

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Katedra molekulární biologie

Bakalářská práce



Studium genů homologických savčím ektonukleotidázám na modelovém organismu *Drosophila melanogaster*



Tomáš KRŮČEK

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

Leden 2009

Bakalářská diplomová práce

Krůček T. (2008): Testování efektu mutací v genech pro ektonukleotidázu (*CG30104*, *CG4827*) na mutantní fenotyp způsobený mutací *adgf-a*. Testování RNA interference genů pro ektonukleotidázy (*CG30104*, *CG11883*, *CG1961*, *CG11126*, *CG4827/49358*, *CG4827/49359*) na molekulární a fenotypové úrovni. Testování efektu RNA interference genů pro ektonukleotidázy (*CG30104*, *CG11883*, *CG1961*, *CG11126*, *CG4827/49358*, *CG4827/49359*) na fenotyp způsobený mutací *cactus*.

Annotation:

Five genes homologous to mammalian ectonucleotidases were studied in model organism *Drosophila melanogaster*. First, effects of P-element insertions in two ectonucleotidase genes *CG30104* and *CG4827* on the *adgf-a* mutant phenotype were tested. Second, RNA interference of all five homologues (*CG30104*, *CG11883*, *CG1961*, *CG11126*, *CG4827*) was induced and effects on molecular and phenotypic level were analyzed. Third, effect of this RNA interference was studied in *cactus* mutant background.

Tato práce byla hrazena z grantu GAAV KJB501410602.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pouze s použitím citované literatury. 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 9. 12. 2008

.....
Tomáš Krůček

Poděkování:

Rád bych poděkovat všem, kteří se na této práci podíleli. Nejvíce bych však chtěl poděkovat svému školiteli, který mi nabídl podílet se na této práci, dal mi spoustu důležitých rad o práci v laboratoři a v neposlední řadě mi také pomohl sepsat tuto práci. Práce na této bakalářské práci by nebyla možná bez ochotného přístupu studentů a všech pracovníků laboratoře nejvíce, však Moniky Žuberové, Michaeli Fenckové a Mileny Novákové. Nakonec děkuji za psychickou podporu své rodiny a přítelkyni.

Obsah

1. Úvod a literární přehled.....	1
1.1. <i>Drosophila Melanogaster</i> jakožto modelový organismus.....	1
1.1.1. Životní cyklus drozofily	1
1.1.2. <i>Drosophila</i> jako modelový organismus v genetice	2
1.1.3. Genom <i>Drosophila</i>	3
1.1.4. Důležité genetické nástroje.....	3
1.2. Adenozin	4
1.3. Adenozin deamináza	5
1.3.1 Ztráta ADGF-A u drozofily.....	6
1.4. Studium úlohy adenozinu	7
1.5. Toll dráha	8
2. Cíle práce.....	10
3. Materiály a metody	11
3.1. Pokusné organismy: <i>Drosophila melanogaster</i>	11
3.2. Získání vajíček a larviček.....	11
3.3.1. Získání larev na izolaci RNA	11
3.3.2. Izolace RNA z <i>Drosophila</i>	12
3.3.3. Měření koncentrace RNA spektrofotometrem	13
3.3.4. RT-PCR.....	13
3.3.4.1. Ošetření vzorků DNase.....	13
3.3.4.2. Syntéza prvního vlákna cDNA.....	14
3.3.4.3. Elektroforéza pro ověření RNA z RT-PCR.....	14
3.3.5. Elektroforézy s PCR vzorky	15
3.3.6. PCR reakce	15
3.3.6.1. PCR na kontrolu funkčnosti primerů.....	15
3.3.6.1.1. PCR	16
3.3.7. PCR na ověření primerů	17
3.3.7.1. PCR ověření P-elementu na genu <i>CG30104</i>	17
3.3.7.2. PCR ověření P-elementu na genu <i>CG4827</i>	17
4. Metodický přístup	19
4.1 P-elementy.....	19
4.2. UAS - GAL4 a RNAi	20

5. Výsledky	22
5.1. Záchrana <i>adgf-a[karel]</i> mutantního fenotypu inzerčními mutacemi v genech potenciálně kódujících ektonukleotidázy	22
5.1.1. Ověření P-elementových inzercí	22
5.1.2. Fenotypové projevy	25
5.1.3. Výsledek pokusu	27
5.2. Ověřování molekulárního efektu RNA interference pěti genů s potenciální ektonukleotidázovou úlohou a fenotypová analýza	27
5.2.1. „Knock-down“ genů pro ektonukleotidázy (NT)	27
5.2.2. Ověření efektu RNAi na molekulární úrovni	29
5.2.3. Kontrola optimální T _m nasedání primerů pro jednotlivé nukleotidázy	30
5.2.4. Testování optimálního počtu cyklů pro RP49	31
5.2.5. Nastavení počtu cyklů pro jednotlivé geny	35
5.2.6. Ověření efektu RNAi pomocí RT-PCR	35
5.2.7. Výsledky pokusu	37
5.2.8. Fenotypový projev RNAi	37
5.2.9. Výsledky pokusu	40
5.3. Efekt vypnutí ektonukleotidáz u nulové a hypomorfní mutace <i>cactus</i>	41
5.3.1. Fenotypový projev RNAi s mutací <i>cactus</i>	41
5.3.2. Výsledky pokusu	45
6. Diskuze	46
6.1. Záchrana <i>adgf-a</i> mutantního fenotypu inzerčními mutacemi v genech potenciálně kódujících ektonukleotidázy	46
6.2. Ověření molekulárního efektu RNA interference pěti genů s potenciální ektonukleotidázovou úlohou a fenotypová analýza	47
6.3. Efekt vypnutí ektonukleotidáz u nulové a hypomorfní mutace <i>cactus</i>	48
7. Závěr	50
8. Použitá literatura	51
9. Přílohy	56

1. Úvod a literární přehled

1.1. *Drosophila Melanogaster* jakožto modelový organismus

Výzkum drozofily započal už na začátku 20. století. Do nejmenších detailů je známa morfologie a vývoj na buněčné úrovni. Dnes se snaží vědci pomocí genetiky popisovat regulační geny a signální kaskády při různých vývojových procesech. Prvním vrcholem byla Nobelova cena udělena za fyziologii a medicínu v roce 1995 Christine Nusslein-Volhardové, Ericu F. Wieschausovi a Edwardu B. Lewisovi, kteří hledali mutace a posléze popisovali geny, účastníci se časného embryonálního vývoje drozofily (Engles W.R. 2000).

Zařazení: *Drosophila melanogaster*

Říše: Animalia (živočichové)

Kmen: Arthropoda (členovci)

Třída: Insecta (hmyz)

Řád: Diptera (dvoukřídlý)

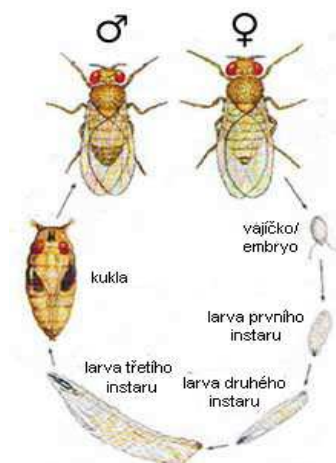
Čeleď: Drosophilidae (octomilkoví)

Rod: *Drosophila* (octomilka)

Druh: *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná)

1.1.1. Životní cyklus drozofily

Drozofila se vyvíjí přes vajíčko, larvu, kuklu až k dospělci (Obr. 1.). Tento vývoj je proměna dokonalá (holometabola). Délka života octomilky je asi 30 dnů při 29 °C. Čas vývoje octomilek je závislý na teplotě. Nejkratší možná doba je 7 dnů, jež je dosaženo inkubací při 28 °C (Ashburner, Thompson 1978; Ashburner a kol. 2005). Při teplotě vyšší než 28 °C se doba prodlužuje v důsledku tepelného šoku, ideální teplotou je 25 °C, při které vývoj trvá 8,5 dnů (Bloomin-gton *Drosophila* Stock Center; Ashburner a kol. 1978; Ashburner 2005). Pokud se požaduje prodloužení vývoje, sníží se teplota. Při 18 °C se vývoj prodlouží na dvojnásobek, a trvá 19 dnů. Vejce jsou dlouhá okolo 0,5 mm a jejich líhnutí začíná 20 hodin po naklazení při 25 °C. Larvální vývoj trvá 4 dny, během nichž se



Obr. 1. Životní cyklus *D. melanogaster*

Pokud se požaduje prodloužení vývoje, sníží se teplota. Při 18 °C se vývoj prodlouží na dvojnásobek, a trvá 19 dnů. Vejce jsou dlouhá okolo 0,5 mm a jejich líhnutí začíná 20 hodin po naklazení při 25 °C. Larvální vývoj trvá 4 dny, během nichž se

larvy 2x svléknou (do 2. a 3. instaru). Vývoj kukly trvá další 4 dny, během nichž prodělá kukla metamorfózu, po které dospělec ukončí vývoj (Ashburner, Thompson 1978; Ashburner a kol. 2005). Při velkém množství drozofil pohromadě se vyvíjejí menší dospělci a čas vývoje se prodlužuje (Chiang, Hodson 1950; Bakker 1961). Samice je schopna množení po 8-12 hodinách po vylíhnutí (Pitnick 1996). Délka úspěšné kopulace je 30 minut, během které samec přesune samici pár stovek spermií, dlouhých 1,76 mm. (Pitnick a kol. 1995). Samice si uchovávají spermie od několika samců, a tyto spermie pak soutěží o oplodnění vajíček (Clark a kol. 1995; Hughes a kol. 1997). Zdá se, že jeden každý z těchto genotypů samčích spermií není vítěz u všech genotypů samic. Některé spermie soutěží lépe o určité genotypy samic (Clark a kol. 1999).

Kuklení larev je po asi 120 hodinách po naklazení vajíček. Samice může naklást až 100 vajíček denně (Obr. 2), ale běžně jich klade 4-15. Panny jsou schopny snášet vejce, která jsou sterilní. Po jednom oplození může samička klást oplozená vajíčka přibližně 6-8 dnů. Klazení je z velké části závislé na teplotě, klazení přestává při teplotě pod 15 °C (Ashburner 1989).



Obr. 2. Vajíčko drozofily

1.1.2. *Drosophila* jako modelový organismus v genetice

Octomilka je jeden z nejvíce studovaných organismů v genetickém, ale i ve fyziologickém výzkumu. Důvodů pro to je několik:

1. Malá a snadno se chová v laboratorních podmínkách.
2. Doba vývoje je krátká, trvá přibližně dva týdny.
3. Velká produkce vajíček (samice s dostatkem potravy je schopna naklást více, než 800 vajíček za celý život).
4. Má 4 páry chromosomů (jeden pár pohlavních chromosomů a tři autozomů).
5. Samci nemají meiotickou rekombinaci, což velmi usnadňuje genetické studie.
6. Ve slinných žlázách dospělých larev se vyskytují polytenní chromosomy.
7. Genom byl osekvenován a poprvé publikován v roce 2000 (Adams 2000) a je přístupný ve Fly base databázi.

1.1.3. Genom *Drosophila*

Genom drozofily je sestaven ze čtyř párů chromosomů, X/Y pár a tři páry autosomů, značené 2., 3., a 4. (je tak malý, a nesoucí jen minimum genů, a je proto málo studován) (<http://www.ceolas.org/fly/intro.html>). Tento seřazený genom, složený ze 120 milionů párů bazí obsahuje přibližně 13,767 protein-kódujících genů, zahrnujících 20% genomu a více než 60% genomu je DNA, která nekóduje žádný protein (Halligan, Keightley 2006).

Okolo 75% známých lidských genových poruch má rozpoznatelnou shodu v genetickém kódování octomilky (Reiter a kol. 2001) a 50% drozofilých proteinů má svou shodu s lidmi.

1.1.4. Důležité genetické nástroje

- **Polytenní chromosomy** - Jde o typ somatických chromosomů, vzniklých mnohonásobnou endoreduplikací. Dochází k ní v raném stádiu vývoje a výsledkem je vznik chromosomů, mající stovky až tisíce neoddělených chromatid. Jde o interfázni chromosomy. Velikost umožňuje snadné pozorování a struktura nabízí identifikaci chromosomových přestaveb a mapování výskytu genů. Polytenní chromosomy popsal Babini v roce 1881 studiem na drozofile. K jejich studiu se využívá hlavně slinných žláz. Hrají důležitou roli v genetickém mapování a uplatňují se v cytogenetice. V databázích se udává údaj pozice všech mutací na polytenním chromosomu.
- **Balancerové chromosomy** - Jde o chromosom s čtenými inverzemi, které znemožňují rekombinaci mezi balancerovým chromosomem a homologickým protějškem. Výsledkem je dosaženo mnohonásobnými zlomy a jejich znovu spojením pomocí radiace. Např. pokud je požadováno udržet linie drozofil s určitou recesivně letální mutací. Ta může být udržena pouze v heterozygotním stavu, což je bez balancerového chromosomu obtížné. Většina balancerových chromosomů je v homozygotním stavu letální a nese vždy nějaký marker pro rozeznání. Pokud by tato mutace nebyla spojena s markerem, bylo by její udržení prakticky nemožné bez přítomnosti balancerového chromosomu. Existují balancerové chromosomy pro všechny tři chromosomy, kromě čtvrtého. Usnadnění práce je i díky balancerům s GFP.
- **Markry** - Jde o možnost, jak pomocí těchto mutací rozeznat genotypy. Pomáhají značit chromosomy, které buď hledáme, nebo je chceme s jejich pomocí ztratit. Markry mají lokace v různých částech těla: barva oka, tvar křídel, tvar chlupů, pigmentace

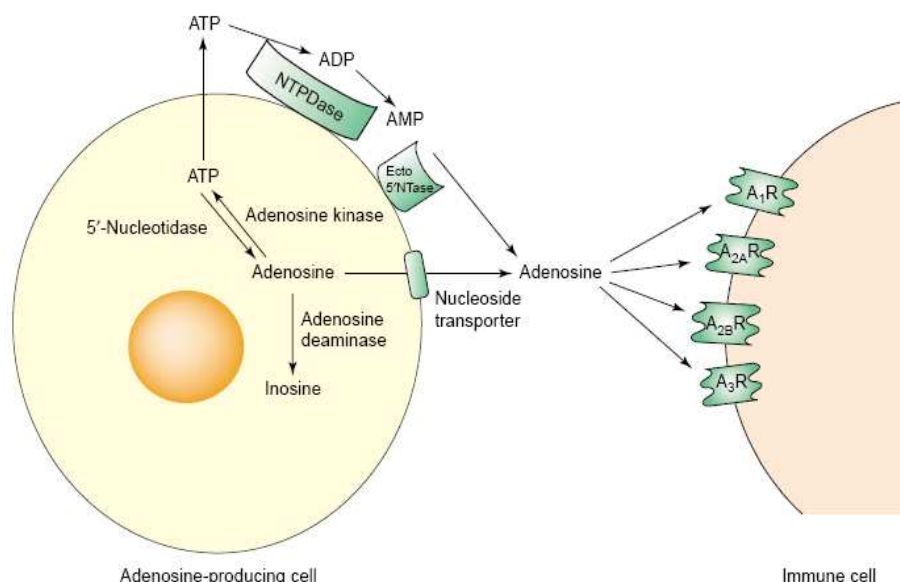
kutikuly, atd. Popis kurantních fenotypů můžeme najít v Lindsley a Zimm (1992), nebo v internetové verzi FlyBase Consortium 2003.

- **P-elementy** - Jde o transpozony o délce 2,9 kb, které nesou 4 exony potřebné pro syntézu funkční transponázy a mají 31 bp dlouhé invertované terminální repetice (nutné, aby došlo k vystřížení a začlenění transpozonu do chromosomu). P-elementy se využívají jako přenašeči DNA sekvencí. Cílená mutagenese pomocí P-elementů představuje nedokonalý nástroj, protože se jedná o náhodný proces (Engles W.R. 2000).

1.2. Adenozin

Adenozin je endogenní purinový nukleosid. Má významnou roli ve fyziologické regulaci uvnitř a vně buněk. Intracelulární adenosin slouží jako strukturní komponenta nukleových kyselin. Extracelulární adenozin hraje roli v neuromodulaci (Dunwiddie a Masino 2001), vasokonstrikci, při uvolňování hormonů (Nyce 1999), jako stresový hormon, uvolňovaný do okolí imunitních buněk během systémového a buněčného stresu (Hasko a kol. 2002) a jako imunitní modulátor. Adenozin vytváří ochranu dvěma způsoby: snižuje energetický nárok tkání a nepřímo chrání tkáně zajištěním příznivého vnitřního prostředí, např. vasodilatací (Hasko G. a Cronstein B.N. 2004).

Adenozin je buď uvolňován z buněk, nebo je zformován extracelulárně. V této formě se váže na specifické adenozinové receptory (Ralevic a Burnstock 1998; Fredholm a kol. 2001). Jsou čtyři typy (A1, A2a, A2b, A3) těchto G-protein spřažených receptorů u savců (Fredholm a kol. 2001) regulujících cAMP v buňce (Latiny a Pedata 2001). Extracelulárně je adenozin v malém množství. Zvýšení jeho hladiny může být stimulováno například hypoxií (Buck 2004), nebo vlivem zánětlivých stimulů, kterými mohou být bakteriální a houbové produkty (Bodin a Burnstock 1998).



Obr. 3. Cyklus adenzinu (Pastor-Anglada M. a kol. 2001)

Intracelulárně je adenzin vytvářen purinním metabolismem při tkáňové hypoxii, nebo ischemii. Jakmile hladina adenzinu v buňce dosáhne vyšší koncentrace, je pomocí nukleosidových transportérů přenášen ven z buňky (Pastor-Anglada a kol. 2001).

Významnější cestou ke zvýšení extracelulárního adenzinu je metabolický stres spojený s uvolněním prekurzorů adeninových nukleotidů (ATP, ADP a AMP) z buněk. Nukleotidy jsou následně extracelulárně katabolisovány, pomocí kaskád ektonukleotidáz [CD 39 nukleoside triphosphate dedephosphorylase (NTPD) a CD73 (5'-ectonucleotidase)] na adenzin. Tento adenzin je dále katabolisován na inozin pomocí adenosin deaminázy a konečným stabilním produktem je kyselina močová (Hasko G. a Cronstein B.N. 2004).

Hlavními producenty extracelulárního adenzinu jsou endoteliální buňky a neutrofilové, které ho uvolňují do míst zánětu a stresu (Cronstein 1994). A také nervová zakončení v místech ischemie jsou nezanedbatelným zdrojem (Sperlagh a kol. 2000).

1.3. Adenzin deamináza

Adenzin deaminázy (ADA) jsou metabolické enzymy katalyzující ireversibilní deaminaci nukleosidů adenzinu a deoxyadenozinu na inozin a deoxyinozin. ADA se vyskytují v rozpuštěné formě jako monomery ve všech lidských buňkách, ale také jako „ekto-ADA“ vázané na membránový glykoprotein CD26/dipeptidyl peptidázu IV a v této formě reguluje úroveň extracelulárního adenzinu (Richard a kol. 2002).

Základní komponenty adenzin deamináz se nacházejí ve všech organismech (Chang a kol. 1991). Jsou známy dvě rodiny adenzin deamináz v Metazoa. První bona fide adenzin

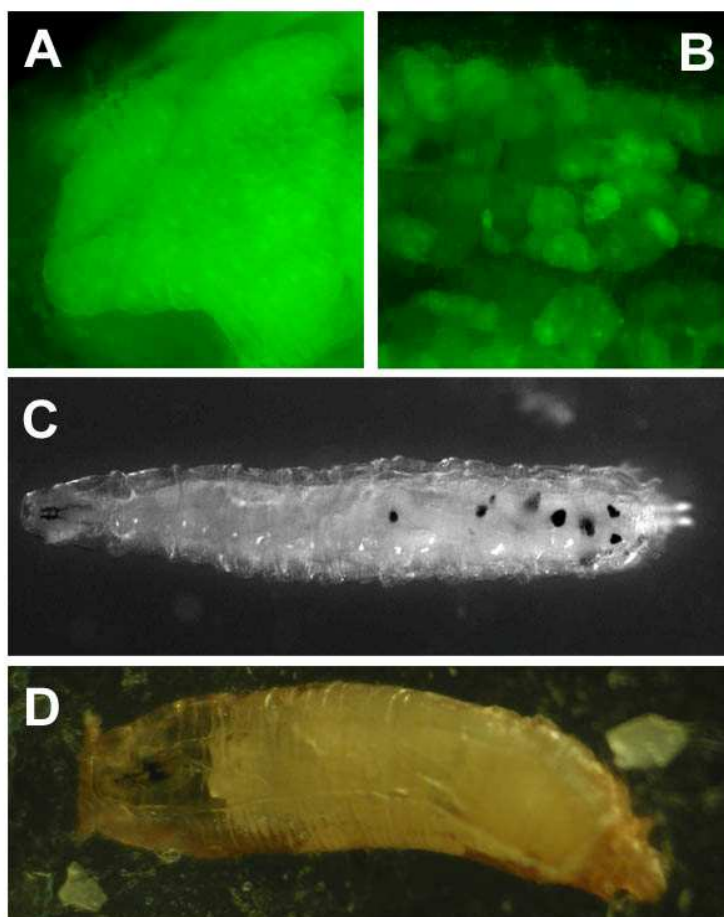
deaminázy jsou proteiny nalezeny ve všech zkoumaných organismech (člověk, *D. melanogaster*, myš, *Culex elegant* a *S. cerevisiae*) (Giblett a kol. 1972). Druhou rodinou je ADGF, nazývaná také ADGF/CECR1 a mnoho z těchto proteinů má adenosin deaminázovou aktivitu (Charlab a kol. 2001; Žurovec a kol. 2001). Tyto enzymy byly mimo jiné nalezeny u drozofily (Maier a kol. 2001) a člověka (Riazi a kol. 2000). Lidský gen této skupiny je CECR1 (Cat Eye Critical Region 1), lokalizovaný na 22. chromozomu (Riazi a kol. 2000). Diptera obsahují neobvykle vysoké množství ADGF genů. Šest ADGF genů a jeden bona fide ADA byly nalezeny v drozofilím genomu (Charlab a kol. 2000).

