). Největší množství ADA je u lidí v lymfatických tkáních. Vrozená absence ADA způsobuje u člověka asi 20% z těžkých imunodeficiencí „Severe Combined Immunodeficiency Disease“ (SCID) (Aldrich *et al.*, 2000), spojenou s výrazným úbytkem tří hlavních kategorií lymfocytů: T a B lymfocytů a buněk NK (natural killers), což vede ke snížené imunitě a snížené produkci imunoglobulinů (Buckley *et al.*, 1997). ADA deficiencie je doprovázena zvýšením hladin Ado a dAdo, což jsou biologicky aktivní puriny, které ovlivňují fyziologii buňky. Bez zásahu postižený jedinec umírá během prvních měsíců života. Přesný molekulární mechanismus SCID není znám, nejspíš dochází k tomu, že akumulace Ado a dAdo (substrátů ADA) narušuje vývoj lymfocytů.

Deaminázy se dají rozdělit do dvou skupin: (1) klasické ADA v savčích buňkách a sekvenčně podobná Ada u *Drosophily*, u níž se ovšem nepodařilo prokázat ADA aktivitu

(Zurovec *et al.*, 2002) a (2) produkty genů z podrodiny CECR1 u člověka a ADGFs u *Drosophily*.

### 1.3. ADGFs (Adenosine Deaminase Related Growth Factors)

U *Drosophily melanogaster* byla objevena skupina šesti genů, sekvenčně podobných CECR1 podrodině (Zurovec *et al.*, 2001), jejichž produkty jsou mitogenní (stimulují buněčné dělení) a nejméně dva z nich (ADGF-A, ADGF-D) mají silnou ADA aktivitu, nezbytnou pro jejich mitogenní funkci. ADGFs *in vitro* stimulují buněčný růst vyčerpáním extracelulárního adenosinu (Zurovec *et al.*, 2002), který je pro dělení buněk negativním signálem. Nejhojněji exprimovaný je ADGF-A.

#### 1.3.1 *adgf-a* mutantní fenotyp

Homozygotní mutace v ADGF-A (gen CG5992, III. chromozom) se projevuje zvýšením hladin Ado a dAdo v larvální hemolymfě. Tento mutant, označován *adgf-a*, byl získán homologní rekombinací (Dolezal *et al.*, 2003). Mutace má řadu projevů (Dolezal *et al.*, 2003):

- zvýšená letalita všech vývojových stádií - zakuklí se méně než 30% jedinců - kukly málo nebo vůbec evertované, zahnuté, často přilepené bokem, dospělosti dosahuje méně než 2% - dospělci jsou drobní, brzy po vylíhnutí umírají
- zpomalení vývoje
- tvorba melanotických tumorů, hlavně v kaudální části těla
- redukce až rozpad tukového tělesa
- abnormální vývoj hemocytů:
- ve 3. larválním instaru dochází k rozpadu lymfatických žláz a uvolnění hemocytů do hemolymfy
- zvýšení jejich počtu na konci larválního vývoje (asi 7x více než u jedince s funkční ADGF-A)
- přibližně 7% z hemocytů jsou lamelocyty (velké ploché buňky), které se v oběhu za normálních podmínek nevyskytují (Lanot *et al.*, 2001)

*adgf-a* mutace, respektive zvýšená koncentrace adenosinu, tedy vede k diferenciaci a uvolňování hemocytů, rozpadu tukového tělesa a zároveň ke zpoždění vývoje a bloku kuklení.

*Drosophilí* mutant v genu ADGF-A je vhodným genetickým modelem ke studiu efektů adenosinu v organismu díky několika výhodám: dobře popsané projevy mutace, jednoduchý vývoj a fyziologie, řada genetických nástrojů pro práci *in vivo*. Tento model byl využit pro hledání genů, modifikujících účinky mutace *adgf-a*, resp. zvýšené hladiny adenosinu, tedy genů, které nějakým způsobem interagují s odezvou na adenosin. K tomuto účelu byl použit genetický skríníng na dominantní supresory *adgf-a* fenotypu v podobě delecí, které v heterozygotním stavu (deletují někdy velký počet genů) potlačují fenotypové projevy *adgf-a* mutace (viz. také schéma na Obr. 6). Testovány byly delece na chromozomu X a II z „Bloomington deficiency kit“ (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df-dp/dfkit-info.htm>) a byly identifikovány následující oblasti (Doležal, nepublikováno):

Supresorová delece	Chromozomální lokalizace
<i>Df(1)ED7294</i>	13B1-13C3
<i>Df(1)Exel9050</i>	10D5-10D6
<b><i>Df(1)Exel6239</i></b>	5F2-6B1
<i>Df(1)Exel6255</i>	20A1-20B1
<i>Df(2L)dp-79b</i>	22A2-3;22D5-E1
<b><i>Df(2L)E110</i></b>	25F3-26A1;26D3-11
<i>Df(2L)C'</i>	h35;h38L
<i>Df(2R)en30</i>	48A3-4;48C6-8
<b><i>Df(2R)robl-c</i></b>	54B17-C4;54C1-4
<i>Df(2R)Px2</i>	60C6;60D9--10
<i>Df(2R)ES1</i>	60E6-8;60F1-2

Tab. 1: Dosud zjištěné oblasti, v nichž jsou geny modifikující *adgf-a* fenotyp

Překryvem dvou delecí v oblasti *Df(2R)robl-c* byla vymezena menší oblast se supresorovým efektem, která obsahuje 5 genů: *mth13* > *CG10764* > *CG34192* > *robl* > *CG14478* (Žuberová & Doležal, 2007).



## 2. CÍLE PRÁCE

Úkoly této bakalářské práce jsou součástí projektu „Úlohy extracelulárního adenosinu při krvetvorbě a vrozené imunitě za použití drozofily jako modelu pro studium těchto úloh in vivo, jehož hlavním řešitelem je Mgr. Tomáš Doležal, a to konkrétněji v části genetického skrínungu pro dominantní supresory *adgf-a* fenotypu, na kterém pracuje v rámci své Ph.D. dizertace Mgr. Monika Žuberová. V rámci tohoto projektu jsem se podílela na následujících úkolech:

- (1) Vytvoření molekulárně definované delece, která by se částečně překrývala s původně nalezenou supresorovou delecí *Df(1)Exel6239*.
- (2) Otestování molekulárně definované mikrolece *Df(2L)EXel7024*, která se nachází v oblasti původně nalezené, molekulárně nedefinované supresorové delece *Df(2L)E110*, na supresorové účinky.
- (3) Ověření pozice P-elementových inzercí a testování jejich supresorových účinků v oblasti původní supresorové delece *Df(2R)robl-c*.

V rámci těchto tří úkolů byla tedy cílem detailní analýza vybraných následujících delecí, které byly původně nalezeny v genetickém skrínungu:

Delece	Chromozomální lokalizace
<i>Df(1)Exel6239</i>	5F2-6B1
<i>Df(2L)E110</i>	25F3-26A1;26D3-11
<i>Df(2R)robl-c</i>	54B17-C4;54C1-4

Tab. 2: Zkoumané oblasti

- (4) Příprava próby pro analýzu exprese genu CG14478 pomocí in-situ hybridizace.

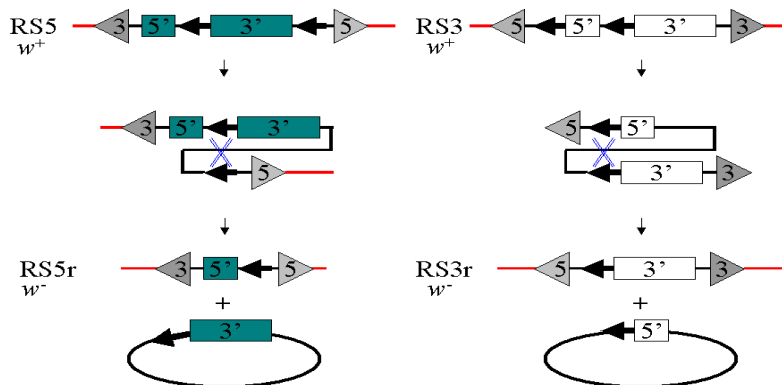
### 3. METODICKÝ PŘÍSTUP

Identifikaci genů jsem prováděla delečním a inzerčním skríníngem. Používala jsem tři různé postupy:

- (1) Vytváření vlastních molekulárně definovaných mikrodelecí - pomocí P-elementů (postup DrosDel - podrobné informace na [www.drosdel.org.uk](http://www.drosdel.org.uk)).
- (2) Použití menších, molekulárně definovaných delecí nacházejících se ve zkoumané oblasti - s použitím delečních kitů z Bloomingtonského stockového centra.
- (3) Testování namapovaných P-elementových inzercí v konkrétním genu.

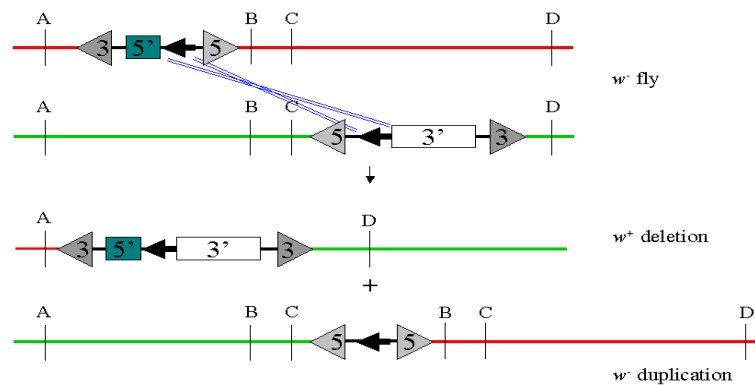
(1) Při tvorbě delece postupem DrosDel byly použity dva P-elementy, vůči sobě posunutě, a flipáza (FLP rekombináza), která rozezná FRT sekvence na koncích P-elementů. Flipáza byla pod heat-shock promotorem. P-elementy obsahovaly mini-white gen (gen pro červenou barvu očí) a navzájem se lišily pozicí FRT sekvencí. Vlastní molekulárně definované delece se tvoří pomocí dvou kroků, kdy se nejdříve upraví speciální P-elementy, inzerované ve vybraných pozicích (FLIP-OUT) a ve druhém kroku se pak rekombinují za vzniku delece, označené mini-white markerem (FLIP-IN):

FLIP-OUT - rekombinací mezi dvěma FRT sekvencemi se odstraní jedna ze dvou částí mini-white genu => v P-elementu zůstane jen druhá část a jedna FRT sekvence ; buňky sítnice, ve kterých došlo k rekombinaci, jsou bílé => vzniká mozaika; z gamet s neúplným mini-white genem vzniknou mouchy s bílými očima:



Obr. 3: Princip FLIP-IN: Trojúhelníky = 5' a 3' konce elementu; obdélníky = 5' a 3' exony mini-white genu; šipky = FRT sekvence (cílová místa pro flipázu)

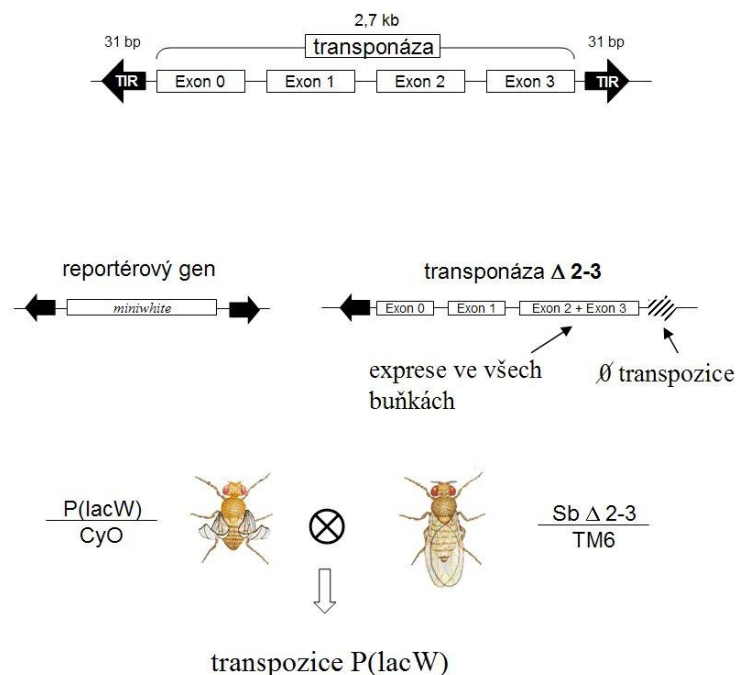
FLIP-IN - rekombinací mezi dvěma FRT sekvencemi se spojí obě části mini-white genu  
 => buňky sítnice, ve kterých došlo k rekombinaci, jsou červené; z gamet se znovusloženým mini-white genem vzniknou mouchy s červenýma očima:



