

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Reportéry genové exprese u *Drosophila melanogaster*

Bakalářská práce

Jiří Štros

Školitel: Mgr. Tomáš Doležal, Ph.d.

České Budějovice 2013

Štros J., (2013): Reportéry genové exprese u *Drosophila melanogaster* [Gene expression reporters in *Drosophila melanogaster*. Bc Thesis, in Czech] - 50 p., Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

Anotation

Drosophila melanogaster is a widely used model organism in genetic research and in a number of other disciplines associated with medical and biotechnological issues. The first part of this thesis presents a review of some basic genetic tools and gene expression reporters used in *D. melanogaster* research with emphasis on the use of GFP reporter. The second part presents a description and results of my experimental work aimed at the reporter construct consisting of adenosine deaminase gene (ADGF-A) and GFP marker. When using gene expression reporters such as GFP, it is important to know whether the presence of reporter does not affect the studied process. The experiment described in this study tested whether the fusion protein consisting of GFP and adenosine deaminase is fully functional enzyme or whether the enzyme activity is influenced by the presence of fluorescent tag. Results of this work support the usefulness of using the fusion construct as a gene expression reporter.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 mého 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 mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 6. 12. 2013

.....
Jiří Štros

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval svému školiteli Mgr. Tomáši Doležalovi, Ph. D. za odborné vedení a pomoc při zpracování této práce a při práci v laboratoři. Dále děkuji všem členům kolektivu laboratoře za trpělivou pomoc při řešení problémů během práce. Mé poděkování patří mým rodičům za vytrvalou podporu během celého mého studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. <i>D. Melanogaster</i> jako modelový organismus	1
1.2. Charakteristika	1
2. Studium genové exprese u <i>D. melanogaster</i>	2
2.1. Mutageneze, P-elementy	3
2.2. Pasti na zesilovače	4
2.3. Řízení genové exprese: Systém GAL4	7
2.3.1. Princip fungování systému GAL4.....	8
2.3.2. Využití systému.....	8
2.3.3. Modifikace a aplikace systému GAL4/UAS	10
2.4. Vizualizace genové exprese. Reportérové geny	12
2.4.1. β -galaktosidasa	13
2.4.2. Zelený fluorescenční protein (GFP)	13
2.4.2.1. Charakteristika	13
2.4.2.2. Mutantní varianty	14
2.4.2.3. Přednosti a aplikace	15
2.4.2.4. Aplikace u <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.4.3. Červený fluorescenční protein <i>DsRed</i>	18
2.6. Systematické studium genové exprese. Projekt FlyFos	19
3. Praktická část	20
3.1. Úvod do problému	20
3.1.1. Adenosin	20
3.1.2. Adenosin deaminasy	21
3.1.3. Deficience adenosin deaminasy v důsledku mutace	22
3.1.4. Mutace v genu ADGF-A u <i>Drosophila melanogaster</i>	22
3.1.4.1. Mutantní fenotyp	22
3.1.4.2. Citlivost mutantních jedinců na složení stravy	24
3.1.5. Konstrukt FlyFos-adgf-a:GFP	24
3.2. Cíle práce	25
3.3. Materiály a metody	25
3.3.1. Chov a zacházení s pokusným organismem	25
3.3.2. Výchozí linie.....	26
3.3.3. Mutantní alely	26
3.3.4. Křížení	27
3.3.4.1. Obecný postup	27
3.3.4.2. Příprava cílového genotypu	29
3.3.4.3. Kontroly	29
3.3.4.4. Ověření správnosti křížení	31
3.3.5. Experiment s vitalitou	33
3.3.5.1. Uspořádání experimentu	33
3.3.5.2. Namnožení rodičovských linií	33
3.3.5.3. Finální krok křížení a příprava kontrol.....	33
3.3.5.4. Kladení, přenos embryí a selekce	34
3.3.6. Diety	37
3.3.6.1. Kukuřičné diety	37
3.3.6.2. Kvasnicová dieta	38

3.4. Výsledky	39
3.4.1. Ověření potvrdilo správnost křížení	39
3.4.2. Konstrukt FlyFos-adgf-A:GFP zachraňuje mutantní jedince na obou typech stravy	40
3.5. Diskuse	40
3.5.1. Neobvykle vysoká vitalita negativní kontroly na 5% dietě	40
3.5.2. Konstrukt FlyFos-adgf-A:GFP jako vhodný reportér genové exprese	42
3.6. Závěr	43
4. Použitá literatura	44

1. Úvod

1.1. *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus

Drosophila melanogaster (octomilka obecná) je druh hmyzu z řádu dvoukřídlých (Diptera) již více než jedno století široce využívaný jako modelový organismus v genetice, buněčné a molekulární biologii, vývojové biologii a řadě dalších vědních oborů, které mají vztah k biotechnologicky a lékařsky významným problémům.

Studium octomilky umožnilo například potvrzení, upřesnění a doplnění Mendelových principů dědičnosti (kromě jiného formulováním a rozvíjením teorie, podle které jsou geny lokalizovány na chromozomech). Na tyto poznatky navázal rozvoj genetického mapování a následně revoluční rozvoj široké řady molekulárně biologických metod v posledních desetiletích. Octomilku jako modelový organismus využívaly průkopnické studie zabývající se různými technikami mutagenese, molekulárního klonování a řadou jiných metod, na které navazuje výzkum dalších organismů. Nebývalé možnosti poskytuje *Drosophila* pro studium genové exprese, které se stále dynamicky rozvíjí.

