

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Katedra molekulární biologie



Analýza efektu RNAi na gen ADGF-A u *Drosophila melanogaster*

Bakalářská práce

Vypracovala: Šárka Pospíšilová
Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Doležal Ph.D.

České Budějovice, 2010

Pospíšilová, Š., 2010: Analýza efektu RNAi na gen *ADGF-A* u *Drosophila melanogaster* (Analysis of RNAi effect on the *ADGF-A* gene in *Drosophila melanogaster* Bc. Thesis, in Czech] – 46p, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic.)

Anotace:

Na *Drosophila melanogaster* (octomilka), klasickém modelovém organismu používaném v genetickém výzkumu, byl vytvořen model pro zkoumání účinku adenosin deamináz a dopadu jejich nedostatečné funkce na vitalitu drozofily. Na tomto modelu začal rozsáhlý výzkum, který má odhalit procesy, na které má vliv vysoká hladina extracelulárního adenosinu. Adenosin je důležitá signální molekula v mnoha různých procesech v tělech různých živočichů. Zvýšená hladina extracelulárního adenosinu vede k několika různým defektům až letalitě. Zvýšená hladina adenosinu může být způsobena nedostatečnou funkcí enzymu adenosin deaminázy, která adenosin odbourává. Cílem této bakalářské práce bylo zjistit účinek RNAi na gen *ADGF-A*. Měla jsem určit vitalitu transgenů, kterým by RNAi měla snižovat hladinu enzymu ADGF-A a poté metodou western blot ověřit míru snížení exprese tohoto enzymu.

Drosophila melanogaster is a classical model organism for genetic studies. The model for studying an effect of an adenosine deaminases and impact of its malfunction to the fruitfly vitality was established. Wide research is held using this model. The research aims to reveal processes which are influenced by high level of the extracellular adenosine. The adenosine is an important signaling molecule. It influences lot of processes in the body of many animals. The increased level of the extracellular adenosine causes several defects or lethality. The malfunction of the enzyme adenosine deaminase may cause these defects because adenosine is not converted into inosine. The goal of this bachelor thesis is to assess the effects of RNAi on a gene *ADGF-A* encoding *Drosophila* adenosine deaminase. RNAi should decrease the level of this enzyme. I was supposed to determine the vitality of flies with such activated RNAi and then verify the expression level of this enzyme

Finanční podpora: GAČR 301/07/0814

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, 4. 1. 2010

.....
Šárka Pospíšilová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomášovi Doležalovi Ph.D., za všechnu pomoc a odborné rady, které mi dal, při práci v laboratoři i při vypracování této práce. Dále chci poděkovat Mgr. Michaelle Fenckové a všem ostatním pracovníkům laboratoře za pomoc při řešení problémů během mé práce. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině a svému příteli za podporu a pomoc při vypracování této práce.

OBSAH:

1. ÚVOD	1
1.1 ADENOSIN A ADENOSIN DEAMINÁZY	1
1.1.1 Adenosin	1
1.1.2 Adenosin deaminázy	1
1.1.2.1 Adenosin deaminázy u <i>D. melanogaster</i>	2
1.1.2.2 Mutanti v <i>ADGF</i> genech:	3
1.2. DROZOFILA JAKO MODEL A GENETICKÉ NÁSTROJE	4
1.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.2.2 UAS-Gal4	5
1.2.3 RNAi	6
2. CÍL PRÁCE:	8
3. METODY	9
3.1 Pěstování a řízení <i>Drosophila melanogaster</i> :	9
3.2 Stanovení vitality larev a dospělců	10
3.3 PCR	10
3.4 Western blot	12
3.5 Dot blot	15
4. VÝSLEDKY:	16
4.1 Křížení <i>D. melanogaster</i>	16
4.2 Stanovení vitality při aktivaci RNAi u genu <i>ADGF-A</i>	24
4.3 PCR	25
4.4 Western blot a dot blot	31
5. DISKUSE:	37
6. ZÁVĚR:	38
7. POUŽITÉ ZKRATKY:	39
8. LITERATURA:	40
9. PŘÍLOHY:	43

V celé práci používám řadu zkratk a výrazů, převzatých z angličtiny, které nemají český ekvivalent, ani je není dost dobře možné stručně opsat. Seznam zkratk je na stránce č. 39.

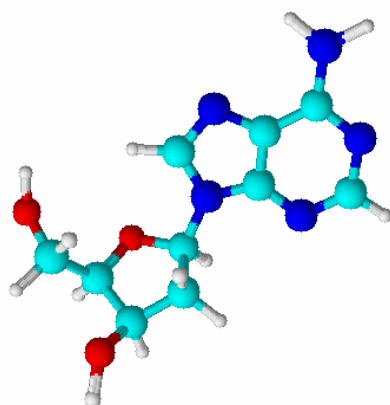
1. Úvod

1.1 Adenosin a adenosin deaminázy

1.1.1 Adenosin

Adenosin je purinový nukleosid, který se skládá z adeninu a ribózy, které jsou spojené glykosidickou vazbou. Podílí se na mnoha biochemických dějích v buňce: na regulaci iontových kanálů a membránového potenciálu, ovlivňuje uvolňování hormonů a působí jako neuromodulátor (Borowiec et al., 2006). Jak adenosin působí je závislé na tom, na který receptor působí a v jaké je koncentraci (Latini a Pedata 2001). Tyto receptory dělíme do dvou tříd: P2X a P2Y. P2X jsou receptory spojené s kanály, které propouští kationy za účasti ATP. P2Y jsou receptory spřažené s G-proteiny. Ty se dělí na G_q , které aktivují fosfolipázu C a na G_i , které inhibují adenylátcyklázu a regulují iontové kanály a G_s jejichž antagonisty jsou xanthiny. (B.B. Fredholm, 2007).

Adenosin prochází přes hematoencefalickou bariéru.



Obrázek 1: Adenosin

Adenosin jako složka ATP (adenosin trifosfátu) pohání procesy, které potřebují energii, zatímco extracelulární adenosin je signální molekula, například v nervové soustavě, v gastrointestinálním traktu a játrech, ovlivňuje proudění krve a okysličování a imunitní odpověď (G.G.Yegutkin, 2008). Puriny a pyrimidiny mají také dlouhodobý účinek na dělení buněk a apoptózu (Kumar, Sharma 2009).

1.1.2 Adenosin deaminázy

Adenosin deamináza katalyzuje deaminaci adenosinu na inosin a deoxyadenosin na deoxyinosin. Adenosin deaminázy jsou evolučně konzervované proteiny se soudkovitou strukturou a atomem zinku v aktivním místě. Můžeme je rozdělit do dvou různých skupin.

První skupina ADA1 je specifická krátkým N-koncem a vyskytuje se především v cytoplazmě. Proteiny z této skupiny byly nalezeny u všech zkoumaných organismů. Mutace v lidském homologu je spojována s kombinovanou imunodeficiencí (SCID = severe combined immunodeficiency disease) (Richard, E., 2002).

Druhá skupina adenosin deamináz je nazývána ADGF/CECR1 (adenosin-deaminase related growth factor = růstový faktor příbuzný adenosin deaminázám). Od ADA1 skupiny se liší dlouhým N-koncem, ve kterém je signální sekvence pro místo určení v buňce nebo pro sekreci. Ne všechny tyto proteiny mají enzymatickou a mitogenní aktivitu. Lidský homolog *CECR1* při duplikaci způsobuje Cat eye syndrom (Maier, S.A., 2001) dědičná nemoc spojená s duplikací *CECR1*, projevuje se fyzickými vadami a lehkou mentální retardací.



Obrázek 2: Adenosin deamináza
(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Adenosine_deaminase_1VFL.png)

1.1.2.1 Adenosin deaminázy u *D. melanogaster*:

Šest *ADGF* a jeden *ADA1* gen byly nalezeny u *Drosophila melanogaster*.

Mutace v genu *ADGF-A* způsobuje u drozofily letální fenotyp. Tento fenotyp je způsoben zvýšenou hladinou adenosinu a deoxyadenosinu v extracelulárním prostoru. Adenosin je v určité koncentraci toxický pro některé buňky, pravděpodobně narušuje homeostázu intracelulárních nukleotidů. Některé buňky drozofily jsou odolné k vyšším koncentracím adenosinu, protože mají adenosin deaminázy na svém povrchu. Podobné mechanismy mají i některé lidské buňky, například lymfocyty.

Drozofila má šest různých genů pro tuto skupinu proteinů: *ADGF-A*, *ADGF-B*, *ADGF-C*, *ADGF-D*, *ADGF-E* a *ADGF-A2*. Tyto geny jsou na chromozomu III a nejsou příbuzné

s jinými růstovými faktory. ADGF-A je z této skupiny nejvíce exprimovaný protein u drozofily a je exprimovaný ve varlatech, lymfatických žlázách a méně v imaginálních discích. Je exprimován ve všech vývojových stádiích. ADGF-D je druhý nejvíce exprimovaný homolog a je exprimovaný v tukovém tělese a mozku. ADGF-B, -E a -A2 jsou exprimovány u samců a jejich exprese začíná až v pupálním stádiu. ADGF-A a -D mají velmi silnou enzymatickou a mitogenní aktivitu. *ADGF-A2* a *ADGF-A* sdílí první netranslatovaný exon, což ukazuje, že jde o produkty alternativního sestřihu. ADGF-A, -C, -D mají sekreční signální sekvenci. ADGF-B a -E mají mitochondriální signální sekvenci. ADGF-A2 má transmembránovou doménu.

1.1.2.2 Mutanti v *ADGF* genech:

Mgr. Doležalovi Ph.D. a jeho kolegům (2003) se podařilo vytvořit mutanty se ztrátou funkce u pěti ze šesti *ADGF* a různé jejich kombinace. Zjistili, že ztráta funkce ADGF-A je larválně letální, ADGF-C a -D (dvojmutant) je semiletální v larválním a pupálním stádiu.

Fenotyp *adgf-a* mutantů je letální v pozdním třetím larválním instaru. Jejich larvální vývoj je opožděný. Rozpadá se jim tukové těleso a většina třetích instarů má melanotické tumory. Drozofily s touto mutací se málokdy zakuklí a mají abnormální kukly. Že je tento fenotyp způsoben ztrátou funkce ADGF-A bylo potvrzeno záchranou fenotypu expresí transgenního ADGF-A spouštěného heat-shockem a nebo UAS promotorem s actin-Gal4 driverem. Dvojité mutanti *adgf-c adgf-d* vykazují semiletální fenotyp v průběhu larválního a pupálního stádia. Také mají opožděný vývoj. Jejich fertilita je nižší než u jejich heterozygotních sourozenců. Efekt obou mutací je pravděpodobně kumulativní, protože se u jednotlivých mutantů objevuje s nižší penetrancí. Podobný efekt byl zaznamenán umlčením *ADGF-C* a *ADGF-D* genů pomocí RNAi.

Aby zjistili, ve které tkáni nadbytek adenosinu škodí nejvíce, testovali Doležal a kol. záchranu pomocí exprese ADGF-A v různých tkáních. Použili *UAS-ADGF-A* a aktivovali ho různými Gal4 drivery. Zaměřili se především na Gal4 driver exprimující v lymfatických žlázách a cirkulujících hemocytech. Prokázali, že exprese ADGF-A v lymfatických žlázách je dostačující k záchraně letálního fenotypu. Také ověřili, že rozpad tukového tělesa je způsoben některými hemocyty.

Pomocí homologní rekombinace vytvořila Eva Doležalová (Doležal et al., 2005) nulového mutantu v adenosinovém receptoru (AdoR). Tito mutanti byli zcela životaschopní. Po zavedení *adoR* mutace do *adgf-a* mutantu, zjistili, že se zvýšil počet zakuklených larviček

a dokonce i vylíhnutých dospělců. U mutantů se snižuje počet melanotických tumorů, ale rozpad tukového tělesa je stejný jako u *adgf-a* mutantů.

1.2. Drozofila jako model a genetické nástroje

1.2.1 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster patří mezi modelové organismy používané vědci po celém světě. Její výhodou je krátký generační čas, mnoho morfologických znaků a malé náklady na udržení linií. Má čtyři chromosomy. Velikosti chromosomů X, II a III jsou přibližně stejné, IV je asi pětinový. Genom octomilky nese přibližně 14 000 genů. Pohlaví je u drozofily určeno poměrem X chromosomů k počtu autosomů. Samičky mají dva X chromosomy a jejich poměr k autosomům je 1, u samců je poměr jednoho X chromosomu ku autosomům 0,5. Chromosom Y nese jen několik genů a není zapotřebí pro vývoj samce, jen pro správnou pohyblivost spermií. U samců chybí meiotická rekombinace.

Důležitým znakem jsou **polytenní chromosomy**. Drozofila je má ve slinných žlázách. Díky nim je možné vytvořit mapu umístění genů na chromosomech.

Velmi důležitým nástrojem při manipulaci s genomem octomilky jsou **balancerové chromosomy** (balancery). Pomáhají při mapování genů a udržování recesivně letálních mutací. Tyto chromosomy mají normální velikost, ale jejich sekvence je pomíchaná v důsledku mnohačetných zlomů a znovuspojení. Balancery nejsou schopné se spárovat a rekombinovat s jejich homology v průběhu meiotické profáze. Také obsahují dominantní markery, které se dají rozpoznat na fenotypu. Tyto markery jsou většinou recesivně letální, čili v potomstvu vždy zůstává balancer a jeho homolog. U X chromosomu většinou nebývá recesivní letalita, protože se u samců chromosom X vyskytuje pouze v jedné kopii, ale vyskytuje se recesivní samičí sterilita. Balancery také umožňují udržet mutace, které jsou homozygotně letální – čili přežívá heterozygot balancer/homolog nesoucí letální mutaci. Existuje mnoho balancerů pro X, II a III chromosom. Pro IV chromosom nejsou balancery potřeba, protože na něm neprobíhá rekombinace. Všechny balancery jsou popsány na webové stránce <http://flystocks.bio.indiana.edu>

Markerové mutace umožňují rozpoznání genotypu na základě fenotypu. Je mnoho markerů pro barvu a tvar oka, tvar křídla a žilek v něm, barvy a tvaru chloupků a pigmentace kutikuly.

Označení genotypu:

Genotyp chromosomu je zapsán pouze, když je na něm mutace, jinak je chromosom ze zápisu vynechán. Genotyp je vždy značen kurzívou. Malopísmenné zkratky jsou pro recesivní

mutace, velkopísmenné pro dominantní mutace. Středník odděluje jednotlivé chromosomy, čárky oddělují jednotlivé mutace na chromosomu. Genotyp zapsaný na jednom řádku značí homozygota, heterozygot je na dvou řádcích – každý řádek pro jeden homolog.

Markery:

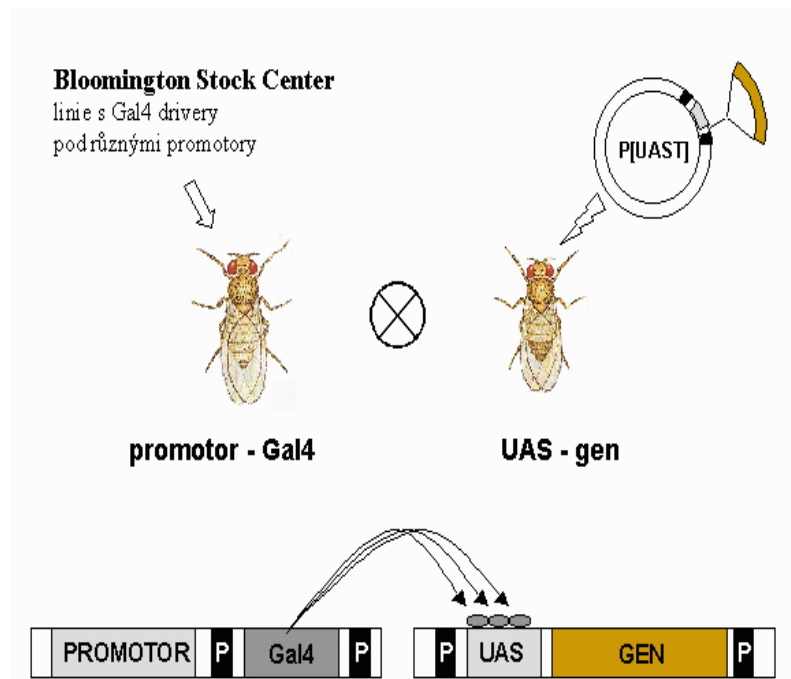
<i>W</i>	white, bílá barva očí
TM3	balancer třetího chromosomu
<i>Ser</i>	serrate, křídla jsou na vnitřní straně vykousnutá
<i>Sb</i>	stubble, krátké chloupky
<i>Y</i>	yellow, světlá barva kutikuly
Xa	spojený balancer pro druhý a třetí chromosom
<i>CyO</i>	curly, zakroucená křídla nahoru, místo aby byly rovné (ve schématech křížení chybně použito <i>Cyo</i>)
<i>CyOGFP</i>	curly a green fluorescent protein, zakroucená křídla, fluorescence (ve schématech křížení chybně použito <i>CyoGFP</i>)
MKRS	balancer třetího chromosomu, krátké chloupky
TM6	balancer třetího chromosomu
<i>B</i>	bar eye, oko je menší jakoby ledvinkovitého tvaru místo kulatého
<i>Hu</i>	humeral, více chloupků na rameni
<i>Tb</i>	tubby, tlustá a krátká larva i kukla
FM7	balancer prvního chromosomu, oko má tvar ledviny

1.2.2 UAS-Gal4

Brand a Perrimon (1993) vytvořili systém pro cílenou expresi genů. Díky tomuto systému je možné spouštět expresi genů v určité tkáni nebo v určité fázi vývoje. Gal4 driver je rozdělen od požadovaného genu pod UAS promotorem do dvou různých transgenních linií. Gen zůstává umlčený, protože není aktivován driverem. V druhé linii je driver přítomen, ale nemá cílový gen, který by díky němu mohl být transkribován. Obě dvě transgenní linie zůstávají životaschopné. Po zkřížení těchto linií se u potomstva exprimuje požadovaný gen pod UAS promotorem aktivací pomocí Gal4 driveru. Díky této metodě je možné vytvořit spoustu linií driverů, které působí na různé buňky, tkáně nebo stádia vývoje.