Obr. 4: Princip FLIP-OUT

(3) Dále byly pro hledání supresorových genů použity vybrané P-elementové inserce:

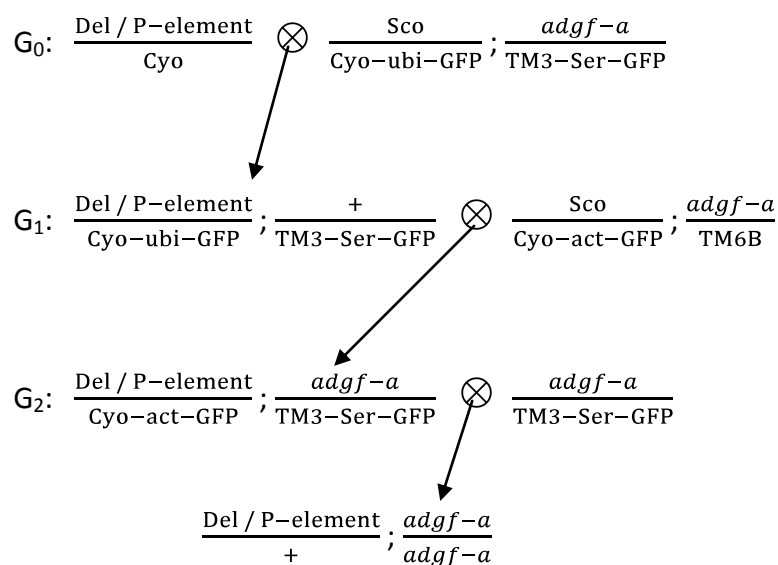
P-elementy jsou transponovatelné elementy *Drosophily melanogaster* o délce 2907bp. Patří mezi transpozony II. skupiny, pro jejichž pohyb v genomu je nutná transponáza (I. skupina = retrotranspozony). Autonomní P-elementy obsahují 4 exony pro syntézu funkční transponázy, 31 bp dlouhé invertované terminální repetice a cílové sekvence 8bp (nutné pro vystřížení a začlenění transpozonu do chromozomu). Non-autonomní postrádají transponázovou aktivitu - jejich pohyb vyžaduje jiný zdroj transponázy v genomu.



Obr. 5: Princip transpozice P-elementu

P-elements byly využity při projektech vytváření jejich náhodných inzercí do genomu, při následném skrínungu byly hledány určité zajímavé fenotypy. Z těchto projektů jsou dnes uchovávány v centrech (Szeged, Bloomington, DrosDel, Exelixis) tisíce linií charakterizované fenotypem nebo místem inserce. Přesná sekvence místa, kde došlo k inserci, se zjišťuje pomocí inverzní PCR (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>).

Při delečním skrínungu jsem sledovala, zda dochází k potlačování mutantního fenotypu (*adgf-a*). Pro sledování jsem si vykřížila mouchy heterozygotní pro delecí nebo P-element a homozygotní v *adgf-a*:



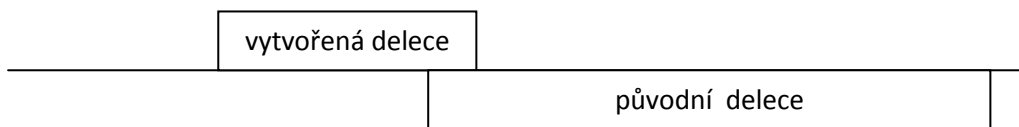
Obr. 6: Křížení pro přípravu mouchy heterozygotní pro delecí nebo P-element a homozygotní v *adgf-a*

Jako negativní kontrolu jsem používala samotného *adgf-a* mutantu, jako pozitivní kontrolu heterozygota pro *adgf-a* - vyvíjí se stejně jako wild-type. U pozitivní kontroly docházelo ke kuklení po 5 dnech od naklazení, prováděla jsem počítání kukel a dospělců u kontrol a zkoumaných much. Zkoumala jsem tedy letalitu, dále jsem u některých much sledovala výskyt melanotických tumorů, rozpad tukového tělesa a počet hemocytů (krevních buněk).

## 4. POUŽITÉ METODY A VÝSLEDKY

### 4.1. Vytvoření molekulárně definované delece, která se částečně překrývá s původně nalezenou supresorovou delecí *Df(1)Exel6239*

Cílem bylo vytvořit delecii na chromozomu X, která se částečně překrývá s již existující delecí *Df(1)Exel6239*. V oblasti původní delece se nachází dominantní supresor efektů adenosinu - pokud by se současně nacházel ve vytvořené delecii, je v oblasti překryvu.



Delece *Df(1)Exel6239*:

Nachází se v oblasti X: 6238366..6418532-6418630 (5F2;6B1)

Byla vytvořena pomocí P-elementů P{XP}d04079 a P{XP}CG3918<sup>d02940</sup>:

P{XP}d04079 - P-element typu P{XP}, chromozomální lokalizace 5F2

Přilehlá genomová sekvence: gatccacatt agccattagc attaacgaaa atcacataaa  
accatatagt gagcaagcga gcgagcgaga gcttggtgcc gccaggtgc gagcaaaagc gc

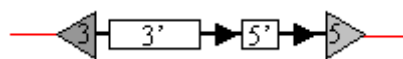
P{XP}CG3918<sup>d02940</sup> - P-element typu P{XP}, chromozomální lokalizace 6B1

Přilehlá genomová sekvence: gatcaaccgt agagcttcaa atttgtaaa caactaagcc  
gtgctggcgt gcagtgtgac cagctcttgt tcgggcaacg gtatttcc

Deleci *Df(1)ED6830* jsem vytvořila pomocí P-elementů P {RS3}CB-0423-3 a P {RS5}5-SZ-3667:

P {RS3}CB-0423-3 - P-element typu P {RS3}, chromozomální lokalizace 5E5

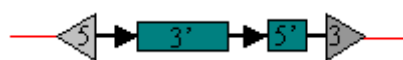
Přilehlá genomová sekvence: agccagacga cggtttgctt ttcgcctcga aacatgacca  
tatatggtca caaaacttgg ccgccgaat tcaacacacc agcgc



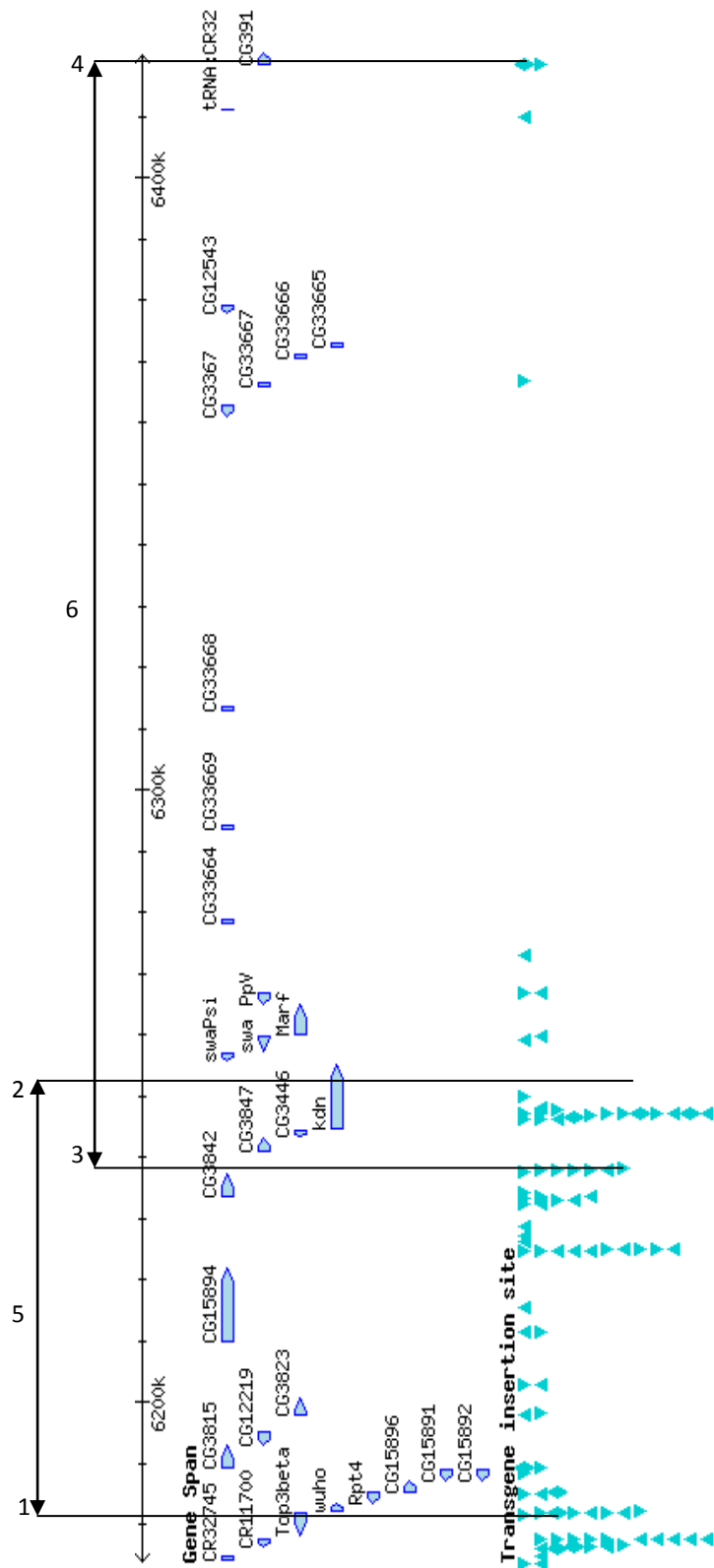
Obr. 7: Struktura P-elementu P {RS3}CB-0423-3

P {RS5}5-SZ-3667 - P-element typu P {RS5}, chromozomální lokalizace 5F3

Přilehlá genomová sekvence: ctctgcgccg tggcatttgt tttgttgtt gtaaatttac  
aagaataaga cccaaaaaaa atcaagccgg



Obr. 8: Struktura P-elementu P {RS5}5-SZ-3667

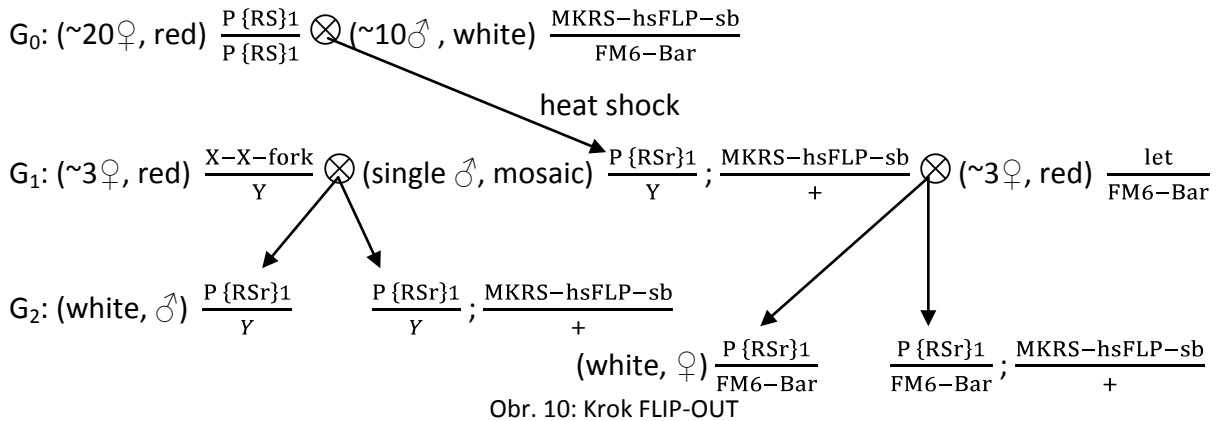


Obr. 9: Poloha P-elementů a delecí v genomu:

- 1 - P {RS3}CB-0423-3 - poloha X: 6,176,245..6,176,245
- 2 - P {RS5}5-SZ-3667 - poloha X: 6,247,128..6,247,128
- 3 - P{XP}d04079 - poloha X: 6,238,366..6,238,366
- 4 - P{XP}CG3918<sup>d02940</sup> - poloha X: 6,418,533..6,418,630
- 5 - vytvořená delece *Df(1)ED6830*
- 6 - původní delece *Df(1)Exel6239*

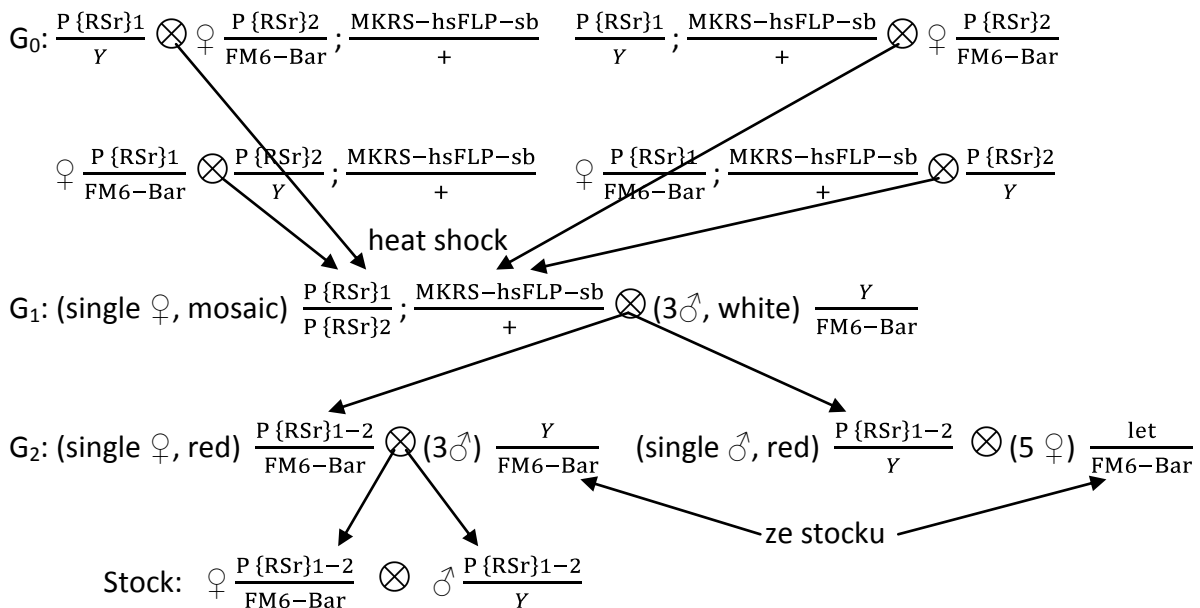
Křížení pro přípravu delece:

FLIP-OUT:



V generaci  $G_0$  jsem křížila mouchy s P-elementem a mouchy s flipázou, k jejíž aktivaci došlo po heat-shocku. Heat-shock jsem provedla po 30 hodinách od naklazení vajíček mouchami z  $G_0$ , 1 hodinu ve vodní lázni při  $38^\circ\text{C}$ . Díky aktivované flipáze došlo k samotnému FLIP-OUT - vystřížení jedné části mini-white genu  $\Rightarrow$  v  $G_1$  vznikly mouchy s mozaikovitými očima. Takové samce z  $G_1$  jsem dále křížila se samicemi  $\frac{X-X-fork}{Y}$ , které mají sloučené dva X chromozomy, díky tomu dojde k přenosu X chromozomu (a tím upraveného P-elementu) ze samečka v  $G_1$  na samečka v  $G_2$ . Samice z  $G_1$  jsem křížila se samci  $\frac{let}{FM6-Bar}$ . V generaci  $G_2$  jsem vybírala bělooké mouchy.

FLIP-IN:



P {RSr}1 - P {RS3}CB-0423-3  
P {RSr}2 - P {RS5}5-SZ-3667

V generaci  $G_0$  jsem křížila ve čtyřech různých kombinacích vždy mouchy se dvěma různými upravenými P-elementy, po 30 hodinách od nakladení jsem provedla heat-shock. Tím došlo k aktivaci flipázy, rekombinaci P-elementů, části mini-white genu se spojily za vzniku delece. V  $G_1$  vznikly mouchy s mozaikovitými očima, které jsem dále křížila individuálně (1 samice s mozaikou na vialku). V  $G_2$  jsem pak selektovala mouchy s červenými očima (v nich jsme předpokládali vznik delece), ze kterých byla ustanovena linie.

Celkem bylo z 39 linií v generaci  $G_1$  FLIP-IN získáno 13 červenookých linií v generaci  $G_2$ , všechny homozygotně letální. Linie č. 10 byla ověřena pomocí PCR dle Ryder *et al.*, 2007 (Žuberová, nepublikováno).

Linie s vytvořenou delecí byla dále použita v delečním skríningu pro nalezení dominantního supresoru *adgf-a* fenotypu.

Delečním skríníngem byl zjištěn supresorový efekt (Žuberová, nepublikováno), čímž se oblast s přítomností supresorového genu omezila na 3 geny:

CG3847

CG3446

kdn

## 4.2. Použití menší, molekulárně definované delece nacházející se ve zkoumané oblasti (deleci)

V rámci delece *Df(2L)E110*, která není molekulárně definovaná, jsem testovala delecí *Df(2L)Exel7024* - 2L: 5,898,291..5,980,153.

Delece *Df(2L)E110*:

chromozomální lokalizace 25F3-26A1 ; 26D3-16D11

Delece *Df(2L)Exel7024*:

Nachází se v oblasti 2L: 5898291...5980153 (26A1;26A9)

Byla vytvořena pomocí P-elementů PBac{RB}e00108 a P{XP}chic<sup>d11344</sup>:

PBac{RB}e00108 - P-element typu PBac{RB}, chromozomální lokalizace 26A1

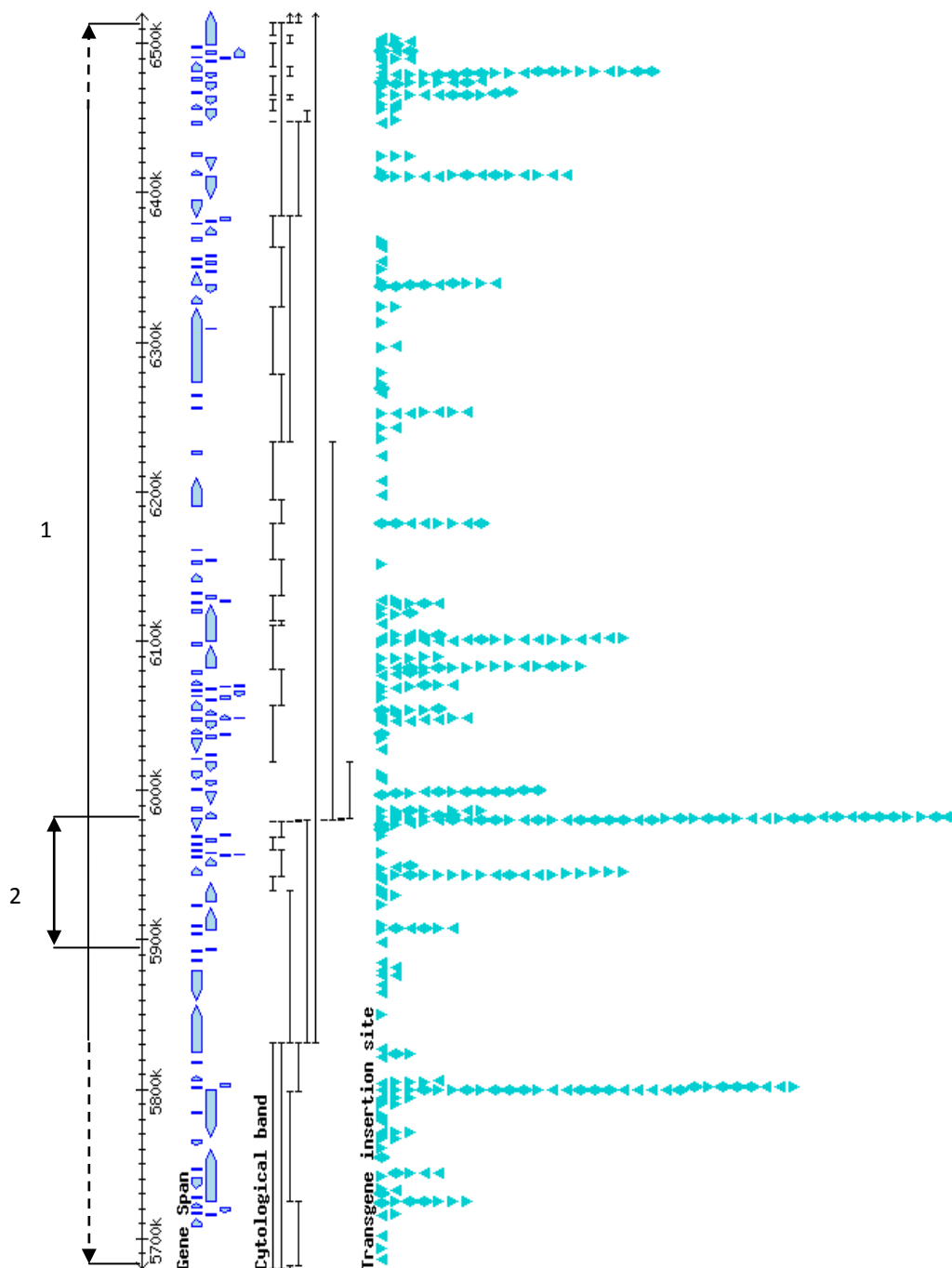
Přilehlá genomová sekvence: ttaaagctgc tgggagtagg cgatgctaca atacatagat  
gttgcaagtg caacaaatat ataaagtata gtcacttac agctggaac tttgtaatt tttttccgt  
tgatcattgc aatactata aatattaaat tgagtaatat ttttcttgc tgattctgaa aaacaactgc  
tccgtcatta cagtattcaa ttcgaccata tatgtgaaga tacatatatg cagcgaatc gaataagata



ctgcactagt atcgtgtatc gaatggagtc tatgccagtt tggctgcttt tctggggcgt gccgagatgc  
 ctccacctc atggtggcag catctggggg ccattgtgg

P{XP}chic<sup>d11344</sup> - P-element typu P{XP}, chromozomální lokalizace 26A9

Přilehlá genomová sekvence: ctctcgagtg ggttttctcg aattgcaaaa tcggtttatg  
 gttctgcttt gcgta



Obr. 12: Poloha delecí v genomu:  
 1 - *Df(2L)E110* (25F3-26A1 ; 26D3-16D11)  
 2 - *Df(2L)Exel7024* (26A1;26A9)

Křížení jsem provedla podle schématu uvedeného v metodickém přístupu (Obr. 6). Vykřížené mouchy a mouchy ze stocku 182 ( $w; \frac{adgf-a}{TM3-Ser-GFP}$ ) jsem namnožila a dala jsem je rozklást na misky s 2% agarem a kvasničnou pastou - na 3 dny, každý den jsem je přendala na čerstvou misku. Před vlastním kládením jsem je dala na 1h na čerstvou misku, aby vykladly stará embrya, potom jsem je 4h nechala klást. Po 24h se líhnou larvy - před jejich vylíhnutím jsem promyla vajíčka lihem a dala jsem je na misku se 4% agarem. Když se larvy vylíhly, podle exprese GFP jsem vybrala ty, které měly požadovaný genotyp:

$$\frac{Df(2L)Exel7024}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a}$$

$$\text{ze stocku 182: } \frac{+}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a} - \text{negativní kontrola}$$

