

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Katedra medicínské biologie



Bakalářská práce

GENETICKÝ SCREENING DOMINANTNÍCH SUPRESORŮ
ADGF-A MUTANTNÍHO FENOTYPU U DROZOFILY

Vypracoval: David Hartmann

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

České Budějovice 2011

Hartmann D, (2011): Genetický screening dominantních supresorů *adgf-a* mutantního fenotypu u drozofily [Genetic screening for the dominant suppressors of *adgf-a* mutant phenotype in *Drosophila*. Bc. Thesis, in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Extracelulární adenzin je důležitou signální molekulou mnoha fyziologických procesů. Pokud není jeho hladina řádně regulována, dochází k různým onemocněním, např. k těžké kombinované imunodeficienci. Pro zkoumání účinků zvýšené hladiny extracelulárního adenzinu byl na octomilce vytvořen genetický model s mutovaným genem pro ADGF-A (Adenosine Deaminase-related Growth Factor A), jenž má hlavní adenzin deaminázovou aktivitu. Tato práce navazuje na rozsáhlý screening dominantních supresorů *adgf-a* mutantního fenotypu a podrobněji zkoumá 3 oblasti, které podle tohoto screeningu dominantní supresory obsahují.

Annotation:

Extracellular adenosine is an important signaling molecule in various physiological processes. When not regulated properly it can cause various pathologies such as Severe Combined Immunodeficiency. To study the effects of increased extracellular adenosine level a *Drosophila* model has been established. This model is based on mutation in the main adenosine deaminase gene in *Drosophila* (*ADGF-A*, Adenosine Deaminase-related Growth Factor A). This work is a consequence of large screening for the suppressors of *adgf-a* mutant phenotype and presents a more detailed study of 3 previously identified regions containing dominant suppressors.

Práce byla financována z grantu GAČR GACR 204-09-1463.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval 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 jejích internetových stránkách, a to se zachováním svého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 27. 4. 2011

.....

David Hartmann

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Tomáši Doležalovi, Ph. D. za možnost pracovat v jeho laboratoři, trpělivost a cenné připomínky při psaní bakalářské práce. Velký dík za pomoc při práci v laboratoři patří Mgr. Monice Žuberové a ostatním členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

1 Úvod.....	1
1.1 Drozofila.....	1
1.2 Drozofila jako modelový organismus.....	1
1.3 Genetika drozofily.....	2
1.3.1 Balancerové chromozomy.....	2
1.3.2 Mobilní transponovatelné elementy.....	2
1.4 Extracelulární adenzin a regulace jeho hladiny.....	3
1.5 Drozofila jako genetický model pro zkoumání účinků extracelulárního adenzinu	4
1.6 Genetický screening.....	5
1.7 Použití flipázy pro vytváření přesně ohraničených delecí.....	6
1.8 Enoláza.....	6
2 Cíl práce.....	8
3 Metodika.....	9
3.1 Testované oblasti.....	9
3.2 Mutace v adenzin deamináze.....	11
3.3 Křížení linií pro podrobný screening.....	12
3.4 Screening.....	13
3.5 Příprava diet.....	14
3.6 Ověření přítomnosti delecí ve vykřížených liniích.....	14
3.6.1 Izolace DNA pro PCR.....	14
3.6.2 PCR reakce.....	14
3.6.3 Elektroforéza.....	16
4 Výsledky.....	17
4.1 Testování supresorových účinků delecí na levém rameni druhého chromozomu.....	17
4.1.1 Počítání červen 2010.....	17
4.1.2 Počítání únor 2011.....	19
4.2 Testování supresorových účinků mutace v enoláze.....	22
4.3 Testování supresorových účinků delecí a P-elementů ve druhé a třetí testované oblasti na pravém rameni druhého chromozomu.....	24
4.4 Ověření přítomnosti delecí pomocí PCR.....	28

5 Diskuze.....	29
6 Závěr.....	31
7 Použitá literatura.....	32

1 Úvod

1.1 Drozofila

Octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) je jedním z nejvýznamnějších modelových organismů pro genetiku a vývojovou biologii. Patří do třídy hmyz (*Insecta*), řádu dvoukřídlí (*Diptera*), čeledi octomilkovití (*Drosophilidae*).

Octomilka je drobná muška, obvykle dorůstá do délky 2,5 - 3 mm. Její obvyklé zbarvení je světle žluté, hnědé až černé. U octomilek je patrný pohlavní dimorfismus.

Octomilky jsou v současné době kosmopolitním organismem, s výjimkou Antarktidy žijí na všech světadílech. Většina druhů žije v tropických deštných pralesích, ale obývají i různá jiná stanoviště včetně pouští. Některé druhy, jako např. právě *Drosophila melanogaster*, jsou vázány na města a lidská obydlí. Octomilky se obvykle vyvíjí v hniјícím ovoci a jiných rozkládajících se rostlinných a houbových materiálech.

1.2 Drozofila jako modelový organismus

Jako modelový organismus má *Drosophila melanogaster* mnoho úžasných vlastností. Jsou jimi relativně snadná genetická manipulovatelnost, nízký počet chromozomů s malým počtem genů, znalost celého genomu, existence balancerových chromozomů, fakt, že u samců neprobíhá rekombinace, krátký životní cyklus, velké množství potomstva, finanční a prostorová nenáročnost chovu a v neposlední řadě také to, že s drozofilou pracují po celém světě tisíce vědců a v laboratořích je využívána již více než 100 let.

Nejdůležitější je, že mnoho genů a procesů je konzervováno i v jiných organizmech včetně člověka. Příkladem mohou být homeotické geny. Také z 289 genů, o kterých je známo, že mají u člověka vztah k různým onemocněním, má své homology u drozofily celá třetina (Rubin et Lewis, 2000).

1.3 Genetika drozofily

Drozofila má čtyři páry chromozomů. Jsou nazývány X (Y), druhý, třetí a čtvrtý. Každý chromozom je tvořen pravým a levým ramenem. Velikosti levého ramene X a obě ramena druhého a třetího chromozomu mají podobnou velikost. X a čtvrtý chromozom mají hlavní levé rameno. Pravé je velmi malé, obvykle u nich bývají znázorňována pouze ramena levá. Velikost čtvrtého chromozomu je oproti ostatním přibližně pětina.

Rameno každého chromozomu je rozděleno na 20 očíslovaných úseků. U chromozomu X rozlišujeme úseky 1-20, u levého ramene druhého chromozomu ($2L$) 21-40, u pravého ramene druhého chromozomu ($2R$) 41-60, u levého ramene třetího chromozomu ($3L$) 61-80 a 81-100 pro pravé rameno třetího chromozomu ($3R$). Čtvrtý chromozom je rozdělen pouze na úseky 101-104. Každý z těchto očíslovaných úseků se dále dělí na úseky značené velkými písmeny (A, B, C, D, E). (Greenspan, 2004)

1.3.1 Balancerové chromozomy

Balancerové chromozomy jsou chromozomy, které obsahují mnohočetné inverze, což téměř znemožňuje rekombinaci s jejich standardními homology během meiózy. Dále obvykle nesou nějakou recesivně letální mutaci a vždy nějaký snadno rozeznatelný dominantní marker. Díky těmto vlastnostem balancerové chromozomy umožňují snadno pracovat i s mutacemi, které nemají v heterozygotním stavu viditelný fenotypový projev, udržovat linie a provádět s nimi křížení, která by byla bez nich prakticky neproveditelná.

Díky homozygotní letalitě, kdy balancerový chromozom může být ze dvou homologních pouze jeden, a dobře viditelnému markeru při křížení stále přesně víme i to, ve kterých jedincích se nachází homologní chromozom se sledovanou alelou. A to dokonce již u embryí a larev, díky variantám balancerových chromozomů nesoucím gen pro tvorbu GFP (green fluorescent protein).

1.3.2 Mobilní transponovatelné elementy

U drozofily jsou nejpoužívanější P-elementy, které patří mezi transpozony II. skupiny (pro mobilizaci vyžadují transponázu). Do *Drosophily melanogaster*

se zřejmě dostaly během posledních čtyřiceti let z jiného druhu.

Na okrajích P-elementu se nachází terminální invertované repetice o délce 31 bazí, které jsou nutné pro vystřižení a zpětné začlenění do chromozomu. Celý P-element má velikost 2,9 kb a ve 4 exonech kóduje funkční transponázu.

Při zajištění kontrolovatelnosti transpozice a nahrazení vnitřní sekvence pro transponázu dobře viditelným markerem (např. *miniwhite*, *rosa*) se P-elementy dají velmi dobře využít pro cílenou mutagenézi. Tak je možné získat celou sbírku linií, které mají nějaký P-element inzerován skoro v každém genu.

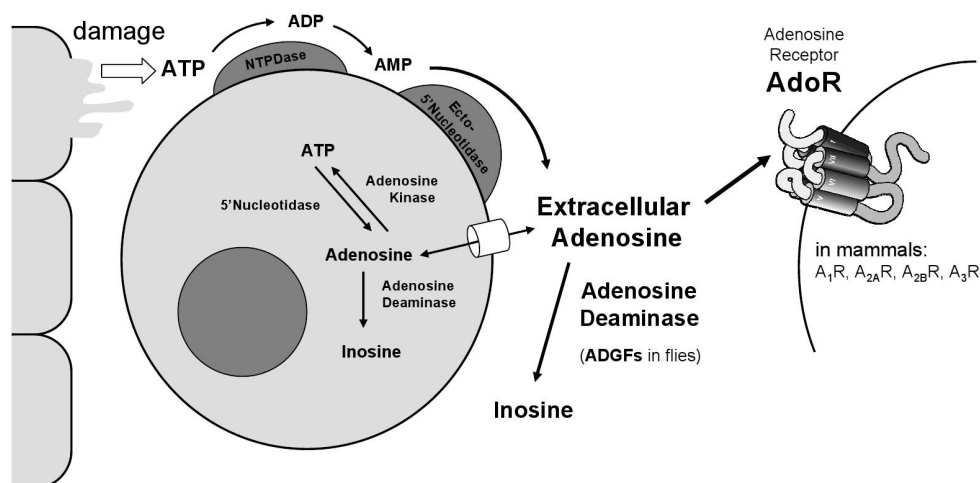
Nevýhodou P-elementů je, že se přednostně transponují do promotorové oblasti a inserce do kódující oblasti genu je velmi vzácná. Proto se občas používají i jiné mobilní elementy, například PiggyBac, které se transponují rovnoměrněji.

1.4 Extracelulární adenosin a regulace jeho hladiny

Adenosin (Ado) je nukleosid, který je složen z adeninu a ribofuranosy spojených β -N₉ glykosidickou vazbou. Adenosin hraje důležitou roli v mnoha různých procesech v organismu, jeho funkce záleží na místě působení.

Extracelulární adenosin je důležitou signální molekulou. Působí přes své specifické receptory. U savců rozlišujeme čtyři skupiny: A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃. (Fredholm et al., 2000). Reguluje vazodilataci (roztažení cév) a vazokonstrikci, stimuluje glykogenolýzu a anaerobní glykolýzu, zásobování myokardu kyslíkem (Berne et al., 1983), cyklus spánku a bdělosti (Ohta et Sitkovsky, 2001), otevírání a uzavírání iontových kanálů, snižuje neurální dráždivost (postsynaptická i presynaptická inhibice) (Buck, 2004). Signální funkce adenosinu je rovněž velmi důležitá za stresových podmínek (hypoxie, záněť) a ovlivňuje buněčný cyklus a apoptosu.