Důkladnější studie exprese ADGF genů se prováděly na drozofile (Maier a kol. 2001; Žurovec a kol. 2002). Zjistilo se, že adenosin deaminázy jsou produkovány geny ADGF/CECR1 rodiny, a jednoduchý ADA gen z bona fide rodiny ukazuje jen na malou všudypřítomnou expresi. Nejvíce exprimovanou formou je ADGF-A ve střevě a lymfatických žlázách jak v larvách, tak v dospělci (Žurovec a kol. 2002) a slabě v imaginálních discích (nepublikováno). ADGF-D je druhá nejvíce produkována forma v tukovém tělese, mozku s vrcholem exprese u dospělci. Adenosin deaminázové aktivity ADGF-A a ADGF-D jsou zásadní pro jejich mitogenní efekt na drozofilí S2 buňky embrya a C18 buňky imaginálního disku (Žurovec a kol. 2001, 2002). ADGF-C se vyskytují hlavně u samců, u kterých se exprimuje s překryvem s ADGF-D. ADGF-B a ADGF-E a ADGF-A2 jsou exprimovány pouze u samců. Exprese těchto tří posledních genů slouží nejspíše jako ochrana varlat před adenosinem/deoxyadenosinem. U lidí je ADA aktivita nalezena u všech zkoumaných tkání, nejvíce však ve vnitřnostech, lymfatických uzlinách a brzlíku (Hershfield and Mitchell, 2001). Většina adenosin-deaminázové aktivity je připisána bona fide ADA z 20. chromosomu (Daddona a Kelly 1981). Poškození lidské ADA vede k nárůstu ADA produktů adenosinu a deoxyadenosinu a má škodlivý vliv na lymfocyty a vede k „Severe Combined Immunodeficiency Disease“ (SCID) (Blackburn a kol. 1998, Hershfield a Mitchell 2001).

1.3.1 Ztráta ADGF-A u drozofily

Přinejmenším některé proteiny z ADGF rodiny jsou nezbytné pro přežití drozofily. Ztráta nejvýznamnější ADGF-A vede ke smrti ve stádiu larvy. Mutace *adgf-a* získaná homologní rekombinací (Doležal a kol. 2003) vede k dramatickému nárůstu adenosinu a deoxyadenosinu v larvální hemolymfě a následně ke smrti ve stádiu larvy, nebo kukly. U larev třetího instaru je patrné rozpadlé tukové těleso (Obr. 4A a 4B) a tvorba melanotických tumorů (Obr. 4C, 4D). Okolo 60% homozygotů pro *adgf-a* dosáhne třetího instaru, během kterého je

vývoj značně zpomalený a vylézání těchto homozygotních larev je o dva dny opožděno oproti heterozygotům, kteří lezou pátý den. Méně než 30% larev dosáhne stádia kukly a méně než 1% dosáhne úplného dospělého stádia. Tyto projevy jsou spojené s velkým uvolňováním hemocytů z lymfatických uzlin a jejich diferenciací. Larvy třetího instaru mutantu *adgf-a* obsahují 7x více hemocytů oproti wild type (Doležal a kol. 2005).



Obr. 4. Foto A,B,C,D

1.4. Studium úlohy adenosinu

Jednou možností, jak potlačit efekt zvýšeného adenosinu je použití mutantu v adenosinovém receptoru, *adoR* (Doleželová a kol. 2007). Záchrana *adgf-a* mutantního fenotypu pomocí mutace v *adoR* naznačuje, že významná část fenotypu je způsobena signálním efektem extracelulárního adenosinu (Doležal a kol. 2005). Další možností je užití genetického skríníngu pro nalezení dominantních supresorů *adgf-a* fenotypu. K tomuto účelu byl použit „Bloomington deficiency kit“ (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df-dp/dfkit-info.htm>).

Takto bylo prozkoumáno asi 70% chromosomů X a II a následně identifikováno 11 oblastí nesoucí dominantní supresory *adgf*-a fenotypů (Doležal a Žuberová, nepublikováno a Tab. 1).

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

Tab. 1. Oblasti s geny modifikujícími *adgf*-a fenotyp

Předchozí práce také ukázala, že ADGF-A interaguje s hlavním modulátorem imunitních reakcí, Toll signalizací. Toll signalizace pravděpodobně vede ke zvýšení hladiny adenosinu (zejména u stále aktivované Toll signalizace způsobené mutací v regulačním proteinu *cactus*) a následnému zvýšení exprese ADGF-A (Doležal nepublikováno), zvláště v larválních hemocytech (Irving a kol. 2005). To, že vlivy adenosinu v Toll signalizaci jsou způsobené extracelulární formou je ukázáno na záchraně *adoR* mutace (Fencková a Doležal 2007).

1.5. Toll dráha

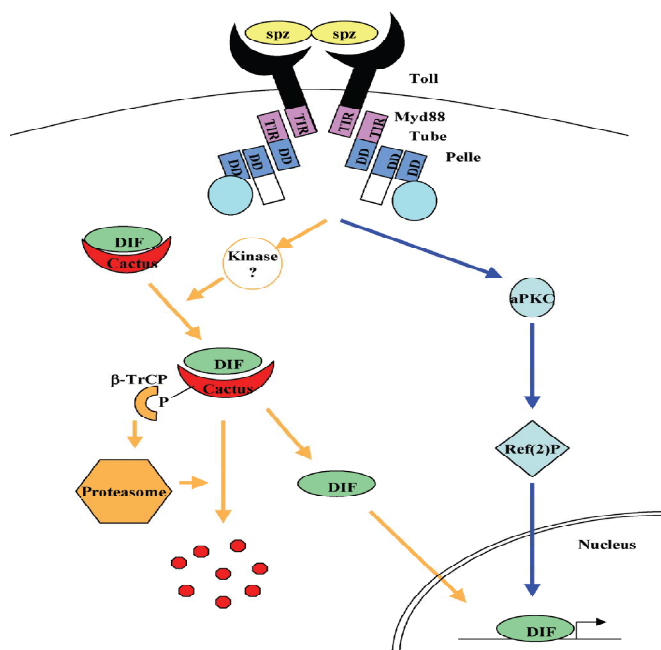
Toll dráha byla původně identifikována pro její roli v organizaci dorzoventrální osy u embrií drozofily a následně pro její zapojení v imunitní odpovědi u dospělců (Lemaitre a kol. 1996; Horng a Medzhitov 2001; Tauszig-Delamasure a kol. 2002).

Hlavní drozofilí imunita spočívá v produkci antimikrobiálních peptidů (AMPs) tukovým tělesem a sekretovaných do hemolymfy (Leclerc V., Reichhart J.M. 2004). Drosomycin a metchnikowins jsou namířeny proti houbám a defensin proti Gram pozitivním bakteriím (Lemaitre a kol. 1997). Houby a gram pozitivní bakterie indukují tvorbu

drosomycinu a stovek dalších genů přes „Toll dráhu“ (Lemaitre a kol. 1996; Rutschmann a kol. 2002).

Rozpoznání a aktivace Toll dráhy (Obr. 5) se děje pomocí „pattern recognition receptors (PRRs)“, které jsou imunními proteiny, rozpoznávající součásti mikroorganismů (Janeway 1989). Jsou nalezeny buď volně cirkulující v hemolymfě, nebo na povrchu imunokompetentních buněk (Medzhitov a Janeway 1997). V drozofile jsou identifikovány dvě rodiny těchto PRRs: „The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) a the Gram-negative binding protein(GNBPs)“ a oba proteiny rozpoznají součásti gram-positivních bakterií a v takto utvořeném komplexu aktivují Toll dráhu. Toll je transmembránový protein obsahující intracelulární doménu Toll/IL-1 (TIR). V drozofilím embryu je Toll aktivace spuštěna kaskádou serinových proteáz (Gastrulation defectie, Snake a Easter) (LeMosy a kol. 2001; DeLotto Y a DeLotto R 1998). Tato kaskáda je ukončena rozštěpením proteinu Spaetzle (spz) na dvě molekuly, pojící se s dvěma molekulami Toll (Weber 2003). Tato dimerizace vede k posílení komplexů složených z Myd 88, Pelle a Tube. Výsledkem heterotrimetrického komplexu je aktivace Pelle kinázy a posléze hydrolýza cactus inhibitoru (Geisler a kol. 1992). Aktivita Pelle kinasy vede k degradaci cactus. (Towb a kol. 2001; Hecht a Anderson 1993).

Degradace cactus je nezbytná, protože jinak je vázaný a inhibuje NF- κ B/Rel transkripční faktor, zadržením v cytoplasmě. Genom drozofily obsahuje tři geny, kódující Rel proteiny, jenom *Dorsal* a *Dorsal-related immunity factor* (DIF) jsou však signály vycházející z Toll dráhy (Geisler R a kol. 1992; Nusslein-Volhard a kol. 1980; Ip a kol. 1993; Dushay a kol. 1996). Hydrolýza proteinu cactus vede k uvolnění *Dorsal* a DIF, které vstoupí do jádra a aktivují expresi antimikrobiálních peptidů (Tauszig-Delamasure a kol. 2002; Belvin a Anderson



Obr. 5. Toll dráha (Weber A.N., a kol. 2003)

1996; Nicolas a kol. 1998). Od napadení mikroby započne melanizační reakce (Soderhall a

Cerenius 1998) a indukce AMPs je velmi rychlá. Peptidy mohou být nalezeny v hemolymfě už 2-4 hodiny po infekci (Meisner a kol. 1997).

2. Cíle práce

1. Ověřit pozice inzercí P-elementů do dvou drozofilích genů (*CG 30104* a *CG 4827*) homologických se savčími ektonukleotidázami a testování jejich efektů na mutantní fenotyp podmíněný ztrátovou mutací v genu *ADGF-A* (mutace *adgf-a[karel]*).
2. Vypnout postupně pomocí RNA interference všech pět genů homologických se savčími ektonukleotidázami (*CG30104*, *CG11883*, *CG1961*, *CG11126*, *CG4827*), molekulárně ověřit RNAi pomocí semikvantitativní RT-PCR a sledovat fenotypový projev.
3. Testovat hypotézu, že aktivace Toll dráhy mutací *cactus* vede mimo jiné ke zvýšení hladiny extracelulárního adenosinu ektonukleotidázami, a to pomocí sledování efektu RNAi ektonukleotidáz v nulovém a hypomorfním mutantu *cactus*.

3. Materiály a metody

3.1. Pokusné organismy: *Drosophila melanogaster*

Použité markery a balancery: balancer CyO - marker „Green fluorescent protein“ (GFP)

marker Scutoid (Sco)

balancer TM3 – Stubble (Sb)

balancer TM3 - marker Serrate (Ser) GFP

balancer TM6B – marker Humerus (Hu) a Tubby (Tb)

Použité linie much včetně genotypů viz. Příloha č. 6.

3.2. Získání vajíček a larviček

Na čistou Petriho misku spolu s agarózovým gelem (4% Agar Bacteriological Scharlau) a nátěrem kvasnic se nechaly křížení much vyklást ve válcích, po dobu dvou hodin. Poté byly mouchy přendány na čistou misku s čerstvým nátěrem kvasnic. Válce s mouchami byly uloženy na 4 hodiny do temna při teplotě 25 °C. Nakladená miska se ponechala v prostředí s teplotou 25 °C. Po 22 hodinách od naklazení byla polovina vajíček promyta lihem a druhá pouze vodou (jen u pokusu s testováním P-elementových inzercí nebyla polovina vajíček promyta lihem, při všech dalších pokusech vždy došlo k promytí) a přendány na čisté agarové misky. Po uplynutí 24 hodin od naklazení byly larvičky požadovaných genotypů vybírány podle exprese GFP pod stereo-mikroskopem s modrým světlem. Mouchy s markrem GFP byly zeleně svítící. Vybírané larvičky se umísťovaly do vialek s dietou pro octomilky {120 g kukuřičná mouka, 1,2 l H₂O, 15 g agar, 75 g cukr, 60 g instantní kvasnice, 25 ml konzervant [10% methylparaben (Sigma)] v etanolu}. Počty vybíraných jedinců na vialku viz. tabulky v přílohách. Dále u těchto larev proběhlo kontrolování počtů zakuklených larev a dospělců s časovým rozestupem jednoho dnu. U testování efektu RNA interference genů pro ektonukleotidázy (*CG30104*, *CH11883*, *CG1961*, *CG11126*, *CG4827/49358*, *CG4827/49359*) na fenotyp způsobený mutací *cactus* byly získané kukly vyfoceny viz. snímky v části s výsledky.

3.3.1. Získání larev na izolaci RNA

Nejdříve byly mouchy křížení $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{5NT(TM6B)} \times \frac{+}{+}; \frac{Act\ Gal4}{TM6B}$ a oregon (jako kontrola) nechány vyklást na misky s agarem (4% Agar Bacteriological Scharlau) a pastou z kvasnic, aby vykladly případná starší vajíčka. Poté byly nechány klást od čtrnácté do osmnácté hodiny

na čisté misky opět s kvasničnou pastou. Tato vajíčka byla standardním způsobem promyta po 22 hodinách lihem a rozetřena na čistou agarovou misku. Aby se předešlo přítomnosti starších jedinců, byly vybírány larvičky od 24. – 28. hodiny po naklazení. Přibližně 500 larev od každého genu a oregona, bylo rozděleno po 50 jedincích do vialek s dietou pro octomilky. Larvy staré 110 – 114 hodin (ve stádiu 3. instarů) použity na izolaci RNA. RNA byla získána z oregona, $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act\ Gal4}$ a ze stejného křížení z $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$ (jako kontrola). Později byla tato RNA pomocí reverzní transkripce převedena na cDNA.

3.3.2. Izolace RNA z *Drosophila*

Chemikálie: Trizol (Invitrogen), chloroform, izopropanol, 75% ethanol, DEPC H₂O, Ringer (na 1l: 6 g NaCl, 0,075 g KCl, 0,01 g CaCl₂, 0,1 g NaHCO₃ a doplněno destilovanou vodou). Při práci s RNA musí být dodržována čistota v podobě ošetření proti RNázám, pracovní prostor byl ošetřen jarem, destilovanou vodou a DEPC H₂O a také všechny nástroje byly ošetřeny DEPC H₂O, popřípadě RNaseZap (Ambion). Při práci je používání rukavic nutností.
Postup:

1. Na jednu izolaci použito \cong 50 - 100 μ g živočišné tkáně (75 larev).
2. Larvy byly vybírány pomocí Ringer roztoku a v něm byly také následně očištěny.
3. Larvy byly rozděleny po 35 do dvou 1,5 ml mikro zkumavek (Eppendorf, epp.) (RNase-free) a uloženy na led.
4. Po přidání 0,5 ml Trizolu do 1 epp. byly larvy homogenizovány homogenizátorky, vyrobenými ze špiček, pokud bylo potřeba larvy krátce stočeny.
5. Inkubace byla provedena 5 min. při pokojové teplotě (RT).
6. Centrifugace 1200g 10 min. na 4 °C.
7. Supernatant byl přelit do čisté epp. Oba vzorky se 35 larvami byly slity dohromady.
8. Inkubace 5 min. při RT.
9. Přidáno 200 μ l chloroformu/na 1 ml Trizolu.
10. Vzorek byl protřepán a poté inkubován při RT 15 min.
11. Centrifugace 1200g 15 min. na 4 °C.
12. Horní vodní fáze supernatantu byla přenesena do nové epp.
13. Přidáno 0,5 ml izopropanolu na 1 ml Trizolu.
14. Promícháno a inkubace při RT 10 min.
15. Centrifugace 1200g 8 min. na 4 °C.

16. Supernatan odlit.
17. RNA omyta 1ml 75 % ethanolu/ 1ml Trizolu
18. Vortex a poté centrifugace 7500g 5 min na 4 °C.
19. Ethanol slit, a promytí ethanolem bylo zopakováno ještě jednou i s následnou centrifugací.
20. Ethanol znovu slit a zbývající odpipetován od peletu, poté pelet osychal po dobu 5-10 min, ale nesměl přeschnout.
21. Pelet byl rozpuštěn v 200 μ l DEPC H₂O a inkubován 10 min na 55 °C.

3.3.3. Měření koncentrace RNA spektrofotometrem

Jako slepý vzorek byla použita PCR H₂O a vzorky vyizolované RNA byly naředěny (1 μ l vzorku do 99 μ l PCR H₂O).

Koncentrace byla měřena při vlnové délce 260 nm.

Je-li absorbance rovna 1 při 260 nm, pak je koncentrace RNA rovna 38 μ g/ ml.

3.3.4. RT-PCR

3.3.4.1. Ošetření vzorků DNase

Bylo pracováno s RNA, proto byly dodrženy stejné podmínky ohledně čistoty, jako u izolace RNA. Práce byla opět prováděna na ledu, pokud není psáno jinak.

Nejdříve bylo potřeba určit množství přidané RNA, pomocí absorbance při 260 nm na spektrofotometru, pokud víme, že požadovaná výsledná koncentrace je 10 μ g RNA/50 μ l DEPC H₂O.

1. Rozpočítání potřebných objemů jednotlivých reagensů na celkový objem 50 μ l
Směs: Pokaždé bylo přidáno 5 μ l pufru (10x), 1 μ l Turbo Dnase (Ambion), vypočtený objem vzorku RNA a doplněno do 50 μ l DEPC H₂O
2. Po namíchání tohoto roztoku byla provedena inkubace po dobu 30 min. při 37 °C
3. Inkubace 10 min. na 75 °C
4. Precipitace 2,5 v ethanolu/ 100% ledový
5. 10 min. inkubace na ledu
6. 20 min. centrifugace na maximum při 4 °C
7. Vzorky byly promyty 75% ethanolem, poté stočeny 10 min. a následně vysušeny

8. Pokračování 1ST řetězcovou syntézou RT-PCR

3.3.4.2. Syntéza prvního vlákna cDNA

1. V RNase - free epp. se smíchalo:
 - 1 μl primeru oligo-dT
 - 5 μg total RNA
 - 1 μl 10 mM dNTPs (TaKaRa)
 - dd H₂O do 13 μl
2. Zahřáto 5 min. na 65 °C.
3. Inkubace na ledu 1 min.
4. Vzorky krátce stočeny a přidáno:
 - 4 μl 5x First Strand buffer (5x Invitrogen)
 - 1 μl 0,1 M DTT (0,1M Invitrogen)
 - 1 μl RNase Out (Invitrogen) - pouze do + vzorků
 - 1 μl Superscript III Reverse Transkriptase (200U/μl Invitrogen) - pouze do + vzorků

Pipetováním se vše promíchá.

5. Inkubace 60 min na 50 °C
6. Reakce zastavena zahřátím na 70 °C 15 min.
7. K odstranění RNA přidáno 0,3 μl RNázy H (TaKaRa) a inkubováno 20 min. na 37 °C.

3.3.4.3. Elektroforéza pro ověření RNA z RT-PCR

1. Namíchání vzorků pro nanesení na gel: Výsledný objem na jamku činí 12 μl
 - 1) 2 μl 6x loading buffer (0,025% bromphenol blue + 30% glycerol ve vodě)
 - 2) Koncentrace vzorků potřeba 2 μg (μl), nutno dopočítat z koncentrace vzorků [c (výsledná) = 2/c (vzorků)]
 - 3) Doplnit na 12 μl DNA H₂O, nanesení vzorků do jamek gelu (1,5% Agarose Serva Premium), zalitého 1x TAE pufrem [20 ml 50x TAE k 980 ml destilované H₂O (dest voda)] 50x TAE [242 g Tris base, 57,1 ml ledové kys. octové, 100 ml 0,5 M EDTA (ph. 8.0), doplněno do 1 l H₂O] a do jamek vedle vzorků byly přidány srovnávací markry (100 bp a 1 Kbp).
2. Elektroforéza puštěna nejdříve na 50 V na zatáhnutí vzorků a poté zvýšena na 70 V.
3. Po doběhnutí elektroforézy bylo nutno ke gelu přidat 8 μl/100ml ethidium bromidu (Sigma) na obarvení a přilít destilovanou vodu po okraj gelu.
4. Gel byl dán na 15 min. k obarvení na třepačku.

5. Po 15 min. byl obarvený gel promyt 3x vodou a dán ještě na 15 min. spolu s vodou třepat.
6. Po těchto 15 min. byl vzorek vyfocen pomocí UV a záznam byl zdokumentován.

3.3.5. Elektroforézy s PCR vzorky

1. Na tyto elektroforézy bylo ke 30 μl PCR reakce přidáno 5 μl 6x loading buffer => toto množství stačí na dvě elektroforézy (pokud by došlo ke špatnému napipetování vzorků do jamek gelu je možno elektroforézu zopakovat).
2. Do 1 jamky se nanášelo z těchto 35 μl PCR vzorků 15 μl (dalších 15 μl na případnou kontrolu) a vedle se nanesl opět srovnávací marker (100 bp).
3. Další postup viz. postup 3.3.4.3.