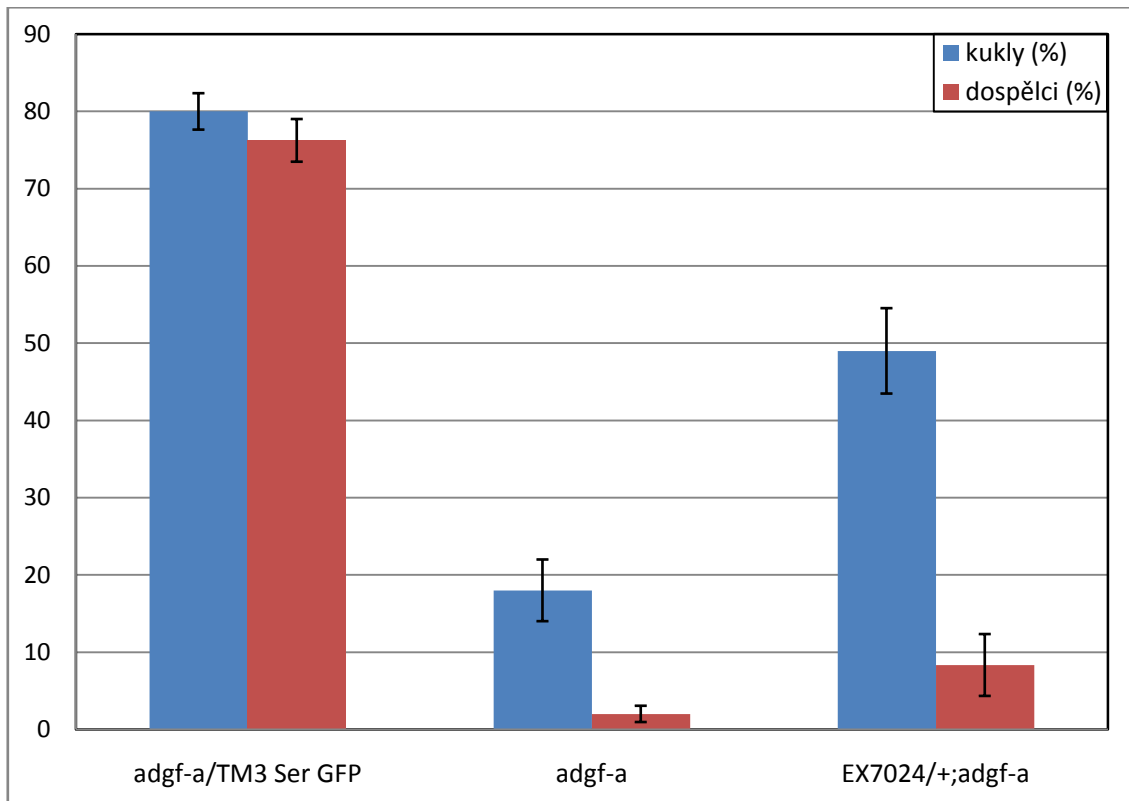
$$\frac{+}{+}; \frac{adgf-a}{TM3-Ser-GFP} - \text{pozitivní kontrola}$$

Vybrané larvičky jsem dala do vialek a sledovala jsem jejich vývoj během následujících 14 dnů:

	larvy	kukly	dospělci
$\frac{+}{+}; \frac{adgf-a}{TM3-Ser-GFP}$			
	30	12	5
	30	15	2
	30	14	3
	10	3	0
$\frac{+}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a}$			
	30	5	1
	30	7	0
	30	6	1
	30	7	1
	30	2	0
$\frac{Df(2L)Exel7024}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a}$			
	20	17	14
	20	16	16
	20	16	16
	20	15	15

Tab. 3: Výsledky testování *Df(2L)Exel7024*

V tabulce (Tab. 3) jsou uvedeny počty larev, které jsem vybrala podle exprese GFP a přenesla do vialek, dále počty kukel a dospělců, kteří se ve vialkách vyvinuli. Tyto počty jsem přepočítala na průměrné procentuální podíly, vypočítala jsem standardní chybu a vše jsem zanesla do Grafu 1:



Graf 1: Výsledky testování *Df(2L)Exel7024*

V Grafu 1 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje kukel a dospělců z přenesených larev a standardní chyby:

$$\frac{+}{+}; \frac{adgf-a}{TM3-Ser-GFP} - \text{kukly } 80\%, \text{ dospělci } 76,25 \%$$

$$\frac{+}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a} - \text{kukly } 18\%, \text{ dospělci } 2\%$$

$$\frac{Df(2L)Exel7024}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a} - \text{kukly } 42,5\%, \text{ dospělci } 8,3\%$$

$\frac{Df(2L)Exel7024}{+}; \frac{adgf-a}{adgf-a}$  - Při vývoji se projevovaly znaky *adgf-a* fenotypu, ale objevilo se větší

množství kukel i dospělců

kukly tlustší než u *adgf-a*, ale se zahnutým zadečkem, některé přilepené trochu z boku a ne bříškem

prokázalo se, že delece *Df(2L)EXel7024* potlačuje plný projev *adgf-a* fenotypu

Skríníngem byl prokázán supresorový efekt v rámci delece *Df(2L)Exel7024* a oblast se tak omezila na 17 genů z původních přibližně 119 genů v deleci *Df(2L)E110*:

CG9021

bchs

CG14000

CG9016

dsf

Gpdh

CG9044

CG13999

CG13998

Vm26Ab

Fcp26Ac

Vm26Aa

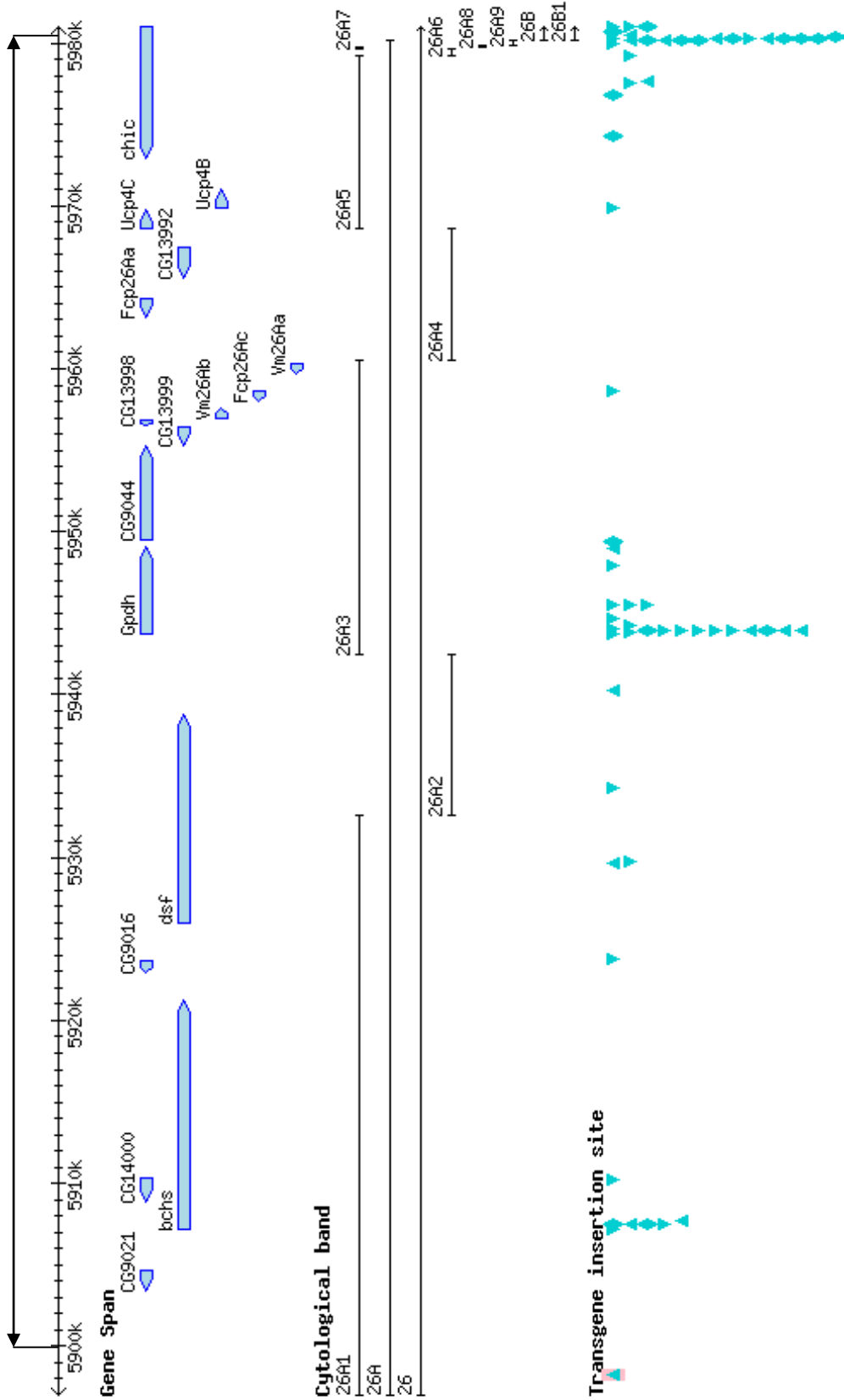
Fcp26Aa

CG13992

Ucp4C

Ucp4B

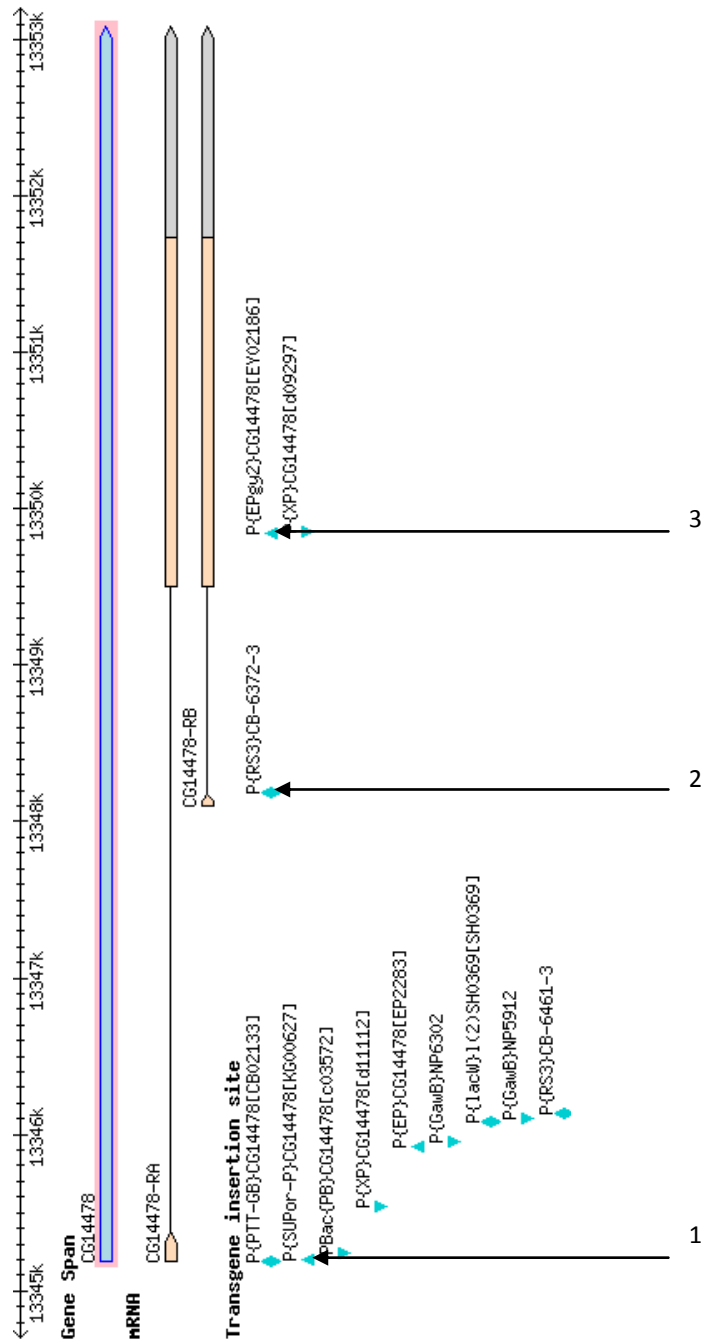
chic



Obr. 13: Poloha delece *Df(2L)EXel7024* v genomu (2L: 5,898,291..5,980,153)

### 4.3. Testování namapovaných P-elementových inzercí v genu CG14478

Mgr. Monika Žuberová našla při genetickém skrínungu dominantní supresor *adgf-a* fenotypu. Supresorová mutace je způsobena inzercí P-elementu do genu CG14478 (Žuberová, nepublikováno).