Gal4 aktivátor je protein, který se přirozeně vyskytuje u kvasnic, ale i při vysoké expresi nemá žádný vliv na expresi přirozených genů *Drosophila melanogaster*. Vazebné místo pro Gal4 aktivátor bylo mutováno, aby vázalo Gal4 driver s co nejvyšší afinitou (Webster et al., 1988). Také byly vytvořeny aktivátory s různou silou exprese (Ma and Ptashne, 1987a,b; Gill and Ptashne, 1987; Johnston and Dover, 1988). UAS-Gal4 systém může spouštět transkripci

i u dalších organismů, například rostlin i savců, ale pouze u genů s promotorem, který má Gal4 vazebné místo (Fischer et al., 1988; mA et al., 1988; Kakidani et al., 1988; Webster et al., 1988; Ornitz et al., 1991).



Obrázek 3: Schéma funkce systému UAS-Gal4. Octomilka vlevo nese Gal4 driver a octomilka vpravo nese gen s UAS promotorem. Po zkřížení těchto much vznikne potomek, u kterého je gen aktivován díky UAS-Gal4 systému.

Brand a Perrimon (1993) dále použili vektory (P-elementy), do kterých mohl být vložen gen za optimalizované vazebné místo pro Gal4 driver – později nazvané UAS (Upstream Activation Sequence).

Tato cílená exprese je velmi silný nástroj pro zkoumání účinku genů. UAS-Gal4 systém je revoluční v tom, že může způsobit expresi nebo overexpresi kteréhokoli genu v určitém stadiu nebo tkáni.

1.2.3 RNAi

RNA interference (RNAi) byla poprvé využita jako způsob posttranskripčního umlčení genů u *Coenorhabditis elegans* Firem et. al (1998). Přírodní funkcí RNAi je ochrana organismů proti mobilním elementům jako jsou transpozony a viry. Proteiny působící RNAi jsou si podobné u všech organismů. RNAi byla dále pozorována u hmyzu, žab, a dalších živočichů včetně myši (Kennerdell and Carthew 1998, Oelgeschlager et al. 2000, Svoboda et al. 2000; Wianny and Zernicka-Goet, 2000 podle Elbashir, S.M., 2001).

Dvouřetězcová RNA spouští při RNAi degradaci mRNA komplementární k jednomu z vláken, zničením mRNA se docílí toho, že se netvoří protein. Je to umlčení genu aniž by vlastní gen byl v genomu změněn. Přitom se uplatňují následující komponenty:

siRNA (small interfering RNA) má 21-25 nukleotidů. Podobá se produktům štěpeným RNázou III, má 5' fosfátovou a 3' hydroxylovou koncovou skupinu a 2-3 nukleotidové převisy.

Dicer je protein patřící do rodiny RNáz III. Byl objeven u *Drosophila* (Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. 2001) a dokáže štěpit dvouvláknovou RNA na 22 bází dlouhé úseky, které se objevují při RNAi. Dicer má čtyři domény: aminoterminální doména má helikázovou aktivitu, dvě RNáza III domény, které váží RNA a PAZ doménu (110 aminokyselin dlouhá doména, která je v proteinech Piwi, Argo a Zwiller/Pinhead). Dvě místa v doménách RNáz III jsou nefunkční a proto dicer štěpí na dvakrát delší úseky než RNáza III.

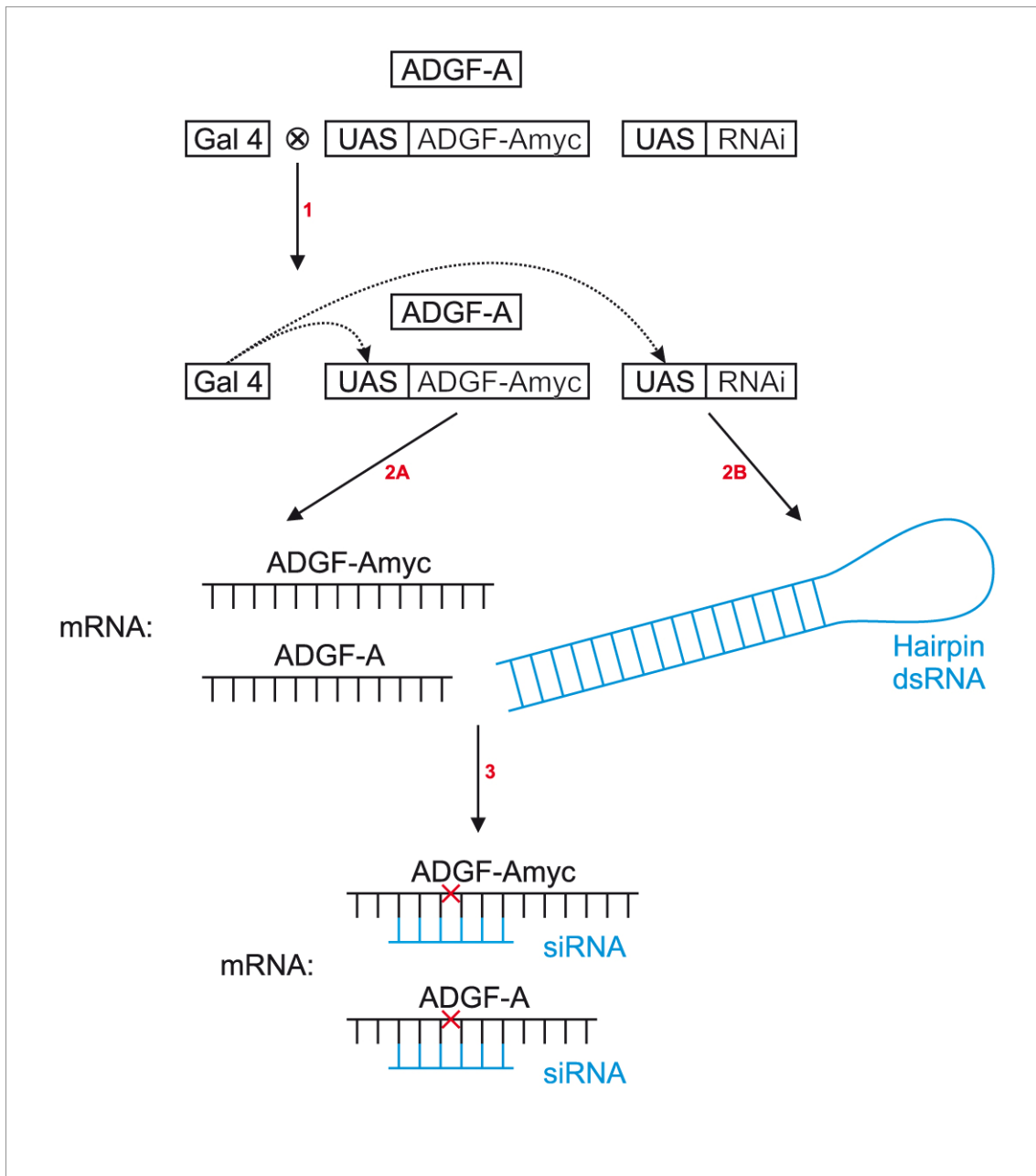
RISC (RNA induced silencing complex = umlčovací komplex vyvolaný RNA) je komplex proteinů, který je RNAi naváděn na cílovou sekvenci.

V prvním kroku je dsRNA štěpena dicerem za vzniku siRNA. V druhém kroku se siRNA váže na RISC, který je aktivován ATP a tím se po rozvolnění dvoušroubovice exponuje antisense komplementární vlákno siRNA a umožní provést RNAi reakci. Výsledkem je endonukleolytické štěpení mRNA. Aktivovaný RISC štěpí mRNA přibližně v polovině oblasti duplexu. Rozštěpená mRNA je pravděpodobně zničena exoribonukleázami.

RNA dependentní RNA polymeráza u *C. elegans* využije rozštěpenou mRNA jako templát a vytvoří další dsRNA, ta je zpracována na siRNA. Je to velmi efektivní proces, který zacílí mnoho sekvencí na mRNA. Tento jev se nazývá tranzitivní RNAi. Terapeutické využití RNAi u člověka je umožněno tím, že tranzitivní RNAi se nevyskytuje u savců, ani u drozofily. Kdyby se u člověka vyskytovala zničila, by všechny možné formy RNA, například po alternativním splicingu. RNAi se tkáněmi může šířit jen u rostlin a červů, jinak zůstává pouze v transgenní buňce.

2. Cíl práce:

Pomocí systému UAS-Gal4 navodit RNA interferenci u genu *ADGF-A* a stanovit její dopad.



Obrázek 4: Schéma RNAi. V prvním kroku křížím mouchu s Gal4 driverem a mouchu s ADGF-Amyc a RNAi konstrukt. Vznikne potomstvo, které produkuje jak endogenní ADGF-A tak i Gal4 driverem spuštěný ADGF-A s myc tagem (2A). Gal4 driverem je také spuštěna exprese RNAi konstrukt (2B) a tvoří se vlásečnková (Hairpin) dsRNA. dsRNA je rozštěpena a v třetím kroku se naváže na mRNA pro ADGF-A i ADGF-A s myc tagem a tuto mRNA zničí. Když chybí mRNA, tak se nemůže tvořit protein, který se později snažím detekovat western blotem.

3. Metody

3.1 Pěstování a řízení *Drosophila melanogaster*:

Octomilky pěstujeme v pokojové teplotě 25°C, ve vialkách - skleničkách s třicentimetrovým průměrem, přibližně 10cm vysokých. Na dně vialek je přibližně 1-2cm potravy z kukuřičné mouky a agaru. Za těchto podmínek se z vajíčka vylíhne octomilka přibližně za 10 dní. Linie také mohou být udržovány v 18°C, to se jejich generační čas prodlouží na 19 dní. Při udržování linií, kdy dospělci a potomci mají stejný genotyp, stačí přenést octomilky na novou potravu každé dva týdny při pokojové teplotě. Při udržování linií v 18°C stačí přenos každé tři týdny. Přenesení můžeme provést bez uspání much. Sklepeme octomilky na dno staré vialky, vyndáme zátku a octomilky sklepeme do čerstvé vialky a zazátkujeme je. Vialku vždy označíme celým genotypem linie a datem přesypání. Pro linie s jednou mutací stačí přibližně 25-30 octomilek na vialku, při vyšším počtu mutací je lepší počet octomilek alespoň zdvojnásobit.

Pro křížení je potřeba vybírat panny, nespárené mouchy. V 25°C se samičky nepáří dříve než za 8 hodin od vyklubání. Čili je nejlepší vybrat panny ráno a pak za přibližně 7 hodin znovu. Ráno se vyklube většina octomilek. Čerstvě vylíhnutá octomilka má světlé tělíčko a tmavou skvrnu uvnitř průsvitného bříška. Pro zvýšení počtu vybraných panen je vhodné dát linie přes noc do 18°C. Vývoj je zpomalen a samičky se nebudou pářit dříve než za 16 hodin. Samci mohou být vybíráni kdykoli, ale musí být alespoň 3 dny staří, aby se spáрили efektivně.

Pro uspání octomilek se používá CO₂. CO₂ je pouštěno přes diffusery – propustné destičky, čili stačí malé množství plynu pro udržení much uspaných. Většinou jsou octomilky ve vialce uspany pomocí jehly napojené na CO₂ nebo vysypány na destičku s diffuserem. Tradičně se octomilky uspávaly éterem v prázdné vialce s vatou namočenou do éteru. Obě dvě metody uspávání oslabí na nějaký čas nervovou aktivitu.

Vždy je potřeba začít s dostatečným množstvím much, abychom dostali dostatečné množství potomků, kteří mohou být méně životní, abychom mohli pokračovat v dalších pokusech.

Potrava:

120g kukuřičná mouka

1,2l vody

vaříme 1h při 95°C

přidáme 15g agaru rozpuštěného v 300ml vody a vaříme další hodinu při 95°C

přidáme 75g cukru

60g instantních kvasnic

necháme zchladnout na 50°C a přidáme 25ml 10% methylparaben v ethanolu po celou dobu pečlivě mícháme.

Pro potřeby této práce byly použity linie uvedené v tabulce 1.

Tabulka 1: Tabulka linií drozofily

Označení linie v textu	Genotyp linie	Chromosom
arm-Gal4	<i>w; arm-Gal4</i>	II
adgf-a ^{karel}	<i>w; ADGF-A^{karel}/TM3 Act-GFP Ser</i>	III
adgf-a ^{gerda}	<i>w; +/CyO; ADGF-A^{Gerda}/TM3 Sb Ser</i>	III
	<i>yw; Xa/Cyo, MKRS</i>	II+III
ADGF-Amyc	<i>w; UAS-ADGF-Amyc2a; karel/TM6B, Tb, Hu</i>	II+III
yw	<i>yw</i>	X
Oregon	<i>Oregon-R</i>	
RNAi (1)	<i>yw P{w+ UAS-RNAi-ADGF-A1b} P{w+ UAS-RNAi-ADGF-A3}</i>	X
	<i>yw; xa/CyO Act>GFP; TM3 Act>GFP, Ser, Sb</i>	II+III
	<i>w; cact[E8]/CyOGFP</i>	II
He-Gal4	<i>w; He-Gal4 UAS-GFP</i>	III
act-Gal4	<i>act-Gal4/TM6B, Hu, Tb</i>	III
RNAi (2)	<i>pMF3-CG5992</i>	III
RNAi (3)	<i>pMF3-CG5992</i>	III
	<i>ΔA⁴⁴ FRT 1861⁽⁹⁻²⁾/FM7</i>	X

3.2 Stanovení vitality larev a dospělců

Na misky s agarem (4% agar v džusu (musí projít varem) + 1% methylparaben - přidává se už do částečně zchladlého agaru) potřené čerstvými kvasnicemi jsem 4 hodiny nechala mouchy klást vajíčka. Po 12-18 hodinách jsem nakladená vajíčka opláchla vodou, aby se odstranily kvasnice a poté promyla ethylalkoholem (1-2 minuty) a přenesla na čerstvé misky. Po 24 hodinách od naklazení jsem vybírala první instary. Do čerstvé vialky jsem vždy přenesla po přibližně 35 larvičkách. Poté jsem sledovala kdy se zakuklí a kdy se líhnou dospělci.

Používala jsem tři Gal4 drivery: arm-Gal4, který je exprimován ve všech buňkách, He-Gal4 který je exprimován v cirkulujících krevních buňkách a act-Gal4 který je velmi silně exprimován také ve všech buňkách.

3.3 PCR

V 50μl Squishing pufu jsem homogenzátorem rozdrtila jednu dospělou octomilku a inkubovala 30 minut při 37°C. Pak jsem 2 minuty při 98°C inhibovala proteinázu. Centrifugovala jsem 5 minut na 2 500g při 4°C. Odebrala jsem supernatant a použila ho do PCR reakce. Připravila jsem si 1,5% agarózový gel (1,5% agaróza v TAE, musí projít varem).

Po amplifikaci jsem přidala 4 μ l loading pufru. Nanesla jsem 10 μ l vzorků a 5 μ l markeru na gel. Elektroforézu jsem pouštěla na 90V dokud barvička loading pufru nedosáhne na konec gelu. Pak jsem gel barvila etidiumbromidem 10 minut na třepačce. Přebytek etidiumbromidu jsem vymyla vodou na třepačce. Gel jsem fotografovala při UV světle.

Tab. 2: Seznam primerů a jejich sekvencí

kontrola obsahu	název	sekvence	použitá teplota	doba annealingu	velikost fragmentu
RNAi (2) a (3)	pUASTforw	TCA ACT GCA ACT ACT GAA ATG TG	61,1°C	30s	390bp
	50426Rev	GCG TCT AGA AGC GAT GGT TGC GGA AG			
Přítomnosti DNA	AdoR-RTF	CTA CCG GGT CAT CAT CAA ACA G	53°C	30s	360bp
	AdoR-RTR3	A CAT AGC AGT CGG GAC AGA AGG			
Myc tagu	D1SarE	CGG ACT ACT ACT ACA AAG C	52°C	90s	925bp
	MYCtag-RV	CAA GTC CTC TTC AGA AAT GAG CTT TTG			
RNAi (1)	pUASTforw	TCA ACT GCA ACT ACT GAA ATG TG	58°C	40s	500bp
	D1SarW	AGG TTC TCA TCC ACA GTG G			

Squishing pufr:

10mM	Tris pH 8,2
1mM	EDTA
25mM	NaCl
200 μ l/ml	Proteináza K

20 μ l pro PCR reakci:

1 μ l	templátová DNA
1 μ l	primer 1
1 μ l	primer 2
2 μ l	ExTag pufr 10x
2 μ l	dNTP 2,5mM
0,4 μ l	ExTag
12,6 μ l	dH ₂ O

PCR reakce:

1. 95°C 5 minut počáteční denaturace
2. 94°C 30s denaturace
3. ?°C ?s annealing (? viz tabulka 2)
4. 72°C ?s elongace (extenze)
5. 72°C 8 minut dokončení všech elongací
6. 14°C pause

Kroky 2-4 opakujeme 35x.