3.3.6. PCR reakce

3.3.6.1. PCR na kontrolu funkčnosti primerů

Objem výsledné PCR reakce činil 20 μl , na reakce byla použita DNA genomu yw (yellow white, jedná se o divoký fenotyp) ($c = 255 \text{ ng}/\mu\text{l}$), a primery (*CG11126 F/R*, *CG1961 F/R*, *CG 30104 F/R*, *CG4827 F/R*, *CG11883 F/R* – získány od T. Doležala), reakce míchány na ledu.

1. Na reakce byla namíchána směs, do které bylo přidáno na 1 vzorek: 2 μl Thermo Pol Buffer (Biolabs 10 x concentration), 2 μl dNTP Mix (TaKaRa), 1 μl DNA, 12,5 μl H₂O (dopočteno do výsledného objemu 20 μl na reakci spolu s primery) a 0,4 μl Taq DNA Polymerase (BioLabs 5000 U/ml, nutno přidat jako poslední, citlivá na teplo).
2. Do jednotlivých epp (0,5 ml) napipetováno 18 μl směsi a specifický 1 μl primeru (Forward) a k němu specifický 1 μl primer (Reverse).
3. Tyto reakce byly pouštěny postupně na různé PCR programy.

3.3.6.1.1. PCR

U všech programů PCR byla nastavena teplota víka 99 °C a předežhátí.

1. NT 55 : 94 °C.....5 min
94 °C.....30 s
55 °C.....30 s
72 °C.....45 s
14 °C.....pauza
Krok 2 až 4 opakován 26x
2. NT 57 : 94 °C.....5 min
94 °C.....30 s
57 °C.....30 s
72 °C.....45 s
14 °C.....pauza
Krok 2 až 4 opakován 23x
3. NT 59 : 94 °C.....5 min
94 °C.....30 s
59 °C.....30 s
14 °C.....pauza
Krok 2 až 4 opakován 29x
3. RT – 16: 94 °C.....5 min
94 °C.....30 s
57 °C.....30 s
72 °C.....45 s
14 °C.....pauza
Krok 2 až 4 opakován 15x
4. RT- 18: stejné viz. RT-16, pouze krok 2 až 4 opakován 17x
5. RT-20: stejné viz. RT-16, pouze krok 2 až 4 opakován 19x

3.3.7. PCR na ověření primerů

3.3.7.1. PCR ověření P-elementu na genu *CG30104*

1. Do reakcí se na 1 vzorek přidalo: 7,25 μ l H₂O, 1,25 μ l Thermo Pol Buffer (Biolabs 10 x koncentrováno), 1 μ l dNTP Mix (TaKaRa), specifický 0,75 μ l primer (Forward) a k němu specifický, 0,75 μ l primer (Reverse), 1 μ l DNA a 0,05 μ l Taq DNA Polymerase (BioLabs 5000 U/ml, nutno přidat jako poslední, citlivá na teplo)
2. **A. K-** (negativní kontrola): H₂O, pufr, polymeráza, primery (reverzní a P-elementový)
B. K+ (positivní kontrola): H₂O, pufr, polymeráza, primery [o jasně známé délce výsledného produktu (4300bp)].
C. Forward při t = 61 °C: H₂O, pufr, polymeráza, primery (Forward a P-elementový), DNA
D. Forward při t = 59 °C: H₂O, pufr, polymeráza, primery (Forward a P-elementový), DNA
E. Revers při t = 57 °C: H₂O, pufr, polymeráza, primery (reverzní a P-elementový), DNA
F. Revers při t = 59 °C: H₂O, pufr, polymeráza, primery (reverzní a P-elementový), DNA
3. PCR (671):
94 °C.....5 min
94 °C.....30 s
60 °C.....30 s
72 °C.....1:30 min
14 °C.....pause
Krok 2 až 4 opakován 34x
4. Elektroforéza, vše z PCR + 5 μ l 10 x loading buffer, vše naamplifikováno do jamek a vedle 4 μ l markeru. Dále postup jako u předešlých elektroforéz.

3.3.7.2. PCR ověření P-elementu na genu *CG4827*

Do reakcí se na 1 vzorek přidalo: 7,25 μ l H₂O, 1,25 μ l Thermo Pol Buffer (Biolabs 10 x koncentrováno), 1 μ l dNTP Mix (TaKaRa), specifický 0,75 μ l primer (Forward) a k němu specifický, 0,75 μ l primer (Reverse), 1 μ l DNA a 0,05 μ l Taq DNA Polymerase (BioLabs 5000 U/ml, nutno přidat jako poslední, citlivá na teplo).

1. **A. K-** (negativní kontrola): H₂O, pufr, polymeráza, primery (Reverzní a P-elementový)
- B. Forward při t = 57 °C:** H₂O, pufr, polymeráza, primery (Forward a P-elementový), DNA
- C. Forward při t = 55 °C:** H₂O, pufr, polymeráza, primery (Forward a P-elementový), DNA
- D. Revers při t = 57 °C:** H₂O, pufr, polymeráza, primery (Reverzní a P-elementový), DNA
- E. Revers při t = 59 °C:** H₂O, pufr, polymeráza, primery (Reverzní a P-elementový), DNA

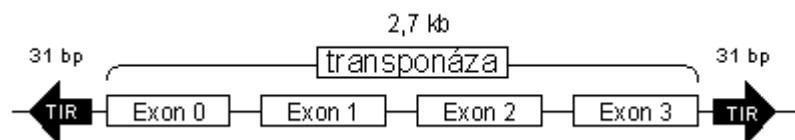
Sekvence primerů viz. Příloha č. 1

2. PCR (672):
 - 94 °C.....5 min
 - 94 °C.....30 s
 - 61 °C.....30 s
 - 72 °C.....1:30 min
 - 14 °C.....pauza
 - Krok 2 až 4 opakován 34x
3. Elektroforéza viz. u předešlé reakce

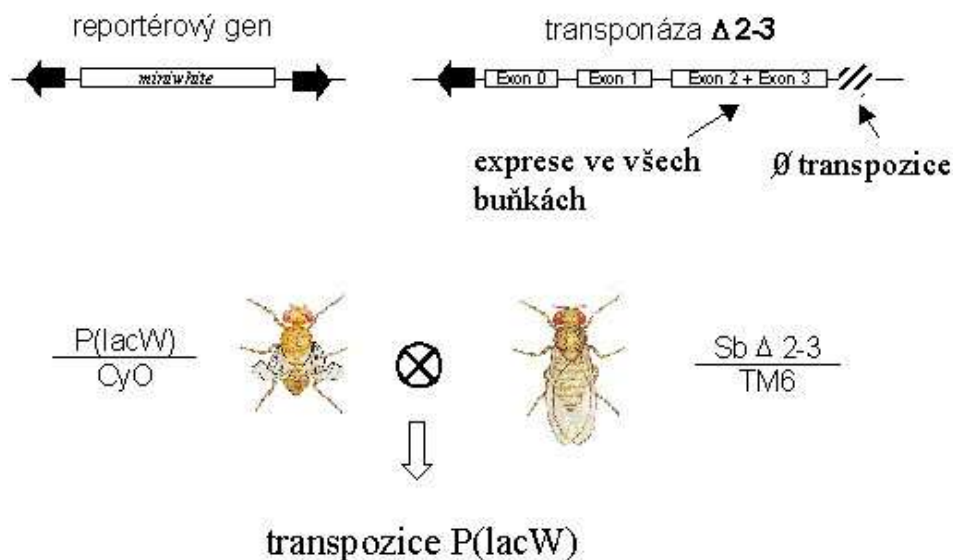
4. Metodický přístup

4.1 P-elementy

Princip P-elementů – Jde o transpozony o délce 2,9 kb, nesoucí 4 exony potřebné pro syntézu funkční transponázy a mající 31 bp dlouhé invertované terminální repetice (nutné, aby došlo k vystřížení a začlenění transpozonu do chromosomu). K invazi P-elementu do *D. melanogaster* došlo v posledních 40 letech z jiného druhu drozofily. Jako zdroj transponázy se nejčastěji využívá upravený 3. chromosom, který má stabilní integrovanou transponázou bez intronu mezi 2. a 3. exonem (bez tohoto upravení se transponuje pouze v buňkách zárodečné linie) a bez jedné terminální repetice (nemobilizovatelnost). Jako mobilizovatelné jednotky se používá neautonomní P-element, který má nenarušené konce (intaktní), ale vnitřní sekvence, původně transponázová, byla nahrazena viditelným markrem. Při křížení much s transponázou na třetím chromosomu a neautonomním P-elementem dochází kontrolovaně k mobilizaci P-elementů. Také je možno využít P-elementy jako přenašeče DNA sekvencí. Mutagenese pomocí P-elementů představuje nedokonalý nástroj, protože se jedná o náhodný proces.



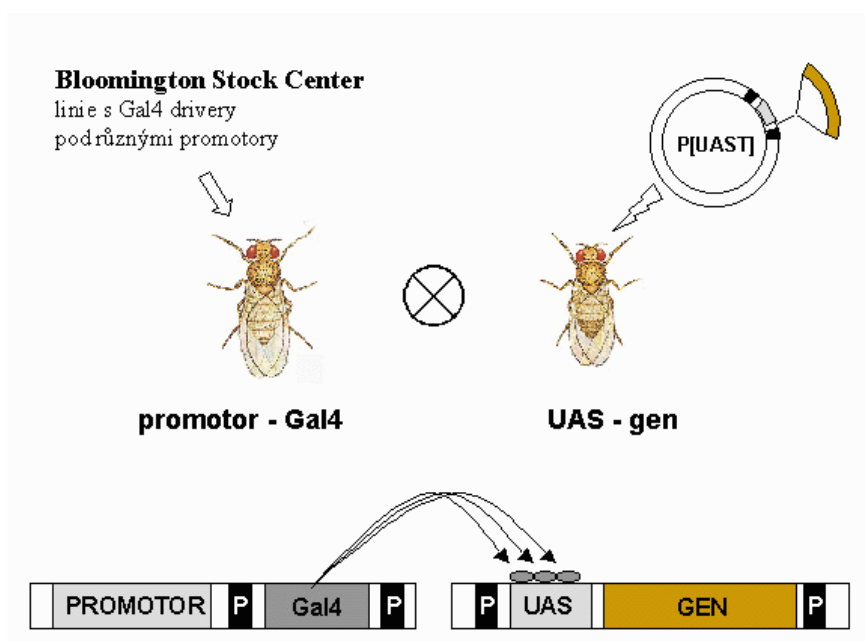
Obr. 6. Uspořádání P-elementu



Obr. 7. Princip transpozice P-elementu

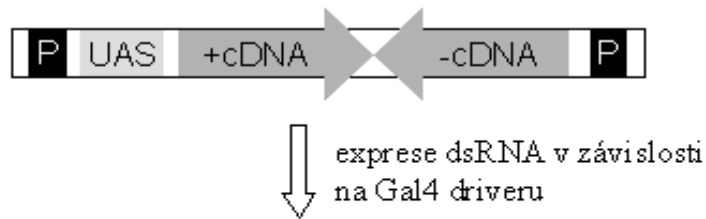
4.2. UAS - GAL4 a RNAi

Princip UAS-GAL4 byl převzat z genetiky kvasinek. Umožňuje u drozofily regulovat expresi genů s již známou sekvencí. Byla vytvořena velká škála mušičích linií, které ve svých genomech nesou pod různými promotory GAL4 drivery. U těchto linií jsou ve FlyBázi informace o jejich expresi. Pokud tedy chceme exprimovat určitý gen jen v nějaké tkáni, podíváme se, zda existuje linie s GAL4 tam, kde potřebujeme. My jsme chtěli mít expresi zajištěnou v celém organismu, proto se použila aktin GAL4, jelikož aktin se vytváří prakticky v celém těle. A dále je potřeba kódující sekvence zájmového genu za sekvencí UAS. Zde jsme měli vždy jeden gen pro ektonukleotidázu. Plazmid na bázi P-elementu umožňuje tento přenos konstruktů "UAS – gen" do mouchy. V tomto komplexu je UAS + TATA box + polylinker, do kterého se zaklonuje kódující sekvence. Při křížení pak bude gen po navázání GAL4 na UAS sekvenci exprimovat podle naší potřeby.



Obr. 8. Princip UAS-Gal4

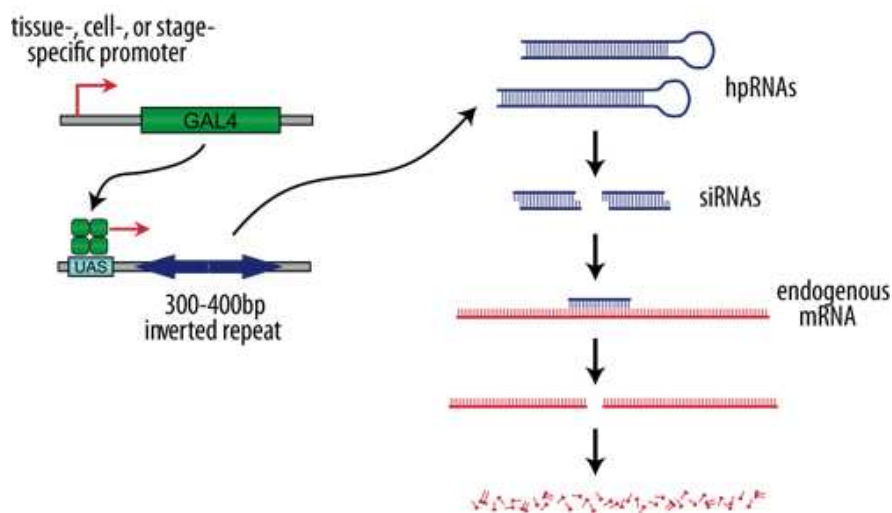
Princip RNA interference je založen na schopnosti dsRNA iniciovat degradaci endogenní RNA, která má stejnou sekvenci, a takto následně vypnout určitý gen. Princip není zcela objasněn, ví se, že dsRNA vstupuje do ribonukleotidového komplexu, který rozštěpuje endogenní RNA na malé fragmenty. V našem případě se štěpily produkty ektonukleotidáz. V drozofile je možno připravit +cDNA a –cDNA konstrukt pomocí P-elementů a pod určitým promotorem. Poté je možné vyvolat expresi dsRNA přepisem +cDNA a –cDNA, využitím UAS-GAL4 systému a takto inaktivovat určitý gen.



Regulovatelná inaktivace genu *in vivo*

Obr. 9. Expres dsRNA

Centrum „Vienna Drosophila RNAi Center“ (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>) vyvíjí drozofilí transgenní RNAi knihovnu. RNAi pomáhá vypínat jednotlivé geny v drozofile pomocí konstruktů UAS-GAL4. Dnes je pokryto přes 85% drozofilího genomu. Princip: GAL4/UAS je používán k řízení exprese hpRNAs (vlásečka RNA) po zaklonování krátkých (300-400bp) fragmentů ve formě invertovaných opakování za UAS sekvenci. Tato dvouřetězcová RNA je zpracována do formy siRNA, která řídí sekvenčně specifickou degradaci cílové mRNA.



Obr. 10. UAS-GAL4

5. Výsledky

5.1. Záchrana *adgf-a[karel]* mutantního fenotypu inserčními mutacemi v genech potenciálně kódujících ektonukleotidázy

Byly zkoumány dvě z pěti ektonukleotidáz s geny *CG30104* a *CG4827*. Mouchy s P-elementovou insercí a mutací *adgf-a[karel]* byly již vytvořeny a objednány z Bloomington Stock centra.

Použité linie: $\frac{671}{CyO}$; $\frac{karel}{TM3-Ser}$

$\frac{672}{CyO}$; $\frac{karel}{TM3-Ser}$

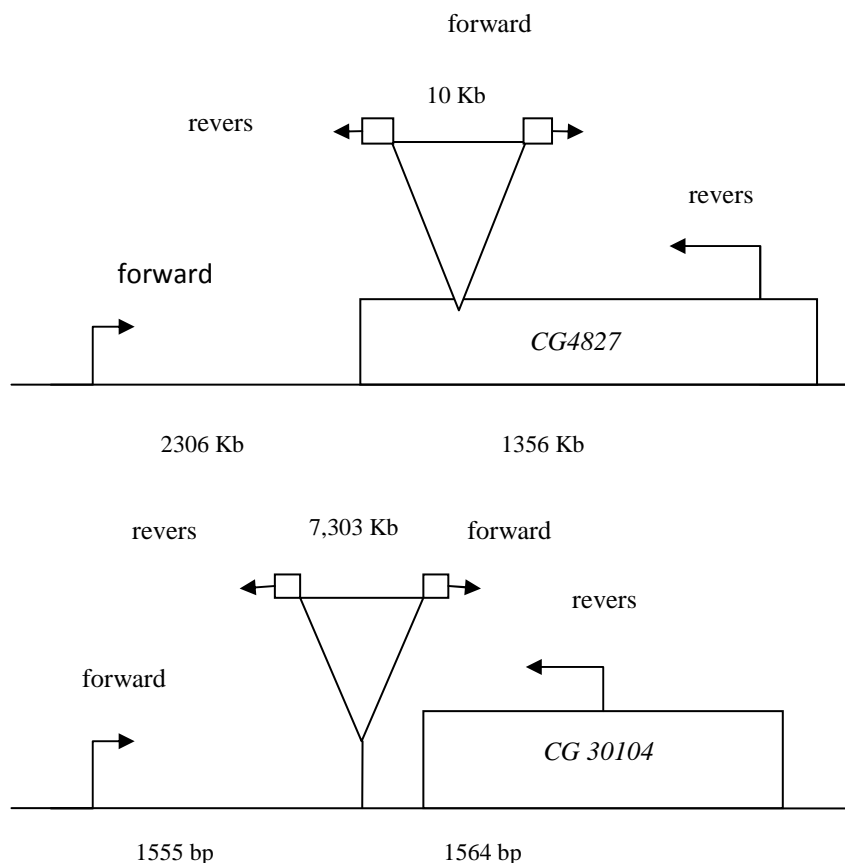
Vysvětlivky: **671:** w[1118]; P{w[+mC]=XP}CG30104[d00824]

672: y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4827[EY02176]

5.1.1. Ověření P-elementových insercí

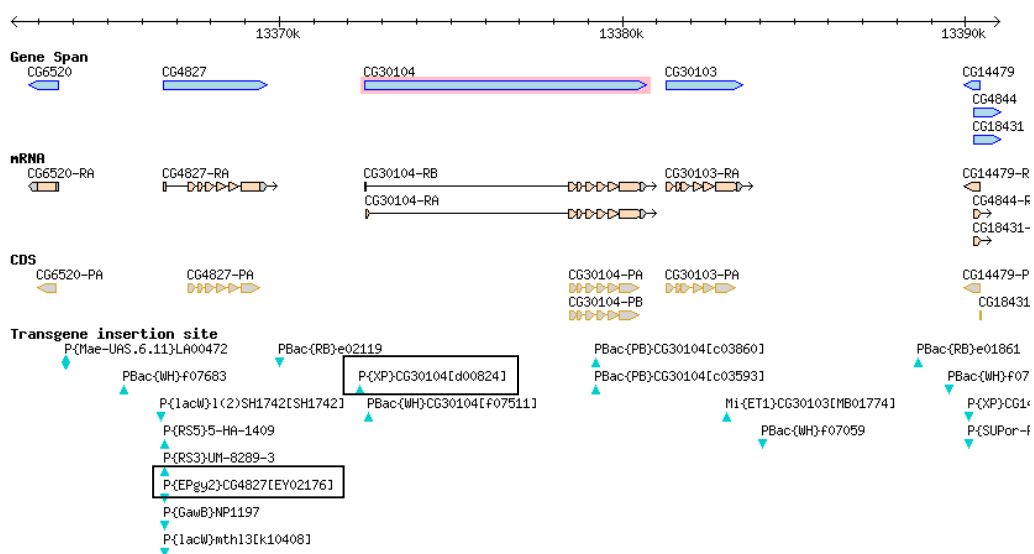
Nejdříve bylo nutné ověřit, zda jsou P-elementové inserce na správném místě (zda se nalézají opravdu v genech pro dvě testované ektonukleotidázy). Bylo nutné navrhnout k těmto P-elementům primery a s nimi pomocí PCR ověřit délku produktů, z nichž se určí, zda mají správnou polohu.

Jako kontroly při ověřování byly použity K- (negativní kontrola bez vzorku DNA) a K+ (positivní kontrola s primery o délce výsledného produktu 4300 bp, a také bez DNA).