Obr. 14: Poloha genu CG14478 a P-elementů v jeho oblasti  
 Použité P-elementy: 1 - P{SUPor-P}CG14478<sup>[KG00627]</sup> - stock BI14074  
 2 - P{RS3}CB-6372-3 - stock CB-6372-3  
 3 - P{EPgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> - stock BI15557

#### 4.3.1. Ověření místa inserce P-elementů P{RS3}CB-6372-3 ve stocku CB-6372-3, P{Epgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> ve stocku BI15557 a P{SUPorP}CG14478<sup>[KG00627]</sup> ve stocku BI14074

Charakteristika P-elementů:

P{RS3}CB-6372-3 - P-element typu P{RS3}, chromozomální lokalizace 54B16

Přilehlá genomová sekvence: gactactgtg tacttttgtg tagctgctgc agcaaactcg gtcgctttcc  
gatcgaaact gctgcagctg tgtgcctcga aactgctgac tgctgactag ctggggcaaa agtttcaccg g

P{Epgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> - P-element typu P{Epgy2}, chromozomální lokalizace 54B16

Přilehlá genomová sekvence: tgaatttttt tttgtttgt ttcaactttt ttgggggcta cgtacaaacg  
atcacgctca cgacttttcg gctgtctcga tttcaaatt cgttgccgct tcgacttggc aactgttcc tctctattc  
tccgtttctg tgcgctgcgc tgagctgagc tgctccctc tctctccctc tctctggctt atcaaagggc tgacc

P{SUPor-P}CG14478<sup>[KG00627]</sup> - P-element typu P{SUPor-P}, chromozomální lokalizace 54B16

Přilehlá genomová sekvence: ttaactcgct gcacacgcgt aactgggtc gaaacgggtg ctgattgggc  
tctcaatca atttattgac tattccgtg aggggtttc tttaaagca agtacgcaa actcacgggt  
tttcaccgac acacgaatcc gtcttctcgc ac

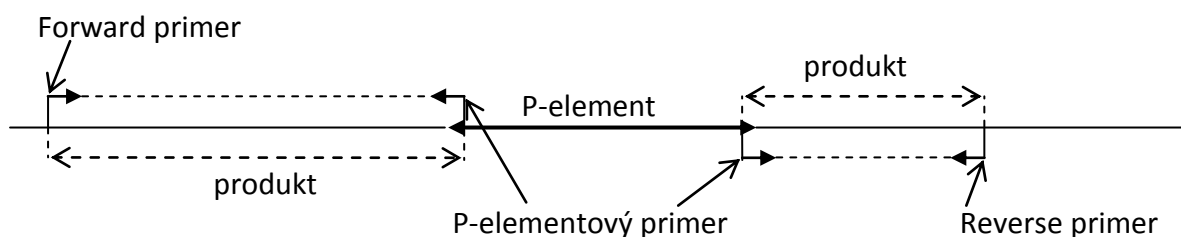
Izolace DNA:

DNA ze stocku CB-6372-3 jsem izolovala podle návodu k Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitek). Kontrolu izolované DNA jsem provedla elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu, k porovnání jsem použila 1kb marker. Koncentraci DNA jsem zjistila měřením absorbance na spektrofotometru při  $\lambda = 260\text{nm}$ . Absorbance po zředění 100x = 0,342. Absorbance = 1 odpovídá koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Z těchto údajů jsem vypočítala koncentraci izolované DNA 1710  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) a naředila jsem ji na koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ).

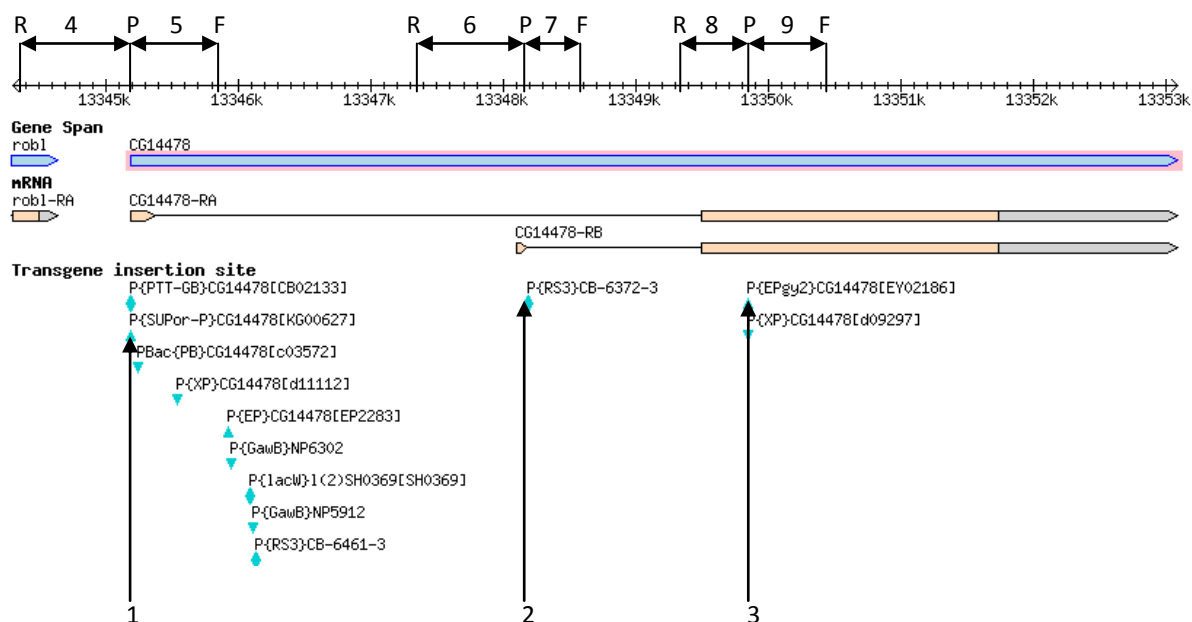
DNA ze stocků 15557 a 14074 jsem izolovala z jedné mouchy z každého stocku. Každou jsem rozdrtila v 50  $\mu\text{l}$  „Squishing bufferu“ (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA), přidala jsem 0,5  $\mu\text{l}$  Proteinázy K (konečná koncentrace 200  $\mu\text{g/ml}$ ) a směsi jsem nechala inkubovat 30 minut při 37°C. Poté jsem inaktivovala Proteinázu K inkubací při 95°C po dobu 2 minut.

Ověření polohy P-elementů pomocí PCR:

Schéma P-elementu a primerů:



Poloha P-elementu a primerů:



Obr. 15: P-elementy: 1 - 14074, 2 - CB-6372-3, 3 - 15557

Primery: F - forward, P - P-elementový, R - reverse

Produkty: 4 - 14074for, 5 - 14074rev, 6 - CB-6372-3for, 7 - CB-6372-3rev, 8 - 15557for, 9 - 15557rev

Ověření místa inzerce P-elementu pomocí PCR:

Reakční směs pro PCR podle návodu TaKaRa:

polymeráza TaKaRa Ex Taq (5 units / $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
10x Ex Taq Buffer	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (2,5 mM)	4 $\mu$ l
templát	<500 ng
primer 1	0,2 – 1,0 $\mu$ M (final conc.)
primer 2	0,2 – 1,0 $\mu$ M (final conc.)
destilovaná voda	doplnit do 50 $\mu$ l



Složení reakčních směsí pro PCR (50  $\mu$ l - 25  $\mu$ l na jednu reakci):

36,25  $\mu$ l destilované H<sub>2</sub>O

5  $\mu$ l pufru

4  $\mu$ l dNTP

2  $\mu$ l templátová DNA

0,25  $\mu$ l polymerázy

1,25  $\mu$ l P-elementového primeru

směs jsem rozdělila na dvě poloviny a do jedné jsem přidala 0,625  $\mu$ l forward primeru

a do druhé 0,625  $\mu$ l reverse primeru

Současně jsem pro stocky 14074 a 15557 provedla pozitivní kontrolu (po 25  $\mu$ l):

16,4  $\mu$ l destilované H<sub>2</sub>O

2,5  $\mu$ l pufru

2  $\mu$ l dNTP

2  $\mu$ l templátové DNA

0,125  $\mu$ l polymerázy

1  $\mu$ l forward primeru a 1  $\mu$ l reverse primeru

Primery: P-elementový univerzální CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG

CB-6372-3 reverse TGACGATTCCTATGCCGACACG

CB-6372-3 forward CAGCCCGGCGCTTATTATCTATCTC

14074 reverse ATGTACGGCAGGCTATGTACCAACG

14074 forward GTGCGATCCAAGAAGCACGAG

15557 reverse GGCACAGAACTGGCACTACG

15557 forward ACAACTGGCACAAACACAGTCAC

kontrola: forward GGAAAGCTGTGAAATAGCCAAG

reverse GCCAGGCAGACAAATCGAAG

Primery jsem si naředila na zásobní koncentraci 200 pmol/ $\mu$ l ( $\mu$ mol/l), do PCR směsi jsem použila primery naředěné na koncentraci 20 pmol/ $\mu$ l.

PCR: Polymerázová řetězová reakce probíhala ve 35 cyklech:

denaturace	94°C	3 min	
	94°C	30 s	←
annealing	63°C	30 s	
elongace	72°C	1 min	—

Předpokládaná délka fragmentů:

CB-6372-3 for - 824b

CB-6372-3 rev - 413b

14074 for - 804b

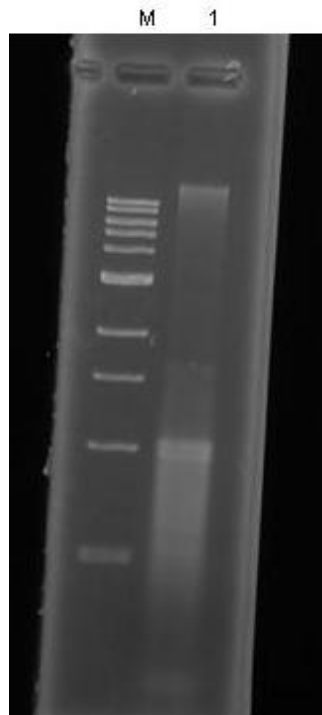
14074 rev - 662b

15557 for - 481b

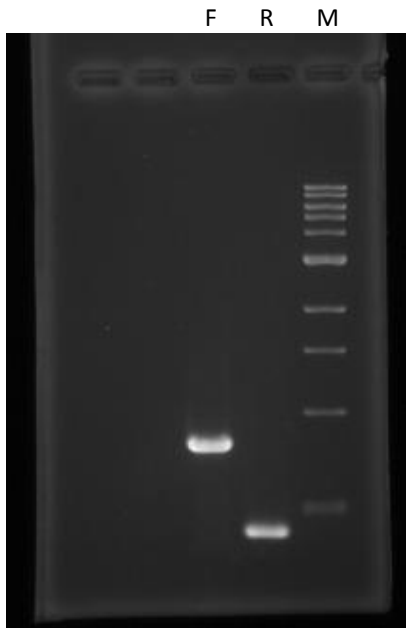
15557 rev - 607b

14074 a 15557 kontrola - 2527b

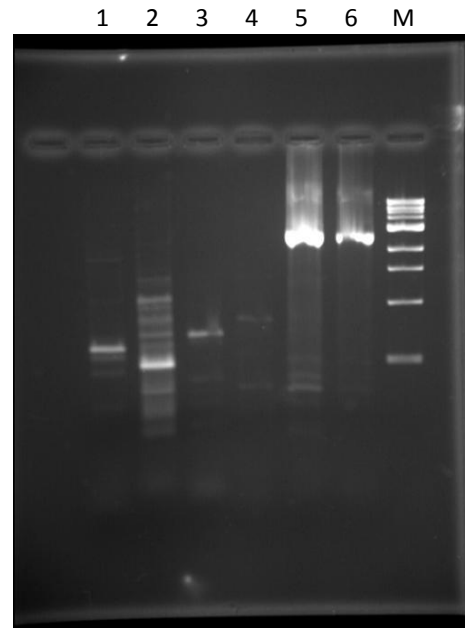
Velikost PCR produktů jsem zkontrolovala elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. Ke vzorkům jsem přidala pufr, na gel jsem nanesla 10  $\mu$ l vzorku. Jako velikostní standard jsem použila 5  $\mu$ l 1kb markeru. Elektroforéza probíhala přibližně 60 min, následovalo obarvení gelu ethidium bromidem a krátké odbarvení.