Množství extracelulárního adenosinu je nutné přísně regulovat. Jeho koncentrace je obvykle nízká (cca kolem 300 nM), protože je rychle metabolizován na inozin enzymem adenosin deaminázou. V případě buněčného poškození, zánětu nebo hypoxie se jeho hladina ale rychle zvyšuje až na několiknásobek. Je uvolňován přímo z buněk nukleosidovými transportéry, nebo je produkován na povrchu některých buněk z ATP uvolněného z poškozených tkání (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma znázorňující uvolnění, signalizaci a degradaci extracelulárního adenosinu

e-Ado může být uvolněn nukleosidovými transportéry z intracelulárního prostoru, kde je produkován při metabolickém stresu, nebo může vznikat z ATP uvolněného z poškozených tkání kaskádou ektoenzymů.

Ztráta schopnosti regulovat hladinu adenosinu následkem vrozené mutace adenosin deaminázy vede u člověka k těžké kombinované imunodeficienci (SCID), kdy jsou postiženy lymfocyty B a T i NK buňky.

Imunodeficence mohou být způsobeny i jinými mutacemi, u člověka je jich známo minimálně sedm různých a většinou jsou lokalizovány na chromozomu X. Mutace v adenosin deamináze je ale nejčastější.

1.5 Drosophila jako genetický model pro zkoumání účinků extracelulárního adenosinu

Pro zkoumání funkce adenosin deaminázy byl na octomilce zhotoven genetický model - mouchy s blokovanou expresí proteinu zvaného adenosine deaminase-related growth factor (ADGF-A) (Doležal et al., 2005), jenž má adenosin deaminázovou aktivitu a je exprimován ve střevě a hematopoetických orgánech. V mouchách postrádajících enzymatickou aktivitu ADGF-A se adenosin a deoxyadenosin hromadí, jeho koncentrace je zvýšená zejména v hemolymfě. Takto postižené mouchy často hynou již v larválním stádiu nebo jako kukly.

Vývoj *adgf-a* mutantů je výrazně opožděný již od třetího instaru larev,

u kterých často dochází k rozpadu tukového tělesa a zejména v zadní části těla se vyskytují mnohočetné melanotické tumory. Méně než 30 % jedinců se zakuklí a obvykle hynou brzy poté. Obvykle se nevyvine abdominální část. U kukel je také časté zahnutí zadečku na pravou stranu. Dospělosti dosahují méně než 2 % jedinců a obvykle jsou sterilní (Doležal et al., 2003).

1.6 Genetický screening

Genetický screening je metoda hromadného zjišťování geneticky podmíněných nemocí (i v heterozygotním stavu) nebo odchylek od normálu v určité populaci. U člověka bývá hlavním cílem identifikovat jedince, u kterých hrozí vyšší riziko, že jejich děti nebo oni samotní budou trpět nějakým geneticky podmíněným onemocněním.

U drozofily se jako genetický screening označuje hledání mutací, které způsobují určitý fenotyp. Deleční screening umožňuje otestovat celý genom pomocí relativně malého počtu delecí, které jej skoro celý pokrývají, namísto testování všech jednotlivých genů postupně. Octomilka má přes 13 700 genů.

Dříve se používal tzv. deleční kit, což je sbírka linií s 270 heterozygotními delecemi, které dohromady pokrývají přibližně 92 % genomu (Ryder et al., 2007). Nevýhodou této sbírky je, že delece byly vytvářeny rentgenovým zářením, které mohlo vyvolat vznik dalších náhodných nežádoucích mutací a u takto připravených delecí neznáme ani jejich přesné hranice.

Dnes je dostupný tzv. deleční kit druhé generace, což je sbírka linií s 209 delecemi, které pokrývají více než 60 % genomu. Tyto delece jsou již přesně ohraničené a v těchto liniích by se neměla vyskytovat žádná jiná mutace. (Ryder et al., 2007).

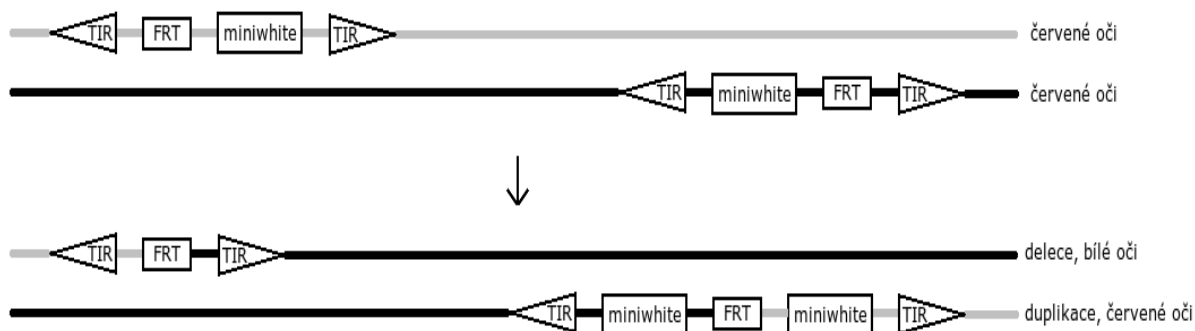
Další možností genetického screeningu je např. inzerční screening, kdy je gen inaktivován inzercí P-elementu.

1.7 Použití flipázy pro vytváření přesně ohraničených delecí

Flipáza je enzym získaný z kvasinek, který katalyzuje rekombinaci mezi dvěma FRT místy (Obr. 2).

Pokud je vnitřní sekvence P-elementu nahrazena FRT místem a nějakým snadno rozeznatelným markerem, např. *miniwhite*, dají se takové P-elementy využít pro výrobu delecí, jejichž hranice je definována polohou P-elementů použitých pro jejich výrobu.

Tímto způsobem vznikly dvě sbírky linií s přesně ohraničenými delecemi, Drosdel v Szegedu (www.drosdel.org.uk) a Exelixis na Harvard Medical School v Bostonu (drosophila.med.harvard.edu). Na obrázku 2 je uveden způsob výroby delecí používaný v Exelixis (Parks et al., 2004).



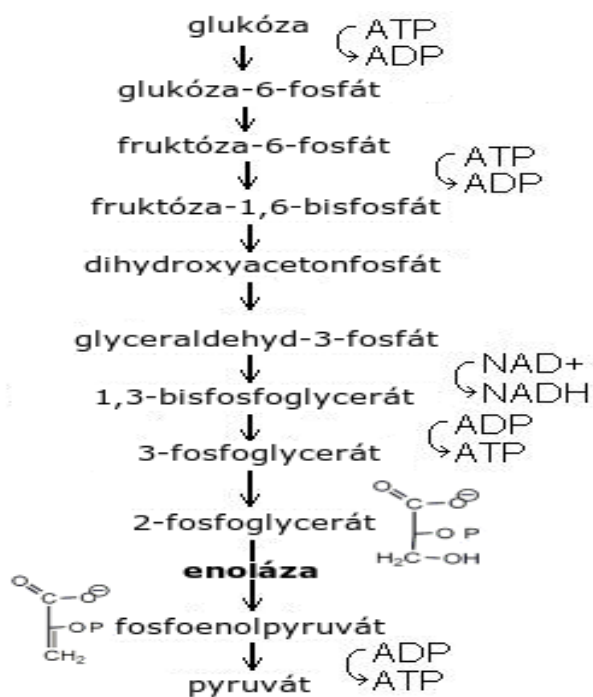
Obr. 2: Vznik delecí mezi dvěma P-elementy rekombinací mezi FRT místy

Schéma znázorňuje výrobu delecí pomocí flipázy a P-elementů nesoucích FRT místo a marker *miniwhite*. Pokud jsou oba P-elementy na různých místech homologních chromozomů, dojde po aktivaci flipázy a rekombinaci mezi oběma FRT místy ke vzniku delecí oblasti mezi těmito P-elementy na jednom chromozomu a ke vzniku duplikace na druhém. Chromozom s delecí nese marker *miniwhite*, proto všechny bělooké mouchy v potomstvu mají delecii, zatímco červenooké mouchy mají duplikaci, nebo původní chromozomy.

1.8 Enoláza

Enoláza, známá také jako fosfopyruvát dehydratáza, je enzym, který katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerové kyseliny (PGA) na fosfoenolpyruvát (PEP) v předposledním kroku glykolýzy (Obr. 3). Nachází se ve všech tkáních, které jsou schopny glykolýzy nebo kvašení. Enoláza se skládá ze dvou dimerů

se dvěma shodnými podjednotkami. Pro svou aktivitu potřebuje jako kofaktor nějaký dvojmocný kov, což bývá Mg^{2+} , který enzymu umožňuje největší aktivitu.



Obr. 3: Pozice a funkce enolázy v glykolýze

Na obrázku je schéma glykolýzy. Enoláza katalyzuje dehydrataci 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát a vodu v předposledním kroku. V obrázku jsou znázorněny chemické vzorce 2-fosfoglycerátu a fosfoenolpyruvátu.

2 Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo identifikovat konkrétní gen(y), jejichž mutace zmírňují nebo potlačují fenotyp způsobený mutací v adenosin deamináze (*adgf-a* fenotypu), nebo snížit jejich možný počet pomocí podrobného delečního a inzerčního genetického screeningu ve třech oblastech na druhém chromozomu, které byly nalezeny dříve pomocí hrubého delečního screeningu.

K dosažení cíle bylo nutné:

- ověřit, zda delece nalezené při hrubém screeningu skutečně potlačují *adgf-a* fenotyp
- pokračovat ve screeningu ověřených oblastí s použitím kratších delecí
- u oblastí omezených na několik genů použít inserce P-elementů

3 Metodika

3.1 Testované oblasti

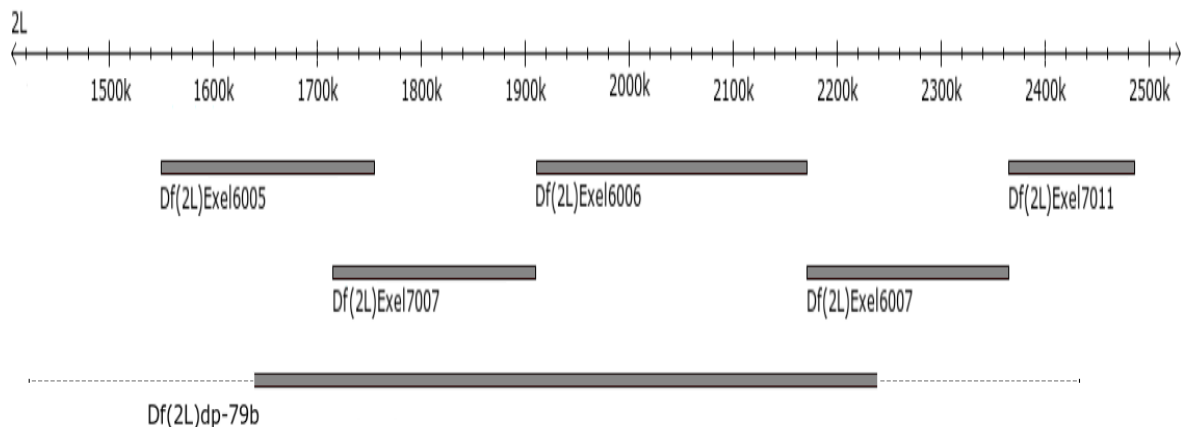
Byly testovány tři oblasti nalezené hrubým screeningem (Doležal, nepublikováno) pomocí „starého“ delečního kitu sestaveného z nepřesně ohraničených delecí.