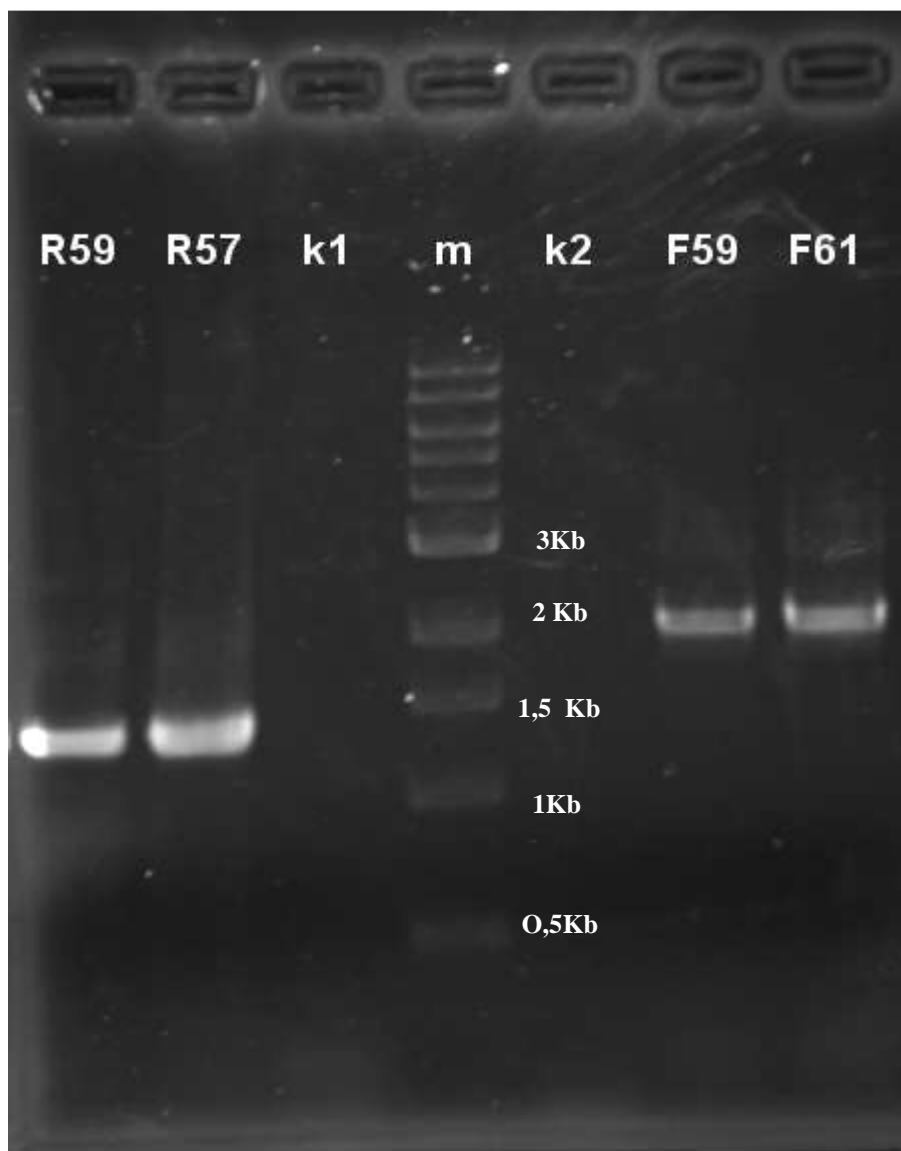
Obr. 11. Rozvržení primerů a délek produktů - ukázka polohy P-elementů (trojúhelníky), ohraničené palindromickými sekvencemi představující v těchto případech revers a forward primery. Šipky jsou umístění použitých primerů vůči primerům P-elementovým. P-element je naznačen v poloze, ve které se v genomu nachází.

Primery a délky výsledných sekvencí viz. Příloha č. 1



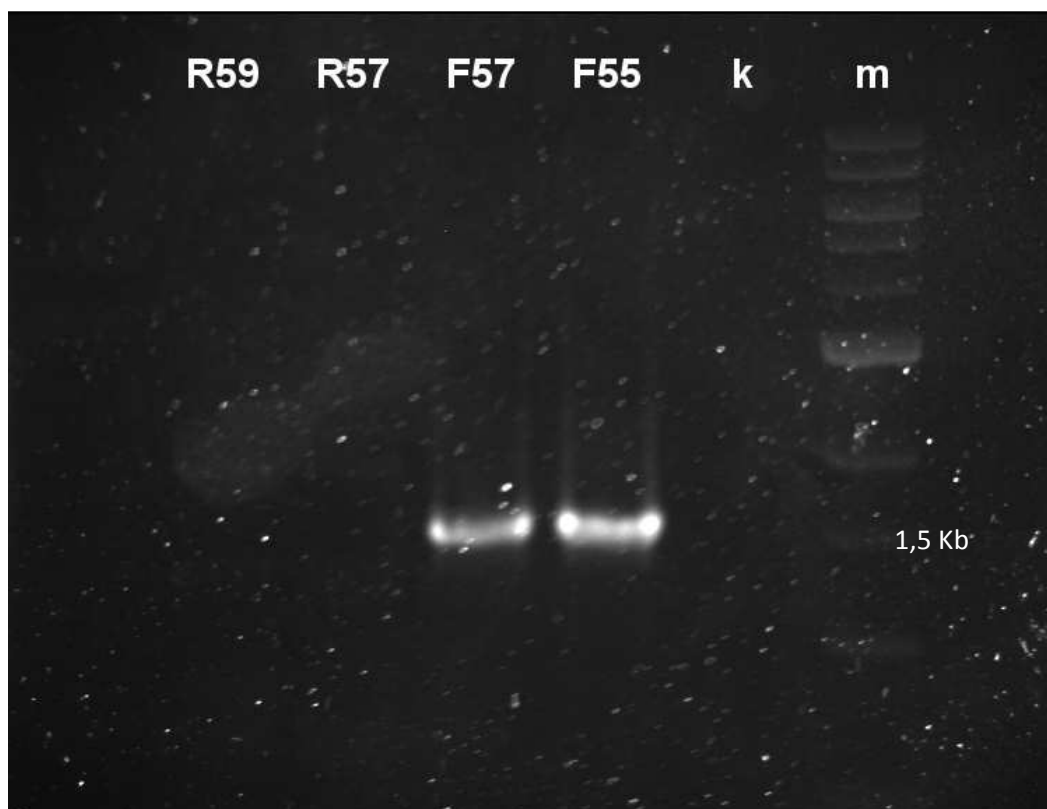
Obr. 12. Cytologická mapa rozložení genů *CG30104* a *CG4827* s použitými P-elementy (zvýrazněné)

Provedená PCR genů *CG30104* a *CG4827*:



Obr. 13. PCR na ověření polohy P-elementu u genu *CG4827* pomocí primerů při různých teplotách nasednutí.

R59 – revers (59 °C), **R57** – revers (57 °C), **k1** – negativní kontrola, **m** – 1Kb marker (délky produktů: 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1; 5; 1; 0,5Kb), **k2** pozitivní kontrola, **F59** – forward (59 °C), **F61** – forward (61 °C)



Obr. 14. Ověření P-elementu na genu *CG30104*

R59 – revers (59°C), **R57** – revers (57 °C), **F57** – forward (57 °C), **F55** – forward (55 °C), **k** – negativní kontrola, **m** – 1 Kb marker (délky produktů:10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1;5; 1; 0,5Kb)

Z délek produktů vyplývá, že P-elementy leží na genech pro ektonukleotidázy, i když není na snímku produkt z genu *CG30104* pro revers primer, stačí nám délka forward, která je správná, a proto bylo provedeno křížení, ze kterého byly pozorovány fenotypové projevy.

5.1.2. Fenotypové projevy

Pomocí následujícího genetického křížení jsme získali jedince homozygotní pro mutaci *adgf-a[karel]* heterozygotní pro každou inzerci zvlášť nebo transheterozygotní pro obě inzerce:

Křížení provedena trojího typu:

požadovaný genotyp

$$1. \frac{671}{CyO\ GFP} ; \frac{karel}{TM3-Ser\ GFP} \times \frac{672}{CyO\ GFP} ; \frac{karel}{TM3-Ser\ GFP} \Rightarrow \frac{671}{672} ; \frac{karel}{karel}$$

$$2. \frac{672}{CyO\ GFP} ; \frac{karel}{TM3-Ser\ GFP} \times \frac{+}{+} ; \frac{karel}{TM3-Ser\ GFP} \Rightarrow \frac{671}{+} ; \frac{karel}{karel}$$

$$3. \frac{672}{CyO\ GFP} ; \frac{karel}{TM3-Ser\ GFP} \times \frac{+}{+} ; \frac{karel}{TM3-Ser\ GFP} \Rightarrow \frac{672}{+} ; \frac{karel}{karel}$$

Jako kontroly použity u	kontrola
1. $\frac{671}{672}; \frac{karel}{karel} \Rightarrow$	$\frac{671/672}{CyO}; \frac{karel}{TM3 GFP ser}$
2. $\frac{671}{+}; \frac{karel}{karel} \Rightarrow$	$\frac{671/+}{CyO GFP}; \frac{karel}{TM3 GFP ser}$
3. $\frac{672}{+}; \frac{karel}{karel} \Rightarrow$	$\frac{672/+}{CyO GFP}; \frac{karel}{TM3 GFP ser}$

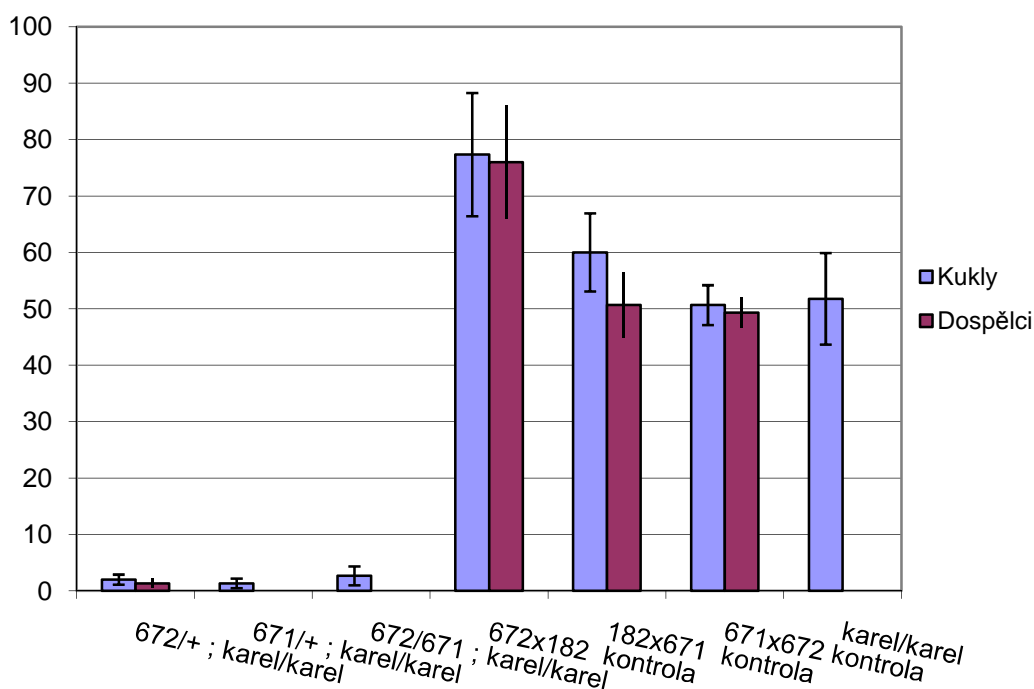
A současně byl jako kontrola použit homozygotní *adgf-a[karel]*, jehož výsledky byly získány od Moniky Žuberové.

Vysvětlivky: **671** w[1118]; P{w[+mC]=XP}CG30104[d00824]

672 y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4827[EY02176]

182 +/+;karel/TM3-ser GFP

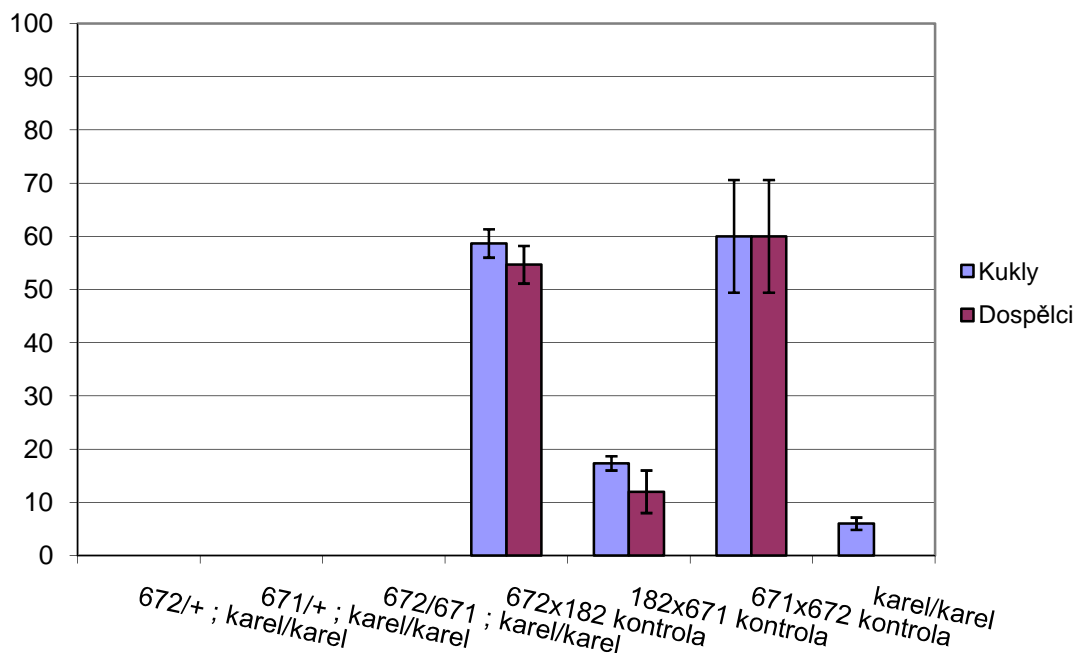
Zpočtená množství jedinců křížení viz. Příloha č. 2 a znázornění těchto hodnot uvedeno v grafech č. 1 a 2.



Graf 1. Vitalita mutantů po promytí lihem.

V Grafu č.1 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje kukel a dospělců z přenesených larev a standartní chyby.

Genotypy vysvětleny viz. výše



Graf 2. Vitalita mutantů bez promytí lihem.

V Grafu č. 2 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje kukel a dospělců z přenesených larev a standartní chyby. Genotypy vysvětleny viz. výše

5.1.3. Výsledek pokusu

Z výsledků vyplývá, že mutace v ektonukleotidázách genů *CG30104* a *CG4827* nemají na homozygotní mutaci *adgf-a[karel]* pozitivní vliv, naopak spíše dochází ke snížení vitality. Je patrné, že promytí lihem má pozitivní vliv na celkové přežívání.

5.2. Ověřování molekulárního efektu RNA interference pěti genů s potenciální ektonukleotidázovou úlohou a fenotypová analýza

5.2.1. „Knock-down“ genů pro ektonukleotidázy (NT)

K dispozici bylo 6 linií drozofil s genotypy viz. tab. 2 získaných z centra „Vienna *Drosophila* RNAi Center“ (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>) Drozofily měly RNAi konstrukt pro 5 genů.

VDRC LINIE	GEN	RNAi konstrukt ID	Genotyp	Číslo stocků
10051	<i>CG30104</i>	2052	w/w; +/+; UAS-2052/UAS-2052	1047
38590	<i>CG11883</i>	7418	w/w; +/+; UAS-7418/UAS-7418	1048
40161	<i>CG1961</i>	9688	w/w; +/+; UAS-9688/TM3-Sb	1049
47397	<i>CG11126</i>	7206	w/w; +/+; UAS-7206/UAS-7206	1050
49358	<i>CG4827</i>	5294	w/w; +/+; UAS-5294/UAS-5294	1052
49359	<i>CG4827</i>	5294	w/w; +/+; UAS-5294/UAS-5294	1053

Tab. 2: 5 drozofilích RNAi linií

Linie s genem *CG1961* byla potřeba přebalancovat na $\frac{5NT}{TM6B}$, jelikož by později v křížení nebylo možno rozeznat mouchy s konstruktem $\frac{5NT}{Act Gal4}$ od ostatních.

a. Křížení: přebalancování *CG1961*

$$\begin{array}{ccc} \frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM3 Sb} & \times & \frac{+}{+}; \frac{karel}{TM6B} \\ & & \downarrow \\ & & \frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B} \end{array}$$

b. Křížení: na genotyp $\frac{5NT}{Act Gal4}$

RNAi byla indukována pomocí Gal4 driveru pod aktinovým promotorem (Act Gal4), který se exprimuje ve většině buněk a tudíž pak ve většině buněk spouští expresi RNAi konstruktů za UAS sekvencí. Genotyp Gal4 driver nad UAS-RNAi (5NT) byl rozpoznán na základě absence TM6B balanceru, tj. jako hubené larvičky/kukličky,

$$\begin{array}{ccc} \frac{+}{+}; \frac{5NT}{5NT (TM6B)} & \times & \frac{+}{+}; \frac{Act Gal4}{TM6B} \\ & & \downarrow \\ & & \frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act Gal4} \end{array}$$

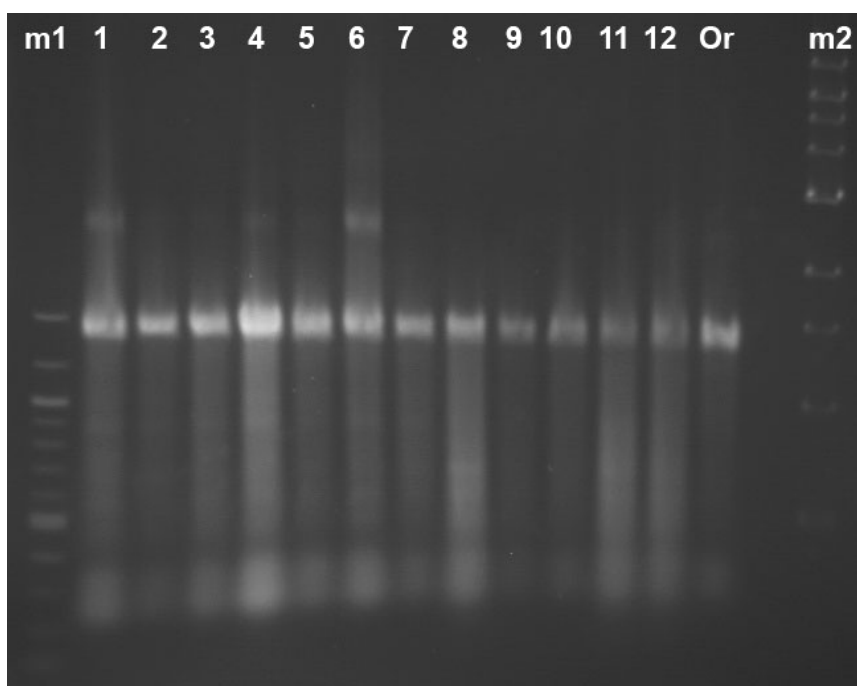
protože TM6B nese na sobě dominantní marker Tubby, který se projevuje ztluštěním těla.

5.2.2. Ověření efektu RNAi na molekulární úrovni

RNA získána z drozofil genotypů: oregon (kontrola), $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act Gal4}$ a ze stejného křížení z $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$ (jako kontrola). Pro další označení u jednotlivých genů použity pro $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act Gal4}$ čísla genů a pro kontroly $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$ použita čísla genů s K (př. CG30104K).

Efekt RNAi na molekulární úrovni jsme ověřili pomocí izolace RNA a semikvantativní RT-PCR.

Získaná RNA byla otestována pomocí elektroforézy. Použitá koncentrace RNA byla 2 μ g/ μ l.



Obr. 15. Otestování RNA

m1 – 100bp marker, 1 – CG30104 Kontrola (K) TM6B/5NT, 2 - CG30104 Act Gal4/5NT, 3 – CG11883 K TM6B/5NT, 4 - CG11883 Act Gal4/5NT, 5 – CG1961 K TM6B/5NT, 6 - CG1961 Act Gal4/5NT, 7 – CG11126 K TM6B/5NT, 8 CG11126 Act Gal4/5NT, 9 – CG4827/49358 K TM6B/5NT, 10 - CG4827/49358 Act Gal4/5NT, 11 – CG4827/49359 K TM6B/5NT, 12 - CG4827/49359 Act Gal4/5NT , Or – oregon, m2 – 1Kb marker

Aby bylo možno zjistit, kolik se exprimovalo původní RNA a z toho se později odvodil efekt RNAi, bylo nutno srovnat koncentrace všech získaných vzorků, aby později byly patrné kvantitativní rozdíly.