Při denaturaci dochází k rozvolnění vodíkových můstků a rozvolnění dvoušroubovice. Annealing je teplota nasedání primeru na komplementární sekvenci, počítá se podle délky

primeru a obsahu CG v primeru. Na primer nasedne Taq polymeráza která elonguje (prodlužuje) úsek DNA. Čas annealingu a elongace je závislý na délce primeru a délce řetězce mezi primery.

TAE 50x

242g	Tris
57,1ml	99% kys. octová
100ml	0,5M EDTA pH 8,0

3.4 Western blot

Western blot je metoda, která pomáhá kvantifikovat množství proteinu díky protilátkám, které se na daný protein váží. Primární protilátka je specifická a váže se na daný protein, sekundární protilátka se váže na primární protilátku a je konjugovaná s enzymem křenovou peroxidázou (HRP - horseradish peroxidase). Při přidání substrátu křenová peroxidáza katalyzuje reakci, při které je emitováno světlo (chemiluminiscence). Toto světlo můžeme zachytit na rentgenový film nebo pomocí speciálního přístroje v digitální podobě.

Tři larvičky třetího instaru jsem oplachovala v roztoku Ringer a homogenizovala v 50 μ l Sample puffru. Vzorky jsem držela na ledu, dále inkubovala 8 minut v 98°C a centrifugovala 5 minut při 14 000 ot/min.

Připravovala jsem si 15% polyakrylamidový gel. Mezi dvě umytá a ethanolem odmaštěná skla jsem nalila separating gel asi 2 cm pod okraj, překryla butanolem a nechala přibližně půl hodiny polymerizovat. Po půl hodině jsem vypláchla butanol destilovanou vodou a nalila stacking gel a do něj zasunula hřebínek. Připravila jsem si elektroforetickou aparaturu a naplnila ji running puffrem. Do jamek na gelu jsem po vyndání hřebínku nanesla 10 μ l vzorků, 7 μ l markeru a pustila elektroforézu na 70V dokud barvička nezajede do separating gelu, poté na 120V dokud barvička nedosáhne konce. Když barvička dosáhla konce gelu zastavila jsem elektroforézu a opatrně rozevřela skla. Odkrojila jsem stacking gel a jeden růžek pro označení orientace gelu. Gel jsem inkubovala 5 minut v transfer puffru a mezitím si vystříhla membránu a 3MM papír podle velikosti gelu. Sestavila jsem elektroblotovací aparaturu. Do zavírací mřížky 3mM silnou houbičku, 3MM papír, membránu, gel, 3MM papír a 6mM silnou houbičku. Vytlačila jsem všechny bubliny a dala do elektroblotovací aparatury tak, aby membrána byla blíže ke kladné elektrodě než gel. Nechala jsem přenášet 1 hodinu za stálého chlazení. Po hodině přenosu jsem 5 minut barvením na třepačce v Ponceau ověřovala přenos proteinů. Poté jsem Ponceau vypláchla opakovaným omytím destilovanou vodou. Přes noc ve 4°C jsem na třepačce blokovala membránu v blocking puffru. Ráno jsem přidala primární protilátku a v pokojové teplotě nechala 2 hodiny inkubovat na

třepačce. Poté jsem membránu promývala na třepačce 5 x 10 minut v TBST. Po promytí se membrána 1 hodinu inkubovala na třepačce v pokojové teplotě se sekundární protilátkou. Poté jsem membránu opět promývala na třepačce 5 x 10 minut v TBST. Připravila jsem si detekční roztoky ECL 1 a 2 a ty jsem před detekcí smíchala. Výsledným roztokem jsem pokryla membránu a nechala 2 minuty inkubovat. Po dvou minutách jsem detekční roztok slila a osušila. Membránu jsem zabalila do potravinářské fólie a exponovala. Alternativním vyvoláváním je použití Super Signal Dura West Extenden Duration Substrate, u kterého jsem smíchala 1:1 Peroxide pufr a Luminol Enhancer solution. Tuto směs jsem nechala na membráně cca 3 minuty, slila a osušila. Membránu jsem zabalila do potravinářské fólie a exponovala.

Sample pufr:

250 μ l 1 M Tris HCl pH 6,8
500 μ l 100% glycerol
500 μ l 20% SDS
500 μ l 1 M DTT
3,25ml dH₂O
1 zrníčko bromphenol blue

Separating pufr: pH 8,8

181g Tris
40ml 10% SDS
doplnit dH₂O do 1l

Stacking pufr: pH 6,8

30,25g Tris
20ml 10% SDS
doplnit dH₂O do 500 ml

Stacking gel:

0,593ml Acrylamid (40% AA:bisAA = 29:1)
1,41ml Stacking pufr
3,57ml dH₂O
45 μ l APS
15 μ l TEMED (tetramethyl-ethylene diamine)

Separating gel (15 %):

4,275ml Acrylamid (40% AA:bisAA = 29:1)
2,85ml Separating pufr
4,2ml dH₂O
84 μ l APS
16,5 μ l TEMED (tetramethyl-ethylene diamine)

APS: (skladovat v -20°C)
0,2g APS
2ml sterilní H₂O

10x Running pufr:

30,3g Tris
144g glycin
10g SDS
doplnit dH₂O do 1l

Transfer pufr:

2,9g glycin
5,8g Tris báze
0,37g SDS
200ml methanol
doplnit dH₂O do 1 l

10x Ponceau:

30g kys. trichloroctová
30g kys. sulfosalicilová
2g Ponceau reagensie
doplnit dH₂O do 100 ml

10x TBST

125ml 2 MTris HCl pH 7,8
150ml 5M NaCl
10ml 0,5M EDTA
5ml Tween 20
doplnit dH₂O do 500 ml

Blocking pufr:

1x TBST
5% sušené mléko

Detekční reagensie ECL 1:

2,25ml dH₂O
250μl 1 MTris-HCl pH 8,5
25μl 250mM Luminol
10μl 90mM kys. kumarová v DMSO

Detekční reagensie ECL 2:

2,25ml dH₂O
250μl 1M Tris-HCl pH 8,5
1,5μl 30% H₂O₂

PBS

8g	NaCl
0,2g	KCl
1,44g	Na ₂ HPO ₄
0,24g	KH ₂ PO ₄
800ml	dH ₂ O
upravit pH na 7,4 pomocí HCl	
doplnit dH ₂ O do 1 l	
0,05%	Tween 20

3.5 Dot blot

Dot blot je metoda, která slouží k detekci antigenu navázaného na membránu bez předchozí elektroforetické separace.

Z membrány jsem vystříhla potřebně veliký obdélník a tužkou označila místa pro vzorky. Na membránu jsem nanesla 5µl vzorků a nechala je zaschnout. Promyla jsem membránu na třepačce 3x5 minut v TBST a nechala blokovat přes noc na třepačce v blocking pufru při 4°C. Ráno jsem přidala primární protilátku a 2 hodiny nechala inkubovat na třepačce v pokojové teplotě. Následně jsem membránu 5x 10 minut na třepačce promývala a poté přidala sekundární protilátku na 1 hodinu na třepačce. Opět jsem membránu 5x 10 minut na třepačce promyla v TBST a detekovala pomocí o-diaminobenzidinu (DAB). Běžící reakci jsem zastavila vodou. Výsledek je viditelný pouhým okem.

Detekce pomocí DAB:

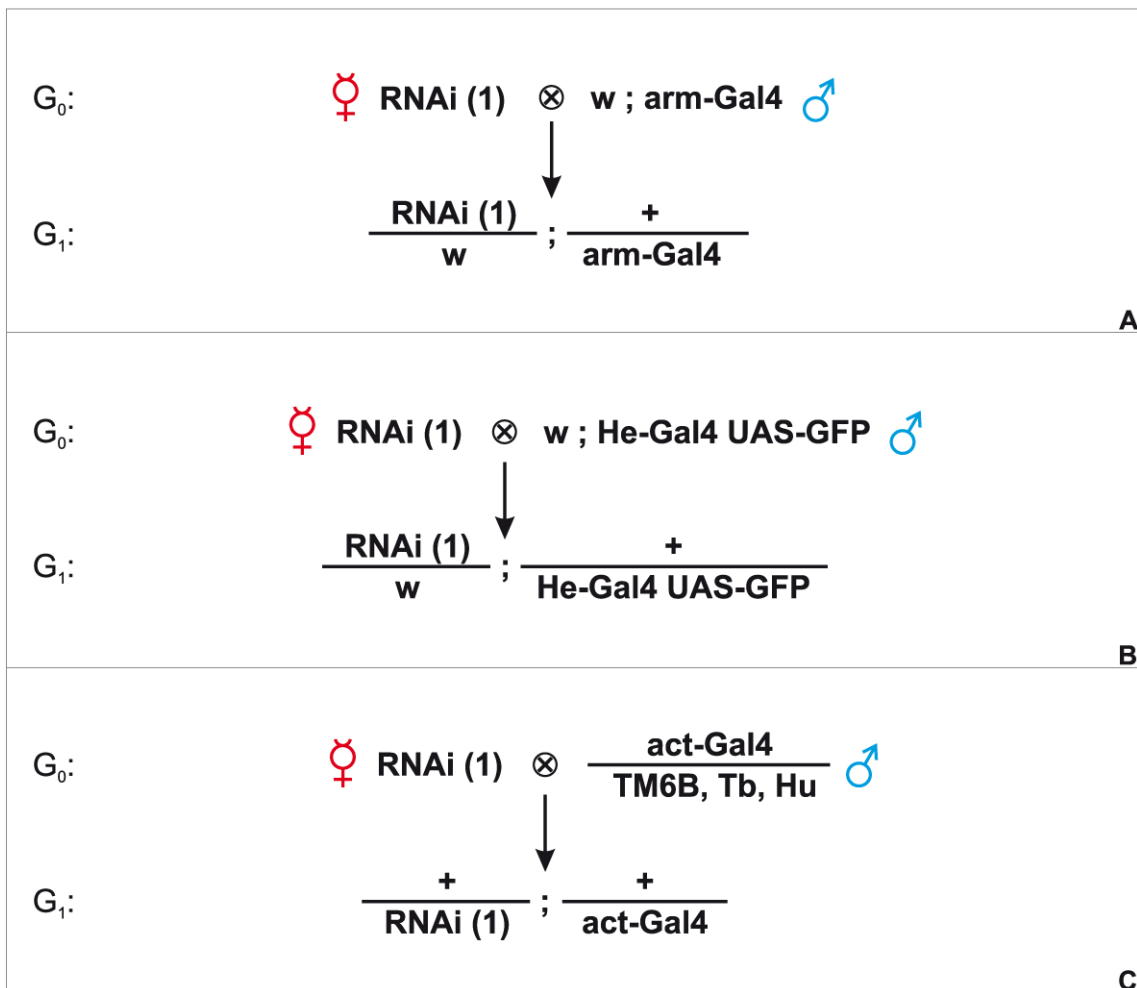
50ml	0,1M Tris (pH 6,7)
12,5mg	o-diaminobenzidinu
15µl	30% H ₂ O ₂

Reakce se zastaví 0,5% azidem sodným nebo vodou

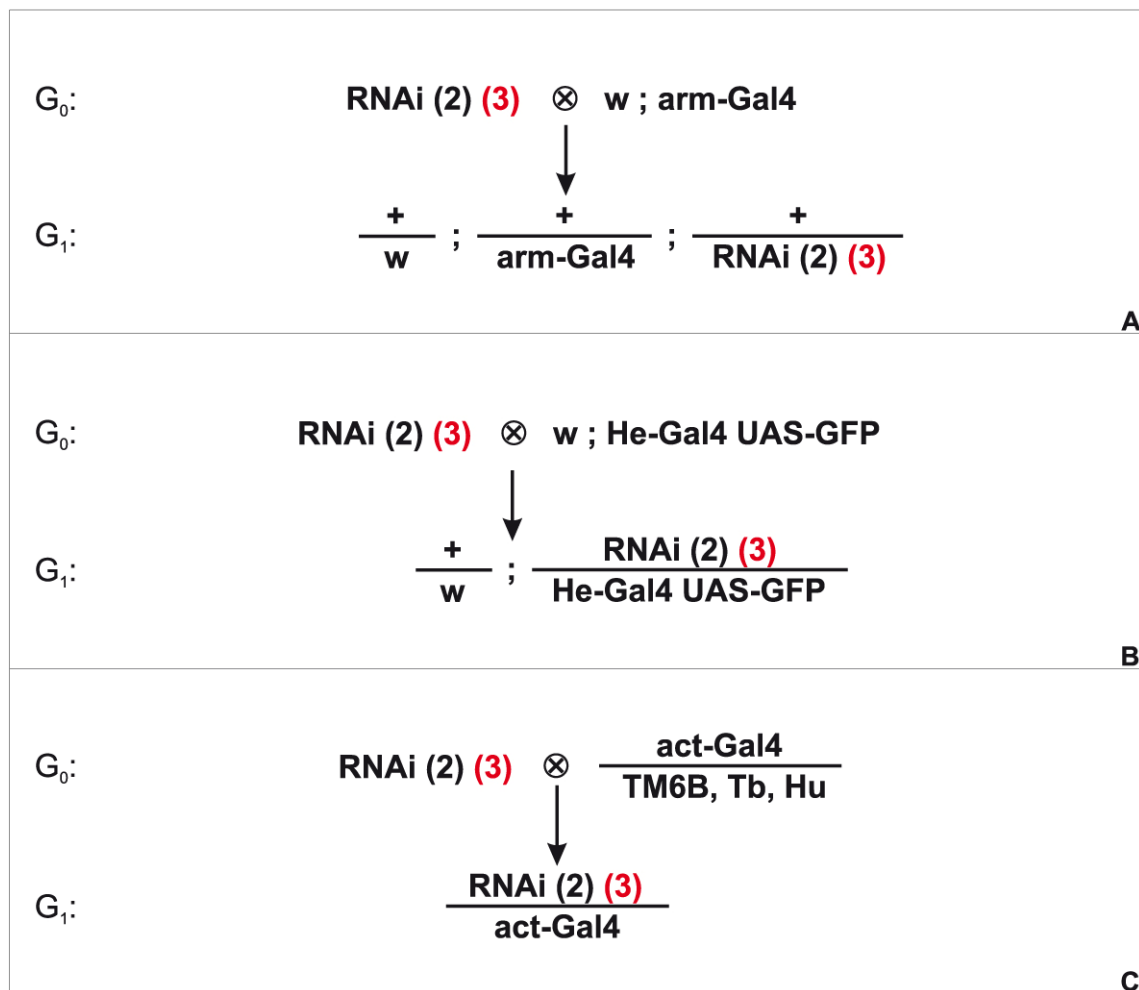
4. Výsledky:

4.1 Křížení *D. melanogaster*

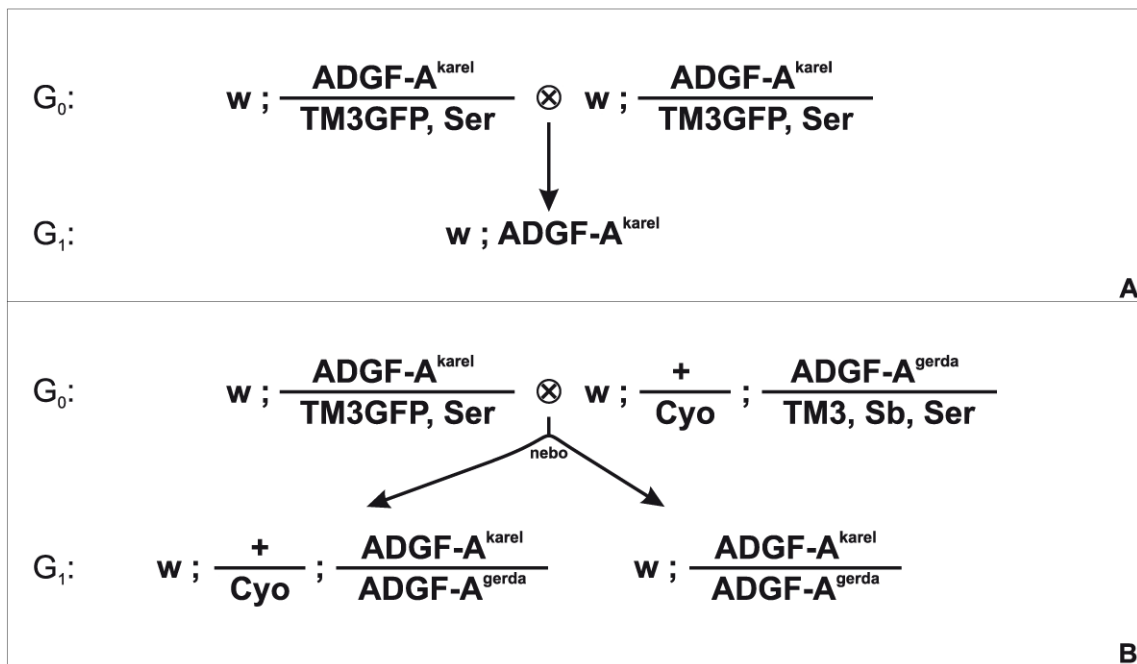
U linie RNAi (1) je pohlaví důležité, protože RNAi konstrukt je na X chromosomu. Proto je v obrázcích označeno pohlaví křížených octomilek. U RNAi (2) a (3) na pohlaví nezáleží. Vždy jsem křížila panny první linie se samci druhé linie odděleně od samců první linie kříženými s pannami druhé linie. Proto pohlaví křížených octomilek není označeno.