První oblast je vymezena delecí *Df(2L)dp-79b*, která zasahuje přibližně 146 genů. *2L* v závorce znamená, že se tato delece nachází na levém rameni druhého chromozomu. Přehled delecí použitých pro podrobný screening v této oblasti je v tabulce I a II a na obrázku 4.

Druhá a třetí testovaná oblast se nachází blízko sebe na pravém rameni druhého chromozomu. (viz Tab. III a Obr. 5).

Tab. I: Přehled kratších delecí pokrývajících oblast vymezenou delecí *Df(2L)dp79b* a souřadnice jejich okrajů

Název	Souřadnice levého okraje	Souřadnice pravého okraje
<i>Df(2L)Exel6005</i>	2L:1,555,098	2L:1,737,249
<i>Df(2L)Exel7007</i>	2L:1,716,977	2L:1,909,976
<i>Df(2L)Exel6006</i>	2L:1,911,627	2L:2,175,599
<i>Df(2L)Exel6007</i>	2L:2,175,607	2L:2,362,917
<i>Df(2L)Exel7011</i>	2L:2,362,917	2L:2,492,447



Obr. 4: Pozice a překryvy použitých delecí v oblasti vymezené delecí *Df(2L)dp79b*

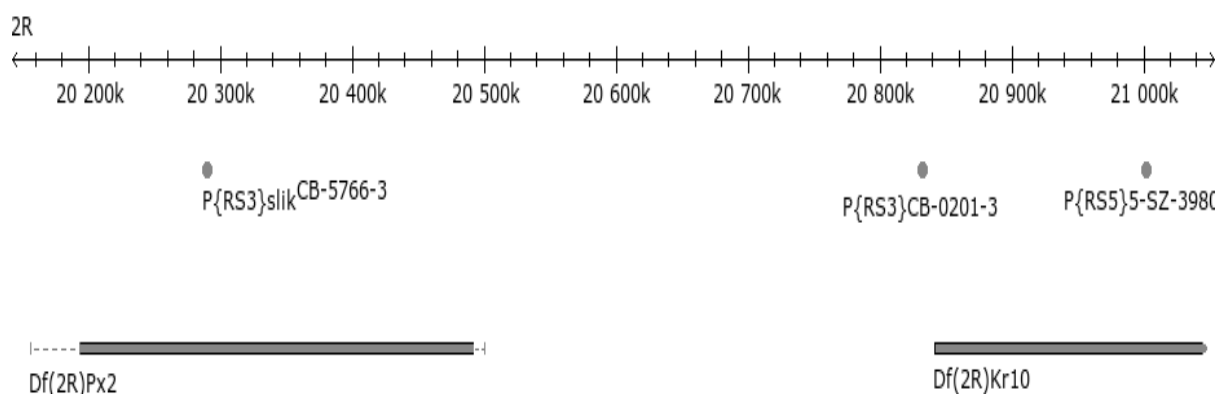
Hranice delecce *Df(2L)dp79b* jsou vymezené pouze cytologicky (podle chybějících proužků 22A2-3 až 22D5-E1 na polyténních chromozomech). Nejisté hranice jsou v obrázku značeny čárkovaně. Hranice pěti kratších delecí jsou přesně definované polohou P-elementů použitých pro jejich výrobu. Kratší delecce pokrývají celou oblast, která by mohla chybět u původní mutace.

Tab. II: Tabulka P-elementů použitých pro výrobu delecí v 1. zkoumané oblasti (na levém rameni druhého chromozomu)

Název delecce	P-elementový progenitor levý okraj	P-elementový progenitor pravý okraj
<i>Df(2L)Exel6005</i>	<i>P{XP}CG17646^{d03246}</i>	<i>P{XP}d05570</i>
<i>Df(2L)Exel7007</i>	<i>P{XP}CG7337^{d07754}</i>	<i>PBac{RB}CG18317^{e00411}</i>
<i>Df(2L)Exel6006</i>	<i>P{XP}aop^{d00761}</i>	<i>P{XP}CG7337^{d01604}</i>
<i>Df(2L)Exel6007</i>	<i>P{XP}aop^{d00761}</i>	<i>P{XP}d05960</i>
<i>Df(2L)Exel7011</i>	<i>P{XP}d05960</i>	<i>PBac{WH}Slh^{f00170}</i>

Tab III: Přehled použitých delecí a P-elementů v 2. a 3. zkoumané oblasti

Název	Typ	souřadnice
<i>Df(2R)Px2</i>	delece	60C6-60D9
<i>Df(2R)Kr10</i>	delece	60E10—60F5
<i>P{RS3}CB-0201-3</i>	P-element	2R:20,830,362..20,830,362
<i>P{RS3}slik^{CB-5766-3}</i>	P-element	2R:20,290,110..20,290,110
<i>P{RS5}5-SZ-3980</i>	P-element	2R:21,080,490..21,080,490



Obr. 5: Pozice dalších dvou delecí nalezených v hrubém screeningu na pravém rameni druhého chromozomu.

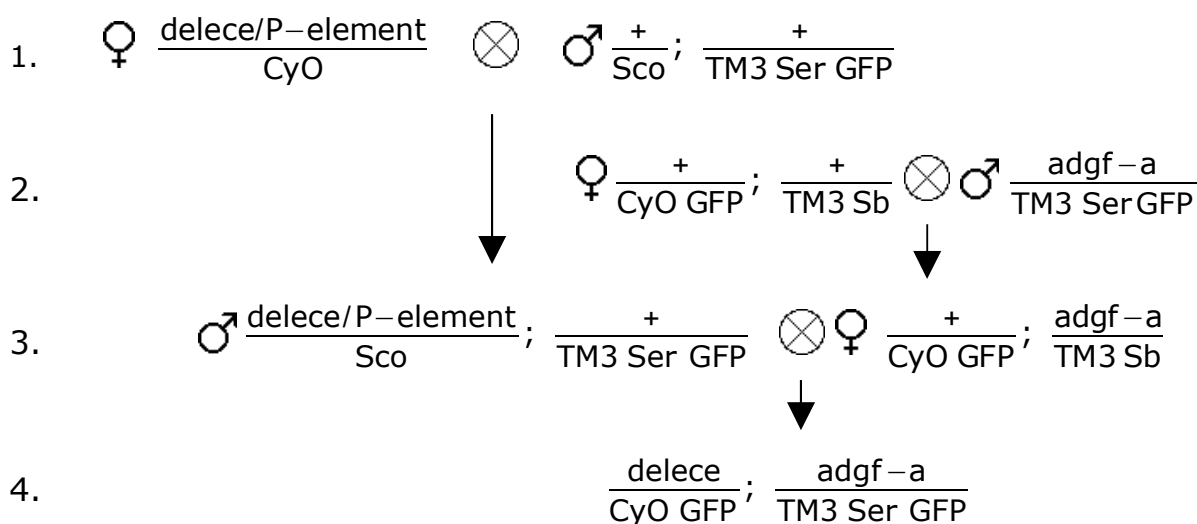
Hranice obou delecí jsou vymezené pouze cytologicky. Pravděpodobné okraje delece *Df(2R)Px2* jsou 60C a 60D, okraje delece *Df(2R)Kr10* jsou 60E10 a 60F5. V těchto oblastech nejsou žádné další vhodné kratší delece. Pro podrobný screening byly použity tři náhodně vybrané P-elementy.

3.2 Mutace v adenzin deamináze

Pro genetický screening byly použity mouchy s mutací v *ADGF-A* (adenosine deaminase-related growth factor). Byly použity dvě mutantní alely tohoto genu - *adgf-a^{karel}* a *adgf-a^{gerda}*, které vznikly nezávisle na sobě, ale mají stejný fenotypový účinek. Pokud se o mutaci v *ADGF-A* hovoří obecně (tedy *adgf-a^{karel}* nebo *adgf-a^{gerda}*), je zapsána zkráceně pouze jako *adgf-a*.

3.3 Křížení linií pro podrobný screening

Pro genetický screening bylo potřeba vykřížit linie, které by měly na druhém chromozomu sledovanou delecí nebo P-element a na třetím chromozomu *adgf-a*, obojí proti nějakému balanceru s GFP (*CyO* balancer pro chromozom 2 a *TM3-Ser* balancer pro chromozom 3). Všechny testované delece a P-elementy byly k *adgf-a* přikříženy podle následujícího schématu (Obr. 6).



Obr. 6: Příprava linií pro genetický screening

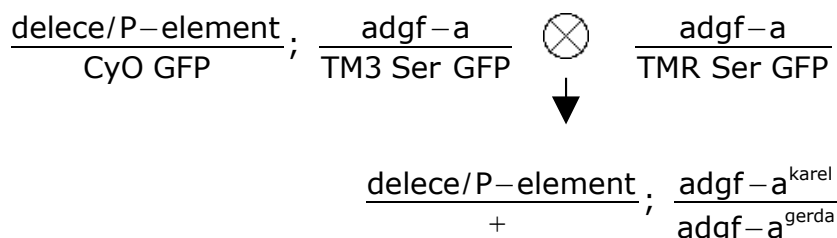
V prvním kroku jsou použity samice se sledovanou delecí nebo P-elementem proti balancerovému chromozomu *CyO*. Kříží se se samci s markerem scutoid na druhém chromozomu a balancerem *TM3 Ser GFP* na třetím chromozomu. Z tohoto křížení jsou použiti samci nesoucí delecí nebo P-element proti mutaci scutoid. Scutoid není balancer, ale u samců neprobíhá rekombinace.

V druhém kroku byly kříženy samice s balancery *CyO GFP* a *TM3 Sb* se samci s *adgf-a* proti balanceru *TM3 Ser GFP*. Z tohoto křížení jsou vybrány samice s balancerem *CyO GFP* a *adgf-a* proti balanceru *TM3 Sb*. První a druhý krok byl křížen paralelně. Ve třetím kroku jsou kříženi potomci z 1. a 2. kroku.

Z nich jsou vybíráni samci a samice, nesoucí požadovanou delecí nebo P-element proti balanceru *CyO GFP* na druhém chromozomu a mutaci *adgf-a* proti *TM3 Ser GFP* na třetím.

Pro samotné testování pak byly panny z těchto linií kříženy se samci *adgf-a/TM3 Ser GFP* (nebo reciproke) tak, aby potomci vždy měli na třetím chromozomu *adgf-a^{karel}/adgf-a^{gerda}* (Obr. 7).

Potomstvo tohoto křížení bylo screenováno na potlačování *adgf-a* fenotypu.