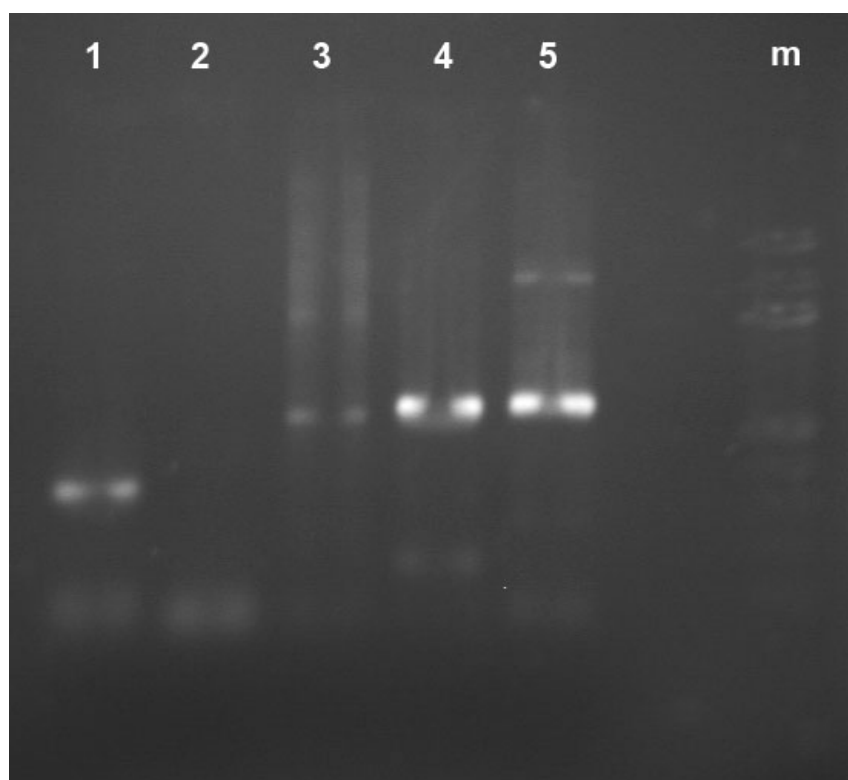
RNA	CG30104	CG30104K	CG11883	CG11883K	CG1961	CG1961K	CG11126	CG11126K	CG4827/49358	CG4827/49358K	CG4827/49359	CG4827/49359K	ORG
Koncentrace (µg/µl)	1,714	1,113	0,422	0,334	2,033	0,828	1,368	1,379	0,992	0,574	2,649	2,698	1,284

Tab. 3: koncentrace vzorků RNA

5.2.3. Kontrola optimální Tm nasedání primerů pro jednotlivé nukleotidázy

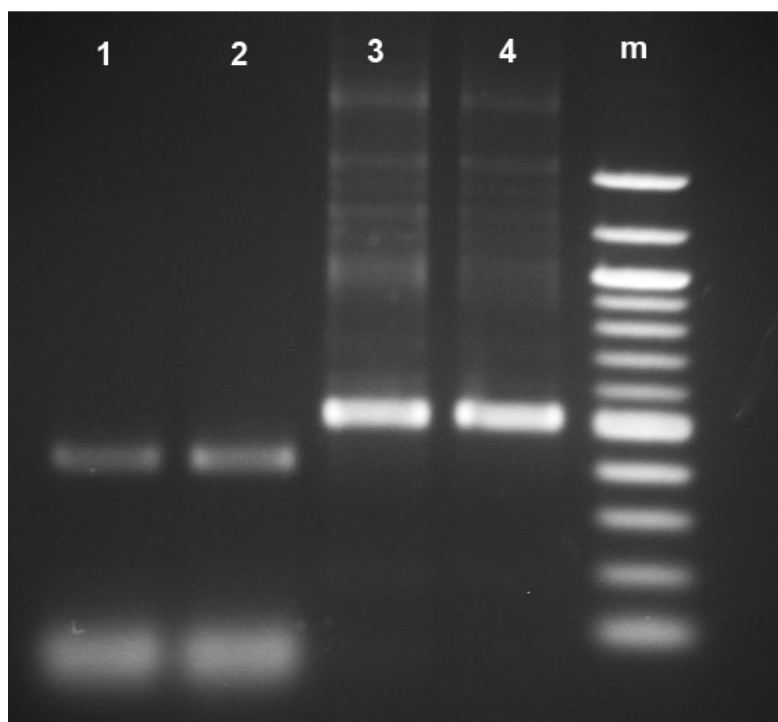
Nukleotidázy byly získány od Tomáše Doležala, kontrola byla provedena na vzorcích DNA genomu yellow white (yw) (c = 255 ng/µl).

Teploty vázání primerů byly použity na první Pcr z poznatků Tomáše Doležala, který je měl již zavedené. Všechny fragmenty jsou delší, než sekvence RNAi konstruktů.



Obr. 16. Kontrola optimální teploty (Tm) nasedání primerů

1 – *CG11126* (55 °C), **2** – *CG1961* (55 °C), **3** – *CG30104* (55 °C), **4** – *CG4827* (59 °C), **5** – *CG11883* (59 °C), **m** – 100bp marker (délky produktů: 1,517; 1,2; 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 Kb)



Obr. 17. Kontrola optimální teploty (T_m) nasedání primerů

1 – *CG1961* (56 °C), 2 – *CG1961* (54 °C), 3 – *CG30104* (55 °C), 4 – *CG30104* (57 °C), m – 100bp marker
(délky produktů: 1,517; 1,2; 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 Kb)

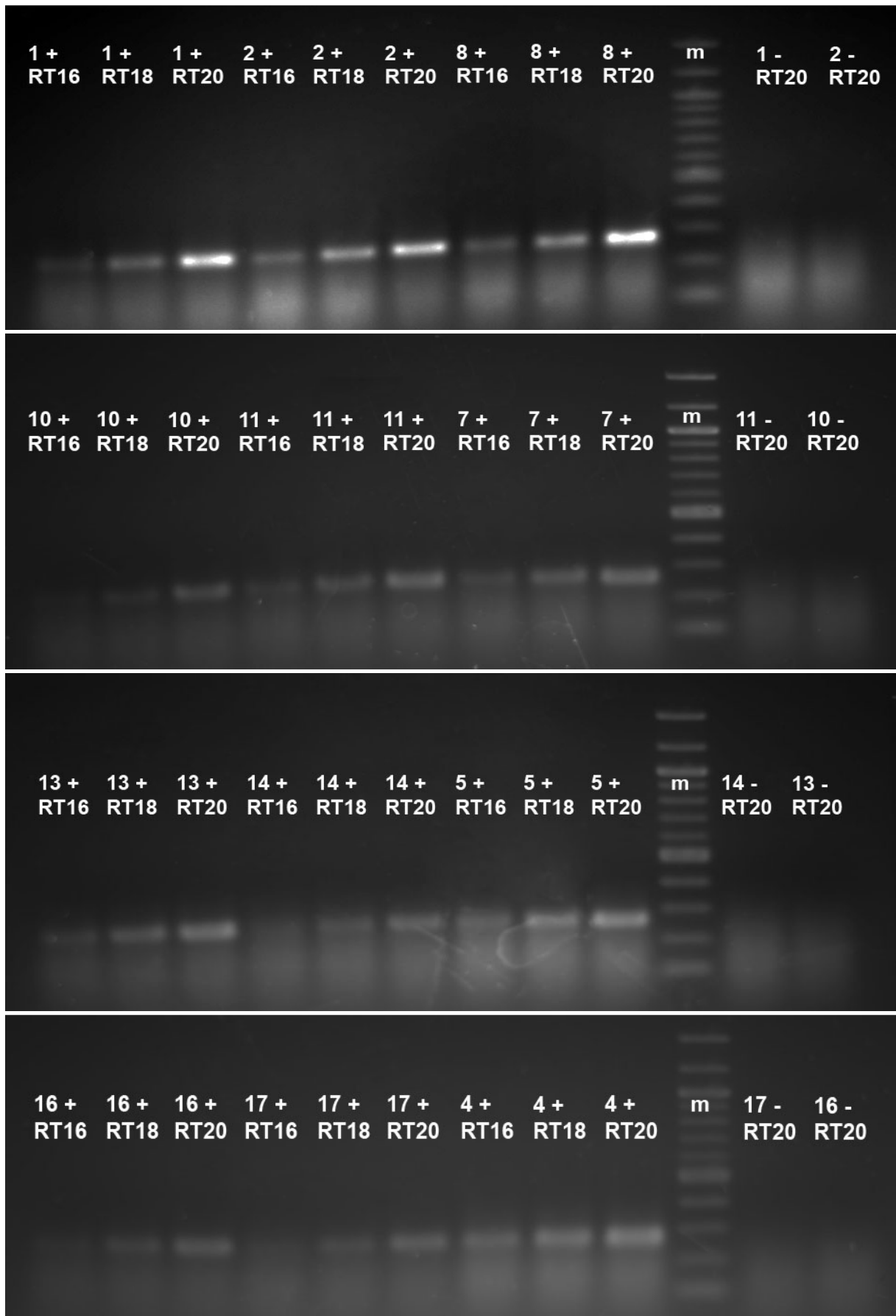
Prováděná PCR

Teploty nejlepšího navázání primerů:	55 °C – <i>CG11126</i> , <i>CG1961</i>	PCR NT55
	57 °C – <i>CG30104</i>	PCR NT57
	59 °C – <i>CG4827</i> , <i>CG11883</i>	PCR NT59

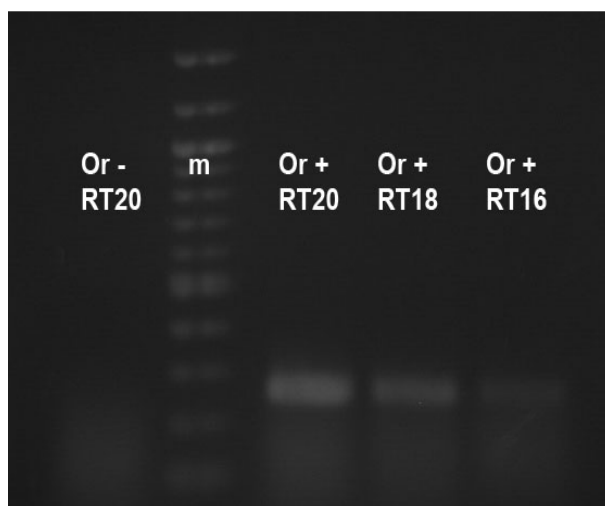
5.2.4. Testování optimálního počtu cyklů pro RP49

Nyní následovalo nastavení počtů cyklů opakování PCR, a zjištěno, při kterém jsou výsledné proužky z elektroforézy dost viditelné na to, aby bylo možné pozdější srovnání PCR, při kterém by se rozlišilo, kolik bylo na počátku templátu RNA. Pro toto rozlišení bylo důležité zajistit optimální počet cyklů PCR, kdy produkt ještě narůstá, ale stále ho není tolik, aby se nerozlišila původní množství mRNA, které bylo vyizolováno z drozofil.

Jako kontrola při nastavení cyklů byla použita DNA s mínus (-) vzorky, u kterých nedošlo k reverzní transkripci, a proto se neměl na gelu ukázat žádný band. U pozitivních vzorků měla být již přítomna DNA. U plus vzorků došlo k reverzní transkripci (+).



Obr. 18, 19, 20, 21 Testování optimálního počtu cyklů pro RP49



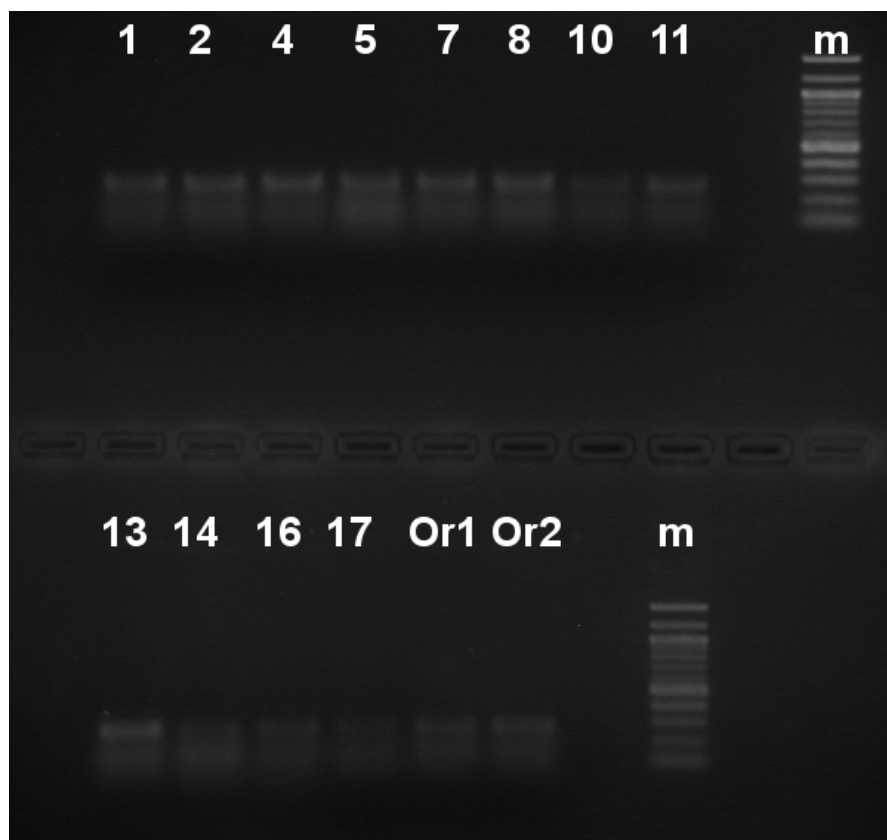
Obr. 22, 23 Testování optimálního počtu cyklů pro RP49

Číslování pro obrázky 18-24, 26 a 27 je shodné. RT 16,18 a 20 označuje nastavení PCR, - označuje negativní vzorky a + pozitivní. U žádného negativního vzorku se neukázal žádný proužek, což ukazuje na nepřítomnost DNA. Všechny – vzorky byly puštěny pouze na RT20.

1 – *CG30104* Act Gal4/5NT **2** – *CG30104* K TM6B/5NT **4** – *CG11883* Act Gal4/5NT, **5** – *CG11883* K TM6B/5NT, **7** – *CG1961* Act Gal4/5NT, **8** – *CG1961* K TM6B/5NT, **10** – *CG11126* Act Gal4/5NT, **11** – *CG11126* K TM6B/5NT, **13** – *CG4827/49358* Act Gal4/5NT, **14** – *CG4827/49358* K TM6B/5NT, **16** – *CG4827/49359* Act Gal4/5NT, **17** – *CG4827/49359* K TM6B/5NT **Or** – oregon, **m** – 100 bp marker

Zjištěno, že cDNA se namnoží na požadované množství po 18 cyklech.

Dále nutno srovnat amplifikovaná množství cDNA do reakcí, aby výsledné proužky při elektroforéze byly stejně znatelné.



Obr. 24. Srovnání amplifikovaných množství pro jednotlivé vzorky (závěrečná reakce)

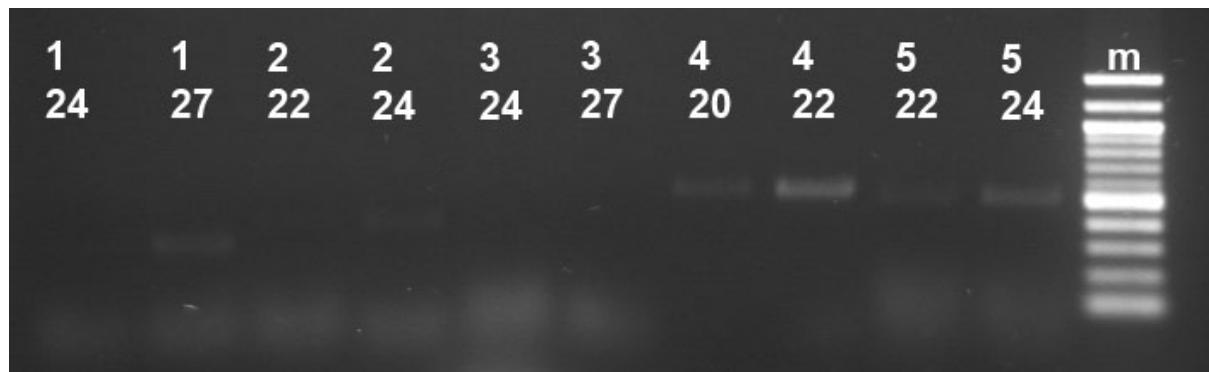
Množství použité cDNA viz „ zjištěná nastavení množství cDNA“. **1** – *CG30104* Act Gal4/5NT **2** – *CG30104* K TM6B/5NT **4** – *CG11883* Act Gal4/5NT, **5** – *CG11883* K TM6B/5NT, **7** – *CG1961* Act Gal4/5NT, **8** – *CG1961* K TM6B/5NT, **10** – *CG11126* Act Gal4/5NT, **11** - *CG11126* K TM6B/5NT, **13** – *CG4827/49358* Act Gal4/5NT, **14** - *CG4827/49358* K TM6B/5NT, **16** – *CG4827/49359* Act Gal4/5NT, **17** – *CG4827/49359* K TM6B/5NT **Or1** (cDNA 0,8 μ l), **Or2** (cDNA 0,9 μ l), **m** – 100 bp marker

Množství cDNA (μ l) na reakci PCR uzpůsobené podle gelu na Obr. 24:

<i>CG11126</i> K	- 0,8
<i>CG11126</i>	- 0,8
<i>CG30104</i> K	- 1
<i>CG30104</i>	- 1
<i>CG1961</i> K	- 1
<i>CG1961</i>	- 1
<i>CG4827/49358</i> K	- 1,15
<i>CG4827/49358</i>	- 0,9
<i>CG4827/49359</i> K	- 1,15
<i>CG4827/49359</i>	- 1,1
Oregon	- 0,9

5.2.5. Nastavení počtu cyklů pro jednotlivé geny

Reakce byly prováděny se vzorky cDNA oregona pro menší plýtvání vzorků s cDNA pro nukleotidázy (také využita cDNA oregona od Michaely Fenckové). Tyto reakce provedeny na PCR NT 55, 57, 59 a primery pro specifické geny nukleotidáz.



Obr. 25. Nastavení cyklů PCR s použitím oregona a nukleotidázových primerů

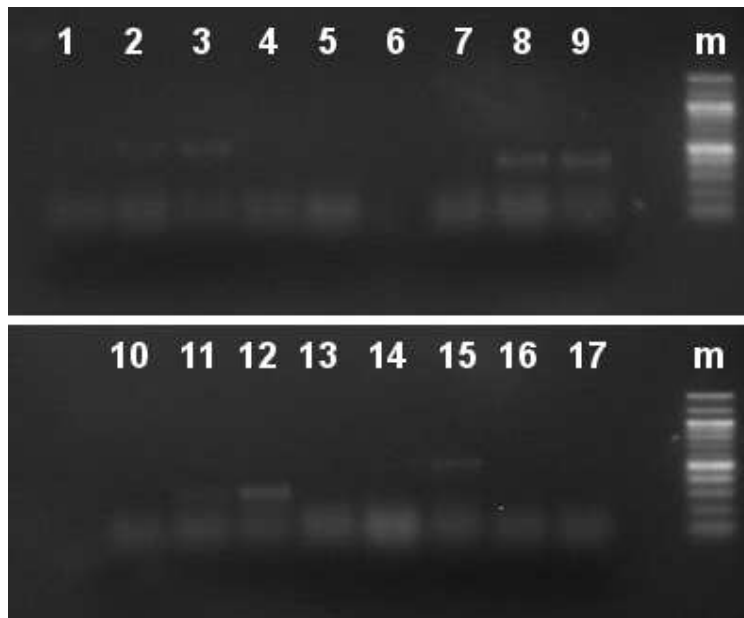
1 – *CG1126* (24 a 27 cyklů), **2** - *CG1961* (22 a 24 cyklů), **3** – *CG11883* (24 a 27 cyklů), **4** – *CG4827* (20 a 22 cyklů), **5** – *CG30104* (22 a 24 cyklů), **m** – 100bp marker

Výsledky nastavení cyklů:

<i>CG11883</i>	35
<i>CG1961</i>	24
<i>CG1126</i>	27
<i>CG4827</i>	20
<i>CG30104</i>	24

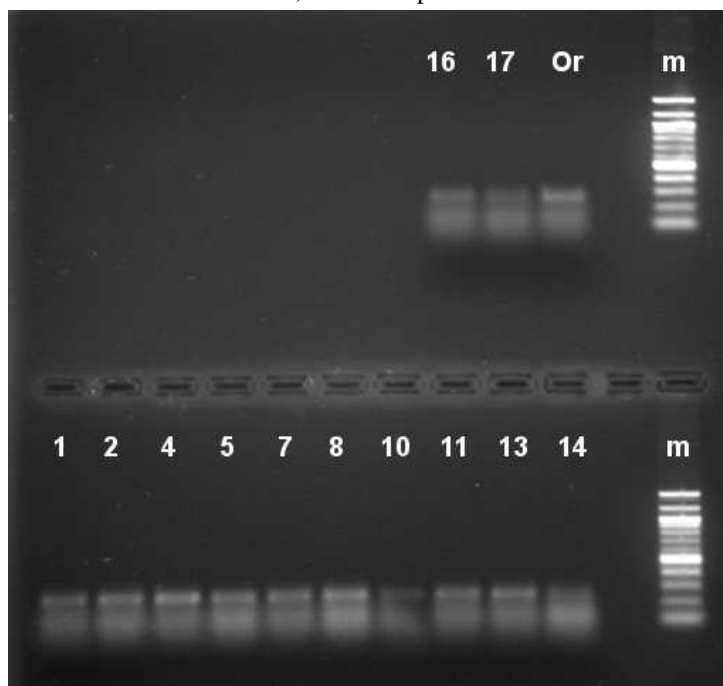
5.2.6. Ověření efektu RNAi pomocí RT-PCR

Poslední reakcí PCR byly vzorky cDNA nukleotidáz spolu s odpovídajícími nukleotidázovými primery. Reakce PCR byla puštěna na PCR NT 55, 57, 59, do kterých bylo přidáno množství cDNA podle zjištěných objemů a počty cyklů také podle dříve zjištěných výsledků. K těmto reakcím byly přidány ještě vzorky oregona (c DNA, ve správných množstvích taktéž s primery pro nukleotidázy).