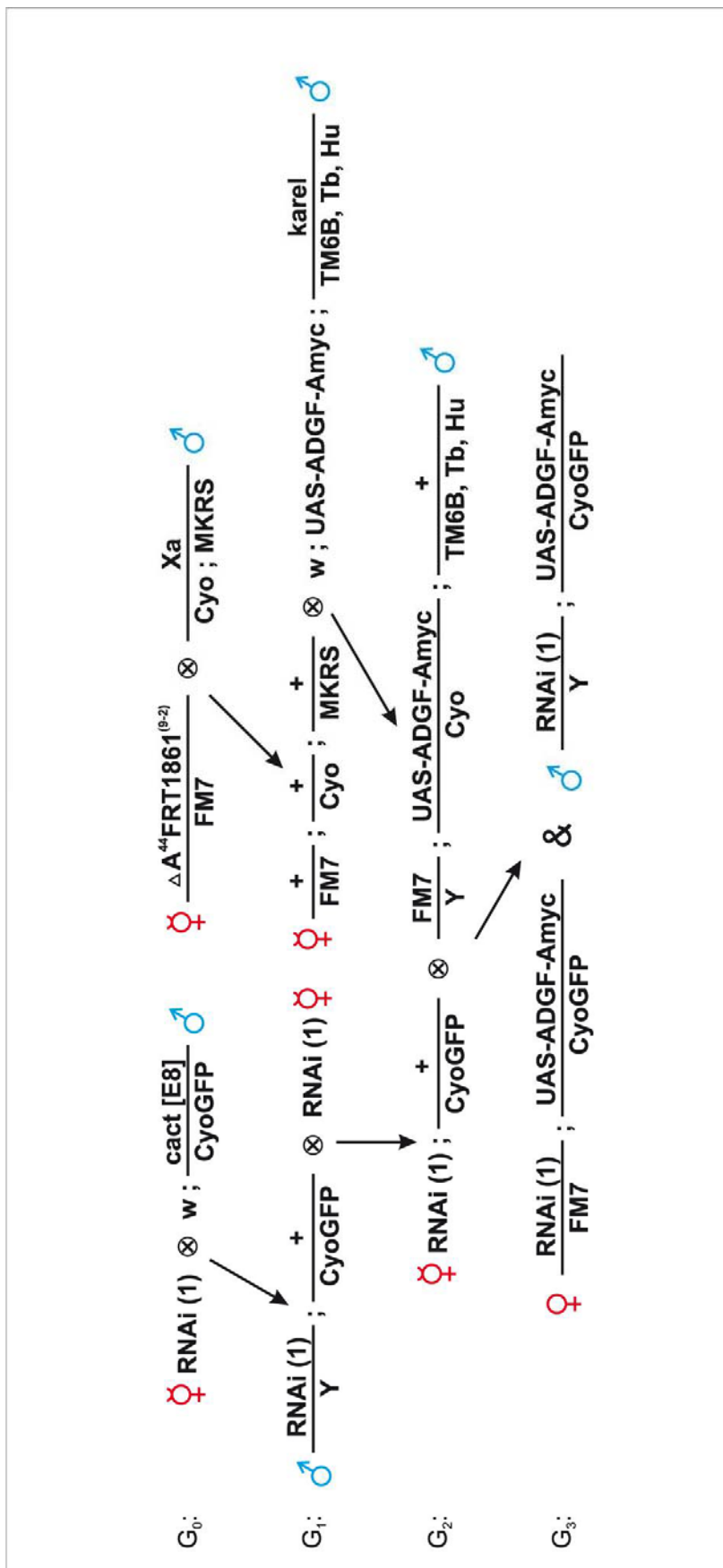
Obrázek 5: Křížení linie RNAi (1) s různými driverly pro hodnocení vitality transgenních much s aktivní RNAi
A,B: Vybírala jsem všechny larvičky. **C:** Vybírala jsem všechny larvičky, protože v prvním instaru není rozpoznat tlustá a krátká larvička (Tb). Ale poté jsem odečetla počty jedinců, kteří byli Tb a Hu.



Obrázek 6: Křížení linií RNAi (2) a (3) s různými drivery pro hodnocení vitality transgenních much s aktivní RNAi. **A, B:** Vybírala jsem všechny larvičky. **C:** Vybírala jsem všechny larvičky, protože v prvním instaru není rozpoznat tlustá a krátká larvička (Tb). Ale poté jsem odečetla počty jedinců, kteří byli Tb a Hu.

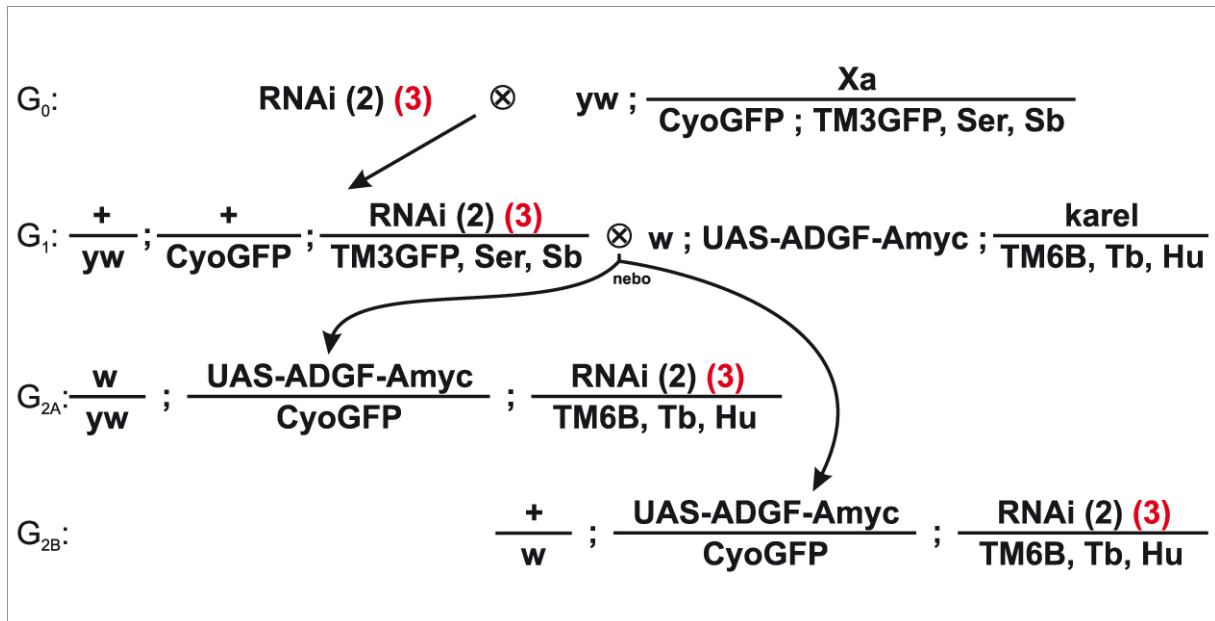


Obrázek 7: Křížení mutantů *adgf-a*. **A:** U mutantů *adgf-a* jsem vybírala jedince, kteří pod mikroskopem nevykazovali GFP expresi. **B:** u larviček není poznat curly (CyO) proto vybírám obě možnosti.

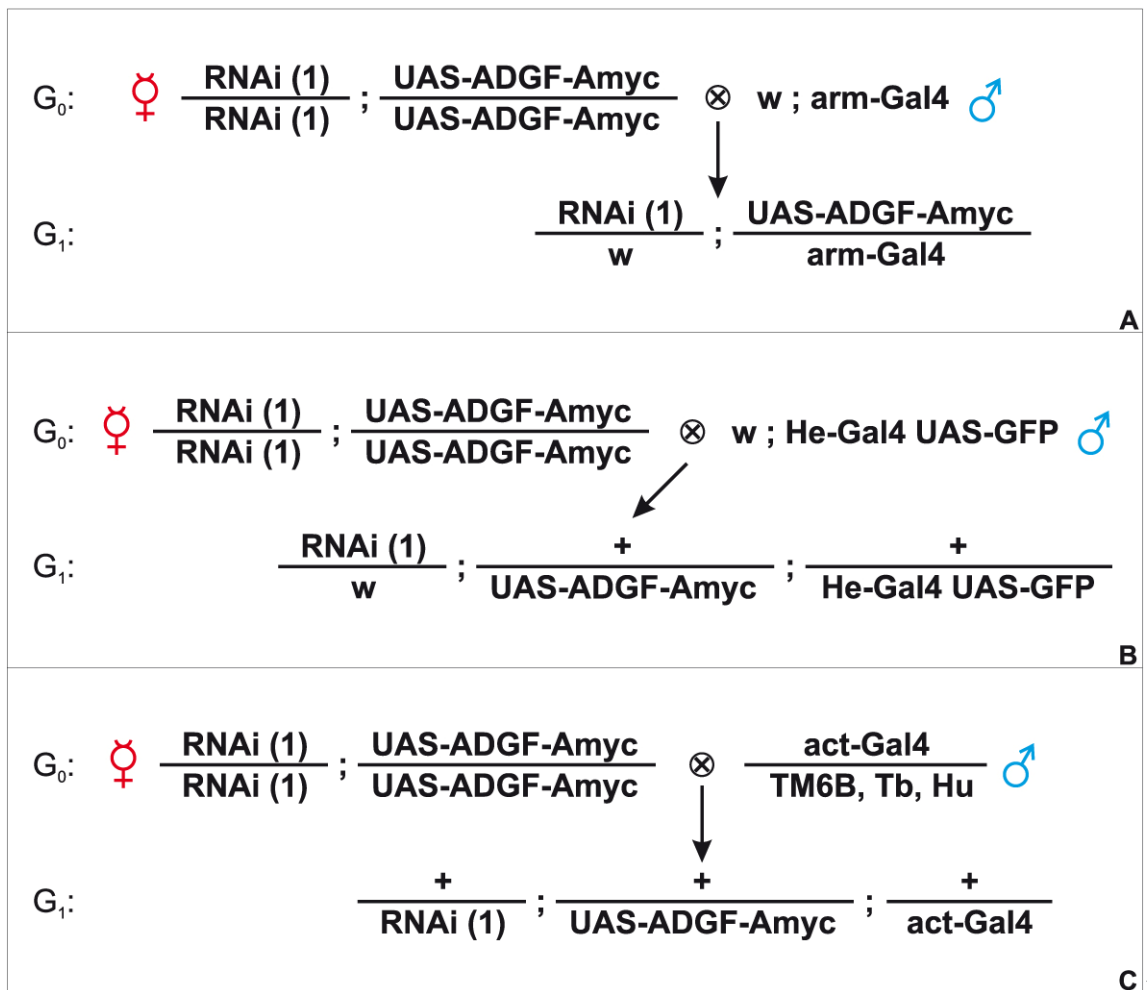


Obrázek 8: Křížení linie RNAi (1) pro získání transgenických much s RNAi konstruktem a ADGF-A s myc tagem. V G_1 generaci jsem podle levé části obrázku vybírala samce se zakroucenými křídly (CyO). Podle pravé

částí obrázku jsem vybírala panny s ledvinitým okem (FM7), zakroucenými křídly (CyO) a krátkými chloupky (MKRS). V G₂ generaci jsem křížila panny se zakroucenými křídly (CyO) a samce s ledvinitým okem (FM7), zakroucenými křídly (CyO) a s více chloupky na ramenou (Hu). V závěrečném kroku jsem vybírala panny s ledvinitým (FM7) okem a zakroucenými křídly (CyO) a samce zakroucenými křídly (CyO). Obě pohlaví musela v očích produkovat zelený fluorescenční protein (GFP), který jsem zjišťovala pod fluorescenčním mikroskopem.

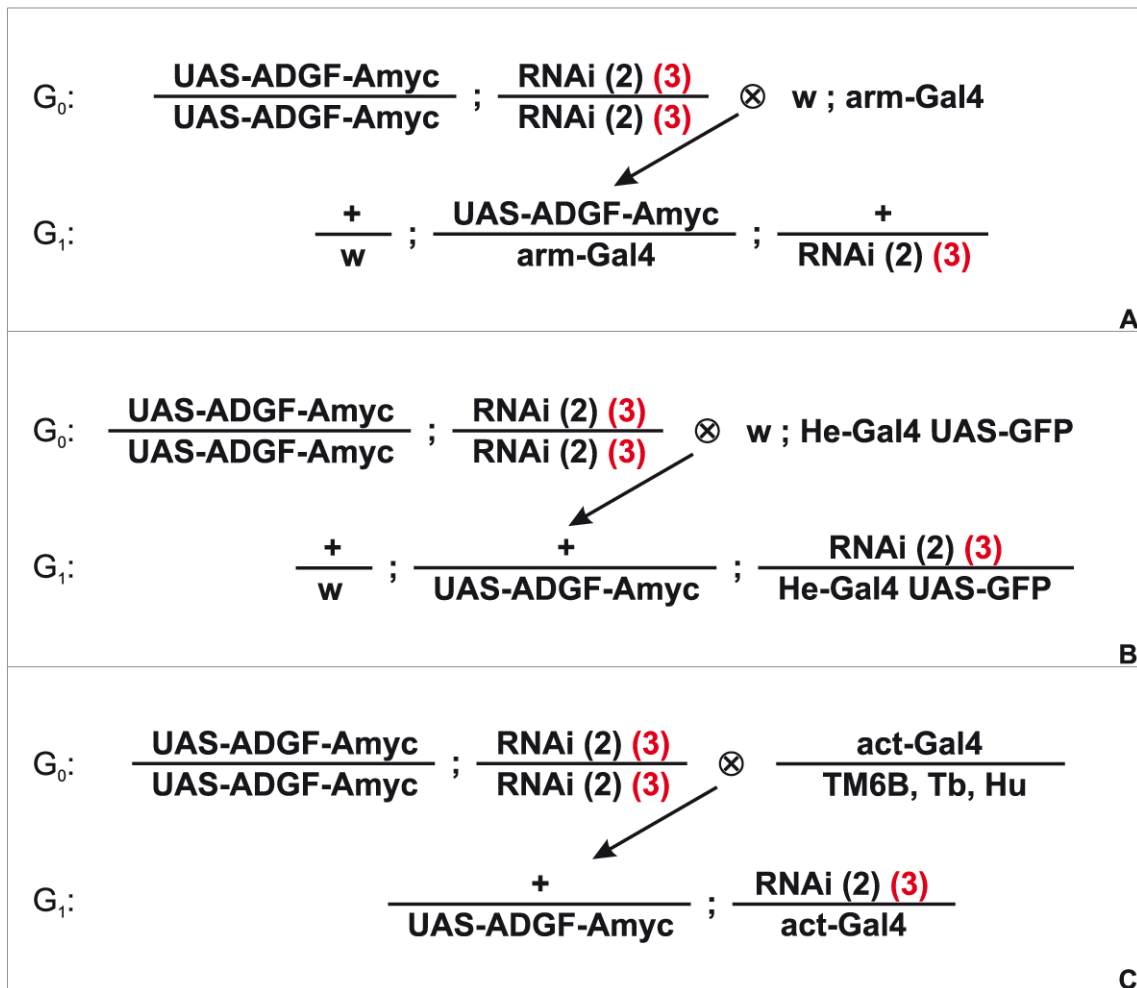


Obrázek 9: Křížení linií RNAi (2) a (3) pro získání transgenních much s RNAi konstruktem a ADGF-A s myc tagem. Po dalším křížení tyto octomilky použiji na western blot. V G₁ generaci vybírám drozofily se zakroucenými (CyO) vykousnutými (Ser) křídly a krátkými chloupky (Sb). V G₂ vybírám mouchy se zakroucenými křídly (CyO) a s více chloupky na ramenou (Hu).



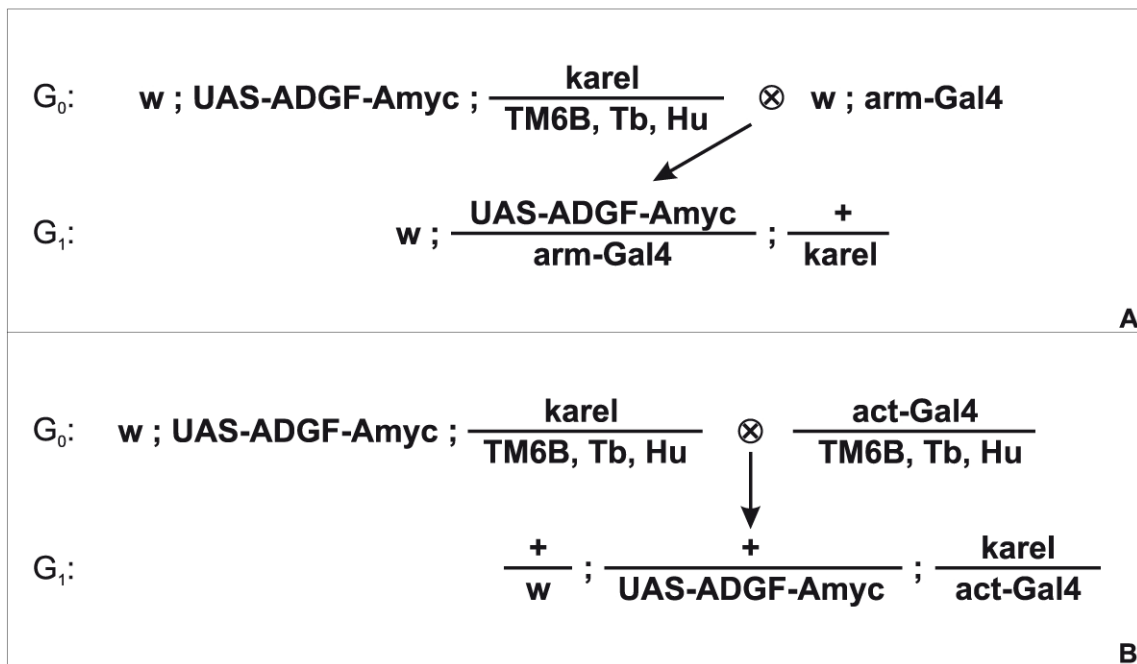
Obrázek 10: Křížení linie RNAi (1)+ADGF-Amyc s různými driversy. Pro křížení jsem vybírala panny, které neměly ledvinité oko (FM7) ani zakroucená křídla (CyO), aby byly homozygotní pro RNAi (1) i pro UAS-ADGF-Amyc. Z vybraných larviček jsem udělala lyzáty, které jsem použila na western blot.