Obr. 7: Schéma křížení pro samotný screening

Jediný genotyp bez GFP, který z tohoto křížení vzniká, je delece nebo P-element v heterozygotním stavu na druhém chromozomu s *adgf-a^{karel}/adgf-a^{gerda}* na třetím chromozomu. První instary tohoto genotypu byly vybírány pro screening.

3.4 Screening

Rodiče (na obrázku 7. nahoře) kladli v komůrkách (v každé asi 200 samic) na džusové misky (4% agar ve višňovém džusu) s kvasničnou pastou. Doba kladení byla přibližně 21 hodin (od asi 13 hodin do asi 10 hodin dopoledne). Vajíčka byla potom smyta vodou do nylonového sítka (BD Falcon, velikost otvorů 100 μm), promyta čistým etanolem a rozprostřena na misku se speciální dietou (viz níže), na které se líhla.

Pro screening byly vybírány první instary larev. Požadovaný genotyp byl rozeznán podle exprese GFP (screenované larvy nesvítilí, samotní *adgf-a* mutanti ano, viz Obr. 7). Do vialek, ve kterých byla vždy stejná dieta jako na misce, bylo přeneseno vždy 25 larev.

Potom byl sledován počet kukel v jednotlivých vialkách a jiné charakteristiky, které by mohly napovídat, že v deletované oblasti se nachází gen, jehož vypnutí potlačuje *adgf-a* fenotyp. Byl sledován počet larev, které pokročily ve vývoji až do třetího instaru, počet kukel a dospělců (podrobněji ve výsledcích).

3.5 Příprava diet

Diety byly připravovány rozvařením agaru (1,6 %), kvasnic (8 %) a cukru (2 %, pouze při screeningu v červnu 2010, ostatní diety byly bez cukru) ve vodě. Směs byla vařena po dobu 30 nebo 70 minut při teplotě 90°C. Poté byla chlazená ve sterilní Erlenmayerově baňce. Po snížení teploty byl přidán metylparaben. Po promíchání byla hotová dieta nalita do sterilních vialek (cca po 5 ml) a Petriho misek. Vialky byly uzavřeny vatovými zátkami. Do některých pak byla přidána antibiotika (penicilin a streptomycin) tak, aby vždy pokryla celý povrch diety ve vialce.

3.6 Ověření přítomnosti delecí ve vykřížených liniích

Přítomnost *adgf-a* je snadno rozeznatelná díky přetrvávání balancerů na třetím chromozomu v liniích.

Přítomnost požadovaných delecí nebo P-elementů je ale dobré ověřit pomocí PCR, např. kvůli možné chybě při křížení linií, kterou by mohla způsobit třeba jedna nepanenská samice.

3.6.1 Izolace DNA pro PCR

Genomová DNA pro PCR byla připravena rozdrcením jedné mouchy v plastové mikrozkuhavce pomocí mikropipetové špičky v 50 μ l squishing bufferu (10 mM Tris-HCl, pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 μ g/ml Proteináza K). Krátkou centrifugací byly odděleny pevné zbytky a supernatant byl inkubován 30 minut při teplotě 37°C. Poté byla deaktivována proteináza K inkubací po dobu 3 minut při teplotě 95°C.

3.6.2 PCR reakce

Každá PCR reakce obsahovala 0,1 μ l DNA polymerázy, 1,6 μ l nukleotidů, 0,8 μ l templátu (500 ng - 1 μ g), 0,4 μ l forward primeru, 0,4 μ l reverse primeru (oba o koncentraci 100 μ M), 2 μ l pufru a 14,7 μ l destilované vody.

Použité forward primery jsou uvedeny v tabulce IV včetně očekávané délky PCR produktů a doby elongační fáze, která pro ně byla použita.

Jako reverse primer byl použit univerzální P-elementový primer, který nasedá na terminální invertované repetice P-elementů, v tomto případě P-elementů použitých pro přípravu delece. Jeho sekvence je CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG.

Tab. IV: Použité forward primery, jejich délka, očekávaná délka produktu a doba elongační fáze při PCR

jméno	sekvence 5'-3'	délka produktu [bp]	délka primeru [nt]	Doba elongační fáze [s]
Ex6005F	AACTGTCGGGTTTAGCAGCTC	607	21	60
Ex7007F	CTACGCCAGCGAACTCACTC	346	20	60
Ex6006F	ATTAACCACCCACACCACCAC	460	21	60
Ex6007F	AGACGCGACGTAATGGAAGC	992	20	90
Ex7011F	TTCGAGGGCGGGTGAATTTG	468	20	60

Aby bylo dosaženo efektivnější amplifikace požadovaných produktů bez předchozího zdlouhavého zabíhání primerů, byla použita touch down PCR, při které se v každém cyklu snížila teplota annealingu o 0,1 °C. Počáteční teplota byla 58,5 °C, konečná 55 °C. Tabulka V ukazuje použitý program termocycleru.

Tab. V: Použitý program termocycleru

	t [°C]	čas [s]
počáteční denaturace	94	120
denaturace	94	20
annealing	58,5—>55	20
polymerace	72	viz Tab. IV
poslední polymerace	72	480

←
x35

3.6.3 Elektroforéza

Pro gelovou elektroforézu bylo použito 100 ml 1,5% agarózového gelu. Do první jamky bylo nanášeno 5 μ l 0,5-10 kbp markeru s 15 μ l vody. Do ostatních jamek po 20 μ l vzorku.

Pro „zajetí“ gelu bylo použito napětí 40 V, potom bylo zvýšeno na 80 V. Po skončení elektroforézy byl gel 20 minut barven v ethydium bromidu a 10 minut odbarvován ve vodě.

4 Výsledky

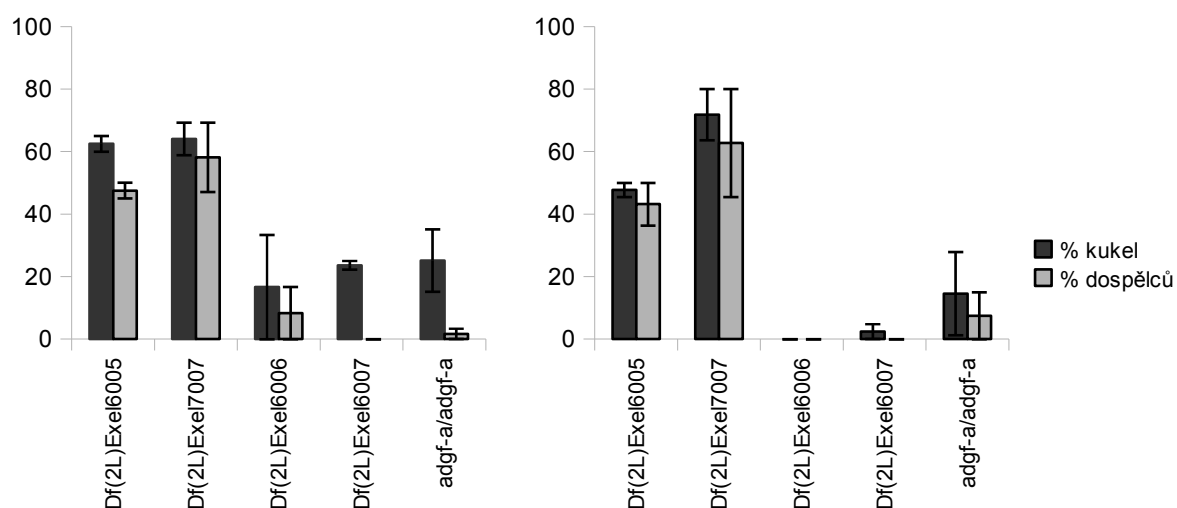
Výsledky testování supresorových účinků zkoumaných delecí a P-elementů jsou znázorněny graficky. Na ose y jsou procenta přeživších kukel, dospělců atd. (viz legenda u každého grafu) a na ose x testované delece nebo P-elementy.

Chybové úsečky u všech grafů znázorňují standardní chybu průměru.

4.1 Testování supresorových účinků delecí na levém rameni druhého chromozomu

4.1.1 Počítání červen 2010

První počítání bylo prováděno v červnu 2010. Byly testovány účinky delecí *Df(2L)Exel6005*, *Df(2L)Exel7007*, *Df(2L)Exel6006* a *Df(2L)Exel6007*. Pro srovnání byli použiti samotní *adgf-a* mutanti. Pro malý počet vylíhnutých larev se podařilo od každé delece vybrat pouze 2 vialky s dietou 0/8 (0 % cukru a 8 % kvasnic) a 2 vialky s dietou 2/8. U delece *Df(2L)Exel6005* se kuklilo 48 % jedinců na dietě 0/8 a 63 % jedinců na dietě 2/8. U delece *Df(2L)Exel7007* se kuklilo 72 % jedinců na dietě 0/8 a 64 % jedinců na dietě 2/8. *adgf-a* mutanti se kuklili z 15 % na dietě 0/8 a z 25 % na dietě 2/8. Grafické znázornění je na obrázku 8.

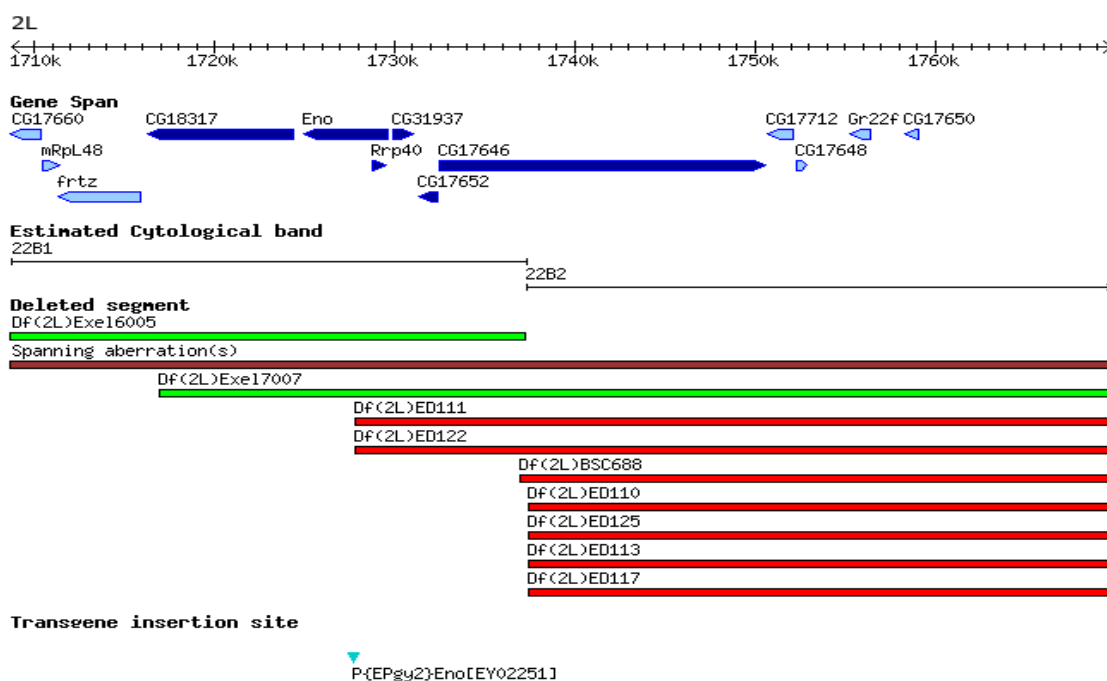


Obr. 8: Výsledky testování supresorových účinků vybraných delecí na dietě 0/8 a 2/8 s antibiotiky z června 2010

Podle těchto výsledků *adgf-a* fenotyp suprimují delece *Df(2L)Exel6005* a *Df(2L)Exel7007*. Později se ale ukázalo, že tyto linie byly špatně vykříženy a mutaci *adgf-a* nenesly.