Obr. 16: Kontrola genomové DNA CB-6372-3  
M - velikostní marker (1kb ladder), 1 - vzorek DNA



Obr. 17: Ověření polohy P-elementu  
M - 1kb marker, F - forward, R - reverse



Obr. 18: Ověření polohy P-elementů  
1 - 15557 rev, 2 - 15557 for, 3 - 14074 rev, 4 - 14074 for,  
5 - 15557 kontrola, 6 - 14074 kontrola, M – 1kb marker

Délka PCR produktů odpovídala předpokládané délce fragmentů, P-elementy se tedy nacházejí na daných místech.

#### 4.3.2. Testování supresorových účinků inzercí P-elementů P{RS3}CB-6372-3 a P{Epgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> v oblasti původní supresorové delece *Df(2R)robl-c*

P-element P{RS3}CB-6372-3 se nachází ve stocku CB-6372-3, P-element P{Epgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> ve stocku 15557.

Podle schématu uvedeného v metodickém přístupu (Obr. 6) jsem si vykřížila mouchy heterozygotní pro P-elementy a homozygotní pro *adgf-a*, ty jsem potom křížila pro získání much s homozygotní inzercí P-elementu a homozygotním *adgf-a*. Dále jsem testovala mouchy s homozygotní inzercí P-elementu bez *adgf-a*, mouchy homozygotní pro *adgf-a*, které byly negativní kontrolou a mouchy heterozygotní pro *adgf-a*, které sloužily jako pozitivní kontrola.

Vykřížené mouchy jsem namnožila a dál jsem postupovala jako v kroku 4.2. Podle exprese GFP jsem vybrala tyto mouchy:

- 1)  $\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3}$  a  $\frac{15557}{15557}$
- 2)  $\frac{CB-6372-3}{+}$ ,  $\frac{adgf-a}{adgf-a}$  a  $\frac{15557}{+}$ ,  $\frac{adgf-a}{adgf-a}$
- 3)  $\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3}$ ,  $\frac{adgf-a}{adgf-a}$  a  $\frac{15557}{15557}$ ,  $\frac{adgf-a}{adgf-a}$

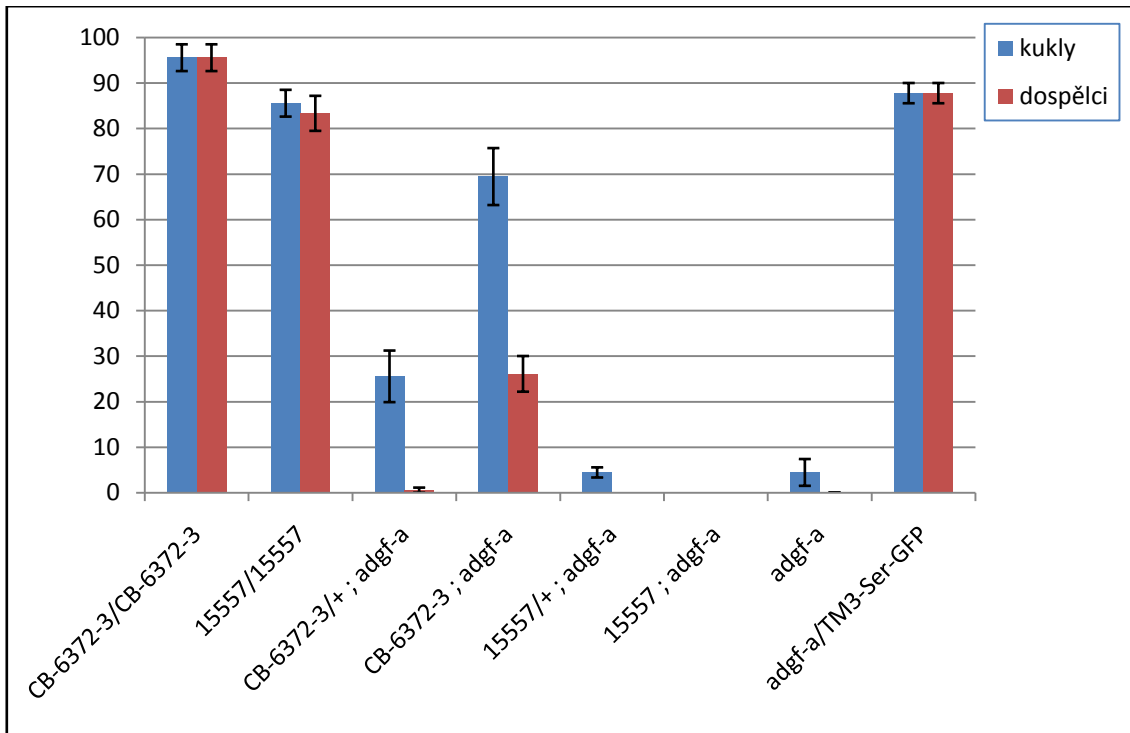
$$4) \frac{adf-a}{adf-a}$$

$$5) \frac{adf-a}{TM3-Ser-GFP}$$

V následující tabulce (Tab. 4) jsou uvedeny výsledky testování supresorových účinků inzercí P-elementů - počty larev daného genotypu přenesených do vialek, počty kukel a dospělců, kteří se ve vialkách vyvinuli. Tato data jsem přepočítala na procentuální podíly a ty jsem spolu se standardními chybami zanesla do Grafu 2.

genotyp	larvy	kukly	dospělci	genotyp	larvy	kukly	dospělci
$\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3}$				$\frac{15557}{15557}$			
	30	30	30		30	27	27
	30	29	29		30	26	25
	30	27	27		30	24	23
$\frac{CB-6372-3}{+} ; \frac{adf-a}{adf-a}$				$\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3} ; \frac{adf-a}{adf-a}$			
	30	9	0		30	24	10
	30	3	0		30	21	6
	30	7	0		30	22	6
	30	10	1		30	16	9
	29	11	0		27	18	6
	28	6	0		29	24	10
$\frac{15557}{+} ; \frac{adf-a}{adf-a}$				$\frac{15557}{15557} ; \frac{adf-a}{adf-a}$			
	30	1	0		30	0	0
	30	1	0		30	0	0
	30	2	0		30	0	0
$\frac{adf-a}{adf-a}$				$\frac{adf-a}{TM3-Ser-GFP}$			
	30	0	0		30	25	25
	30	1	0		30	27	27
	30	3	0		30	27	27

Tab. 4: Výsledky testování supresorových účinků P-elementových inzercí



Graf 2: Výsledky testování supresorových účinků P-elementových inzercí

V Grafu 2 jsou uvedeny procentuální podíly vývoje kukel a dospělců z přenesených larev se standardními chybami:

$\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3}$  - kukly i dospělci 95%

$\frac{15557}{15557}$  - kukly 85%, dospělci 83%

$\frac{CB-6372-3}{+} ; \frac{adgf-a}{adgf-a}$  - kukly 25%, dospělci 0,5%

$\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3} ; \frac{adgf-a}{adgf-a}$  - kukly 69%, dospělci 26%

$\frac{15557}{+} ; \frac{adgf-a}{adgf-a}$  - kukly 4%, dospělci 0%

$\frac{15557}{15557} ; \frac{adgf-a}{adgf-a}$  - kukly 0%, dospělci 0%

$\frac{adgf-a}{adgf-a}$  - kukly 4,5%, dospělci 0%

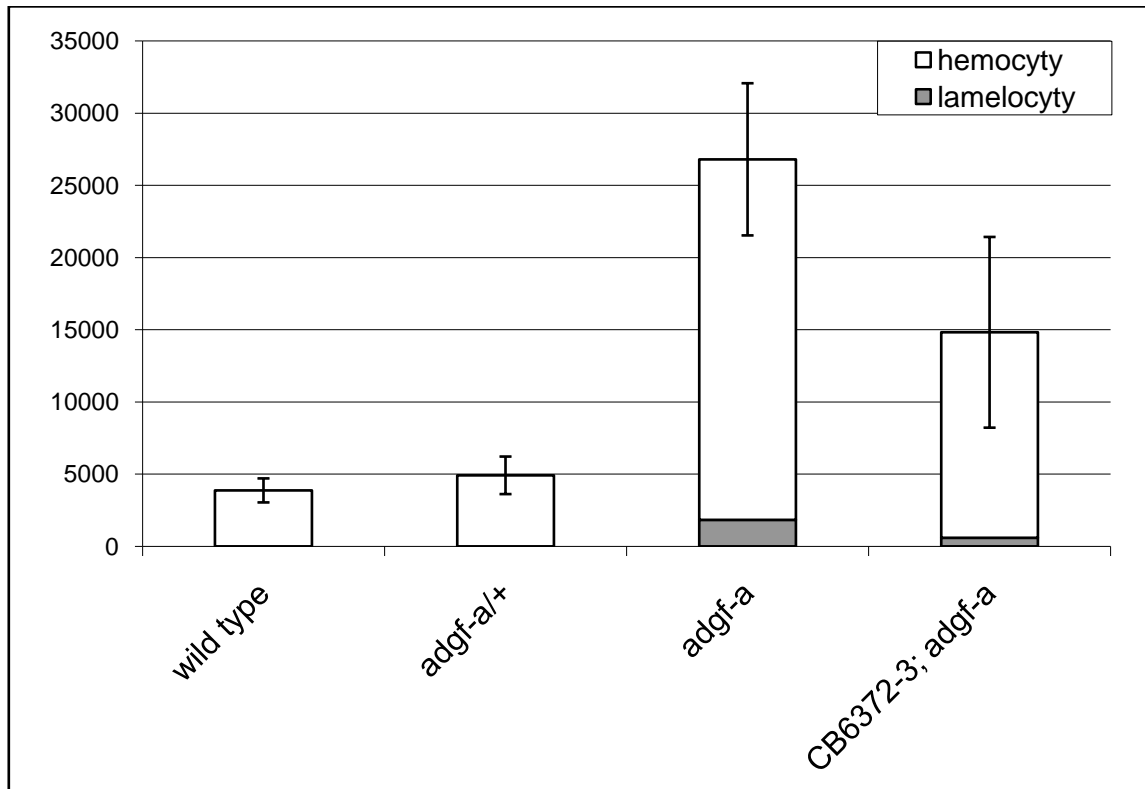
$\frac{adgf-a}{TM3-Ser-GFP}$  - kukly i dospělci 88%

Při testování tedy byly prokázány supresorové účinky inserce P-elementu P{RS3}CB-6372-3.

U much  $\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3} ; \frac{adgf-a}{adgf-a}$  jsem také počítala množství hemocytů (celkem 6x):

Dvě larvy 3. instaru jsem dala do 30  $\mu$ l PBS, roztrhla jsem je, promíchala jsem tekutinu obsahující hemocyty pipetou a 12  $\mu$ l jsem přenesla na hemocytometr. Pod mikroskopem

jsem spočítala počet hemocytů a lamelocytů a přepočítala jsem ho na jednu larvu. Vypočítala jsem průměr a standardní chybu a ty jsem zanesla do Grafu 3.