Obr. 26. Konečné ověření efektu RNAi pomocí RT-PCR

1 – *CG30104* Act Gal4/5NT **2** – *CG30104* K TM6B/5NT, **3** – Or (*CG30104*), **4** – *CG11883* Act Gal4/5NT, **5** – *CG11883* K TM6B/5NT, **6** – Or (*CG11883*), **7** – *CG1961* Act Gal4/5NT, **8** – *CG1961* K TM6B/5NT, **9** – Or (*CG1961*), **10** – *CG11126* Act Gal4/5NT, **11** – *CG11126* K TM6B/5NT, **12** – Or (*CG11126*), **13** – *CG4827/49358* Act Gal4/5NT, **14** – *CG4827/49358* K TM6B/5NT, **15** – Or (*CG4827*), **16** – *CG4827/49359* Act Gal4/5NT, **17** – *CG4827/49359* K TM6B/5NT, **m** – 100 bp marker



Obr. 27. K Obr. 26 vytvořena současně konečná kontrola v podobě RP 49

Srovnání amplifikovaných množství pro jednotlivé vzorky

1 – *CG30104* Act Gal4/5NT **2** – *CG30104* K TM6B/5NT **4** – *CG11883* Act Gal4/5NT, **5** – *CG11883* K TM6B/5NT, **7** – *CG1961* Act Gal4/5NT, **8** – *CG1961* K TM6B/5NT, **10** – *CG11126* Act Gal4/5NT, **11** – *CG11126* K TM6B/5NT, **13** – *CG4827/49358* Act Gal4/5NT, **14** – *CG4827/49358* K TM6B/5NT, **16** – *CG4827/49359* Act Gal4/5NT, **17** – *CG4827/49359* K TM6B/5NT, **Or**, **m** – 100 bp marker

5.2.7. Výsledky pokusu

Při kontrole výsledků z RT-PCR se zjistilo, že RNAi efekt funguje

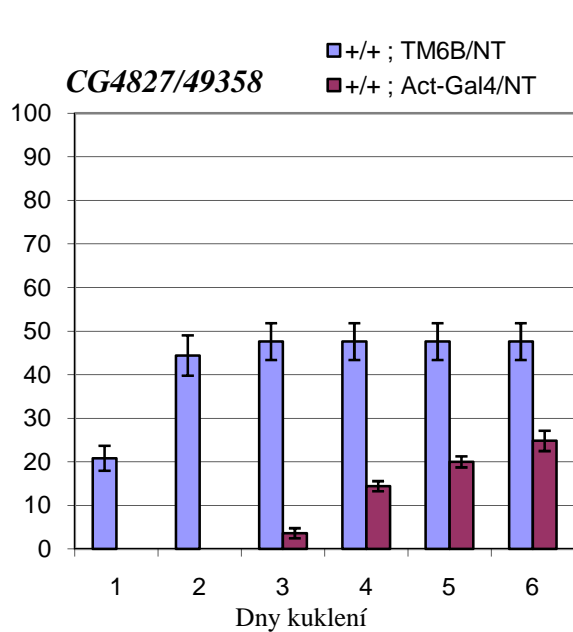
- *CG1961* kontrola (K) TM6B/5NT RNAi sama o sobě nijak významně nesnižuje transkript genu, ale s *CG1961 Act Gal4/5NT* se potlačuje produkce genu, tudíž není detekovatelný.
- *CG30104* K TM6B/5NT RNAi i sama o sobě částečně funguje a snižuje trochu transkript, *CG30104 Act Gal4/5NT* však potlačí transkript ještě více.
- *CG11126* K TM6B/5NT sama RNAi opět částečně tlumí transkript genu, ale u *CG1126 Act Gal4/5NT* je utlumen úplně.
- U *CG4827/49358* K TM6B/5NT by efekt potlačení transkriptu mohl být o něco větší, jelikož při kontrole RP49 bylo templátu o něco méně, než ostatních RNA. *CG4827/49358 Act Gal4/5NT* tlumí transkript úplně.
- U *CG4827/493589* K TM6B/5NT spolu s *CG4827/49359* dochází k velkému snížení transkriptu už jen s RNAi, *CG4827/493589 Act Gal4/5NT* a spolu s Act Gal4 je transkript utlumen úplně.

5.2.8. Fenotypový projev RNAi

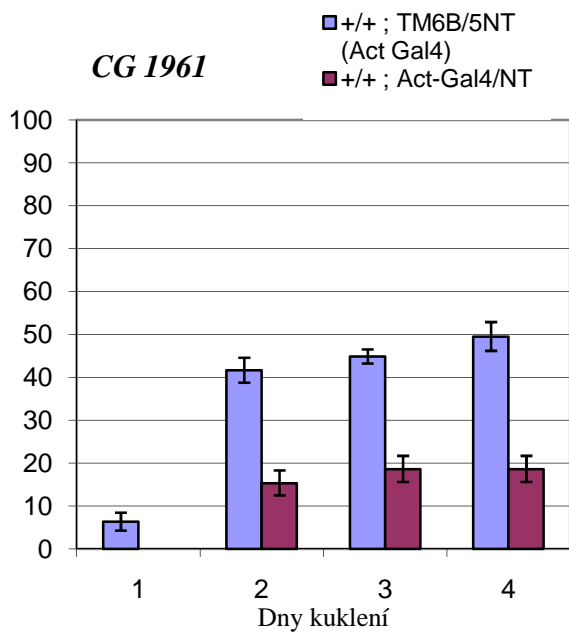
Larvy na tento pokus získány spolu s izolací na RNA. Počty vybraných larev prvních instarů, spolu s jejich fenotypovým projevem $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act Gal4}$ viz. tabulka (Příloha č.3), jako kontrola opět použit oregon a $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$

Pokus sledován 14 dní. Larvy a dospělci byli od sebe rozeznány viz. fenotypové projevy jejich znaků [Genotyp Gal4 driver nad UAS-RNAi (5NT) byl rozpoznán na základě absence TM6B balanceru, tj. jako hubené larvičky/kukličky, protože TM6B nese na sobě dominantní marker Tubby, který se projevuje ztlustěním těla a u dospělců se marker Humerus (Hu) projevuje stejnocennými chloupky na předohrudi oproti standardním dvěma výrazným chloupkům].

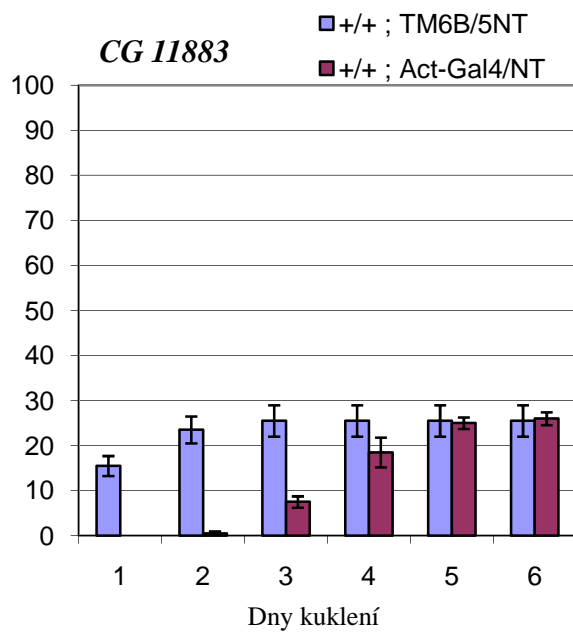
Kuklení jedinců prováděno s denním rozestupem. Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 3-10 a v tabulkách (viz. Příloha č. 3) den první znamená pět dnů od naklazení. U grafů 2-8 sledované časové rozložení kuklení $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act Gal4}$ oproti kontrolám $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$ a oregonu. V grafu č. 10 sledované časové rozložení vylézání dospělců $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act Gal4}$, oproti kontrolám $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$ a oregonu.



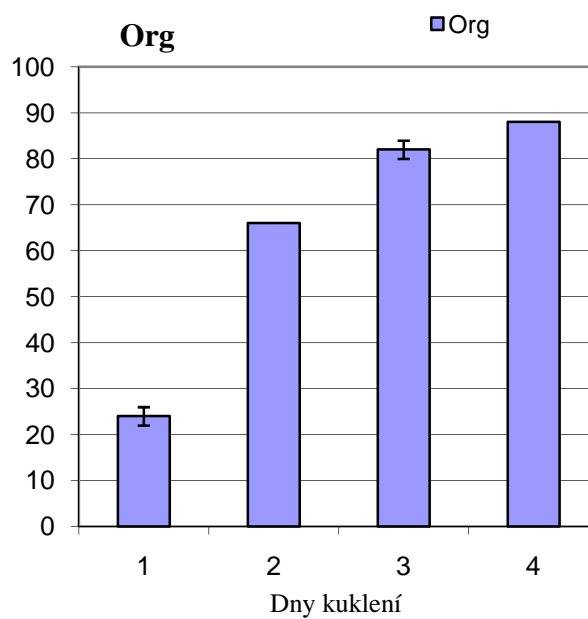
Graf 3. Časově sledované kuklení



Graf 4. Časově sledované kuklení

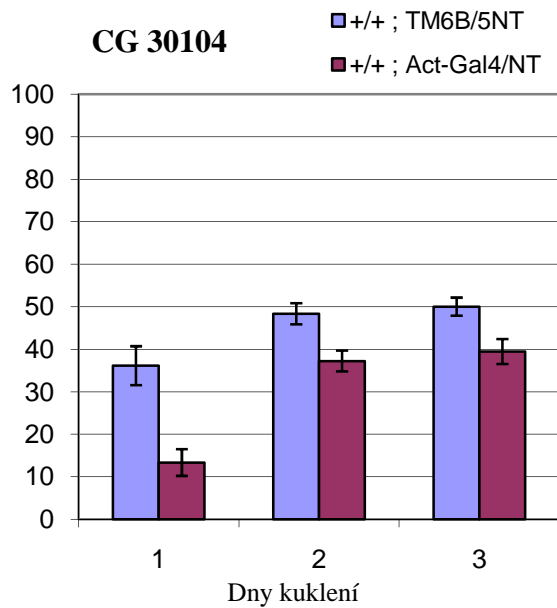


Graf 5. Časově sledované kuklení

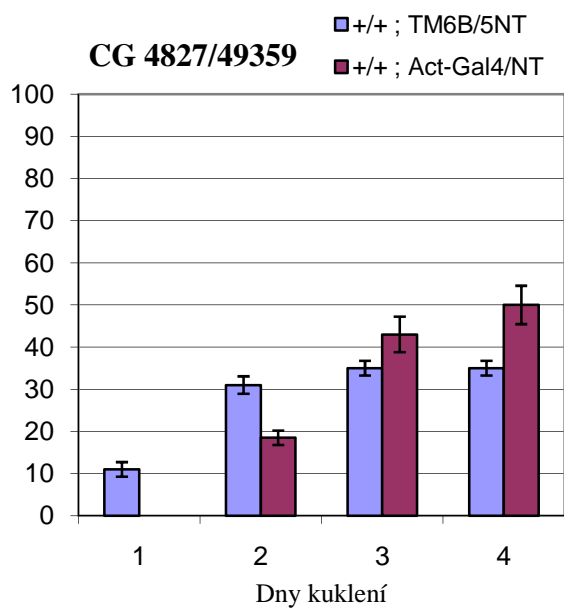


Graf 6. Časově sledované kuklení

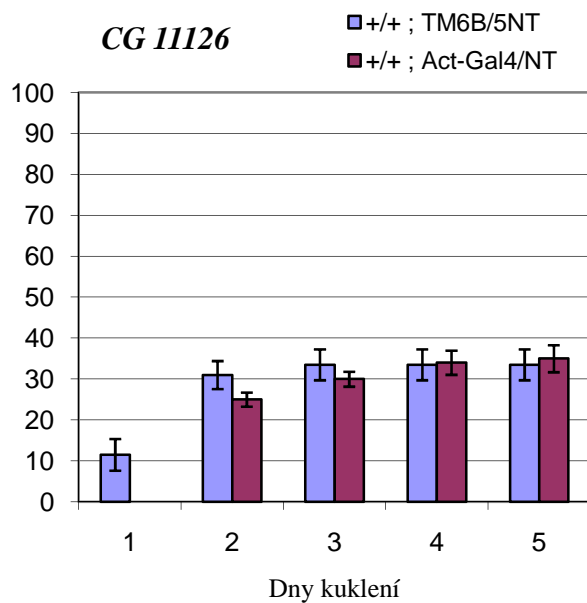
V Grafu č. 3, 4, 5, 6 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje kukel z přenesených larev a standartní chyby.



Graf 7. Časově sledované kuklení

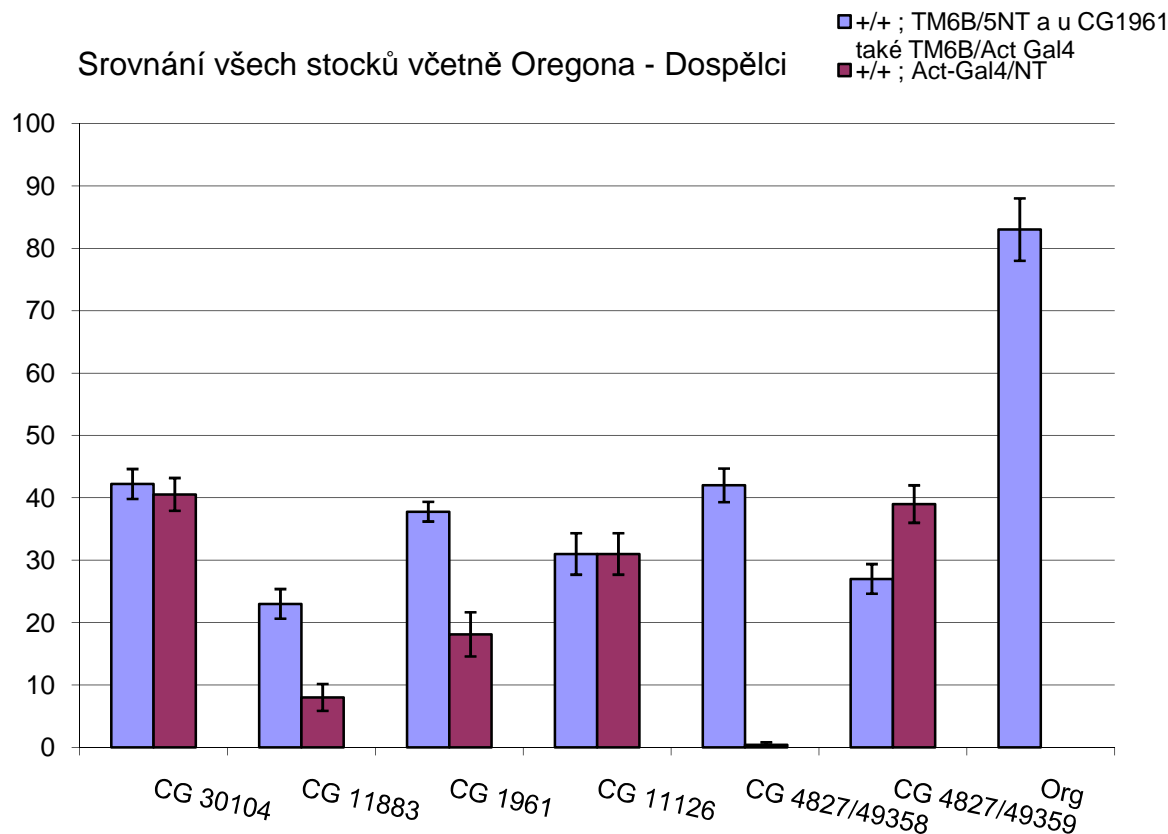


Graf 8. Časově sledované kuklení



Graf 9. Časově sledované kuklení

V Grafu č. 7, 8, 9 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje kukel z přenesených larev a standartní chyby.



Graf 10. Porovnání dospělců

V Grafu č.10 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje dospělců z přenesených larev a standartní chyby.

5.2.9. Výsledky pokusu

- Došlo ke snížení životaschopnosti jedinců u všech analyzovaných genů a to i v případě samotného RNAi bez indukce, tj. bez Gal4 driveru $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$.
- Ve třech případech vede indukce Gal4 driverem k dalšímu snížení životaschopnosti a to u genů: *CG 4827/49358*, *CG11883* a *CG1961*.
- Ve všech případech je také patrné opožděné kuklení $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act GAL4}$ proti $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$.
- U *CG1961* a *CG4827/49358* je patrná letalita $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act GAL4}$ proti $\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$ už ve stádiu kuklení

5.3. Efekt vypnutí ektonukleotidáz u nulové a hypomorfní mutace *cactus*

5.3.1. Fenotypový projev RNAi s mutací *cactus*

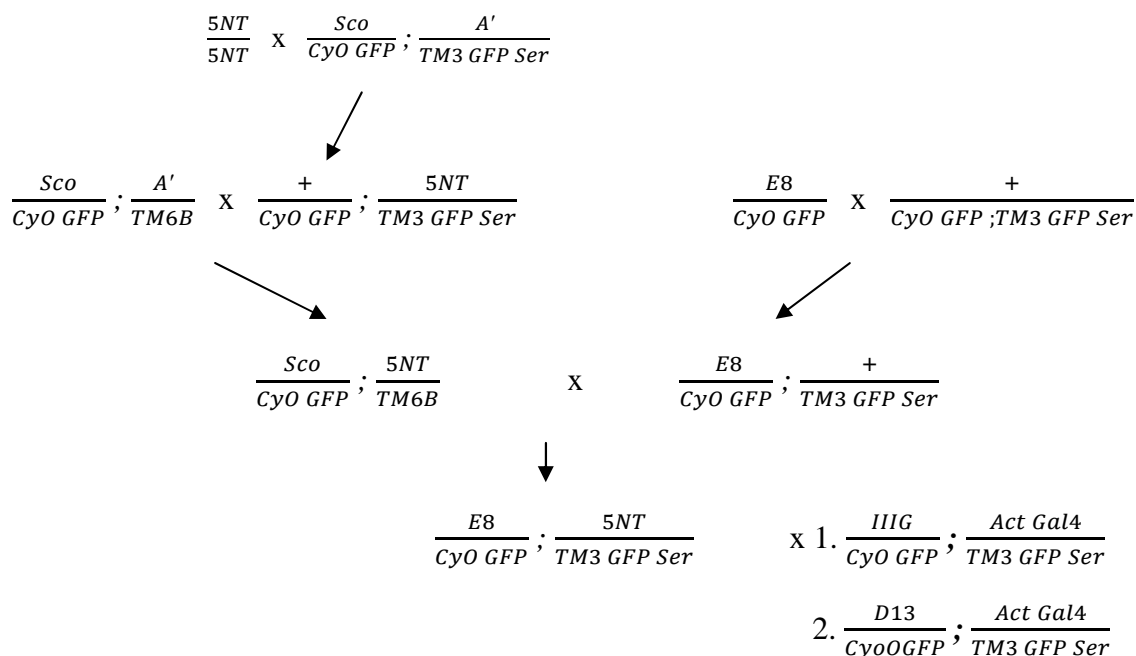
Zkoumáno 5 ektonukleotidáz:

Geny ektonukleotidáz	CG 30104	CG 11883	CG 1961	CG 11126	CG 4827
----------------------	----------	----------	---------	----------	---------

CG4827/49359 inzerce v tomto lokusu nepoužívána z důvodu špatné vitality v průběhu křížení.

$\frac{III\text{G}}{\text{CyO GFP}} ; \frac{\text{act Gal4}}{\text{TM3 GFP Ser}} a \frac{D13}{\text{CyO GFP}} ; \frac{\text{act Gal4}}{\text{TM3 GFP Ser}}$ Tyto linie, které vykřížila Michaela Fencková obsahují alely genu *cactus*, které v kombinaci s alelou *cactus*^{E8} tvoří hypomorfní mutaci (*cactus*^{III\text{G}/cactus}^{E8}) a nulovou mutaci (*cactus*^{D13/cactus}^{E8}) pro gen *cactus*.

Dále byla vykřížena alela *cactus*^{E8} spolu s jednotlivými liniemi pro RNAi všech pěti ektonukleotidáz:

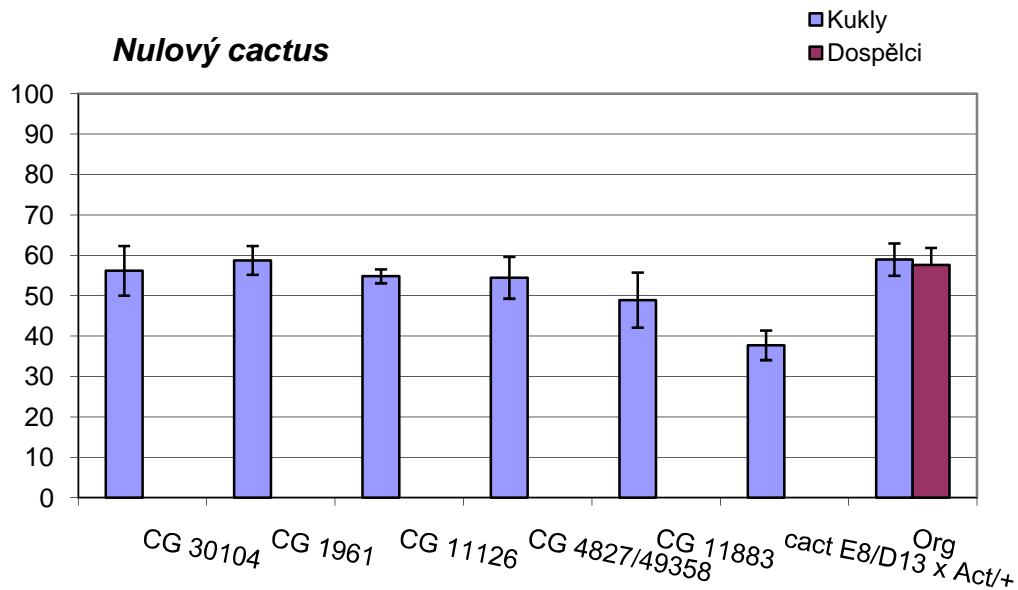


Z tohoto křížení vybrány genotypy: $s \frac{III\text{G}}{E8} ; \frac{5NT}{\text{Act Gal4}}$ a $\frac{D13}{E8} ; \frac{5NT}{\text{Act Gal4}}$ (pod GFP vybrány jako nesvítící), které obsahovaly hypomorfní nebo nulovou mutaci genu *cactus* spolu s RNAi indukovanou Gal4 driverem pod aktinovým promotorem.