Pro menší počet larev vložených do vialek (zde se nepodařilo vybrat 25) a malý počet opakování bylo nutné testování opakovat, protože by tyto výsledky nebyly statisticky průkazné. I přesto se zdálo, že v delecích *Df(2L)Exel6005* a *Df(2L)Exel7007* by mohl být nějaký dominantní supresor *adgf-a* mutantního fenotypu. Tyto dvě delece se částečně překrývají, zdálo se tedy být pravděpodobné, že supresor se nachází v jejich překryvu. Překryv těchto dvou delecí je na obrázku 9 a obsahuje 6 genů. Z nich jsem se zaměřil na gen pro enolázu (*CG17654*), který byl pak zkoumán detailněji, protože mutace v enoláze by mohla zpomalit glykolýzu a tím zachránit mutantu v adenzin deamináze.

Po několika generacích ale z těchto linií vymizely balancery *TM3 Ser GFP*, z čehož vyplývá, že linie byly špatně vykříženy. Na třetím chromozomu neobsahovaly *adgf-a* a tudíž se kuklily více než *adgf-a* kontroly. Následující počítání se stejnými, ovšem nově a správně vykříženými liniemi, již na žádnou záchranu neukazovalo (výsledky níže).



Obr. 9: Překryv delecí *Df(2L)Exel6005* a *Df(2L)Exel7007*, které při prvním screeningu v červnu 2010 vyšly jako supresorové. Překrývající se delece jsou označeny zeleně. Geny ležící v tomto překryvu jsou zvýrazněny tmavší barvou. Ve spodní části je znázorněn P-element *P{EPgy2}Eno[EY02251]*, který pravděpodobně inaktivuje gen pro enolázu. Obrázek byl vygenerován na www.flybase.org a upraven.

4.1.2 Počítání únor 2011

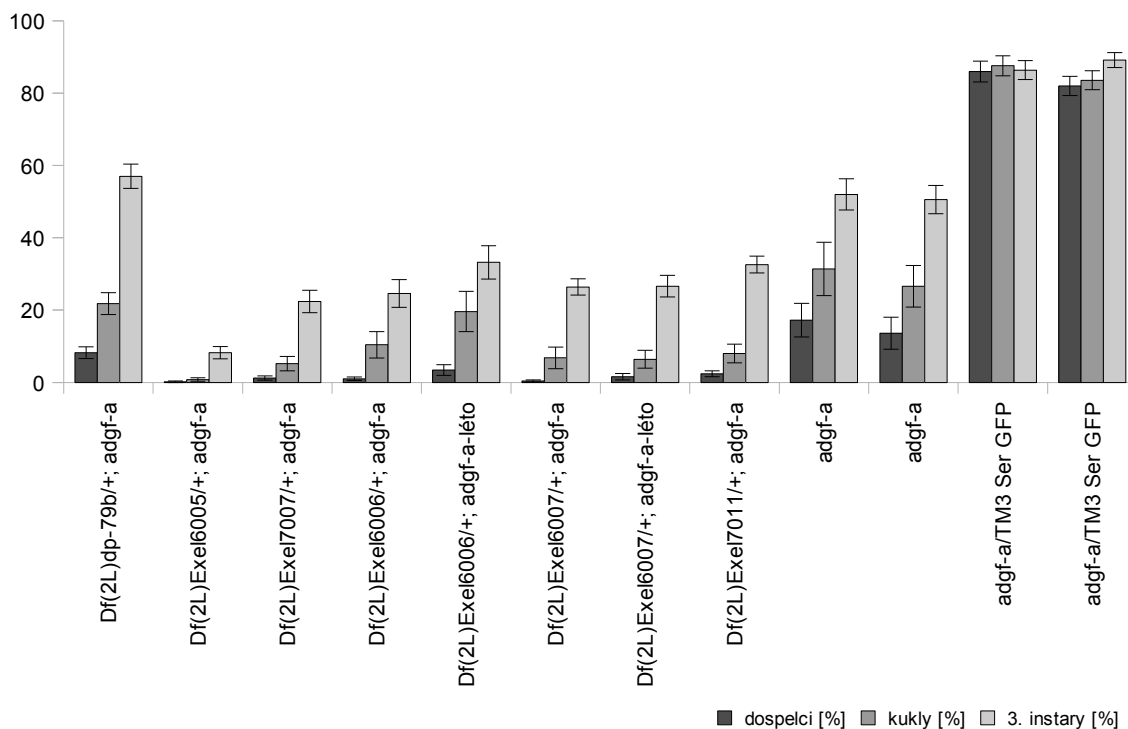
V únoru 2011 byla provedena další 2 počítání supresorových účinků nově vykřížených delecí *Df(2L)Exel6005*, *Df(2L)Exel7007*, *Df(2L)Exel6006* a *Df(2L)Exel6007* a navíc delece *Df(2L)Exel7011*. Pro srovnání byly znovu testovány i delece *Df(2L)Exel6006* a *Df(2L)Exel6007* vykřížené v létě a původní supresorová delece *Df(2L)dp-79b* nalezená při hrubém screeningu. Delece *Df(2L)dp-79b* je v grafech vždy na prvním místě.

Při prvním únorovém počítání bylo od každé delece a *adgf-a* mutantních kontrol vybráno po dvaceti vialkách. Pro kontrolu podmínek experimentu byl použit genotyp *adgf-a/TM3 Ser GFP*, který se vyvíjí jako mouchy divokého typu (tedy neprojevuje mutantní fenotyp), od kterého bylo vybráno po 10 vialkách. Byla použita dieta 0/8 (0 % cukru, 8 % kvasnic, 1,6 % agaru). Doba vaření byla 70 minut.

Výsledky tohoto počítání ukazuje obrázek 10. Žádná z testovaných delecí nepotlačuje *adgf-a* mutantní fenotyp. U původní supresorové delece *Df(2L)dp-79b* se kuklilo 22 % jedinců, u *adgf-a* mutantů 33 %, respektive 26 % u reciprokého křížení.

Delece *Df(2L)dp-79b* statisticky významně nezlepšuje *adgf-a* mutantní fenotyp ($p=0,47$; $t=-0,737$; $df=38$) podle T-testu na hladině významnosti 5 %.

Dále byl zjišťován rozdíl mezi kratšími delecemi jednostrannou ANOVOu a následným Post Hoc Tukey testem. Byl zjištěn rozdíl pouze mezi delecemi *DF(2L)Exel6006-léto* a *Df(2L)Exel6005* ($p = 0,0003$).



Obr. 10: Počty dospělců, kukel a jedinců vyvinutých alespoň do 3. instaru na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 minut při prvním počítání v únoru 2011.

U kontrol, které byly kříženy reciproke (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproké křížení. Od každého genotypu bylo vybráno po 20 vialkách.

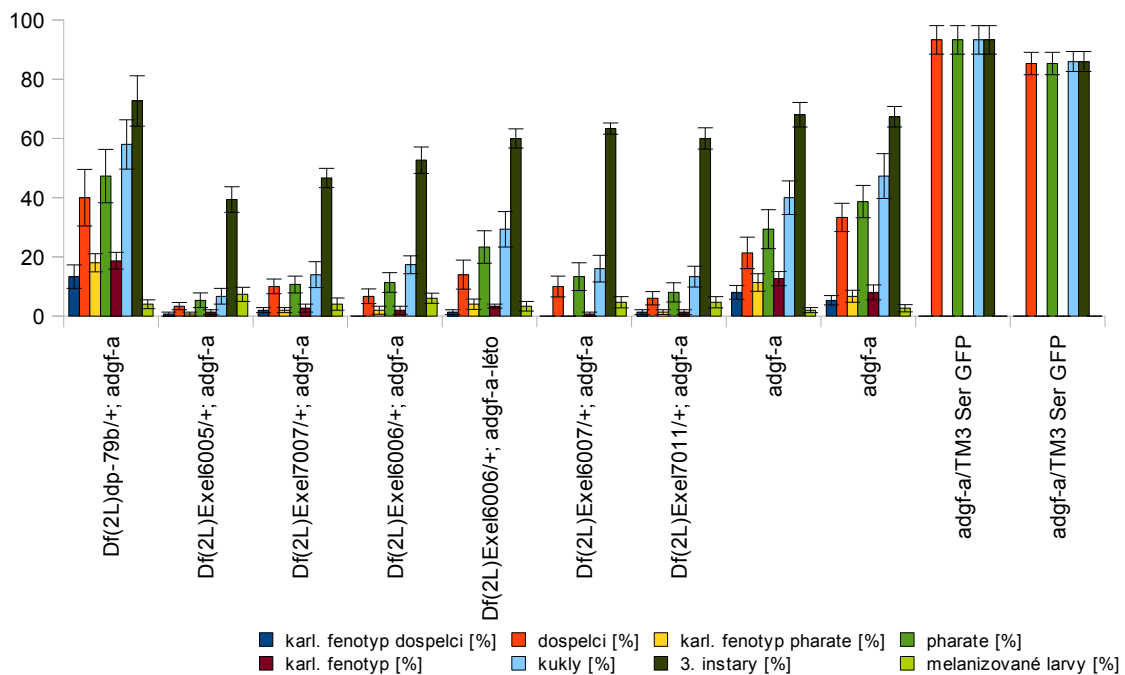
Při druhém počítání v únoru 2011 bylo vybráno po 7 vialkách od každé delecce do čtyř různých diet (Tab. VI).