A, B: Vybírala jsem všechny larvičky ve třetím instaru. **C:** Vybírala jsem pouze larvičky, které nejsou krátké ani tlusté (Tb).



Obrázek 11: Křížení linií RNAi (2)+ADGF-Amyc a RNAi (3)+ADGF-Amyc s různými drivery. Pro křížení jsem vybírala octomilky, které neměly zakroucená křídla (CyO) ani více chloupků na ramenou, aby byly homozygotní pro RNAi (2) nebo (3) i pro UAS-ADGF-Amyc. Z vybraných larviček jsem udělala lyzáty, které jsem použila na western blot.

A, B: Vybírala jsem všechny larvičky ve třetím instaru. **C:** Vybírala jsem pouze larvičky, které nejsou krátké ani tlusté (Tb).



Obrázek 12: Křížení linie ADGF-Amyc s různými drivery. Z vybraných larviček jsem udělala lyzáty, které jsem použila na western blot. **A:** Vybírala jsem všechny larvičky ve třetím instaru. **B:** Vybírala jsem pouze larvičky, které nejsou krátké a tlusté (Tb).

Mnou použité RNAi konstrukty ničí mRNA genu *ADGF-A*, proto by se neměl tvořit enzym ADGF-A s adenosin deaminázovou aktivitou a adenosin by se měl hromadit v těle octomilky a způsobit snížení vitality. Efekt RNAi jsem pozorovala dvěma způsoby: hodnocením vitality transgenů s RNAi konstruktem aktivovaným Gal 4 driverem a stanovením množství proteinu pomocí western blotu.

Pro hodnocení vitality transgenů s RNAi konstruktem jsem křížila linie RNAi (1), (2) a (3) s liniemi obsahujícími různé drivery (obr. 4 a 5). arm-Gal4 je exprimován ve všech buňkách, He-Gal4 je exprimován v cirkulujících krevních buňkách a act-Gal4 je velmi silně exprimován také ve všech buňkách.

Pro kvantifikaci úbytku ADGF-A proteinu pomocí western blotu jsem musela vykříždit drozfilky (obr. 7 a 8), které mají tento protein označený myc tagem, protože protilátka proti samotnému ADGF-A proteinu nebyla dostupná. Protilátka proti myc tagu je komerčně vyráběna.

Transgenní gen *ADGF-A* s myc tagem má stejnou sekvenci jako endogenní *ADGF-A*, jen má přidanou koncovou sekvenci myc tagu. ADGF-A s myc tagem je exprimován pouze po aktivaci Gal4 driverem (obr. 12). Proto jsem musela octomilky dále křížít s Gal4 drivery (obr. 9 a 10), abych indukovala RNAi i expresi transgenního proteinu ADGF-A s myc tagem. Gal4 driver spustí expresi mRNA pro ADGF-A s myc tagem a zároveň RNAi konstrukt. RNAi

konstrukt ničí mRNA endogenního i transgenního ADGF-A proteinu. Proto by při detekci mělo být viditelně menší množství transgenního proteinu než u kontrol, u kterých dochází k expresi transgenního ADGF-A bez indukce RNAi. Tím nepřímo pozoruji efekt RNAi. Kontroly jsem také křížila s Gal4 drivery (obr. 11).

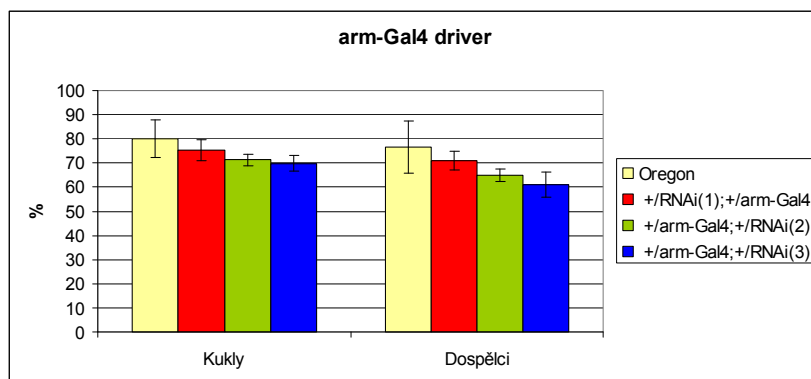
4.2 Stanovení vitality při aktivaci RNAi u genu *ADGF-A*

Pro sledování vitality při aktivaci RNAi jsem vykřížila mouchy tak, jak je uvedeno v předchozí části, vybrala larvičky příslušných genotypů a sledovala míru zakuklení a počty dospělců. Používala jsem pozitivní kontrolu Oregon R, negativní kontrolu nulového mutanta *adgf-a* a aktivaci RNAi pomocí tří různých Gal4 driverů: armadillo (*arm-Gal4*), který je exprimován ve všech buňkách, Hemese (*He-Gal4*) který je exprimován v cirkulujících krevních buňkách a actin (*act-Gal4*), který je velmi silně exprimován také ve všech buňkách.

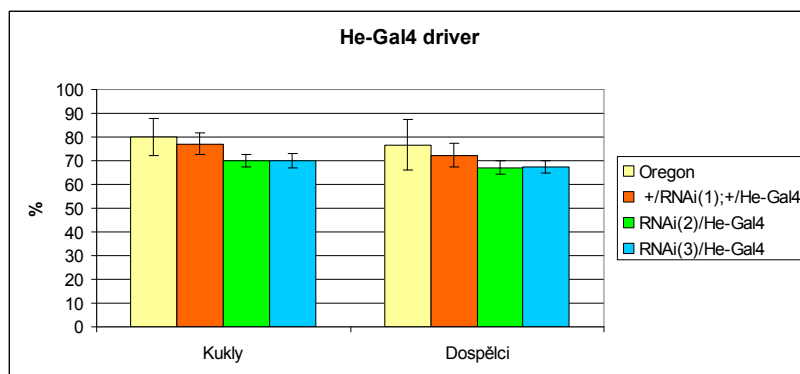
Pokusy jsem dvakrát opakovala. Vytvořila jsem tabulky a veškeré hodnoty jsem převedla na procenta. Dále jsem vytvořila průměry obou pokusů a z nich grafy, s vloženou standardní chybou (tab. 1, Grafy 1, 2, a 3). Časová osa kuklení a líhnutí je vložena do tabulek a grafů (příloha, tabulky 3 a 4, grafy 4, 5 a 6)

Tabulka 3: Vitalita transgenů

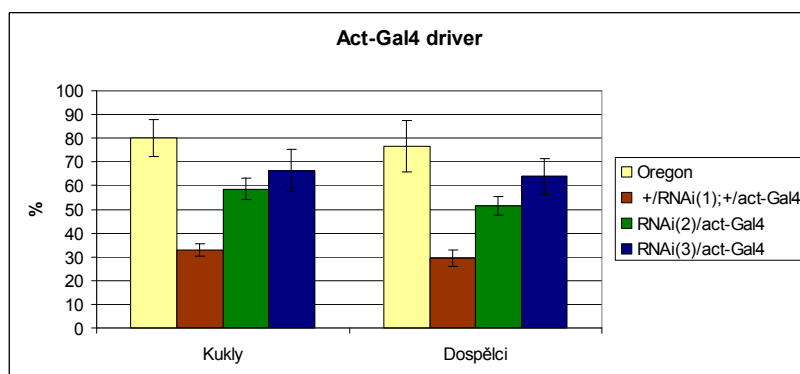
Linie	Kukly [%]	Dospělci [%]
Oregon	80,00	76,67
+/RNAi(1);+/arm-Gal4	75,35	71,07
+/RNAi(1);+/He-Gal4	77,13	72,33
+/RNAi(1);+/act-Gal4	33,04	29,45
+/arm-Gal4;+/RNAi(2)	71,26	64,83
RNAi(2)/He-Gal4	69,92	67,13
RNAi(2)/act-Gal4	58,60	51,51
+/arm-Gal4;+/RNAi(3)	69,86	61,13
RNAi(3)/He-Gal4	69,89	67,29
RNAi(3)/act-Gal4	66,34	63,89
ADGF-A ^{karel} /ADGF-A ^{karel}	7,52	0,00
ADGF-A ^{karel} /ADGF-A ^{gerda}	29,57	15,56



Graf 1: Kontrola vitality transgenních linií aktivovaných armadillo driverem.



Graf 2: Kontrola vitality transgenních linií aktivovaných hemese driverem.



Graf 3: Kontrola vitality transgenních linií aktivovaných actin driverem.

4.3 PCR

Pomocí PCR (polymerase chain reaction) jsem ověřovala správné vykřížení octomilek pro použití na western blot. Používala jsem čtyři dvojice primerů. První jako pozitivní kontrolu funkčnosti PCR reakce pro konkrétní templátovou DNA, druhou a třetí k ověření přítomnosti RNAi konstruktů a čtvrtou k ověření přítomnosti ADGF-Am μ c.

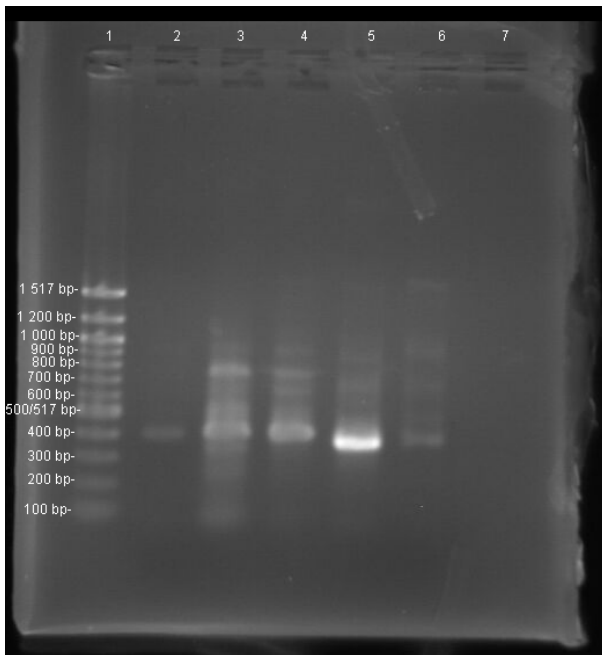
PCR 1 – optimalizace teploty primerů pro konstrukty RNAi (2) a RNAi (3)

Použitý templát *RNAi* (2)

Primer 1: pUASTforw

Primer 2: 50426Rev

Předpokládaná délka fragmentu: 390bp.



Obrázek 13: Optimalizace teploty primerů. **1.** jamka - 100bp DNA Ladder| **2.** jamka - 55,5°C| **3.** jamka - 56,9°C| **4.** jamka - 58,6°C| **5.** jamka - 61,1°C| **6.** jamka - 62,5°C| **7.** jamka - prázdná

Vybrala jsem teplotu 61,1°C

PCR 2 - kontrola vykřížených linií na přítomnost myc tagu.

Použité templáty: *ADGF-A myc*, *RNAi* (2)+*ADGF-AMyc* linie 1-5 a *RNAi* (3)+*ADGF-AMyc* linie 1-5 vzešlých z křížení na obrázku 9.

Kontrola vykřížených linií na přítomnost konstruktů *ADGF-AMyc-tag*:

Primer 1: D1SarE

Primer 2: MYCtag-RV

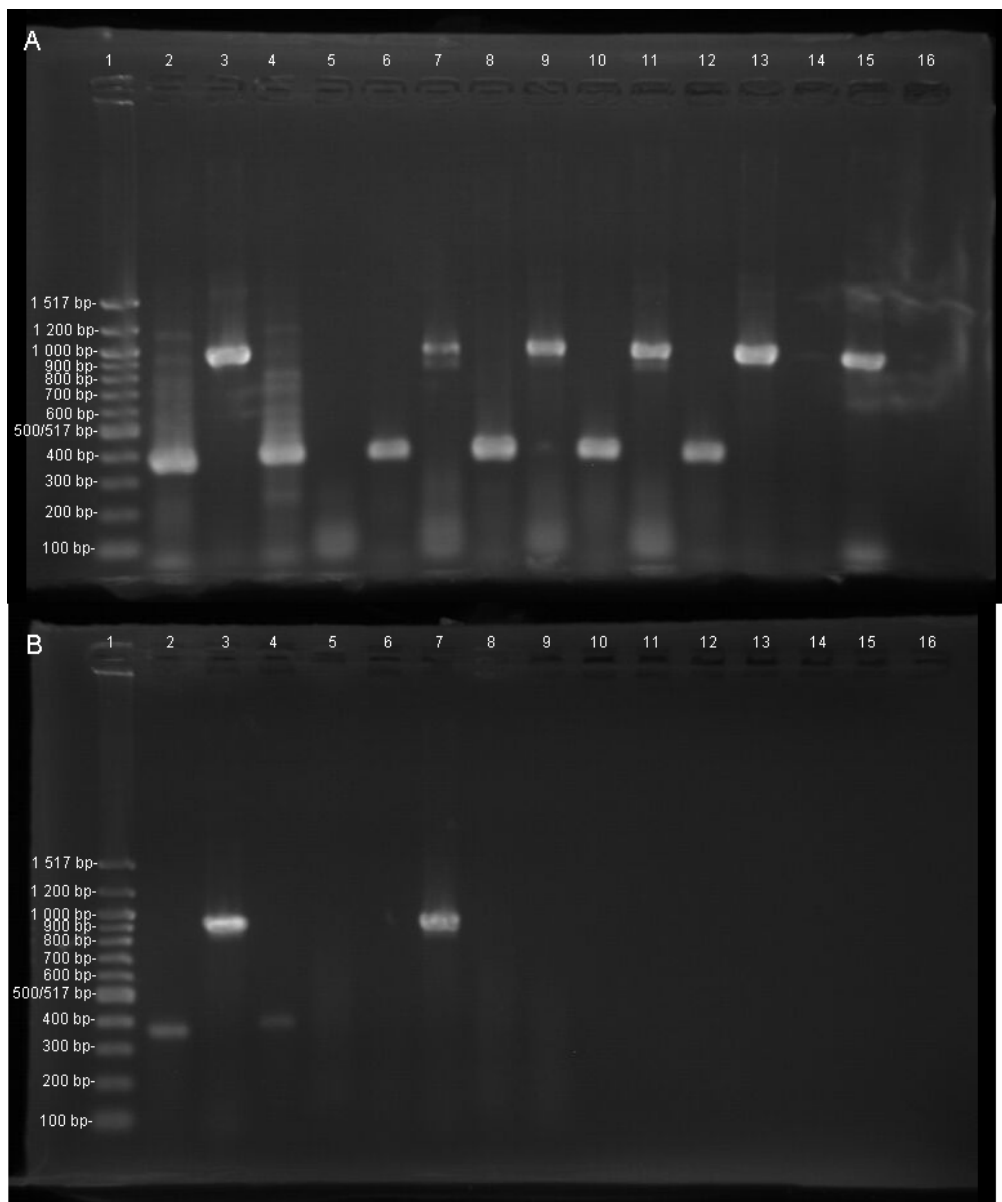
Předpokládaná délka fragmentu: 925bp

Kontrola přítomnosti templátové DNA:

Primer 1: AdoR-RTF

Primer 2: AdoR-RTR3

Předpokládaná délka fragmentu: 360bp.



Obrázek 14: Kontrola vykřížených linií na Myc tag.

A: 1. jamka - 100bp DNA Ladder| 2. jamka - kontrola templátu ADGF-Amyc| 3. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u ADGF-Amyc| 4. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 1| 5. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 1| 6. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 2| 7. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 2| 8. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 3| 9. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 3| 10. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 4| 11. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 4| 12. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 5| 13. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 5| 14. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 1| 15. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 1| 16. jamka – prázdná

B: 1. jamka - 100bp DNA Ladder| 2. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 2| 3. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 2| 4. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 3| 5. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 3|

6. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 4| 7. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 4| 8. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 5| 9. jamka - kontrola přítomnosti Myc tagu u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 5| 10. – 16. jamky prázdné.

Konstrukt ADGF-Amyc obsahují následující linie: RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 1, 3, 4 a 5 a RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 2 a 4, se kterými jsem dále pokračovala

PCR 3 - kontrola na přítomnost RNAi (2) a (3) konstruktů

Použité templáty: *RNAi (2)*, *ADGF-A myc*, *RNAi (2)+ADGF-Amyc* linie 1, 3, 4 a 5 a *RNAi (3)+ADGF-Amyc* linie 2 a 4 vzešlých z křížení na obrázku 9.