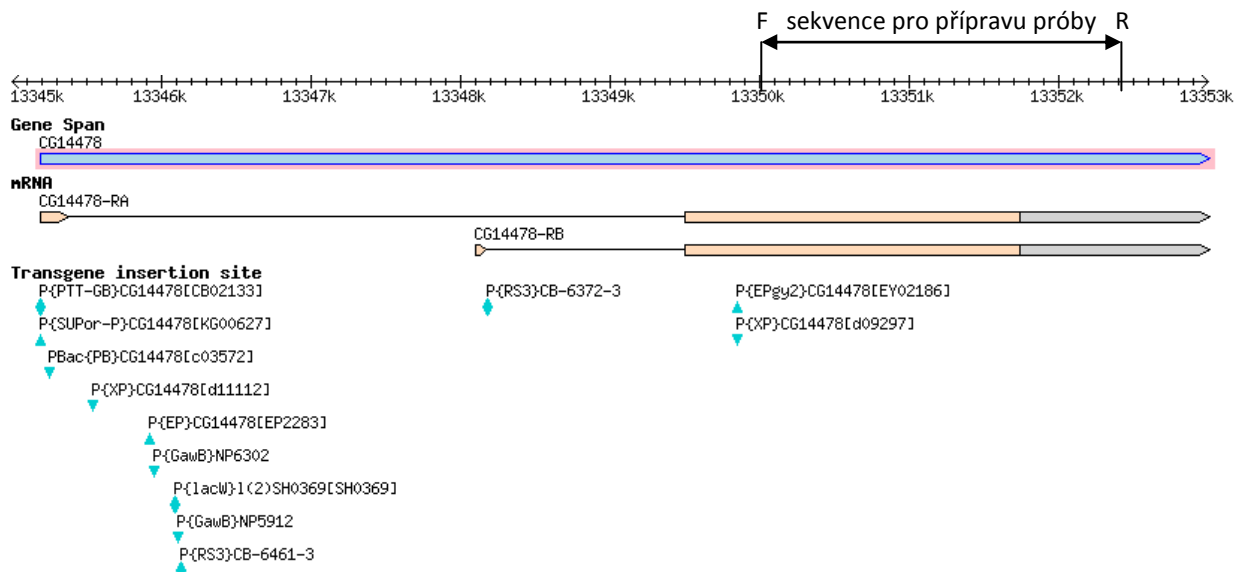
Graf 3: Počet hemocytů a lamelocytů

U mouchy  $\frac{CB-6372-3}{CB-6372-3}$ ;  $\frac{adgf-a}{adgf-a}$  bylo detekováno částečné snížení počtu hemocytů oproti  $\frac{adgf-a}{adgf-a}$ , to ovšem nebylo statisticky zcela významné. Přítomny byly i diferencované lamelocyty, které se vyskytují v *adgf-a* mutantovi.

#### 4.4. Příprava próby pro analýzu exprese genu CG14478 pomocí in-situ hybridizace

Vybraný úsek DNA, nepřerušovaný v RNA a dostatečně dlouhý, jsem zaklonovala do plazmidu pGem<sup>®</sup>-T Easy (Promega). Šlo o úsek z genu CG14478, ze 2. exonu, který je společný pro oba transkripty. Pomocí programu APE jsem si navrhla primery, úsek jsem amplifikovala pomocí PCR a zaklonovala jsem ho do plazmidu, ze kterého bude možné připravit DNA nebo RNA próbu.

#### 4.4.1. PCR amplifikace sekvence pro přípravu próby



Obr. 19: Poloha sekvence pro přípravu próby v genomu, F - forward primer, R - reverse primer

Próbu jsem připravovala z muší genomové DNA (wild type), která již byla vyizolovaná.

Změřila jsem její absorbanci na spektrofotometru, z naměřené hodnoty jsem vypočítala koncentraci 255 ng/μl. Přípravu jsem provedla pomocí PCR:

Složení reakční směsi pro PCR (25 μl):

- 18,2 μl destilované H<sub>2</sub>O
- 2,5 μl pufru
- 2 μl dNTP
- 1 μl templátové DNA
- 0,12 μl polymerázy
- 0,6 μl forward primeru + 0,6 μl reverse primeru

Sekvence primerů:

CG14478 for - AGTGCGTGAGCGTGATCGTTTG

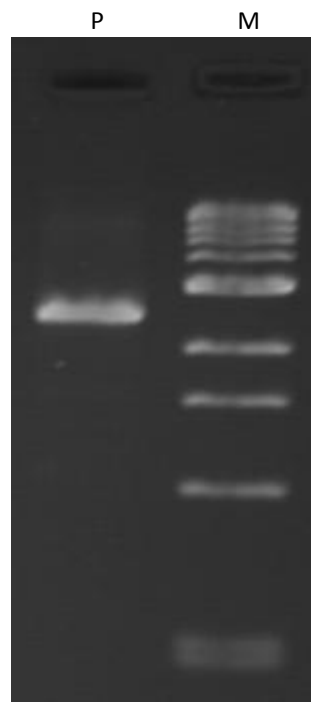
CG14478 rev - TTGTTTGCTTCCTCTGCTCGCTTG

PCR probíhala ve 30 cyklech:

denaturace	94°C	3 min	
	94°C	30 s	←
annealing	60°C	30 s	
elongace	72°C	2 min 45 s	—

Předpokládaná délka produktu: 2424b

Velikost PCR produktu jsem zkontrolovala gelovou elektroforézou.



Obr. 20: Ověření velikosti inzertu: P - PCR produkt (inzert), M – marker (1kb)

Elektroforéza potvrdila očekávanou délku PCR produktu, sekvenci pro přípravu próby se mi tedy podařilo amplifikovat.

## 4.4.2. Ligace a transformace

### 4.4.2.1. Ligace

Ligaci jsem provedla pomocí pGem<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega) - viz obr. 21. Nejdříve jsem si podle návodu spočítala množství PCR produktu (inzertu), které jsem dala do ligační směsi:

$$\frac{50 \text{ ng vektor} \times 2,5 \text{ kb inzert}}{3 \text{ kb vektor}} \times \frac{1}{1} = 42 \text{ ng inzertu} \qquad \frac{1}{1} = \text{poměr } \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}}$$

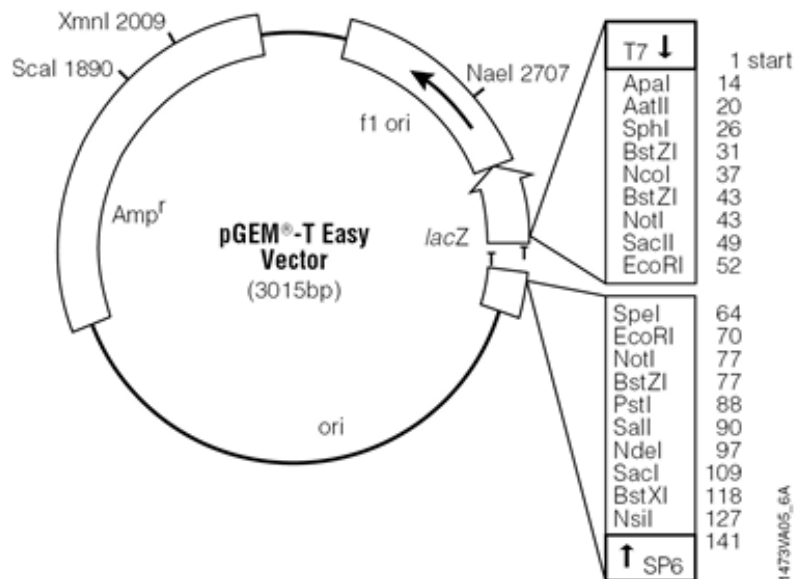
koncentrace PCR produktu, odvozená z proužku na gelu, byla přibližně 15 ng/ $\mu$ l => do směsi 3  $\mu$ l PCR produktu

Složení ligační směsi:

2x Rapid ligační pufr	5 $\mu$ l
pGem (50 ng)	1 $\mu$ l
PCR produkt (inzert)	3 $\mu$ l
T4 DNA ligáza	1 $\mu$ l

Ligaci jsem nechala probíhat 1 hodinu při teplotě 24°C.





Obr. 21: pGEM®-T Easy Vector

#### 4.4.2.2. Transformace

Pro transformaci jsem si připravila Petriho misky s LB médiem (na 100 ml):

75 ml destilované H<sub>2</sub>O

1 g tryptonu

0,5 g kvasničného extraktu

1 g NaCl

Po promíchání jsem změřila pH, pomocí 5N NaOH jsem ho upravila na hodnotu 7.

přidala jsem 2 g agaru

Objem jsem destilovanou vodou doplnila na 100 ml a nechala jsem klávkovat 20 minut při 120°C. Po zchladnutí jsem k médiu přidala 100 µl ampicilinu, nalila jsem do misek.

Transformace:

1. Na ledu jsem nechala rozmrznout kompetentní buňky DH5α, 100 µl jsem přenesla do 1,5 ml eppendorfky.
2. Přidala jsem 10 µl ligační směsi a nechala jsem inkubovat 30 minut na ledu.
3. V termobloku jsem provedla heat-shock po dobu 45 sekund za teploty 42°C, 2 minuty jsem nechala inkubovat na ledu.
4. Přidala jsem 700 µl LB média ohřátého na pokojovou teplotu, dala jsem třepat na 60 minut při 37°C.
5. Mezitím jsem na misky s LB médiem nanasla a rozetřela 40 µl X-gal a 7 µl IPTG.
6. Na připravené misky jsem vysela transformační směs po 100 a 200 µl.

Nechala jsem inkubovat dnem vzhůru při 37°C přes noc.

Plazmid (vektor) nese gen pro rezistenci vůči ampicilinu a gen *lacZ'*, který je částí genu *E. coli* pro enzym  $\beta$ -galaktosidázu. Zbytek genu *lacZ* se nachází v genomu *E. coli*. Proteiny kódované těmito částmi genu spolu mohou vytvořit funkční  $\beta$ -galaktosidázu, která přeměňuje X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) na modrý produkt. *lacZ'* gen obsahuje skupinu restrikčních míst - inserce DNA do některého z nich způsobí přerušení a tím inaktivaci genu a ztrátu  $\beta$ -galaktosidázové aktivity. Rekombinanti pak mohou být snadno rozlišení vyšetím na misky s médiem obsahujícím ampicilin a X-gal.

Všechny kolonie, které na médiu vyrostou, jsou transformované - transformací získaly rezistenci vůči ampicilinu. Kolonie jsou buď modré, nebo bílé. Modré kolonie obsahují buňky s funkční  $\beta$ -galaktosidázou, tedy nepřerušným *lacZ'* genem - nejsou rekombinantní. Bílé kolonie obsahují buňky bez  $\beta$ -galaktosidázové aktivity - jsou rekombinantní.

#### 4.4.2.3. Ověření přítomnosti a orientace fragmentu DNA

Z narostlých bílých kolonií jsem si vybrala 14, které jsem otestovala na přítomnost inzertu.

Ověření jsem provedla pomocí PCR. Složení PCR směsi (150  $\mu$ l):

115  $\mu$ l destilované H<sub>2</sub>O  
15  $\mu$ l pufru  
12  $\mu$ l dNTP  
templátová DNA z kolonie  
primery: T7 3,6  $\mu$ l  
ověřovací (CG14478over) 3,6  $\mu$ l  
0,8  $\mu$ l polymerázy

Vybrané kolonie jsem špičkou přenesla do prázdné eppendorfky a přidala jsem 10  $\mu$ l PCR směsi. Zbytek kolonie jsem přečárkovala na novou misku.

P-elementy:

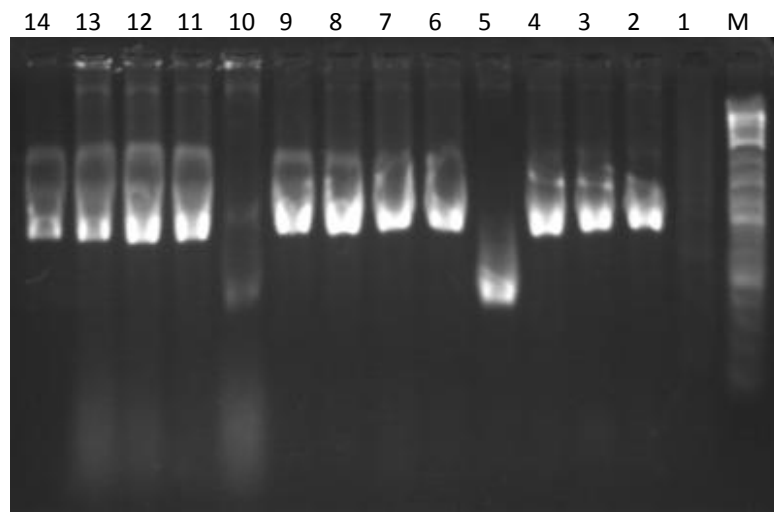
CG14478over	CCAGGATCTTCTCAATGC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

PCR probíhala v 35 cyklech:

denaturace	94°C	3 min
	94°C	30 s ←
annealing	50°C	30 s
elongace	72°C	2 min 45 s —

Předpokládané délka sekvence: 1015b

Velikost PCR produktu jsem zkontrolovala elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. Na gel jsem nanesla po 10  $\mu$ l vzorků s pufrem, jako velikostní standard jsem použila 100b marker.