Tab. VI: Přehled použitých diet při počítání v únoru 2011

	Doba vaření [min]	Antibiotika
Dieta 1	30	ano
Dieta 2	30	ne
Dieta 3	70	ano
Dieta 4	70	ne

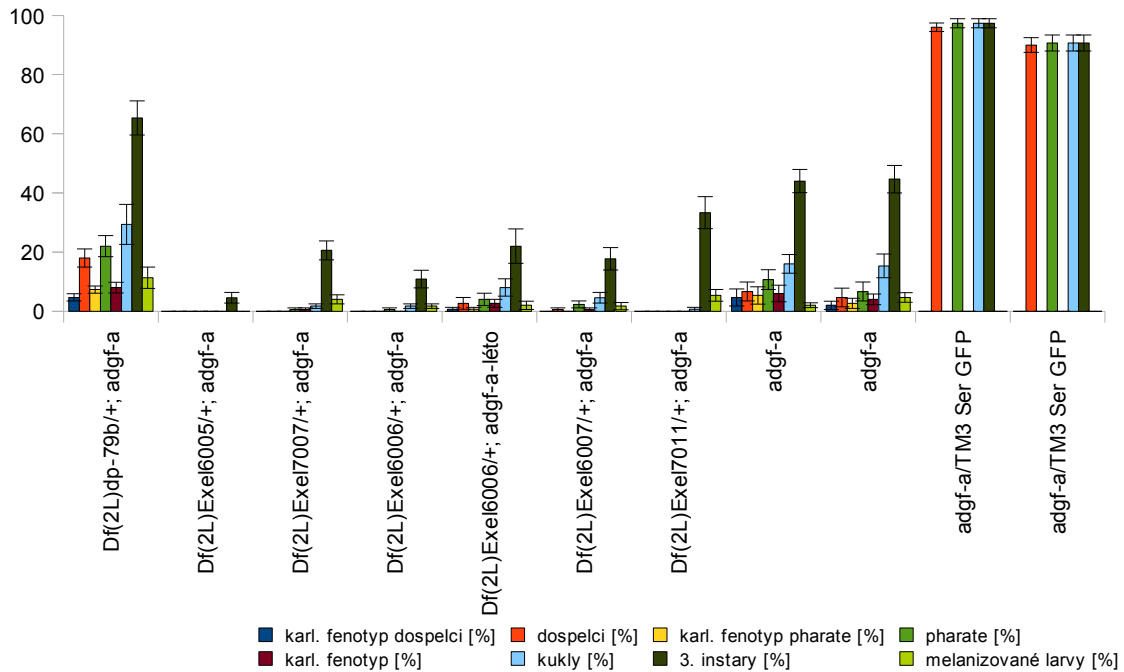
Výsledky se lišily pouze podle doby vaření, přítomnost antibiotik neměla význam. Na obrázcích 11 a 12 jsou uvedeny výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky při době vaření 30 a 70 minut. Byly zaznamenávány počty třetích instarů, melanizovaných larev, kukel a dospělců. U kukel a dospělců bylo také sledováno, zda mají patrný „karlovský fenotyp“ (*adgf-a* mutantní fenotyp) - zakřivení zadečku kukel (obvykle doprava), melanotické tumory a menší vzrůst. Žádná z testovaných delecí nepotlačuje *adgf-a* mutantní fenotyp.

Na dietě vařené po dobu 30 minut se u původní supresorové delecce *Df(2L)dp-79b* kuklilo 56 % jedinců, u *adgf-a* mutantů 40 %, respektive 45 % u reciprokého křížení. Ani u tohoto počítání delecce *Df(2L)dp-79b* statisticky významně nezlepšuje *adgf-a* mutantní fenotyp ($p=0,33$; $t=1,02$; $df=10$). Další statistické vyhodnocení výsledků z této oblasti jsem již neprováděl, protože se larvy kuklily obdobně a případné odlišnosti by kvůli menšímu počtu opakování byly méně věrohodné než u předchozího počítání.



Obr. 11: Graficky znázorněné výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 30 minut při druhém počítání v únoru 2011. U kontrol, které byly prováděny reciproce (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproké křížení. Od každého genotypu bylo do této diety vybráno 7 vialek.

Na dietě vařené po dobu 70 minut se u původní supresorové delece *Df(2L)dp-79b* kuklilo 24 % jedinců, u *adgf-a* mutantů 9 %, respektive 13 % u reciprokého křížení.



Obr. 12: Graficky znázorněné výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 minut při druhém počítání v únoru 2011. U kontrol, které byly kříženy reciproke (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*, druhý sloupec ukazuje reciproké křížení. Od každého genotypu bylo do této diety vybráno 7 vialek.

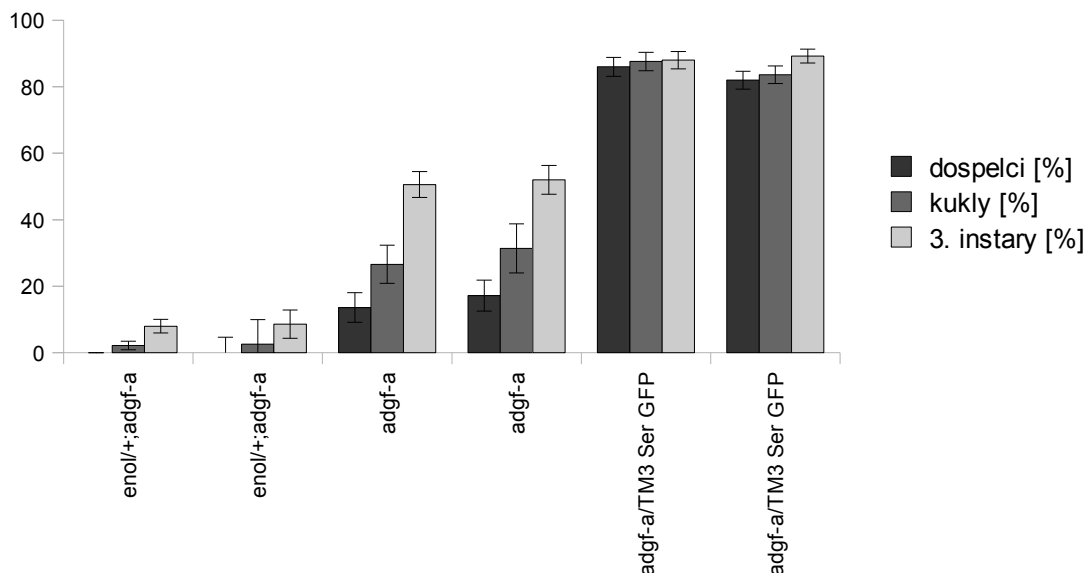
4.2 Testování supresorových účinků mutace v enoláze

Byla použita linie BL-19899, která má inzerci P-elementu *P{EPgy2}Eno[EY02251]* v genu *CG17654* pro enolázu.

Byly počítány 3 různé genotypy - mutanti v *adgf-a* heterozygotní v enoláze (*enol/+; adgf-a*), samotní *adgf-a* mutanti a heterozygoti *adgf-a* (*adgf-a/TM3 Ser GFP*). Heterozygoti v *adgf-a* přežívají stejně jako divoký typ. Všechna tři křížení pro vybírání larev byla prováděna reciproke.

Jak ukazuje graf na obrázku 13, mutace v enoláze *adgf-a* mutantní fenotyp zhoršovala (kuklilo se 2,2 % a 2,6 % heterozygotů v enoláze, zatímco

samotných *adgf-a* mutantů se kuklilo 31 % a 27 %). Z grafu je také patrné, že obě reciproká křížení dávají stejné výsledky.



Obr. 13: Výsledky prvního počítání mutantů v enoláze na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 min.

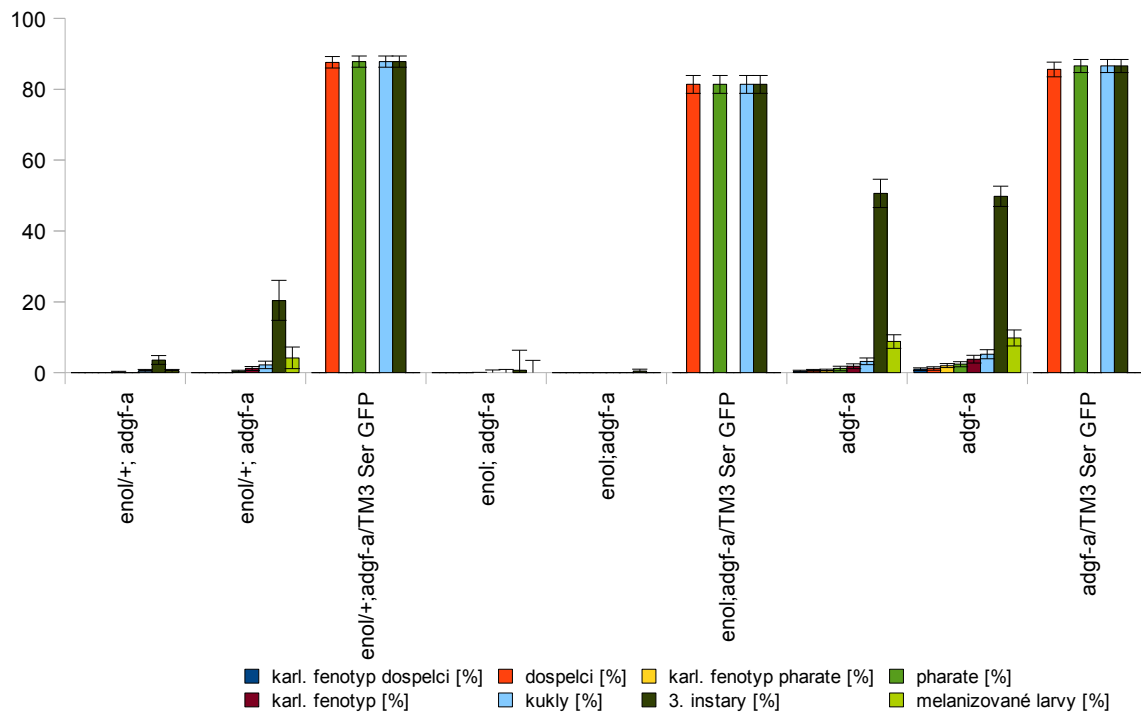
Byly počítány 3 různé genotypy - mutanti v *adgf-a* heterozygotní v enoláze (*enol/+; adgf-a*), samotní *adgf-a* mutanti a heterozygoti *adgf-a* (*adgf-a/TM3 Ser GFP*). Všechna tři křížení pro vybírání larev byla prováděna reciproce, v grafu jsou uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproké křížení. Od každého genotypu bylo vybráno po 20 vialkách.

Při druhém počítání bylo testováno 6 genotypů - *adgf-a* mutanti heterozygotní v enoláze, heterozygoti v enoláze i *adgf-a*, *adgf-a* mutanti homozygotní v enoláze, homozygoti v enoláze heterozygotní v *adgf-a*, samotní *adgf-a* mutanti a heterozygoti v *adgf-a* jako divoký typ.

Bylo provedeno rovněž 20 opakování od každého genotypu, kromě *adgf-a* mutantů homozygotních v mutaci v genu pro enolázu, kde bylo nakladeno malé množství vajíček a líhlo se velmi malé množství larev, přestože samotná inzerce je homozygotně vitální. Zde bylo vybráno pouze 6 a 8 vialek.

Graf na obrázku 14 ukazuje, že jak homozygotní tak heterozygotní mutace v enoláze *adgf-a* fenotyp zhoršovala. U heterozygotních *adgf-a* mutantů heterozygotních v enoláze se zakuklilo průměrně 88 % jedinců,

u heterozygotních *adgf-a* mutantů homozygotních v enoláze pouze 81 %. Tento rozdíl je podle Post Hoc Tukey testu statisticky průkazný ($p=0,37$).



Obr. 14: Výsledky druhého počítání mutantů v enoláze na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 min

Při druhém počítání bylo testováno 6 genotypů - *adgf-a* mutantů heterozygotní v enoláze, heterozygoti v enoláze i *adgf-a*, *adgf-a* mutantů homozygotní v enoláze, homozygoti v enoláze heterozygotní v *adgf-a*, samotní *adgf-a* mutantů a heterozygoti v *adgf-a* jako divoký typ. U křížení, která byla prováděna reciproke (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproke křížení. Od každého genotypu bylo vybráno po 20 vialkách.