Kontrola vykřížených linií RNAi (2) a RNAi (3):

Primer 1: pUASTforw

Primer 2: 50426Rev

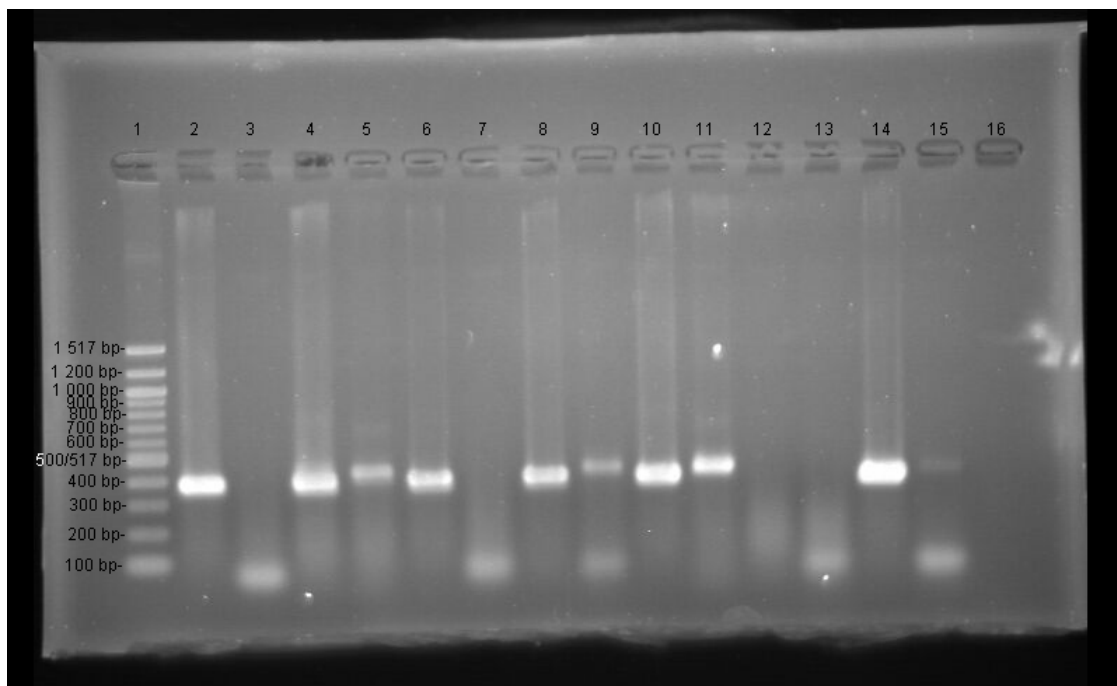
Předpokládaná délka fragmentu: 390bp.

Kontrola přítomnosti templátové DNA:

Primer 1: AdoR-RTF

Primer 2: AdoR-RTR3

Předpokládaná délka fragmentu: 360 bp



Obrázek 15: Kontrola vykřížených linií RNAi (2) a RNAi (3). 1. jamka - 100bp DNA Ladder| 2. jamka - kontrola templátu RNAi (2)| 3. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u RNAi (2)| 4. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 1| 5. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u

RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 1| 6. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 3| 7. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 3| 8. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 4| 9. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 4| 10. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 2| 11. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 2| 12. jamka - kontrola templátu RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 4| 13. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u RNAi (3)+ADGF-Amyc linie 4| 14. jamka - kontrola templátu RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 5| 15. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstruktů u RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 5| 16. jamka - prázdná.

Na základě tohoto výsledku jsem vybrala RNAi (2)+ADGF-Amyc linie 1 a 4, tyto linie jsem smísila dohromady a používala je dále jako jedinou linii "RNAi (2)+ADGF-Amyc". Z RNAi (3)+ADGF-Amyc jsem vybrala a dále používala linii 2.

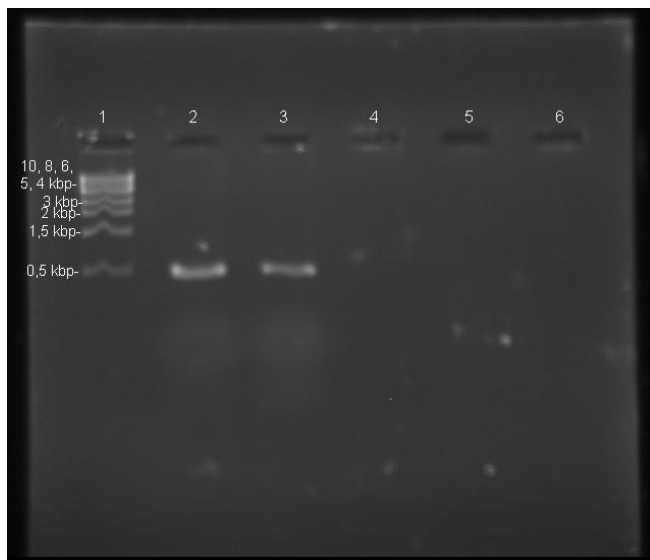
PCR 4 – optimalizace teploty primerů pro RNAi (1)

Použitý templát: *RNAi (1)*

Primer 1: pUASTforw

Primer 2: D1SarW

Předpokládaná délka fragmentu: 500bp



Obrázek 16: Optimalizace teploty primerů pro RNAi (1). 1. jamka - 1kbp Ladder| 2. jamka - 58°C| 3. jamka - 60°C| 4.-6. jamka - prázdné.

Vybrala jsem teplotu 58°C.

PCR 5 – kontrola vykřížených linií na RNAi (1) a Myc tag

Použité templáty: *RNAi (1)* ; *UAS-ADGF-A myc*, linie 1 a 4-8, *RNAi (1)* vzešlých z křížení na obrázku 8. a *ADGF-Amyc*

Kontrola myc tagu:

Primer 1: D1SarE

Primer 2: MYCtag-RV

Předpokládaná délka fragmentu: 925bp.

Kontrola RNAi (1):

Primer 1: pUASTforw

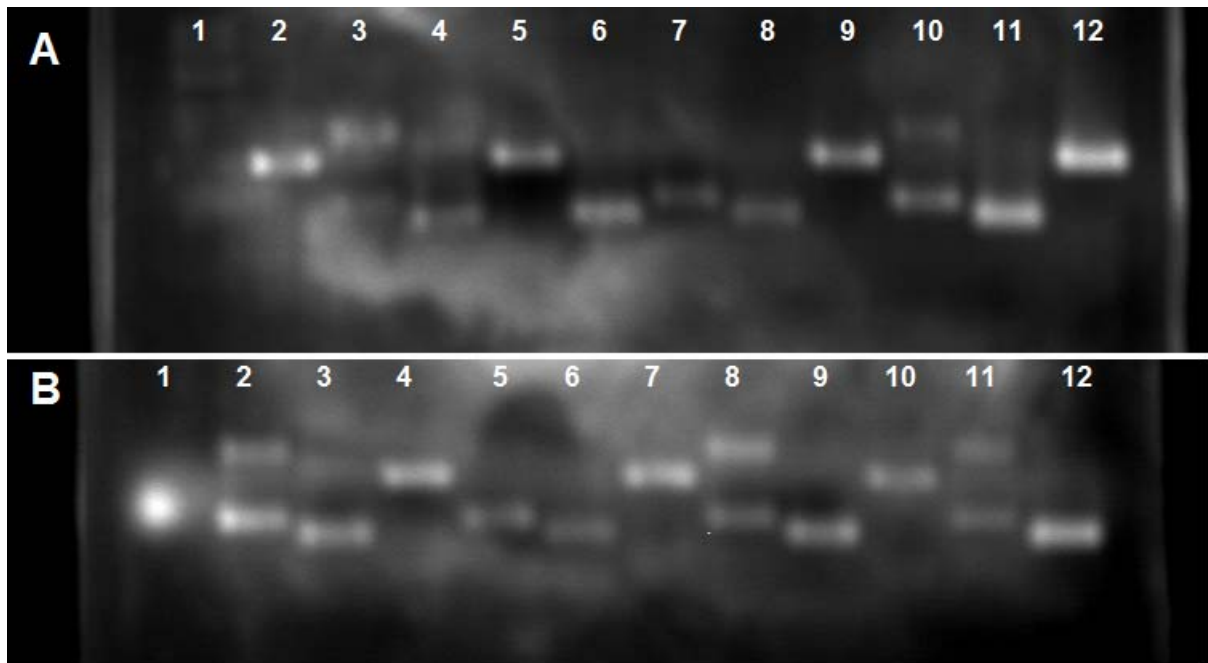
Primer 2: D1SarW
Předpokládaná délka fragmentu: 500bp

Kontrola přítomnosti templátové DNA:

Primer 1: AdoR-RTF

Primer 2: AdoR-RTR3

Předpokládaná délka fragmentu: 360bp.



Obrázek 17: kontrola vykřížených linií na RNAi (1) a Myc tag.

A: 1. jamka - 100bp DNA Ladder| 2. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 1| 3. jamka - kontrola přítomnosti RNAi (1) konstrukt u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 1| 4. jamka - kontrola templátu RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 1| 5. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u ADGF-Amyc| 6. jamka - kontrola templátu ADGF-Amyc| 7. jamka - kontrola přítomnosti RNAi konstrukt u RNAi (1)| 8. jamka - kontrola templátu RNAi (1)| 9. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 4| 10. jamka - kontrola přítomnosti RNAi (1) konstrukt u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 4| 11. jamka - kontrola

templátu RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 4| 12. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 5|

B: 1. jamka - 100bp DNA Ladder| 2. jamka - kontrola přítomnosti RNAi (1) konstrukt u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 5| 3. jamka - kontrola templátu RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 5| 4. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 6| 5. jamka - kontrola přítomnosti RNAi (1) konstrukt u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 6| 6. jamka - kontrola templátu RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 4| 7. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 7| 8. jamka - kontrola přítomnosti RNAi (1) konstrukt u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 7| 9. jamka - kontrola templátu RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 7| 10. jamka - kontrola přítomnosti myc tagu u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 8| 11. jamka - kontrola přítomnosti RNAi (1) konstrukt u RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 8| 12. jamka - kontrola templátu RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 8.

Bohužel se mi u obrázku 17 opakovaně nepodařilo vymýt etidiumbromid a ladder je špatně čitelný. Ovšem velikosti fragmentů odpovídají a jsou dobře čitelné a tak jsem na základě tohoto výsledku vybrala RNAi (1)+ADGF-Amyc linie 1, 4 a 7, tyto linie jsem smísila dohromady a používala je dále jako jedinou linii "RNAi (1)+ADGF-Amyc".

4.4 Western blot a dot blot

Měla jsem zjistit, zda funguje RNAi - zda bude viditelný úbytek proteinu ADGF-A. Abych mohla ADGF-A detekovat, musela jsem vykříždit octomilky, které mají zároveň RNAi konstrukt a protein ADGF-A označený myc tagem, na který je vytvořená monoklonální primární protilátka. Proti primární protilátce je sekundární protilátka, která je konjugovaná s enzymem křenovou peroxidázou (HRP - horseradish peroxidase). Při přidání substrátu křenová peroxidáza katalyzuje reakci, při které je emitováno světlo (chemiluminiscence). Toto světlo můžeme zachytit na rentgenový film nebo pomocí speciálního přístroje v digitální podobě.

Velikost fragmentu ADGF-A s myc tagem je 64kDa. Ověření se mi nedařilo a proto jsem mnoho času strávila eliminací chyb a opakováním pokusů.

Western blot 1

Protilátky: primární: Anti c-Myc, antibody (SIGMA), ředění 1:2 000
sekundární: Stabilized Goat anti Mouse HRP conjugated (PIERCE), ředění 1:2 500
Vyvolávala jsem roztoky ECL - žádný signál.

Později mi školitel řekl, že zjistil, že byla špatná sekundární protilátka.

Western blot 2

Protilátky: primární: Anti c-Myc antibody, ředění 1:2 000
sekundární: Anti Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in Rabbit (SIGMA), ředění 1:5 000
Přenos na membránu proběhl správně - kontrolní barvení Ponceau
Vyvolání Dura West - signálu je hodně, ale je rozmazaný.

Western blot 3

Stejný postup jako u 2. western blotu, jen zkouším jiné ředění sekundární protilátky: 1:8 000 a 1: 20 000
Vyvolání Dura West - žádný signál (Až později jsem zjistila, že Dura West nefunguje. To bohužel platilo i pro následující pokusy).

Odstraňování problému a chyb

Namíchala jsem všechny roztoky nové, z nových chemikálií. Postupně jsem zkoušela jednotlivé protilátky a jejich ředění.

Dot blot 1

Na malé čtverečky membrány jsem nakápla po 2 μ l primární protilátky (Anti c-Myc antibody). Blokovala jsem 30 minut v pokojové teplotě a nechala jsem inkubovat s různě ředěnou sekundární protilátkou (Anti Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in Rabbit).

Ředění sekundární protilátky: 1:6 000, 1: 8 000, 1:40 000 a 1:80 000

Vyvolávala jsem pomocí Dura West - žádný signál.

Dot blot 2

Zopakovala jsem dot blot s půjčenými roztoky, které jsou funkční. Použila jsem PBST místo TBST. Také jsem použila naší a půjčenou membránu. Na obě membrány jsem nanesla 2 μ l primární protilátky (Anti c-Myc antibody), nechala blokovat 30 minut v pokojové teplotě. Na hodinu jsem přidala sekundární protilátku (Anti Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in Rabbit) na 1 hodinu a následně promývala 5x 10 minut v PBST.

Vyvolávala jsem pomocí Dura West - žádný signál.

Dot blot 3

Chtěla jsem vyzkoušet detekci, která je vidět pouhým okem. Proto jsem vyvolávala pomocí DAB. Znovu používám půjčenou i naši membránu. Na obě membrány jsem nanesla po 2 μ l různě naředěné primární protilátky (Anti c-Myc antibody) 1:10, 1:100, 1:1 000 a 1:10 000. Také jsem nanesla 2 μ l sekundární protilátky (Anti Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in Rabbit) na naši membránu a na půjčenou membránu jsem nanesla půjčenou sekundární protilátku (bohužel nevím název ani výrobce). Membrány jsem promyla 3x5 minut v PBST a 30 minut blokovala. Následně jsem přidala sekundární protilátku. K naší membráně naši sekundární protilátku ředěnou 1:6 000. K půjčené membráně půjčenou sekundární protilátku ředěnou 1:500. Nechala jsem inkubovat 1 hodinu. V následujícím kroku jsem membrány promyla 5x 10 minut v PBST a vyvolávala DAB.

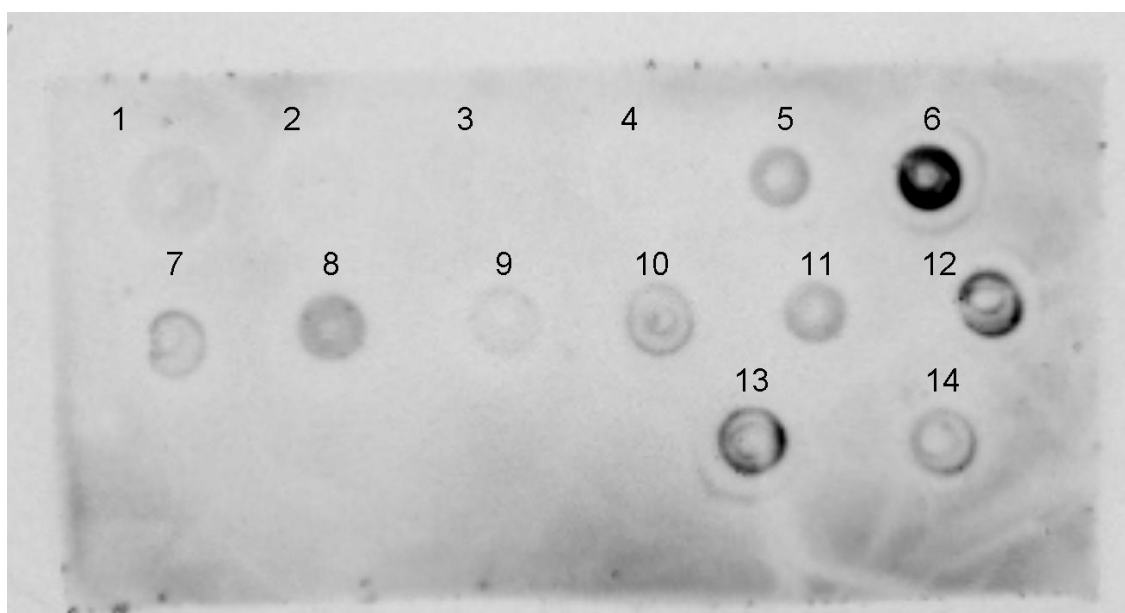
Obě nanesené sekundární protilátky zružověly na obou membránách. Primární protilátka s navázanou sekundární slabě zružověla pouze u ředění 1:10 na obou membránách.

To znamená, že naše membrána v pořádku váže proteiny. Že není problém ve vazbě sekundární protilátky na primární. A hlavně, že primární protilátka je špatná.

Dot blot 4

Stále jsem používala půjčené chemikálie, ale naši membránu. Na membránu jsem nanesla 5 μ l vzorků - lyzáty z drozofilích S2 buněk od Jana Ryneše (protein značený Myc tagem) a lyzáty octomilek získaných křížením z obrázků 10, 11 a 12 a nechala je zaschnout. Membránu jsem promyla 3x5 minut v PBST a nechala blokovat přes noc v 4°C. Ráno jsem přidala primární protilátku v ředění 1:500 a nechala inkubovat 2 hodiny v pokojové teplotě. Dále jsem membránu promývala 5x 10 minut v PBST a poté jsem přidala na 1 hodinu sekundární protilátku ředěnou 1:6 000. Po hodině jsem membránu promývala 5x 10 minut v PBST a vyvolávala ECL.