Obr. 22: Ověření přítomnosti a orientace inzertu  
1-15 - jednotlivé kolonie, M - 100b marker

Pomocí PCR jsem prokázala přítomnost a správnou orientaci inzertu v plazmidu bakterií v koloniích číslo 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 a 14. Vybrala jsem si kolonii č. 2 a s tou jsem dále pracovala.

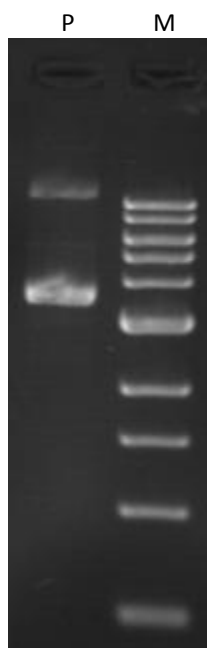
#### 4.4.3. Izolace plazmidu a restrikční štěpení

Bakterie z vybrané kolonie (č. 2 - viz obr. 22) jsem špičkou přenesla do tekutého LB média (3 ml média + 3  $\mu$ l ampicilinu) a nechala jsem je přes noc na třepačce při 37°C.

Izolaci plazmidu jsem provedla podle návodu k Zyppy Plasmid Miniprep II Kit™ (Zymo Research).

Vyizolovaný plazmid jsem ověřila pomocí elektroforézy:

Ke 3  $\mu$ l plazmidu jsem přidala 7  $\mu$ l destilované H<sub>2</sub>O a 2  $\mu$ l pufru, na gel jsem nanesla 10  $\mu$ l. Jako velikostní standard jsem použila 5  $\mu$ l 1kb markeru.



Obr. 23: Izolovaný plazmid  
P - plazmid, M - marker

Podle síly proužku na gelu jsem spočítala koncentraci plazmidu:

125 ng (koncentrace proužku 3kb u 1kb markeru x 5  $\mu$ l) x 1,5 (proužek plazmidu je asi 1,5x silnější) = 187,5 ng

187,5 / 3 (na gel jsem nanesla 3  $\mu$ l plazmidu) = 62,5 ng/ $\mu$ l

Restrikční štěpení:

Štěpení jsem provedla pomocí restrikční endonukleázy SacI.

Restrikční endonukleázy jsou enzymy izolované z bakterií, které specificky štěpí dsDNA - vytvářejí fragmenty definované délky. Sekvence, kterou rozpoznávají, je palindromická - symetrická podle centrálního bodu, dlouhá nejčastěji 4b nebo 6b. Štěpení může být buď asymetrické, při němž vznikají lepivé konce, nebo symetrické, které vede ke vzniku tupých konců.

Směs pro restrikční štěpení:

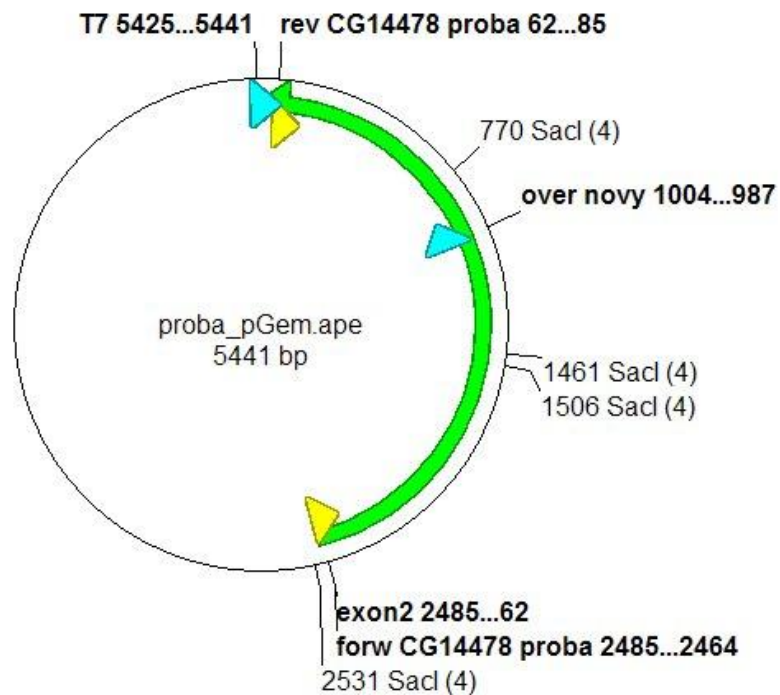
3  $\mu$ l plazmidu

1  $\mu$ l pufru

1  $\mu$ l restrikční endonukleázy SacI

5  $\mu$ l destilované H<sub>2</sub>O

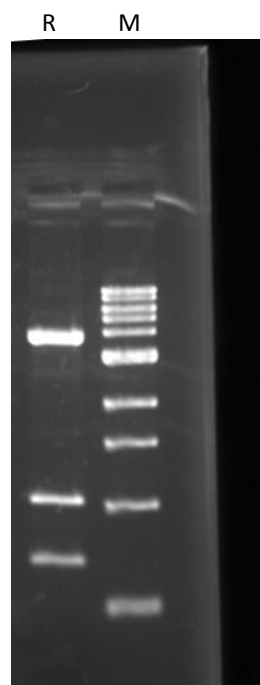
Restrikce probíhala 2 hodiny při teplotě 37°C.



Obr. 24: pGem se zaklonovaným inzertem - obrázek vytvořen programem APE

Ověření délky fragmentů jsem provedla elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. Na gel jsem nanesla 10  $\mu$ l vzorku s puforem, jako velikostní standard jsem použila 5  $\mu$ l 1kb markeru.

Předpokládaná délka fragmentů: 3680b, 1025b, 691b, 45b



Obr. 25: Ověření restrikce  
R - restrikce, M - marker

Elektroforéza potvrdila předpokládanou délku fragmentů, restrikční štěpení tedy proběhlo úspěšně.

## 5. SHRNUÍ VÝSLEDKŮ A ZÁVĚRY

(1) Vytvoření molekulárně definované delece, která se částečně překrývá s původně nalezenou supresorovou delecí *Df(1)Exel6239*:

- Byl úspěšně použit postup *DrosDel* a vytvořena molekulárně definovaná delece v oblasti *Df(1)Exel6239* s poměrně vysokou účinností (delece nalezeny v 1/3 individuálních křížení).
- (Tato delece byla ověřena pomocí PCR a dále použita pro testování supresorových účinků na *adgf-a* fenotyp - bylo zjištěno, že fenotyp zachraňuje => oblast se supresorovými účinky se tak omezila jen na 3 geny: CG3478, CG3446 a *kdn*.)
- Úspěšně použitý postup nám ukázal, že ho je možné v naší laboratoři velmi efektivně využít při detailní analýze zejména rozsáhlejších delecí a urychlit tak identifikaci konkrétních genů.

(2) Otestování molekulárně definované mikrodelece *Df(2L)EXel7024*, která se nachází v oblasti původně nalezené, molekulárně nedefinované supresorové delece *Df(2L)E110*, na supresorové účinky:

- Byl prokázán supresorový účinek testované mikrodelece *Df(2L)EXel7024* a oblast se supresorovými účinky se tak omezila z přibližně 119 na 17 genů (viz str. 15). U takto nízkého čísla je již možné použít pro identifikaci supresoru P-elementové inzerce v konkrétních genech.

(3) Ověření pozice P-elementových inzercí a testování jejich supresorových účinků v oblasti původní supresorové delece *Df(2R)robl-c*:

- V rámci oblasti *Df(2R)robl-c* byl identifikován konkrétní gen CG14478 se supresorovými účinky.
- Byly testovány inzerce P-elementů v tomto genu:
  - Byly ověřeny skutečné pozice vybraných 3 P-elementů - P{RS3}CB-6372-3 ve stocku CB-6372-3, P{Epgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> ve stocku BI15557 a P{SUPorP}CG14478<sup>[KG00627]</sup> ve stocku BI14074, které mohou rozlišit efekt dvou alternativních transkriptů tohoto genu - 1 inzerce specifická pro transkript RA (BI14074), 1 inzerce specifická pro

transkript RB (CB-6372-3) a 1 inzerce pro společnou část transkriptů (BI15557). PCR analýza ukázala, že linie skutečně nesou inzerce v udaných sekvencích.

- 2 vybrané P-elementy byly otestovány na supresorové účinky:

- Inzerce P{RS3}CB-6372-3 (CB-6372-3 - pro transkript RB) zachraňuje *adgf-a* fenotyp - již v heterozygotním stavu, v homozygotním ještě silněji.
- Oproti tomu inzerce P{Epgy2}CG14478<sup>[EY02186]</sup> (15557), společná pro oba transkripty, překvapivě *adgf-a* fenotyp nezachraňuje - v heterozygotním stavu probíhá vývoj přibližně stejně jako u *adgf-a*, v homozygotním stavu je přežívání dvojitých mutantů dokonce sníženo. U inzerce společné pro oba transkripty jsme spíše očekávali, že tato bude fenotyp zachraňovat, narozdíl od inzerce specifických jen pro jeden či druhý transkript, které mohou buď obě zachraňovat nebo jen jedna. Nicméně je nutné konstatovat, že mutace v genomu se mohou chovat nejrůznějším způsobem a že inzerce P-elementu, resp. genetické pozadí linie s touto inzerací, může mít i další neočekávané efekty. Proto bude třeba otestovat i další, jiné mutace v této oblasti, abychom byli schopni rozhodnout o výsledku.
- Inzerce P{SUPorP}CG14478<sup>[KG00627]</sup> (14074 - pro transkript RA) se teprve bude zkoumat, posléze budou výsledky porovnány. Tento test bude velmi zajímavý právě z výše uvedených důvodů, týkajících se společné inzerce.
- Dále bude zkoumána exprese genu - připravuje se próba (viz. níže), zatím společná pro oba transkripty, plánuje se příprava prób pro každý transkript zvlášť a výsledky budou porovnány s výsledky záchran.

(4) Příprava próby pro analýzu exprese genu CG14478 pomocí in-situ hybridizace:

- Byl identifikován konkrétní supresorový gen CG14478 - viz (3) a připravuje se jeho bližší identifikace.
- Sekvence pro přípravu próby společné pro oba transkripty byla úspěšně zaklonována do plazmidu. Ten bude dále použit pro přípravu DNA nebo RNA próby pro in-situ hybridizaci.
- Po otestování dalších P-elementů budou případně připraveny próby specifické pro jednotlivé transkripty.

## 6. LITERATURA

- Aldrich MB, Blackburn MR, Kellems RE (2000) The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 311 - 315
- Bodin P, Burnstock G (1998) Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res* 47: 351 - 354
- Buck LT (2004) Adenosine as a signal for ion channel arrest in anoxia-tolerant organisms. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139(3): 401 - 14
- Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, Roberts JL, Puck JM (1997) Human Severe Combined Immunodeficiency: Genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr* 130: 378 - 387
- Dolezal T, Gazi M, Pavlova E, Bryant PJ (2003) Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 165: 653 - 666
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann Rev Neuroscience* 24: 31 - 55
- Hasko G, Deitch EA, Szabo C, Nemeth ZH, Vizi ES (2002) Adenosine: A potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. *Curr Opin Pharmacol* 2: 440 - 444
- Hershfield MS, Aiyar VN, Premakumar R, Small WC (1985) S-Adenosylhomocysteine hydrolase from human placenta. Affinity purification and characterization. *J Biochem* 230(1): 43 - 52
- Hershfield MS, Mitchell BS (2001) Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: Vogelstein B editor. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. pp. 2585 - 2611
- Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M (2001) Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 230: 243 - 257
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463 - 484
- Richard E, Alam SM, Arredondo-Vega FX, Patel DD, Hershfield MS (2002) Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding



the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 277: 19720 - 19726

Sperlagh B, Doda M, Baranyi M, Hasko G (2000) Ischemic-like condition releases norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips. *J Neuroimmunol* 111: 45 - 54

Zurovec M, Dolezal T, Gazi M, Bryant PJ (2001) ADGFs - Growth factors with enzymatic activity. *A Dros Res Conf* 42: 69

Zurovec M, Dolezal T, Gazi M, Pavlova E, Bryant PJ (2002) Adenosine deaminase - related growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4403 - 4408