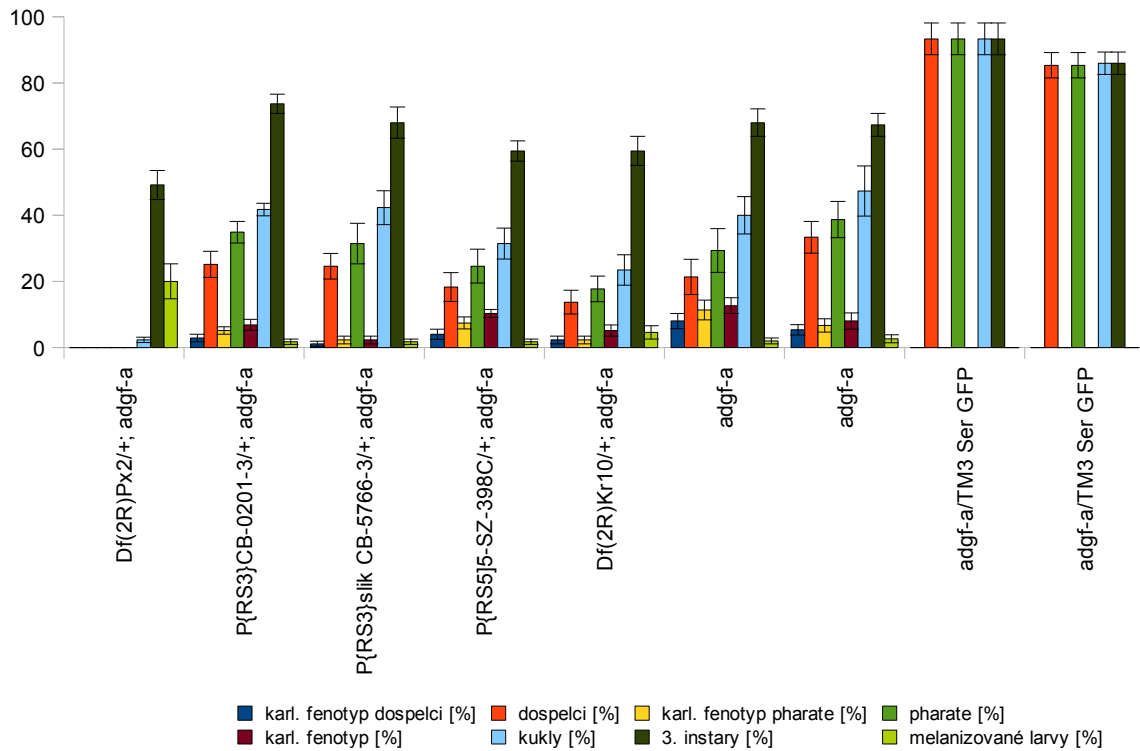
4.3 Testování supresorových účinků delecí a P-elementů ve druhé a třetí testované oblasti na pravém rameni druhého chromozomu

Při prvním počítání suprimujících účinků *adgf-a* mutantního fenotypu geny z pravého ramene druhého chromozomu bylo stejně jako při druhém únorovém počítání v oblasti delece *Df(2L)dp-79b* na levém rameni vybráno po 7 vialkách od každého zkoumaného genotypu (delece nebo inserce P-elementu) do čtyř diet

zaznamenaných v tabulce VI.

I zde se výsledky lišily pouze podle doby vaření a přítomnost antibiotik neměla význam. Na obrázcích 15 a 16 jsou uvedeny výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky při době vaření 30 a 70 minut.

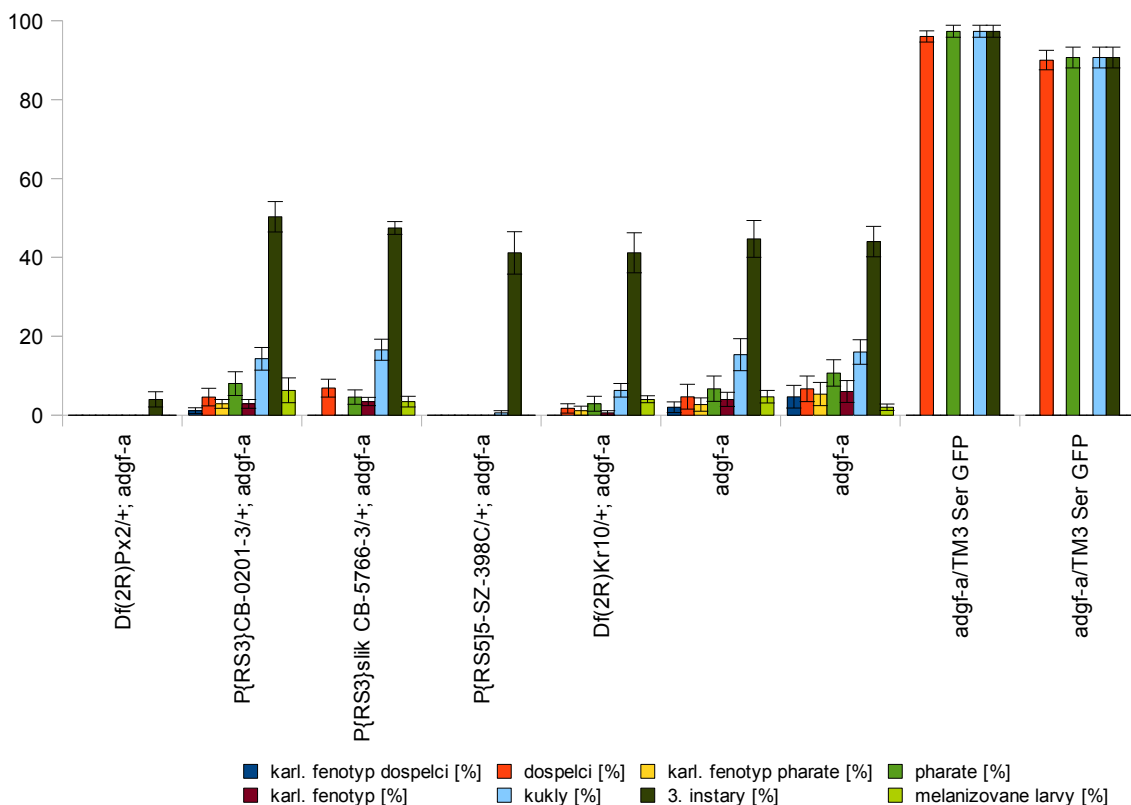
Žádná z testovaných delecí a inzercí P-elementů nepotlačuje *adgf-a* mutantní fenotyp. Delece *Df(2R)Px2* jej naopak zhoršuje - kuklilo se pouze 2,3 % jedinců. Larvy s P-elementem *P{RS3}CB-0201-3* se kuklily ve 43 % případů, larvy s P-elementem *P{RS3}slik CB-5766-3* ve 49 % případů, *P{RS5]5-SZ-398C* ve 30 %, původní supresorová delece *Df(2R)Kr10* v 18 % a *adgf-a* mutanti ve 45 %, respektive 40 % případů u reciprokého křížení.



Obr. 15: Graficky znázorněné výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 30 minut při prvním počítání v oblasti pravého ramene druhého chromozomu

U kontrol, které byly kříženy reciproce (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproké křížení.

Ani u diety vařené po dobu 70 minut žádná z testovaných delecí a inzercí P-elementů nepotlačuje *adgf-a* mutantní fenotyp. Delece *Df(2R)Px2* se nekuklila vůbec. Larvy s P-elementem *P{RS3}CB-0201-3* se kuklily v 17 % případů, larvy s P-elementem *P{RS3}slik CB-5766-3* ve 13 % případů, *P{RS5]5-SZ-398C* se nekuklily, původní supresorová delece *Df(2R)Kr10* ve 4 % a *adgf-a* mutanti v 9 %, respektive 13 % případů u reciprokého křížení.

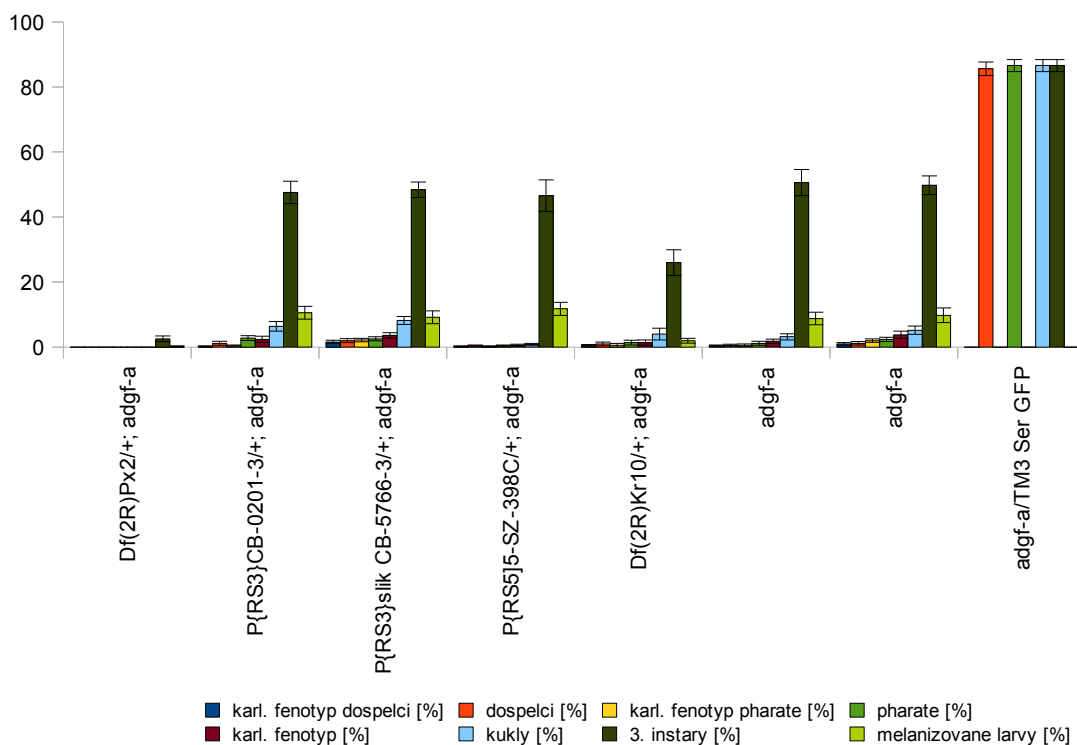


Obr. 16: Graficky znázorněné výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 minut při prvním počítání v oblasti pravého ramene druhého chromozomu

U kontrol, které byly kříženy reciproke (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproké křížení.

Při druhém počítání suprimujících účinků *adgf-a* mutantního fenotypu geny z pravého ramene druhého chromozomu bylo vybráno po 20 vialkách od každého zkoumaného genotypu (delece nebo inserce P-elementu) do diety 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 minut.