Použité lyzáty: lyzáty buněk "Myc Tc T600", "Myc TcSS", "Myc C2", "Myc", vykřížené mouchy z obrázku 11: +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(2), +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(2)/act-Gal4, +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(3), +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(3)/act-Gal4, vykřížené mouchy z obrázku 10: RNAi(1)/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4, +/RNAi(1);+/UAS-ADGF-Amyc;+/act-Gal4, RNAi(1), RNAi(2), RNAi(3) a ADGF-Amyc.



Obrázek 18: Dot blot s použitím půjčených chemikálií, naší membrány a našich protilátek. **1** - lyzát buněk "Myc Tc T600" | **2** - lyzát buněk "Myc TcSS" | **3** - lyzát buněk "Myc C2" | **4** - lyzát buněk "Myc" | **5** - +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(2) | **6** - +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(2)/act-Gal4 | **7** - RNAi(2) | **8** - RNAi(1)/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4 | **9** - +/RNAi(1);+/UAS-ADGF-Amyc;+/act-Gal4 | **10** - RNAi(1) | **11** - +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(3) | **12** - +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(3)/act-Gal4 | **13** - RNAi(3), **14** - ADGF-Amyc.

Dot blot 5

Dále jsem chtěla vyzkoušet zda fungují naše roztoky a také různé detekční metody. Používala jsem naše roztoky a naši membránu. Na 3 čtverečky membrány jsem nanesla po 2µl primární protilátky ředěné 1:10, nechala zaschnout a 3x5 minut promyla v TBST. Blokovala jsem membrány 30 minut v pokojové teplotě a následně inkubovala se sekundární protilátkou ředěnou 1:6 000. Promyla 5x 10 minut v TBST a vyvolávala 1) ECL, 2) Dura West, 3) DAB.

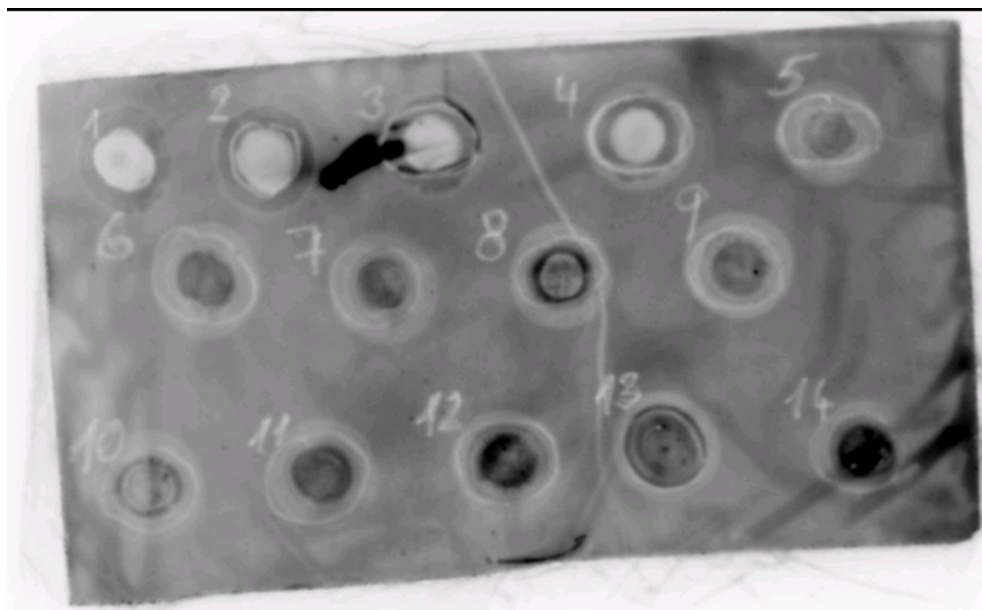
Membrána s ECL dává krásný signál. Membrána s Dura West nedává žádný signál. A u vyvolávání pomocí DAB nebylo vidět nic, ale vím, že při 3. dot blotu bylo toto ředění velmi slabě viditelné.

Zjistila jsem, že naše roztoky jsou v pořádku a že Dura West detekce nefunguje. Při vyvolávání jsem zjistila, že Dura West nefunguje, byla prošlá.

Dot blot 6

Použila jsem naše roztoky a půjčenou primární protilátku (Mouse anti-myc IgG, SIGMA) Primární protilátku jsem ředila 1:5 000 a sekundární 1:6 000 a vyvolávala ECL.

Použité lyzáty: lyzáty buněk "Myc Tc T600", "Myc TcSS", "Myc C2", "Myc", vykřížené mouchy z obrázku 11: +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(2), +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(2)/act-Gal4, +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(3), +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(3)/act-Gal4, vykřížené mouchy z obrázku 10: RNAi(1)/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4, +/RNAi(1);+/UAS-ADGF-Amyc;+/act-Gal4, RNAi(1), RNAi(2), RNAi(3) a ADGF-Amyc.



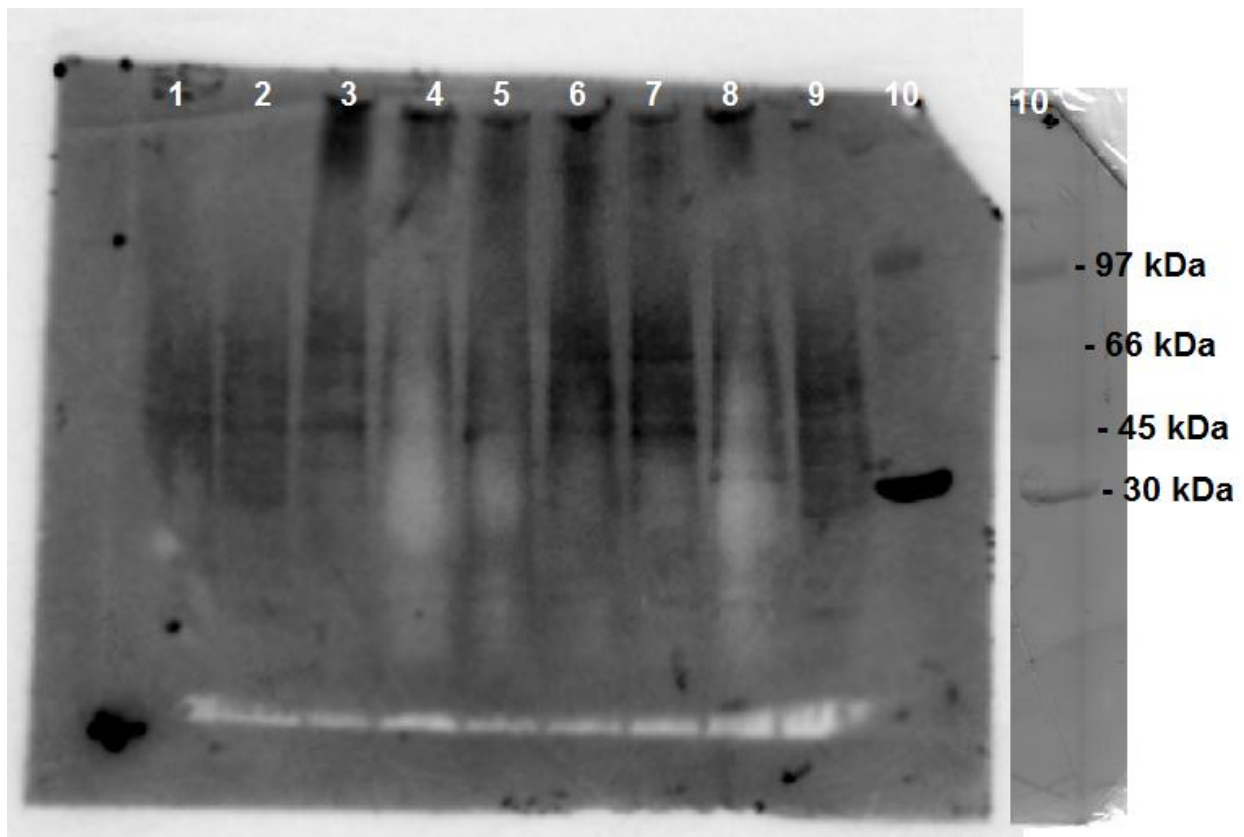
Obrázek 19: Dot blot s použitím našich chemikálií, naší membrány a půjčené primární protilátky. **1** - lyzát buněk "Myc Tc T600" | **2** - lyzát buněk "Myc TcSS" | **3** - lyzát buněk "Myc C2" | **4** - lyzát buněk "Myc" | **5** - ADGF-Amyc | **6** - RNAi(1) | **7** - +/RNAi(1);+/UAS-ADGF-Amyc;+/act-Gal4 | **8** - RNAi(1)/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4 | **9** - RNAi(2) | **10** - +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(2)/act-Gal4 | **11** - +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(2) | **12** - RNAi(3) | **13** - +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(3)/act-Gal4 | **14** - +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(3).

Western blot 4

Po několika dalších neúspěšných pokusech jsem si vzorky přenesla do jiné laboratoře a použila veškeré jejich roztoky. Použila jsem předpřipravený gradientový 5-17,5% polyakrylamidový gel. Nanesla jsem 20 μ l markeru a po 10 μ l vzorků. Transfer probíhal 1h při 250mA. Blokovala jsem 2,5 hodiny v 5% sunaru v pokojové teplotě. Promyla jsem v PBST 3x5 minut na třepačce. Primární protilátka (Mouse anti-myc IgG, SIGMA) ředěná 1:5 000 se inkubovala přes noc při 4°C. Ráno jsem membránu promyla 5x 10 minut v PBST a nechala 1 hodinu inkubovat se sekundární protilátkou (Anti Mouse IgG (whole molecule))

Peroxidase antibody produced in Rabbit) ředěnou 1:6 000. Promyla jsem membránu 5x 10 minut v PBST a vyvolávala ECL.

Použité lyzáty: vykřížené mouchy z obrázku 11: +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(2), +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(2)/act-Gal4, +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(3), +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(3)/act-Gal4, vykřížené mouchy z obrázku 10: RNAi(1)/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4, +/RNAi(1);+/UAS-ADGF-Amyc;+/act-Gal4, vykřížené mouchy z obrázku 12: w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/karel, +/w;+/UAS-ADGF-Amyc;karel/act-Gal4 a ADGF-Amyc.



Obrázek 20: Western blot. 1. jamka - +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(3)/act-Gal4| 2. jamka - +/RNAi(1);+/UAS-ADGF-Amyc;+/act-Gal4| 3. jamka - +/UAS-ADGF-Amyc;RNAi(2)/act-Gal4| 4. jamka - +/w;+/UAS-ADGF-Amyc;karel/act-Gal4| 5. jamka - +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(3)| 6. jamka - +/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/RNAi(2)| 7. jamka - RNAi(1)/w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4| 8. jamka - w;UAS-ADGF-Amyc/arm-Gal4;+/karel| 9. jamka - ADGF-Amyc| 10. jamka - LMW marker.

5. Diskuse:

Podářilo se mi vykřížít transgenní mouchy s RNAi (1), (2) i (3) konstrukty a ADGF-A s myc tagem. Pomocí PCR jsem ověřila a vybrala pouze linie nesoucí oba dva konstrukty.

Měla jsem ověřit dopad RNAi na gen *ADGF-A* pomocí dvou metod. První metodou bylo počítání vitality transgenů s RNAi aktivovanou různými Gal4 drivery (Obr 5 a 6), (grafy 1, 2 a 3). Z grafů je zřetelné, že vitalita těchto mutantů je snížena minimálně. Vitalitu nejvíce snižuje RNAi aktivovaná actin Gal4 driverem, nejméně pak armadillo Gal4 driverem. Hemese Gal4 driver snižuje vitalitu více než armadillo driver, což naznačuje, že exprese v krevních buňkách je důležitá. Snížení vitality je ale nevýrazné, je v rámci chybové odchylky. Pouze u konstrukt RNAi (1) aktivovaného actin Gal4 driverem byla vitalita výrazně snížena. Konstrukt RNAi (1) byl připraven naší laboratoří (Doležal, nepublikováno) a liší se sekvencí od konstrukt RNAi (2) a (3) připravených centrem VDRC. Měření vitality tudíž naznačuje, že námi připravený konstrukt má silnější účinek při RNAi, ovšem pouze při silné indukci ve všech buňkách organismu pomocí actin Gal4 driveru. V takové kombinaci je efekt RNAi na přežívání larev skoro srovnatelný s nulovou mutací v genu *ADGF-A* (Doležal et al. 2005 a tabulka 3), efekt na přežívání do dospělosti je pak již v porovnání s nulovou mutací slabší.

Při vybírání larev *+arm-Gal4;RNAi (3)* je spousta mrtvých vajíček a malé množství živých larev. Ověřovala jsem, zda RNAi v tomto konstruktu nemůže mít další cíl (off target). Pomocí vyhledávání možných cílů jsem na www.flybase.org zjistila, že jeden možný cíl existuje. Je to neprozkoumaný gen označovaný *Dmel\CG14855*, nachází se na chromosomu III a podle sekvenční podobnosti je jeho předpovídaná funkce spojená s kationovými transmembránovými přenašeči. Ale konstrukt *RNAi (2)* má stejnou sekvenci a tento jev se u larev *+arm-Gal4;RNAi (2)* nevyskytl. RNAi (2) a (3) se liší místem inserce konstrukt do genomu, což může ovlivnit, jak silně se konstrukt aktivuje, tudíž mohou i různě silně vypínat cíle.

Druhou metodou mělo být ověření pomocí western blotu – detekcí a kvantifikací množství enzymu adenosin deaminázy. Práce s western bloty nebyla úspěšná, protože jsem opakovaně měla technické problémy. Tyto problémy souvisely s tím, že jsem pracovala s vadnými chemikáliemi, což netušil ani nikdo jiný v laboratoři. Na výsledcích z dot blotů bohužel nemohu nic odhadnout, protože jsem používala nevhodné kontroly. Ze začátku jsem nevěděla, že transgenní ADGF-A s myc tagem také musí být aktivován Gal4 driverem a používala jsem jako kontrolu lyzát larev ADGF-Amyc, které ale transgenní protein skoro neexprimují.

A když jsem na posledním western blotu konečně získala nějaký výsledek, tak jsem bohužel již neměla vzorky ani čas octomilky znovu vykřížit, abych mohla optimalizovat ředění protilátek a získat lepší výsledek.

Vzhledem k tomu, že se mi nepodařilo kvantifikovat účinek RNAi pomocí western blotu, mohu pouze spekulovat, zda RNAi v těchto případech nefunguje nebo zda RNAi není tak účinná a exprimovaný protein stačí na udržení normálního fenotypu.

Zabývala jsem se také otázkou, jak dalece je nutné čekat na vylíhnutí much a zda nestačí pracovat jen s počtem zakuklených larev. Zjistila jsem, že rozdíl mezi těmito počty je minimální. Bude-li tento nález potvrzen na jiném pracovišti může to výrazně zkrátit dobu podobných experimentů.

Nemám možnost porovnat své výsledky s výsledky jiných laboratoří, protože jsem v dostupné literatuře nenašla práci sledující vliv účinku RNAi na expresi enzymu adenosin deaminázy. Mohu tedy předpokládat, že téma této práce navržené školitelem dosud nebylo zpracováno.

6. Závěr:

Rozdíl ve vitalitě mezi kontrolními liniemi a liniemi s aktivací RNAi je minimální. Vzhledem k velikosti tohoto rozdílu nelze vyloučit, že jde o náhodný rozdíl. Výjimkou je aktivace pomocí actin-Gal4 driveru, kde došlo k výraznějšímu snížení vitality. Toto platí pouze pro linii RNAi (1). Rozdíl u linií RNAi (2) a (3) je menší. Tudiž kombinace act-Gal4 RNAi (1) se jeví jako slibný nástroj pro aktivaci RNAi u genu *ADGF-A*.

Zjistila jsem, že je jasný vztah mezi zakuklením a vitalitou – když už se moucha zakuklí, tak přežije. Nález, že rozdíl mezi počtem zakuklených a vylíhnutých drozofil je tak minimální, že při práci s touto metodou řešící podobnou otázku se nemusí čekat na vylíhnutí, kdyby se tento nález potvrdil na jiném pracovišti.