Jako kontrola mutantů *cactus* byla vykřížena linie 628 ($\frac{E8}{\text{CyO GFP}} ; \frac{+}{+}$) s $\frac{III\text{G} (D13)}{\text{CyO GFP}} ; \frac{\text{Act Gal4}}{\text{TM3 GFP Ser}}$. Z tohoto křížení vybrány hypomorfní či nulový mutant *cactus* $\frac{III\text{G} (D13)}{E8} ; \frac{\text{Act}}{+}$ (pod GFP vybrány jako nesvítící).

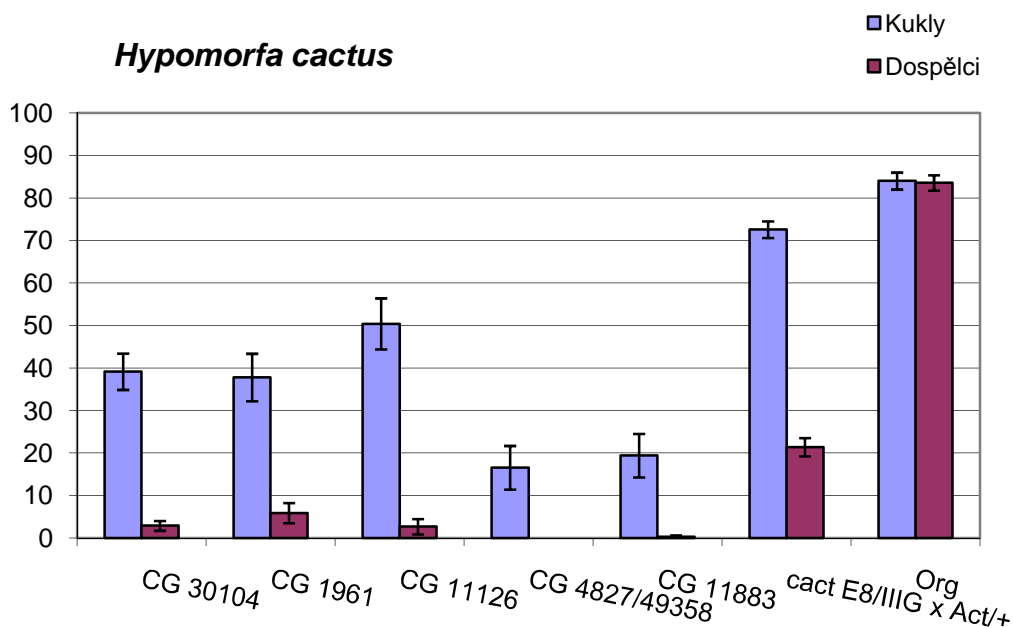
Jako pozitivní kontrola použit oregon. Vajíčka byla opět promyta lihem.

Zpočtená množství jedinců křížení viz. Příloha č. 4 a znázornění těchto hodnot jsou uvedena v grafech č. 11 a č. 12 a současně jsou fenotypy kukel zdokumentovány (Obr. 28 a 29).

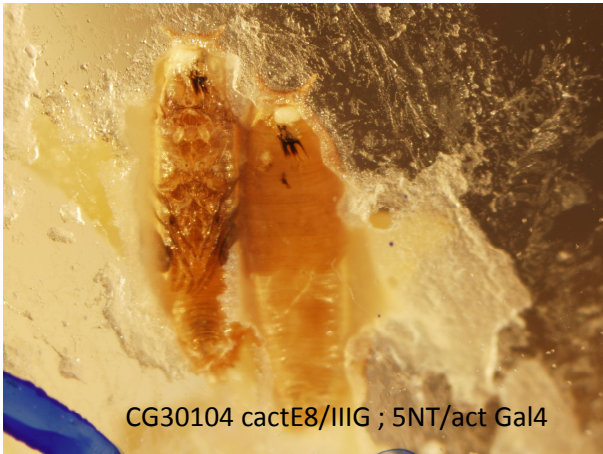


Graf 11: obsahující jedince genotypu $\frac{D13}{E8}; \frac{5NT}{act-Gal4}$ (CG30104, CG11883, CG1961, CG11126, CG4827), jako kontrolu $\frac{D13}{E8}; \frac{Act}{+}$ a oregon (Org)

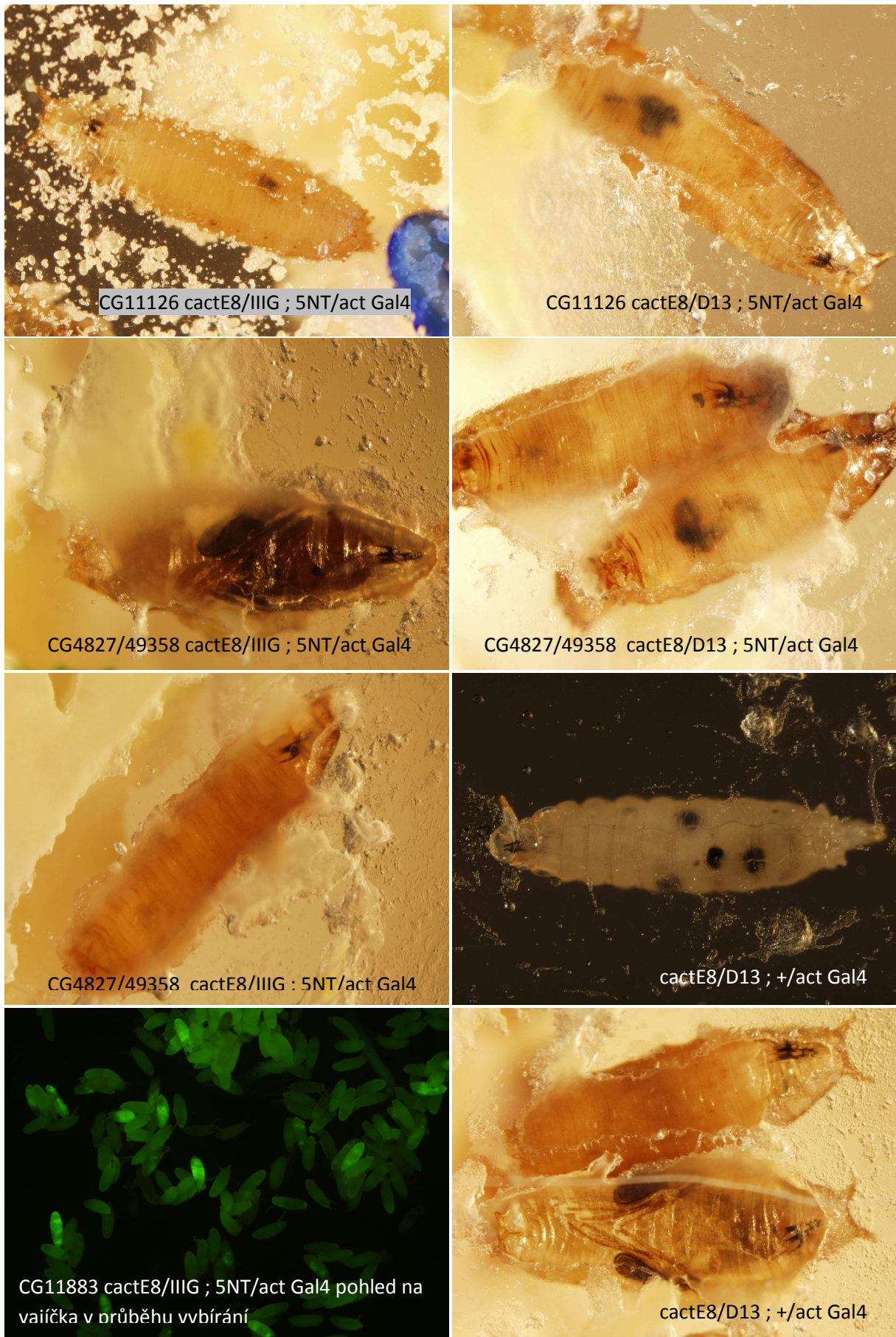
V Grafu č. 11 a 12 jsou uvedeny průměrné procentuální podíly vývoje kukel a dospělců z přenesených larev a standartní chyby.



Graf 12: obsahující jedince genotypu $\frac{IIIIG}{E8}; \frac{5NT}{act Gal4}$ (CG30104, CG11883, CG1961, CG11126, CG4827), jako kontrolu $\frac{IIIIG}{E8}; \frac{Act Gal4}{+}$ a oregon (Org)



Obr. 28. Foto kukel



Obr. 29. Foto kukel srovnání tvorby melanotických tumorů proti

5.3.2. Výsledky pokusu

- Z křížení jedinců s nulovým mutantem *cactus*^{D13/E8} u všech genů s RNAi je patrné zvýšené zakulení, oproti kontrole $\frac{D13}{E8}$; $\frac{Act}{+}$.
- Z křížení jedinců s mutací *cactus*^{IIIIG/E8} je oproti *cactus*^{D13/E8} snížená vitalita už ve stádiu kukel. Jedinců $\frac{IIIIG}{E8}$; $\frac{5NT}{act Gal4}$, co se dožili dospělosti je také minimum, pokud vůbec. Oproti $\frac{IIIIG}{E8}$; $\frac{5NT}{act Gal4}$, je současně vidět lepší vitalita kontroly $\frac{IIIIG}{E8}$; $\frac{Act}{+}$ u které byli i dospělci. Oregon má standardně dobrý výsledek.
- Z fotografií kukel je patrný větší výskyt tumorů u jedinců u nulového mutantu, než u hypomorfy, což odpovídá publikovaným závěrům. Ovšem indukce RNAi ektonukleotidáz celkově zmenšuje tumory na pozadí nulového *cactus* mutantu.

6. Diskuze

6.1. Záchrana *adgf-a* mutantního fenotypu inzerčními mutacemi v genech potenciálně kódujících ektonukleotidázy

Při genetickém skríninku, při kterém se hledaly delece potlačující projevy mutace *adgf-a*, byla mimo jiné izolována oblast Df(2R)robl-c s asi 10 geny, z nichž dva - *CG30104* a *CG4827* – kódují homologické geny k savčím ektonukleotidázám. Protože tyto geny by mohly být spojeny s tvorbou adenosinu, jevíly se jako potenciální geny zodpovědné za potlačující účinek delece Df(2R)robl-c. Pro ověření této hypotézy byly získány dvě P-elementové inserce v těchto genech. Pomocí PCR byla ověřena přesná poloha těchto dvou P-elementových insercí na molekulární úrovni.

Obě P-elementové inserce jsou homozygotně vitální, takže samy o sobě nemají žádný snadno zjištělý efekt na vývoj/přežívání. To může být způsobeno i tím, že inserce nemusí vést ke kompletní ztrátě funkce nebo exprese těchto genů. Inserce v genu *CG4827* je v nekódující části prvního exonu a v genu *CG30104* je v promotoru. I když efekt insercí nebyl dosud přesně stanoven, jejich umístění s velkou pravděpodobností ovlivňuje konečnou expresi těchto genů.

Tyto inzerční mutace byly dále vykříženy s mutací *adgf-a* (*karel*) a byl sledován efekt heterozygotní inserce v každém genu zvlášť ($\frac{671}{+}; \frac{karel}{karel}$ a $\frac{672}{+}; \frac{karel}{karel}$) a transheterozygotní v obou genech ($\frac{671}{672}; \frac{karel}{karel}$) na mutantní fenotyp způsobený homozygotní mutací *adgf-a* (*karel*). Namísto potlačení fenotypu, jak naznačovaly výsledky skríninku, se projevíly mutace ve všech konstitucích spíše zhoršením fenotypu, kdy se celkově snížilo procento zakuklených jedinců.

Předpoklad, že by prosté vypnutí genů pro ektonukleotidázu vedlo ke snížení produkce adenosinu a tak k potlačení *adgf-a* fenotypu se tak nepotvrdilo. Naopak se zdá, že vypnutí dvou důležitých regulátorů hladiny adenosinu najednou vede k příliš velkému rozhození metabolismu adenosinu, což se v důsledku projeví snížením přežívání takovýchto jedinců.

Je třeba dodat, že další zkoumání delece Df(2R)robl-c vedlo k identifikaci jiného genu v této oblasti (*CG14478*), který je skutečně zodpovědný za potlačení fenotypu a přesné namapování hranice původní delece vyloučilo dvě zkoumané ektonukleotidázy z oblasti potlačující fenotyp *adgf-a* (Žuberová, nepublikováno).

U tohoto pokusu byl ještě zkoumán případný vliv promývání vajíček před vylíhnutím pomocí lihu. Zde se ukázalo nepatrné zlepšení ve vitalitě. I když bylo zjištěno, že promývání

je lepší variantou pro analýzu přežívání, na výsledek výše diskutovaného pokusu toto zjištění vliv nemělo. Toto zlepšení bylo nejspíše způsobeno eliminací případných nákaz ať už v podobě různých bakterií či plísní. A proto v dalších pokusech bylo promýváno lihem pokaždé.

6.2. Ověření molekulárního efektu RNA interference pěti genů s potenciální ektonukleotidázovou úlohou a fenotypová analýza

Druhým cílem práce bylo na molekulární úrovni otestovat, zda-li je možné vypnout/potlačit expresi všech 5 drozofilích genů homologických se savčími ektonukleotidázami pomocí RNA interference, a zjistit případný fenotypový efekt při vypnutí. Použili jsme RNAi linie z VDRC centra a pomocí ubikvitního aktinového Gal4 driveru jsme indukovali interferenci ve většině buněk vyvíjejících se drozofil. Pomocí semikvantitativní RT-PCR se podařilo prokázat úspěšnou RNA interferenci pro 4 z 5 genů. Při zavádění metody jsme optimalizovali počet cyklů PCR, kdy produkt ještě narůstá, ale stále ho není tolik, aby se saturovala reakce. Ve 4 případech byl přítomen PCR produkt kontroly, tj. RNA izolované z divokého typu bez RNAi. V jednom případě, u genu *CG11883*, je zřejmě transkripce příliš nízká, kdy transkript nebylo možno ve vývojovém stádiu, v jakém jsme detekovali i transkripty ostatních genů, detekovat.

Ve všech 4 detekovatelných případech prokázala tato metoda, že indukce RNAi pomocí act-Gal4 potlačuje expresi ektonukleotidáz, kdy na rozdíl od kontroly se na gelu neobjevil žádný PCR produkt. Kontrola pomocí house-keeping genu *RP49* byla ve všech případech srovnatelná s divokým typem bez RNAi. Nemůžeme bohužel říci, zda došlo k úplné degradaci transkriptu, nebo jen ke snížení pod detekovatelnou hranici, nicméně ve všech případech došlo k výraznému a jasně detekovatelnému potlačení.

Zajímavě dopadla další kontrola u larev, které sice obsahovaly konstrukt pro RNAi, ale neměly Gal4 driver, tudíž by nemělo docházet k indukci RNAi. Nicméně ve třech případech bylo i u těchto organismů detekováno částečné snížení transkriptu. Nejvíce se to projevilo u genu *CG4827* v obou inzercích (49358, 49359). U genů *CG30104* a *CG11126* též došlo ke snížení exprese bez indukce. Tento efekt nicméně není překvapující, velmi často se stává, že exprese je ovlivněna místem, kam se konstrukt pro RNAi vložil - dochází k tzv. podtečení a částečné expresi konstruktů, aniž bych indukoval jeho expresi pomocí GAL4 driveru. Snad až na *CG4827* je možné konstatovat, že indukce GAL4 driverem vede k mnohem výraznějšímu efektu RNAi na molekulární úrovni.

Analýza efektu RNAi na fenotypové úrovni ukázala snížení životaschopnosti jedinců u všech analyzovaných genů. Je třeba ale konstatovat, že i RNAi bez indukce, tj. bez Gal4 driveru ($\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$), vedla ve všech případech ke snížení životaschopnosti. To by na první pohled mohlo být v dobrém souladu s výše uvedenou molekulární analýzou, která naznačuje podtěkání RNAi konstruktů. Ovšem ve většině případů vedla indukce Gal4 driverem ke zvýšení efektu RNAi na molekulární úrovni, což se neprojevuje ve všech případech na fenotypové úrovni ($\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act\ GAL4}$). Pouze ve třech případech vede indukce Gal4 driverem k dalšímu snížení životaschopnosti. Z toho u jednoho genu je výsledek rozporuplný, kdy byly použity dvě různé inzerce toho samého konstruktů (RNAi pro *CG4827*). U obou inzercí byl prokázán efekt na molekulární úrovni, a přesto se na fenotypové úrovni tyto inzerce významně liší. Je třeba poznamenat, že pro zjednodušení křížení byly jako kontroly bez indukce použity mouchy s RNAi konstruktem proti *TM6B* balancerovému chromozomu, namísto Gal4 driveru ($\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6B}$). Mouchy heterozygotní pro *TM6B* prospívají normálně, ale další mutace nebo zátěž (jako například RNAi) mohou spolu s *TM6B* někdy vést ke snížení životaschopnosti. Tudíž nelze vyloučit, že do jisté míry za snížení životaschopnosti kontrol může právě *TM6B* balancer. Bylo by tedy zapotřebí dále otestovat heterozygoty pro RNAi konstrukty bez balanceru. Víme, že i homozygoti jsou životaschopní, ale nebylo počítáno přesné procento přeživších much. V tuto chvíli tedy můžeme konstatovat pouze to, že potlačení exprese genů *CG1961* a *CG11883* by vzhledem k porovnání kontroly bez indukce a s indukcí RNAi mohlo vést ke snížení životaschopnosti. U genu *CG1961* by to bylo již na úrovni larválních stádií, kdy se zakuklí méně jedinců, než u kontroly bez indukce, u genu *CG11883* spíše až na úrovni metamorfózy, kdy vzniká nižší procento dospělců. Další práce ovšem bude nutná pro ověření a lepší objasnění dosažených výsledků.

6.3. Efekt vypnutí ektonukleotidáz u nulové a hypomorfní mutace *cactus*

Výsledky uvedené v Doležal a kol. (2005) vedly k hypotéze, že ektopická aktivace dráhy Toll (např. mutací v genu *cactus*) by mohla vést ke zvýšené hladině adenosinu. Over-exprese ADGF-A, která hladinu adenosinu snižuje, vede k částečné záchraně mutantů *cactus* (Doležal a kol. 2005). Proto jsme se rozhodli testovat hypotézu, že zabránění tvorbě adenosinu ektonukleotidázami by mohlo podobně vést k záchraně mutantů *cactus*. Využili jsme opět RNAi linie pro všech pět drozofilích genů homologických savčím ektonukleotidázám.

Získané výsledky jsou poněkud překvapující. Zatímco u nulového *cactus* mutanta (*cact^{D13}/cact^{E8}*) skutečně dochází vypínáním ektonukleotidáz k mírné záchraně mutantního fenotypu, jak předpovídá hypotéza, u hypomorfy (*cact^{III}G/cact^{E8}*) dochází naopak ke zhoršení. Zde bychom spíše předpokládali, že pokud bude vůbec docházet k nějaké záchraně, bude této záchrany dosaženo snáze právě u hypomorfy, než u nulového *cactus* mutanta, který má mnohem drastičtější projev. Předchozí výsledky s prostým vypínáním ektonukleotidáz za jinak normálních podmínek naznačují, že tato deregulace tvorby adenosinu spíše poškozuje jinak normální jedince. Je možné, že hypomorfní mutace v genu *cactus* je blíže tomuto případu, kdy poškození mutací *cactus* není tak drastické a vypnutí ektonukleotidáz spíše organismus dále poškozuje. Až v případě nulové mutace v genu *cactus* se původně poškozující efekt deregulace adenosinu za drastických podmínek způsobených nulovou mutací *cactus* projeví jako kompenzující mechanismus. V tomto ohledu by mohlo být zajímavé to, že nejvyšší záchranou se projevuje vypnutí právě *CG1961*, který se v larválních stádiích projevuje nejsilnějším efektem u jinak normálních jedinců.

Jako problematické se mohou zdát záchrany nulového *cactus* mutanta vypínáním genů *CG30104* a *CG4827*, jejichž inzerční mutace vedou ke zhoršení fenotypu na pozadí mutace *adgf-a*. Zde je třeba si uvědomit, že *cactus* mutant má schopnost regulace hladiny adenosinu degradací pomocí ADGF-A, narozdíl od *adgf-a* mutanta, a některé výsledky potvrzují, že tato regulace u *cactus* mutantů je důležitá (Doležal, osobní komunikace).

Je nutné zdůraznit, že dosažené výsledky (analýza přežívání) mohou být ovlivněny podmínkami experimentu, u kterých je velmi obtížné zabránit variabilitě (Doležal a Žuberová, osobní komunikace). To naznačuje i variabilita přežívání kontrol s divokým typem. Na druhou stranu mutantní fenotyp a přežívání kontrol nulového a hypomorfního mutanta *cactus* bez RNAi jsou v souladu s předchozími výsledky (Qiu a kol. 1998 a Doležal a kol. 2005). Záchranný efekt u nulového mutanta je navíc mimo efektu na přežívání, který přece jen není tak výrazný, dále podpořen analýzou fenotypu, kdy u nulového mutanta *cactus* dochází k výrazné tvorbě melanotických tumorů, zatímco vypnutí ektonukleotidáz potlačuje i tento efekt (Obr. 28, 29).

Tyto výsledky tedy naznačují, že v extrémním případě nulového *cactus* mutanta může vypnutí ektonukleotidáz fungovat jako kompenzační mutace. Toto je potřeba dále ověřit, zejména se vypořádat s variabilitou podmínek a pokusit se o buněčné/tkáňově specifické interakce mezi Toll dráhou a regulací adenosinu.