Jak ukazuje obrázek 17, žádná delece ani P-element neměly supresorový účinek na *adgf-a* mutantní fenotyp. Pomocí testu ANOVA bylo zjištěno, že od *adgf-a* mutantů se v množství kukel statisticky liší pouze delece *DF(2R)Px2*, která se při této dietě nekuklila ($p=0,0075$ %). P-element *P{RS3}slik CB-5766-3*, u kterého se kuklilo 8 % jedinců, se téměř neliší od *adgf-a* mutantů ($p=5,2$ %). Ostatní testované genotypy jsou srovnatelné s *adgf-a* kontrolou, která se kuklila z 3 %, respektive 5 % u reciprokého křížení.



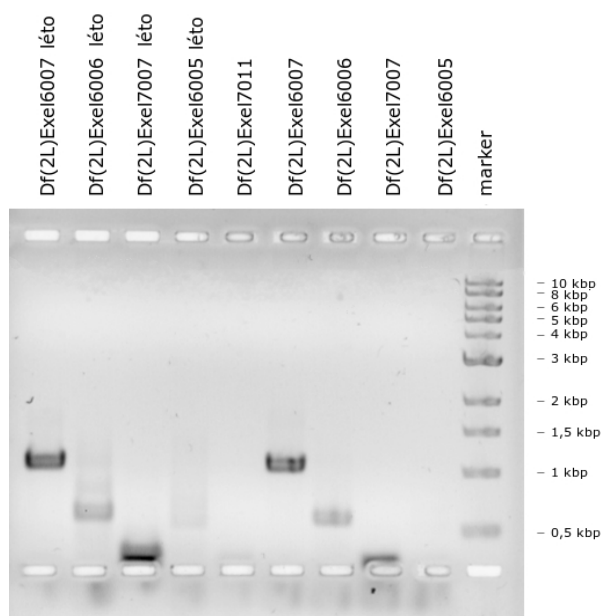
Obr. 17: Graficky znázorněné výsledky počítání na dietě 0/8 s antibiotiky a dobou vaření 70 minut při druhém počítání v oblasti pravého ramene druhého chromozomu

U kontrol, které byly kříženy reciproke (v grafu mají stejný genotyp), jsou vždy uvedeny výsledky z počítání obou křížení. První sloupec ukazuje výsledky z křížení, kde samice nesly mutaci *adgf-a^{gerda}* a samci *adgf-a^{karel}*. Druhý sloupec ukazuje reciproké křížení. Od každého genotypu bylo vybráno 20 vialek.

4.4 Ověření přítomnosti delecí pomocí PCR

Na obrázku 18 je fotografie gelu po elektroforéze PCR produktů. Velikosti produktů u linií s delecemi *Df(2L)Exel7007*, *Df(2L)Exel6006*, *Df(2L)Exel6007*, *Df(2L)Exel6005* léto, *Df(2L)Exel7007* léto, *Df(2L)Exel6006* léto, *Df(2L)Exel6007* léto odpovídají očekávané délce PCR produktů (Tab. IV).

Přítomnost delece *Df(DL)Exel6005* v nově vykřížené linii je zřejmá ze shodných výsledků počítání této delece a stejné delece vykřížené v červnu 2010, u které ověření PCR vyšlo. Delece *Df(2L)Exel7011* ověřena nebyla.



Obr. 18: Fotografie gelu po elektroforéze PCR produktů

Velikost všech viditelných bandů odpovídá očekávaným hodnotám. Přítomnost delece *Df(DL)Exel6005* v nově vykřížené linii je zřejmá ze shodných výsledků počítání této delece a stejné delece vykřížené v červnu 2010, u které ověření PCR vyšlo. Delece *Df(2L)Exel7011* ověřena nebyla.

5 Diskuze

Supresorový účinek *adgf-a* mutantního fenotypu delecí *Df(2L)dp-79b* není statisticky průkazný. Nebyl zjištěn ani u žádné z kratších delecí, které tuto zcela pokrývají. Rovněž nebyl potvrzen supresorový účinek delece *Df(2R)Kr10* ani *Df(2R)Px2*, která *adgf-a* mutantní fenotyp naopak zhoršuje.

Zvýšená hladina adenzinu v *adgf-a* mutantovi stimuluje mobilizaci glukózy do hemolymfy z glykogenových zásob nebo z potravy (Žuberová et al., 2010). Proto jsou *adgf-a* mutanti extrémně citliví na množství cukrů v dietě – pokud jich je málo, špatně přežívají a nekuklí se. Proto byla potřeba optimalizovat dietu, aby se potlačila přílišná variabilita a zároveň se nastavil stupeň letality a přežívání na takovou hodnotu, která by umožňovala screening. To ovšem výrazně změnilo podmínky oproti původnímu screeningu.

Optimalizovat dietu se ukázalo být velkým problémem. Jako nejlepší se jeví dieta bez cukru, s 8 % kvasnic a 1,6 % agaru vařená po dobu 70 minut. Při této době vaření byl potlačen *adgf-a* mutantní fenotyp natolik, že bylo možné sledovat vliv ostatních mutací, zatímco dieta při době vaření 30 minut *adgf-a* mutantní fenotyp tolik nezhoršovala.

Přítomnost antibiotik za podmínek, ve kterých byly experimenty prováděny, neměla vliv. Antibiotika viditelně nezpomalovala ani neurychlovala vývoj larev.

Adenzin také vzniká při stresu. Proto velmi záleží na aktuálních podmínkách, ve kterých se larvy nachází.

Dalším velkým problémem je genetické pozadí použitých linií. Např. výsledky mého delecního screeningu, kde použité kratší delece *adgf-a* mutantní fenotyp zhoršovaly, mohou naznačovat, že linie ze sbírky Exelixis obecně zhoršují *adgf-a* fenotyp. Další zde nepublikované výsledky z naší laboratoře zase naznačují, že naopak linie ze sbírky DrosDel *adgf-a* fenotyp potlačují. Řešením by bylo přenést mutaci v *adgf-a* do stejného genetického pozadí jako testované delece a P-elementy.

Významnou roli mohou hrát i náhodné mutace, které se snadno nahromadí během křížení prováděného s příliš malým počtem jedinců.

Původní (hrubý) screening byl prováděn za velmi komplexních podmínek (přítomnost heterozygotních sourozenců ve vialce, přirozené prostředí

nepotlačené antibiotiky, komplexní dieta založená na kukuřičné mouce atd.) a za nich v určitém genetickém pozadí měla delece *Df(2L)dp-79b* potlačující efekt. Další delece již byly zkoumány za jiných podmínek a v jiném genetickém pozadí. Proto je možné, že potlačující efekt byl skryt těmito změnami.

Zdá se, že výše uvedené externí faktory jsou mnohdy silnější, než účinek heterozygotní mutace, která by mohla fenotyp potlačovat.

Na základě výsledků screeningu z června 2010, kdy vyšly jako supresorové překrývající se delece *Df(2L)Exel6005* a *Df(2L)Exel7007*, byl z šesti genů, které se v tomto překryvu nachází, vybrán gen pro enolázu. Z dřívějších screeningů totiž vycházelo, že zvýšené množství adenosinu v *adgf-a* mutantech souvisí s energetickým metabolismem a stimuluje mobilizaci glukózy do hemolymfy. Za předpokladu, že těmito mutantům by nejvíce škodila právě jejich přílišná snaha udržet vysokou hladinu glukózy v hemolymfě, by mutace v enoláze svým pravděpodobným zpomalením glykolýzy mohla *adgf-a* mutanty zachraňovat, protože udržet hladinu glukózy v hemolymfě by pro ně pak bylo snazší.

Tento předpoklad se ale nepotvrdil, mutace genu pro enolázu *adgf-a* fenotyp naopak ještě zhoršovala, podobně jako nově vykřížené delece *Df(2L)Exel6005* a *Df(2L)Exel7007*. Zpomalení glykolýzy ve všech buňkách organismu má pravděpodobně spíše negativní účinek na přežívání oslabených mutantů. Zdánlivý supresorový účinek těchto dříve vykřížených delecí byl způsoben s největší pravděpodobností chybou během křížení, protože všechny výsledně screenované mouchy nenesly mutaci *adgf-a*. Opět ale nemohu vyloučit ani vliv genetického pozadí.

Po detailním počítáním třetích instarů, kukel, dospělců a melanizovaných larev jsem došel k závěru, že často používaný způsob, kdy jsou počítány pouze kukly, je dostatečný.

6 Závěr

U žádné z delecí nebyl potvrzen supresorový účinek *adgf-a* mutantního fenotypu.

Detailním delečním screeningem se tedy nepodařilo identifikovat konkrétní gen či skupinu genů, které by byly zodpovědné za supresorový účinek. Ukázalo se, že konkrétní genetické pozadí má silnější vliv, než testované heterozygotní mutace. Výsledky také ovlivňují externí faktory jako jsou aktuální podmínky, použitá dieta atd.

Nejlepší délka vaření diety pro zvýraznění *adgf-a* mutantního fenotypu byla asi 70 minut. Byla potlačena variabilita *adgf-a* mutantů a stupeň letality a přežívání byl nastaven tak, že alespoň částečně umožňoval deleční screening.

Přítomnost antibiotik za podmínek, ve kterých byly experimenty prováděny, nemá vliv. Antibiotika viditelně nezpomalují ani neurychlují vývoj larev.

Běžně užívané počítání samotných kukel má dostatečnou výpovědní hodnotu a počty ostatních vývojových stádií odráží.

7 Použitá literatura

Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R (1983), „Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview“, *Federation Proceedings* 42: 3136-3142.

Buck LT (2004), „Adenosine as a signal for ion channel arrest in anoxia-tolerant organisms“, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139(3): 401 – 414.

Dolezal T, Dolezelova E, Zurovec M, Bryant PJ (2005), „A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development“, *Public Library of Science Biology* 3(7): e201. doi:10.1371/journal.pbio.0030201.

Dolezal T, Gazi M, Pavlova E, Bryant PJ (2003), „Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*“, *Genetics* 165: 653 - 666.

(2005), „*Drosophila* larval development and human immunodeficiency: The adenosine deaminase connection.“ *Public Library of Science Biology* 3(7): e232. doi:10.1371/journal.pbio.0030232.

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W (2000), „Structure and function of adenosine receptors and their genes“, *Naunyn-Schiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 364-374.

Greenspan RJ. *Fly Pushing: The theory and practice of drosophila genetics*. Second edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. 191 s.

Ohta A, Sitkovsky M (2001), „Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage“, *Nature* Dec 2001 Vol 414: 916-919.

Parks AL, Cook KR, Belvin M, Dompe NA, Fawcett R et al. (2004), „Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome“, *Nature Genetics* 36: 288 - 292.

Rubin GM and Lewis EB (2000), „A brief history of *Drosophila*'s contributions to genom research“, *Science* 287:2216-2218.

Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J et al., (2007), „The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource“, *Genetics* 177: 615–629.

Zuberova M, Fenckova M, Simek P, Janeckova L, Dolezal T (2010), „Increased extra-cellular adenosine in *Drosophila* that are deficient in adenosine deaminase activates a release of energy stores leading to wasting and death“, *Disease Models and Mechanisms* 3(11-12): 773-784.

Internetové zdroje:

www.drosdel.org.uk

drosophila.med.harvard.edu

www.flybase.org