7. Použité zkratky:

Act.....	actin Gal4 driver
ADGF.....	adenosinedeaminase related growth factor = růstový faktor příbuzný adenosin deamináze
ADP.....	adenosin difosfát
AMP.....	adenosin monofosfát
Arm.....	armadillo Gal4 driver
ATP.....	adenosin trifosfát
DAB	o-diaminobenzidin
dH ₂ O.....	destilovaná voda
DNA.....	deoxiribonukleová kyselina
dsRNA.....	dvouvláknová RNA
ECL.....	roztok pro vyvolání chemiluminiscence
GFP.....	green fluorescence protein = zelený fluoreskující protein
He.....	hemese Gal4 driver
HRP.....	horseradish peroxidase = křenová peroxidáza
ot/min.....	otáček za minutu
P2X, P2Y, AdoR.....	adenosinové receptory
PCR.....	polymerase chain reaction
RISC.....	RNA induced silencing complex = umlčovací komplex vyvolaný RNA
RNA.....	ribonukleová kyselina
RNAi.....	RNA interference
RNáza.....	enzym štěpící RNA
SCID.....	severe combined immunodeficiency disease = vážná kombinovaná imunodeficiencie
siRNA.....	small interfering RNA = krátká interferující RNA
ssRNA.....	jednovláknová RNA
UAS.....	Upstream Activation Sequence

8. Literatura:

- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. and Mukherjee, S.K. (2003)
RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications
Microbiology and Molecular Biology Reviews, Dec. 2003, p. 657–685 Vol. 67, No. 4
- Aronin, N. (2006)
Target selectivity in mRNA silencing
Gene Therapy (2006) 13, 509–516 & 2006
- Beller, M. & Oliver, B. (2006)
One hundred years of high-throughput *Drosophila* research
Chromosome Research (2006) 14:349–362
- Borowiec, A., Lechward, K., Tkacz-Stachowska, K. and Składanowski, A.C. (2006)
Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases
Acta Biochimica Polonica Vol. 53 No. 2/2006, 269–278
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993)
Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes
Development 118, 401-415 (1993)
- Doležal, T., Dolezelova, E., Žurovec, M., Bryant, P.J. (2005)
A Role for Adenosine Deaminase in *Drosophila* Larval Development
PLoS Biology, Volume 3, Issue 7, 1213-24, July 2005
- Doležal, T., Gazi, M., Žurovec, M., and Bryant, P.J. (2003)
Genetic Analysis of the *ADGF* Multigene Family by Homologous Recombination and Gene Conversion in *Drosophila*
Genetics **165**: 653–666 (October 2003)
- Dolezelova, E., Žurovec, M., Doležal, T., Simek, P., Bryant, P.J. (2005)
The emerging role of adenosine deaminases in insects
Insect Biochemistry and Molecular Biology 2005 May;35(5):381-9.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001)
RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs
GENES & DEVELOPMENT 15:188–200, 2001
- Fire, A., SiQun Xu, Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998)
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*
Nature. 1998 Feb 19;391(6669):744-5.

- Fredholm, B.B. (2007)
Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair
Cell Death and Differentiation (2007) 14, 1315–1323
- Greenspan, R.J. (2004)
Fly Pushing, The theory and Practice of *Drosophila* Genetics
2004 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York)
- Jeff Huaqing Ye, Vazhaikkurichi M. Rajendran (2009)
Adenosine: An immune modulator of inflammatory bowel diseases
World J Gastroenterol 2009 September 28; 15(36): 4491-4498
- Latini, S. and Pedata, F. (2001)
Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations
Journal of Neurochemistry, 2001, 79, 463±484
- 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 (2001)
- McDermid, H.E., Morrow, B.E. (2002)
Genomic disorders on 22q11.
Am J Hum Genet. 2002 May;70(5):1077-88. Epub 2002 Mar 29
- Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosatol, E., Kyriacou, C. P., and Costa, R. (2001)
Efficient and heritable knockout of an adult phenotype in *Drosophila* with a GAL-4 driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer.
Nucleic Acid Res. 29:55–60
- Richard, E., Munir Alam, S., Arredondo-Vega, F.X., Dhavalkumar D. Patel, and 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*
The Journal Of Biological Chemistry Vol. 277, No. 22, Issue of May 31, pp. 19720–26, 2002
- Ryder, E. and Russel, S. (2003)
Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*
Henry Stewart Publications 1473-9550. Briefings in Functional Genomics and Proteomics. Vume 2, no 1, 57–71. April 2003
- Wolf, M.J. and Rockman, H.A. (2008)
Drosophila melanogaster as a model system for genetics of postnatal cardiac function
Drug Discov Today Dis Models. 2008 October 1; 5(3): 117–123.

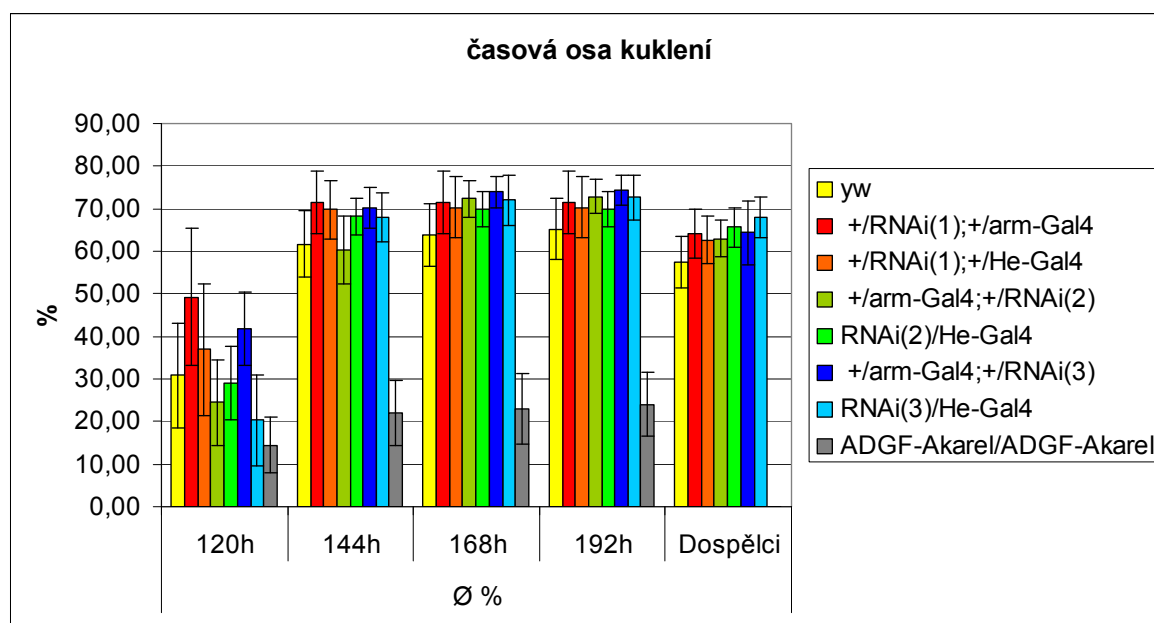
- Yegutkin, G.G. (2008)
Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade.
Biochimica et Biophysica Acta 1783 (2008) 673–694
- Žurovec, M., Doležal, T., Gazi, M., Pavlova, E. and Bryant, P.J. (2002)
Adenosine deaminase-related growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine
PNAS, April 2, 2002, vol. 99, no. 7, 4403–4408

9. Přílohy:

Časové osy kuklení a líhnutí drozofil.

Tabulka 4: Časová osa kuklení a líhnutí, první pokus

Linie	Ø %				Dospělci
	120h	144h	168h	192h	
Yw	30,85	61,70	63,74	65,22	57,56
+/ <i>RNAi</i> (1);+/ <i>arm-Gal4</i>	49,21	71,48	71,48	71,48	64,13
+/ <i>RNAi</i> (1);+/ <i>He-Gal4</i>	36,90	69,77	70,27	70,27	62,67
+/ <i>arm-Gal4</i> ;+/ <i>RNAi</i> (2)	24,54	60,37	72,31	72,87	63,00
<i>RNAi</i> (2)/ <i>He-Gal4</i>	29,17	68,19	69,86	69,86	65,60
+/ <i>arm-Gal4</i> ;+/ <i>RNAi</i> (3)	41,80	70,08	73,89	74,37	64,41
<i>RNAi</i> (3)/ <i>He-Gal4</i>	20,40	68,00	72,00	72,67	68,00
<i>ADGF-A</i> ^{karel} / <i>ADGF-A</i> ^{karel}	14,50	22,00	23,00	24,00	0,00

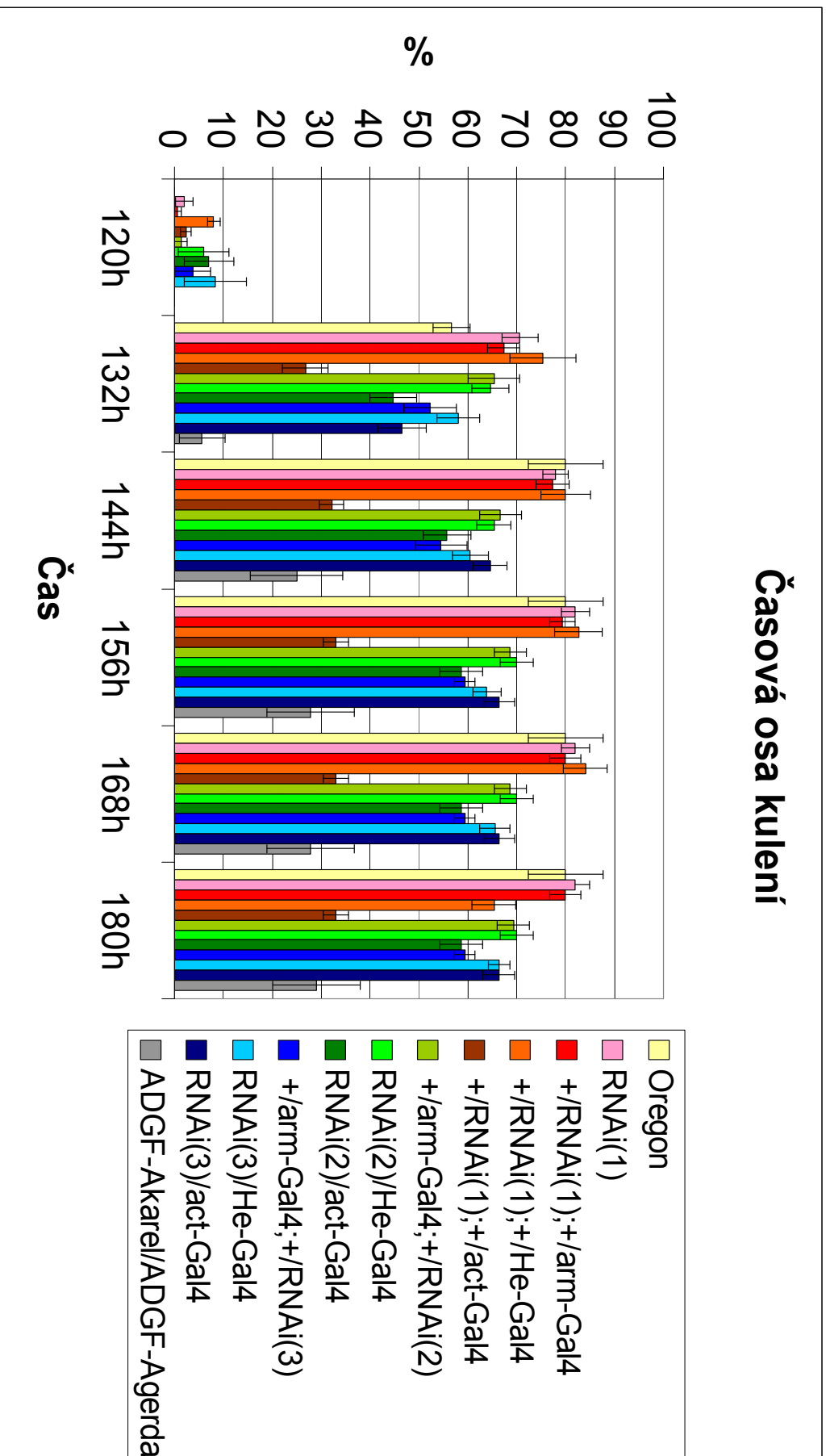


Graf 4: Časová osa kuklení a líhnutí, první pokus

Tabulka 5: Časová osa kuklení a líhnutí, druhý pokus

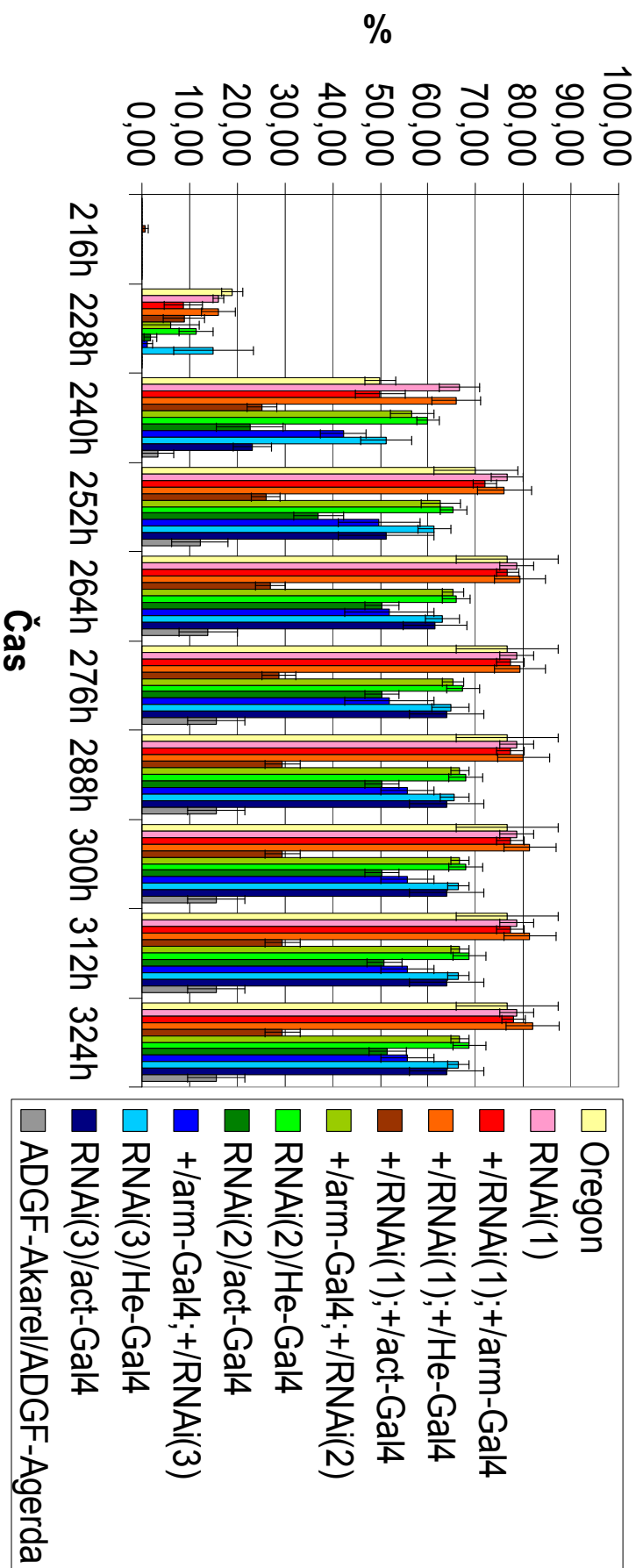
Linie	Kukly									
	Ø %									
	120h	132h	144h	156h	168h	180h	192h			
Oregon	0,00	56,67	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00			
RNAi(1)	2,00	70,67	78,00	82,00	82,00	82,00	82,00			
+RNAi(1);+/arm-Gal4	0,67	67,33	77,33	79,33	80,00	80,00	80,00			
+RNAi(1);+/He-Gal4	8,00	75,33	80,00	82,67	84,00	84,00	84,00			
+RNAi(1);+/act-Gal4	2,34	26,79	32,16	33,04	33,04	33,04	33,04			
+arm-Gal4;+/RNAi(2)	1,33	65,33	66,67	68,67	68,67	69,33	69,33			
RNAi(2)/He-Gal4	6,00	64,67	65,33	70,00	70,00	70,00	70,00			
RNAi(2)/act-Gal4	7,04	44,70	55,75	58,60	58,60	58,60	58,60			
+arm-Gal4;+/RNAi(3)	3,70	52,31	54,54	59,35	59,35	59,35	59,35			
RNAi(3)/He-Gal4	8,33	57,99	60,52	63,85	65,57	66,42	66,42			
RNAi(3)/act-Gal4	0,00	46,55	64,52	66,34	66,34	66,34	66,34			
ADGF-A ^{karel} /ADGF-A ^{gerda}	0,00	5,64	24,96	27,82	27,82	29,02	29,57			
Linie	Dospělci									
	Ø %									
	216h	228h	240h	252h	264h	276h	288h	300h	312h	324h
Oregon	0,00	18,89	50,00	70,00	76,67	76,67	76,67	76,67	76,67	76,67
RNAi(1)	0,00	16,00	66,67	76,67	78,67	78,67	78,67	78,67	78,67	78,67
+RNAi(1);+/arm-Gal4	0,00	8,67	50,00	72,00	76,67	77,33	77,33	77,33	77,33	78,00
+RNAi(1);+/He-Gal4	0,00	16,00	66,00	76,00	79,33	79,33	80,00	81,33	81,33	82,00
+RNAi(1);+/act-Gal4	0,62	8,82	25,15	26,03	26,90	28,66	29,45	29,45	29,45	29,45
+arm-Gal4;+/RNAi(2)	0,00	6,00	56,67	62,67	65,33	65,33	66,67	66,67	66,67	66,67
RNAi(2)/He-Gal4	0,00	11,33	60,00	65,33	66,00	67,33	68,00	68,00	68,67	68,67
RNAi(2)/act-Gal4	0,00	1,79	22,70	37,07	50,27	50,27	50,27	50,27	50,89	51,51
+arm-Gal4;+/RNAi(3)	0,00	1,11	42,22	49,72	51,94	51,94	55,65	55,65	55,65	55,65
RNAi(3)/He-Gal4	0,00	15,03	51,24	61,35	63,02	64,74	65,57	66,41	66,41	66,41
RNAi(3)/act-Gal4	0,00	0,00	23,14	51,19	61,52	63,89	63,89	63,89	63,89	63,89
ADGF-A ^{karel} /ADGF-A ^{gerda}	0,00	0,00	3,33	12,22	13,89	15,56	15,56	15,56	15,56	15,56

Časová osa kuliní



Graf 5: Časová osa kuliní, druhý pokus

Časová osa líhnutí



Graf 6: Časová osa líhnutí, druhý pokus