7. Závěr

1. U *Drosophila melanogaster* byla ověřena poloha P-elementových inzercí v genech *CG30104* a *CG4827*, homologických savčím ektonukleotidázám.

U těchto mutantů bylo provedeno křížení s mutací *adgf-a[karel]* pro drozofilí adenosin deaminázu. U potomků homozygotních pro *adgf-a* mutaci a heterozygotních pro každý z genů *CG30104* a *CG4827* nebo transheterozygotních pro tyto geny byl zkoumán fenotypový projev, ze kterého bylo zjištěno, že mutace v těchto genech nezachraňuje *adgf-a* mutantní fenotyp. Předpoklad, že by prosté vypnutí genů pro ektonukleotidázu vedlo ke snížení produkce adenosinu a tak k potlačení *adgf-a* fenotypu, se tak nepotvrdil. Naopak se zdá, že vypnutí dvou důležitých regulátorů hladiny adenosinu najednou vede k příliš velkému rozhození metabolismu adenosinu, což se v důsledku projeví snížením přežívání takových jedinců.

2. Byla izolována celková RNA z linií s indukovanou RNAi pro geny ektonukleotidáz (*CG30104*, *CG11883*, *CG1961*, *CG11126* a *CG4827*) a pomocí semikvantitativní RT-PCR se podařilo prokázat, že indukce pomocí act-Gal4 potlačuje jejich expresi. Pouze gen *CG11883*, zřejmě kvůli nízké transkripci, nebylo možné analyzovat. Zjištěn byl také částečný efekt RNAi bez indukce Gal4 driverem, pravděpodobně kvůli podtékání RNAi konstruktů. Potlačení exprese genů *CG1961* a *CG11883* pomocí RNAi pravděpodobně vede ke snížení životaschopnosti během larválních, resp. kuklových stádií. Bude ovšem potřeba další ověření dosažených výsledků fenotypových studií.
3. Protože ektopická aktivace dráhy Toll by mohla vést ke zvýšené hladině adenosinu, rozhodli jsme se testovat hypotézu, že zabránění tvorbě adenosinu ektonukleotidázami (opět pomocí RNAi) by mohlo vést k záchraně mutantů *cactus*. Výsledky naznačují, že v extrémním případě nulového *cactus* mutanta může vypnutí ektonukleotidáz fungovat jako kompenzační mutace a zvyšovat jeho přežívání.

8. Použitá literatura

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., a kol. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461): 2185–95.

Ashburner M. (1989) *Drosophila* a laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Ashburner M., Golic K.G., Hawley R.S. 2005: *Drosophila: A Laboratory Handbook.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 162–4.

Ashburner M., Thompson J.N. (1978) The laboratory culture of *Drosophila*. In: The genetics and biology of *Drosophila*. (Ashburner M, Wright TRF (eds.)). Academic Press 2A: 1–81.

Bakker K. (1961) "An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster*.". *Archives Neerlandaises de Zoologie* 14: 200–81.

Belvin M.P., Anderson K.V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 393–416.

Blackburn M.R., Datta S.K., Kellems R.E. (1998) Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. *J Biol Chem* 273(9): 5093–100.

Bodin P., Burnstock G. (1998) Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res* 47: 351–354.

Buck L.T. (2004) Adenosine as a signal for ion channel arrest in anoxia-tolerant organisms. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139(3): 401–14.

Clark A.G., Aguade M., Prout T., Harshman L.G., a Langley C.H. (1995) Variation in sperm displacement and its association with accessory gland protein loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139: 189–201.

Clark A.G., Begun D.J., a Prout T. (1999) Female X Male interactions in *Drosophila* sperm competition. *Science* 283: 217–220.

Cronstein B.N. 1994: Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol* 76: 5–13.

Daddona P.E., Kelley W.N. (1981) Characteristics of an aminohydrolase distinct from adenosine deaminase in cultured human lymphoblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 14: 280–290.

DeLotto Y., DeLotto R. (1998) Proteolytic processing of the *Drosophila* Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mech Dev* 72: 141–148.

Doležal T., Doleželová E., Žurovec M., Bryant P.J. (2005) A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS Biol* 3(7): 1213–1224.

Doležal T., Gazi M., Žurovec M., Bryant P.J. (2003) Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 165(2): 653–66.

Doleželová E., Nothacker H.P., Civelli O., Bryant P.J., Žurovec M. (2007) A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem Mol Biol* 37(4): 318–29.

Dunwiddie T.V., Masino S.A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31–55.

Dushay M.S., Asling B., Hultmark D. (1996) Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10343–10347.

Engles W.R. (2000) Science 288

Fencková M., Doležal T. (2007) Genetic interaction of Toll signaling pathway and adenosine signaling in *Drosophila*. Program and Abstracts. 48th Annual *Drosophila* Research Conference, Philadelphia, PA.

Fredholm B.B. a kol. (2001) International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev* 53: 527–552

Geisler R., Bergmann A., Hiromi Y., Nusslein-Volhard C. (1992) *Cactus*, a gene involved in dorsoventral pattern formation of *Drosophila*, is related to the I kappa B gene family of vertebrates. *Cell* 71: 613–621.

Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen F., Pollara B., Meuwissen H.J., (1972) Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 2: 1067–1069.

Halligan D.L., Keightley P.D. (2006) "Ubiquitous selective constraints in the *Drosophila* genome revealed by a genome-wide interspecies comparison". *Genome Res* 16 (7): 875–84.

Hasko G. a Cronstein B.N. (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* 25(1)

Hasko G., Deitch E.A., Szabo C., Nemeth Z.H., Vizi E.S. (2002) Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. *Curr Opin Pharmacol* 2: 440–444.

Hecht P.M., Anderson K.V. (1993) Genetic characterization of tube and pelle, genes required for signaling between Toll and dorsal in the specification of the dorsolventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Genetics* 135: 405–417.

Hershfield M.S., Mitchell B.S. (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: Mc Graw-Hill 2585–2611.

Horng T., Medzhitov R. (2001) *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12654–12658.

Hughes K.A. (1997) Quantitative genetics of sperm precedence in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 145: 139–151.

Chang, Z.Y., Nygaard, P., Chinault, A.C., Kellems, R.E. (1991) Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues: implications for catalytic function. *Biochemistry* 30: 2273–2280.

Charlab R., Rowton E.D., Ribeiro J.M. (2000) The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp. Parasitol.* 95: 45–53.

Charlab R., Valenzuela J.G., Andersen J., Ribeiro J.M. (2001) The invertebrate growth factor/CECR1 subfamily of adenosine deaminase proteins. *Gene* 267: 13–22.

Chiang H.C., Hodson A.C. (1950) "An analytical study of population growth in *Drosophila melanogaster*.". *Ecological Monographs* 20: 173–206.

Ip Y., a kol. 1993: Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75: 753–763.

Irving P., Ubeda J.M., Doucet D., Troxler L., Lagueux M., Zachary D., Hoffmann J.A., Hetru C. a Meister M. (2005) New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis *Cellular Microbiology* 7 (3): 335–350.

Janeway C. (1989) Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54: 1–13.

Latini S., Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 79(3): 463–84.

Leclerc V., Reichhart J.M. (2004) The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews* 198: 59–71.

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973–983.

Lemaitre B., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14614–14619.

LeMosy E K , Tan Y Q , Hashimoto C. (2001) Activation of a protease cascade involved in patterning the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5055–5060.

Lewis E.B., Thomas Hunt Morgan and His Legacy [cit. 20. dubna 2007]. Dostupné na internetu: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/articles/lewis/index.html>

Maier S.A., Podemski L., Graham S.W., McDermid H.E., Locke J. (2001) Characterization of the adenosine deaminase-related growth factor (ADGF) gene family in *Drosophila*. *Gene* 280: 27–36.

Medzhitov R. a Janeway C.A. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–298.

MEISTER M., LEMAITRE B. a HOFFMANN J.A. (1997) Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays.* 19: 1019-1026.

Nicolas E., Reichhart J., Hoffmann J., Lemaitre B. (1998) *In vivo* regulation of the I κ B homologue cactus during the immune response of *Drosophila*. J Biol Chem 273: 10463–10469.

Nusslein-Volhard C., Lohs-Schardin M., Sander K., Cremer C. (1980) A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternaleffect mutant of *Drosophila*. Nature 283: 474–476.

Nyce J.W. (1999) Insight into adenosine receptor function using antisense and gene- knockout approaches. Trends Pharmacol. Sci. 20: 79–83.

Pastor-Anglada M. a kol. (2001) Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. Mol. Membr. Biol. 18: 81–85.

Pitnick S. (1996) "Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*". American Naturalist 148: 57–80.

Pitnick S., Spicer G.S, a Markow T.A. (1995) How long is a giant sperm? Nature 375: 109.

Ralevic V. a Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol. Rev. 50: 413–492.

Reiter a kol. (2001) Genome Research 11(6): 1114–25.

Riazi M.A., Brinkman-Mills P., Nguyen T., Pan H., Phan S., Ying F., Roe B.A., Tochigi J., Shimizu Y., Minoshima S., Shimizu N., Buchwald M., McDermid H.E. (2000) The human homolog of insect-derived growth factor, CECR1, is a candidate gene for features of cat eye syndrome. Genomics 64: 277–285.

Richard E., Alam S.M., Arredondo-Vega F.X., Patel D.D., Hershfield M.S. (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.

Rutschmann S., Kilinc A., Ferrandon D. (2002) The Toll pathway is required for resistance to gram positive bacterial infections in *Drosophila*. J Immunol 168: 1542–1546.

Soderhall K., Cerenius L. (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr Opin Immunol 10: 23–28.

Sperlagh B. a kol. (2000) Ischemic-like condition releases norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips. J. Neuroimmunol. 111: 45–54.

Tauszig-Delamasure S., Bilak H., Capovilla M., Hoffmann J.A., Imler J.L. (2002) *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. Nat Immunol 3: 91–97.

Tauszig-Delamasure S., Bilak H., Capovilla M., Hoffmann J.A., Imler J.L. (2002) *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. Nat Immunol 3: 91–97.

Towb P., Bergmann A., Wasserman S.A. (2001) The protein kinase Pelle mediates feedback regulation in the *Drosophila* Toll signaling pathway. *Development* 128: 4729–4736.

Weber A.N., a kol. (2003) Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* 4: 794–800.

Žurovec M., Doležal T., Gazi M., Pavlova E., Bryant P.J. (2001) ADGFs- growth factors with enzymatic activity. *Annual Drosophila Research Conference* 42: 69.

Žurovec M., Doležal T., Gazi M., Pavlova E., Bryant P.J. (2002) Adenosine deaminaserelated growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4403–4408.

9. Přílohy

Příloha č. 1

Seznam a sekvence použitých primerů:

1. Primery použité pro kontrolu polohy P-elementových inzercí v genech pro ektonukleotidázy (*CG30104* a *CG4827*)

A. Pro gen *CG4827*

Forward primer – *CG 4827* forward x P-elementový (revers)

Očekávaný produkt o délce: 2306 bp

Sekvence primeru CTC TTC GAT CGG CAC TTC CC

Teplota nasedání primeru: $61-2 = 59$ °C

Revers primer – *CG4827* revers x P - elementový (forward)

Očekávaný produkt o délce: 1430 bp

Sekvence primeru GAT AAC GCC AAC CTT CAC CC

Teplota nasedání primeru: $59-2 = 57$ °C

P-element je z obou stran ohraničen krátkými opakujícími se sekvencemi (forward a revers primery), jejichž sekvence je palindromická CGA CGG GAC CAC CTT ATG TTA TTT CAT CAT G

B. Pro gen *CG30104*

Forward primer – *CG30104* forward x P-elementový (revers)

Očekávaný produkt o délce: 1555 bp

Sekvence primeru TAG AGA TGG CAT ATC ATT GGG

Teplota nasedání primeru: $57-2 = 55$ °C

Revers primer – *CG30104* revers x P-elementový (forward)

Očekávaný produkt o délce: 1564 bp

Sekvence primeru TTG TTG GAG GTA GCG GGG C

Teplota nasedání primeru: $59-2 = 57$ °C

P-element je z obou stran ohraničen krátkými opakujícími se sekvencemi (forward a revers primery), jejich sekvence je palindromická CGA CGG GAC CAC CTT ATG TTA TTT CAT CAT G

Příloha č. 2

kontrola

Jako kontroly použity u

1. $\frac{671}{672}; \frac{karel}{karel} \Rightarrow \frac{671/672}{Cyo}; \frac{karel}{TM3 GFP ser}$
1. $\frac{671}{+}; \frac{karel}{karel} \Rightarrow \frac{671/+}{Cyo GFP}; \frac{karel}{TM3 GFP ser}$
2. $\frac{672}{+}; \frac{karel}{karel} \Rightarrow \frac{672/+}{Cyo GFP}; \frac{karel}{TM3 GFP ser}$

Vysvětlivky : **671** w[1118]; P{w[+mC]=XP}CG30104[d00824]

672 y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}CG4827[EY02176]

182 +/+ ; karel/TM3 GFP ser

671/+ ; karel/karel	Larvy	Kukly	Dospělci	672x182 kontrola	Larvy	Kukly	Dospělci
	25	0	0		25	14	12
	25	0	0		25	14	14
	25	0	0		25	16	15
	25	0	0	182x671 kontrola			
	25	0	0		25	5	5
	25	0	0		25	4	2
672/+ ; karel/karel					25	4	2
	25	0	0	671x672 kontrola			
	25	0	0		25	11	11
	25	0	0		25	14	14
	25	0	0		25	20	20
	25	0	0				
672/671 ; karel/karel							
	25	0	0				
	25	0	0				
	25	0	0				
	25	0	0				
	25	0	0				
	25	0	0				

Tab. 4. Nepromyto lihem

671/+ ; karel/karel	Larvy	Kukly	Dospělci	672x182 kontrola	Larvy	Kukly	Dospělci
	25	1	0		25	14	14
	25	0	0		25	23	22
	25	1	0		25	21	21
	25	0	0	182x671 kontrola			
	25	0	0		25	18	15
	25	0	0		25	15	13
672/+ ; karel/karel					25	12	10
	25	1	0	671x672 kontrola			
	25	0	0		25	14	13
	25	1	0		25	11	11
	25	0	0		25	13	13
	25	0	0				
	25	0	0				
672/671 ; karel/karel							
	25	0	0				
	25	2	0				
	25	2	0				
	25	0	0				
	25	0	0				
	25	0	0				

Tab. 5. Promyto lihem

Příloha č. 3

Geny	Larvy	Kukly	Dospělci	Kukly	Dospělci
		$\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6 B}$	$\frac{+}{+}; \frac{5NT}{TM6 B}$	$\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act GAL4}$	$\frac{+}{+}; \frac{5NT}{Act GAL4}$
<i>CG4827/49358</i>	50	18	18	9	0
	50	30	24	13	0
	50	22	18	16	1
	50	27	24	13	0
	50	22	21	11	0
<i>CG11883</i>	50	18	15	13	4
	50	11	10	14	3
	50	11	11	11	2
	50	11	10	14	7
<i>CG11126</i>	50	12	11	21	20
	50	18	16	18	16
	50	21	19	13	13
	50	16	16	18	13
	50	19	15	20	16
<i>CG4827/49359</i>	50	19	15	20	16
	50	16	15	24	22
	50	19	14	25	18
	50	16	10	31	22
	50	19	14	25	18
<i>CG1961*</i>	45	19	18	11	11
	45	23	15	9	9
	45	21	17	9	9
	50	29	20	5	4
	50	29	20	5	4
<i>CG30104</i>	45	22	20	17	20
	45	20	16	18	18
	45	24	19	20	20
	45	24	21	15	15
	45	24	21	15	15

Tab. 6A: Počty kontrolovaných jedinců

*1049 u tohoto křížení je 2:1 pravděpodobnost většího množství TM6 B, než GAL4, viz. Křížení obsažené ve výsledkové části.

Oregon	Larvy	Kukly	Dospělci
		oregon	oregon
	50	44	44
	50	44	39

Tab. 6B: Počty kontrolovaných jedinců

Kuklení jedinců prováděno s denním rozestupem. A výsledky uvedeny v grafech.

Příloha č. 4

	Larvy	Kukly	Dospělci		Larvy	Kukly	Dospělci
<i>CG30104</i>				<i>CG11126</i>			
	16	7	0		11	7	1
	30	7	0		18	3	0
	5	0	0		25	13	0
	30	12	0		17	13	0
	27	12	1		19	9	0
	25	9	1		17	8	0
	20	5	0		8	4	1
	25	8	2		4	2	0
	14	9	2				
	25	12	0				
	19	11	0				
	27	12	1				
	18	7	0				
	14	7	1				
<i>CG11883</i>				<i>CG4827/49358</i>			
	12	3	0		23	1	0
	27	4	1		25	3	0
	2	0	0		5	2	0
	4	2	0		30	4	0
	8	1	0		15	1	0
	22	2	0		25	4	0
	4	0	0		20	1	0
	9	2	0		28	0	0
	15	2	0		20	0	0
	12	2	0		27	3	0
	8	4	0		7	4	0
					18	6	0
<i>CG1961</i>	larvae	pupae	adults				
	22	8	1				
	13	3	0				
	30	9	3				
	14	5	3				
	25	11	0				
	14	4	0				
	25	10	3				
	4	2	0				
	8	1	0				
	9	7	1				

Tab. 7. A IIIIG/E8 ; 5NT/Act-Gal4

	Larvy	Kukly	Dospělci
Org			
	25	21	21
	25	22	22
	25	22	22
	25	23	22
	25	20	20
	25	20	20
	25	21	21
	25	22	22
	25	18	18
IIIIG/E8 ; Act/+			
	25	19	6
	25	17	8
	25	20	3
	25	15	4
	30	20	7
	30	20	7
	30	19	10
	30	21	7
	25	19	4
	30	22	9
	30	25	4
	30	21	9
	35	23	9
	25	19	5
	25	19	0
	30	27	6

Tab. 7. B Kontrola IIIIG/E8 ; Act/+, Org-oregon

	Larvy	Kukly	Dospělci		Larvy	Kukly	Dospělci
<i>CG30104</i>				<i>CG11126</i>			
	9	8	0		25	15	0
	25	7	0		25	13	0
	25	13	0		20	10	0
	1	1	0		20	10	0
	25	13	0		25	13	0
	25	15	0		14	9	0
	25	16	0		25	16	0
	6	3	0		10	6	0
	35	24	0		30	19	0
	10	4	0		14	7	0
	30	8	0		30	15	0
	18	6	0		14	7	0
	15	10	0		21	12	0
<i>CG11883</i>					18	8	0
	7	2	0				
	10	7	0				
	15	15	0				
	17	9	0				
	31	21	0				
	20	11	0				
	15	5	0				
	7	2	0				
	24	10	0				
	15	4	0				
	10	2	0				
	16	10	0				
<i>CG1961</i>				<i>CG4827/49358</i>			
	25	18	0		25	9	0
	20	10	0		8	4	0
	25	18	0		17	12	0
	25	17	0		30	19	0
	25	12	0		30	13	0
	20	7	0		28	23	0
	25	11	0		11	3	0
	15	10	0		27	14	0
	30	15	0		20	8	0
	30	22	0		30	22	0
	30	24	0		18	11	0
	30	16	0				
	25	15	0				
	24	12	0				

Tab. 8. A D13/E8 ; 5NT/Act-Gal4

	Larvy	Kukly	Dospělci
Org			
	25	9	8
	25	9	8
	25	15	15
	25	12	11
	25	12	12
	25	19	19
	25	16	15
	25	16	15
	25	16	16
	25	18	18
	25	18	18
	25	12	12
	25	12	12
	25	14	14
	25	23	23
D13/E8 ; Act/+			
	25	10	0
	25	13	0
	25	6	0
	25	10	0
	40	10	0
	30	10	0
	30	5	0
	30	8	0
	20	6	0
	30	8	0
	30	16	0
	30	14	0
	35	18	0
	16	10	0

Tab. 8. B. Kontrola D13/E8 ; Act/+, Org- oregon

Příloha č. 5 Seznam použitých zkratk:

cDNA.....Komplementární DNA

DEPC H₂O.....1ml DEPC + 1l H₂O a vyklákováno

DEPC.....Diethylpyrokarbonát

Epp.....Eppendorfka (mikrozkumavka)

RT.....Pokožová teplota

bp.....Páru bazí

PCR.....Polymerázová řetězová reakce

dNTP.....Deoxi nukleotid trifosfát

PCR H₂O.....Dedestilovaná H₂O**Příloha č. 6** Seznam použitých stoků *Drosophila*

Laboratorní číslo linie	Genotyp
604	Xa/CyOGFP ; TM3GFP
628	w; cact[E8]/CyoGFP
671	CG30104 w[1118]; P{w[+mC]=XP}CG30104[d00824]
672	CG4827 y[1]w[67c23];P{w[+mC]y[+mDint2]=EPgy2}CG4827[EY02176]
1047	CG30104 w/w; +/+; UAS-2052/UAS-2052
1048	CG11883 w/w; +/+; UAS-7418/UAS-7418
1049	CG1961 w/w; +/+; UAS-9688/TM3-Sb
1050	CG11126 w/w; +/+; UAS-7206/UAS-7206
1052	CG4827/49358 w/w; +/+; UAS-5294/UAS-5294
1053	CG4827/49359 w/w; +/+; UAS-5294/UAS-5294
1018	act-Gal4/TM6B, Hu, Tb
182	w; <i>ADGF-A</i> ^{karel} /TM3 Act-GFP Ser