Na molekulárně genetické úrovni existuje podobnost mezi bezobratlými živočichy a člověkem. Také proto je *Drosophila* využívána jako model ke studiu různých lidských onemocnění.

1.2. Charakteristika

D. Melanogaster je muška kosmopolitního rozšíření dorůstající několika milimetrů. Jako modelový organismus je využívána především pro svou nenáročnost a rychlé rozmnožování s relativně velkými počty potomků.

Haploidní genom octomilky velký přibližně 170 miliónů párů bází je organizován do čtyř chromosomů (označených X/Y, 2, 3 a 4), přičemž čtvrtý chromosom je malý a geneticky málo významný. V genomu je kódováno přibližně 13 600 genů, což odpovídá zhruba polovině počtu genů člověka. DNA obsahuje výrazný podíl repetitivních sekvencí (21%) a mobilních genetických elementů (9%; shrnují Hartwell et al, 2000). Transpozony mají významné využití při experimentálních studiích jako prostředky inzerční mutagenese a v dalších navazujících metodách.

Při studiu *D. melanogaster* jsou velmi užitečné tzv. balancerové chromosomy. Jedná se o varianty chromosomů upravené vícečetnými inverzemi tak, aby nemohly podstupovat rekombinaci. Hlavním přínosem balancerových chromosomů je možnost udržovat

recesivně letální mutace v heterozygotním stavu. To je umožněno tím, že takto upravené chromosomy jsou samy v homozygotním stavu obvykle letální, takže jediné heterozygot nesoucí balancerový chromozom a recesivně letální mutaci na jeho homologu je životaschopný. V důsledku absence rekombinace vzniká rozmnožováním takových jedinců opět jen heterozygotní potomstvo s jedním balancerovým chromosomem a jeho homologem nesoucím danou mutaci. Pro všechny tři geneticky významné chromosomy *D. melanogaster* jsou dnes k dispozici balancerové varianty. Pro snadné rozpoznání genotypu nesou balancerové chromozomy obvykle nějakou fenotypově nápadnou značku.

2. Studium genové exprese u *D. melanogaster*

Genová exprese nebo též exprese genu je proces, kterým je informace zakódovaná v sekvenci DNA využívána k syntéze funkčního genového produktu. Těmito produkty jsou obvykle proteiny. Exprese genů tedy zahrnuje procesy transkripce a v případě genů kódujících proteiny také translaci. Kromě toho se mohou uplatňovat některé další procesy, jako např. sestřih RNA nebo posttranslační modifikace proteinů. Výsledkem tohoto procesu je molekulární aparát zajišťující všechny životní pochody buňky a organismu. Exprese sehrává hlavní roli v procesech vývoje a ve fyziologických reakcích. Regulace genové exprese probíhá na více úrovních zahrnujících fyzikální a chemické modifikace DNA, regulaci transkripce a translace a posttranslační procesy. Jelikož exprese genů je fyzickou realizací dědičnosti, představuje její výzkum jednu z nejdůležitějších oblastí genetického výzkumu, která se v poslední době stále dynamicky rozvíjí.

Studium genové exprese u *D. melanogaster* již přineslo velmi podrobné poznání široké řady různých biologických procesů a mechanismů od identifikace a charakterizace genů, jejich produktů a funkcí až po rozkrytí a podrobný popis různých signálních kaskád a vývojových a fyziologických mechanismů. Zcela zásadní význam má studium genové exprese u *D. melanogaster* při odhalování molekulárně genetické podstaty procesu vývoje, neboť tyto poznatky se stávají východiskem pro výzkum u dalších organismů včetně člověka. Revoluční rozvoj technik a metodických přístupů umožňuje další prohlubování existujících poznatků.

Z toho vyplývá hlavní cíl studia genové exprese, kterým je identifikace a funkční charakterizace genů ve vztahu k fenotypu. Při dosahování tohoto cíle byla vyvinuta řada významných metodických přístupů. K obecně nejdůležitějším postupům patří mutagenese,

identifikace genů na základě jejich exprese (pasti na zesilovače; viz 2.2.) a cílená manipulace s genovou expresí (systém GAL4; viz 2.3.; nebo RNA interference). Přelomový význam mají v současnosti nové celogenomové přístupy (viz 2.5.).

Jmenované přístupy široce využívají reportérové geny, které umožňují vizualizovat genovou expresi a její proměnlivost v čase a prostoru. Zvláštní pozornost je v dalších kapitolách této práce věnována jednomu z nejvýznamnějších genových reportérů, zelenému fluorescenčnímu proteinu (GFP; viz 2.4.).

2.1. Mutageneze, P-elementy

Dalekosáhlé možnosti studia genů u *D. melanogaster*. přineslo využití mobilních genetických elementů, které jsou pro tento organismus typickým fenoménem. Ve výzkumu našly velké uplatnění především tzv. P-elementy (Ryder a Russell, 2003).

P-elementy jsou transpozony ve své původní podobě dlouhé 2,9 kb. Z obou konců jsou ohraničené invertovanými repeticemi dlouhými 31 párů bází. Tyto invertované repetice jsou nezbytné pro transpozici (vystřížení z genomu). Vnitřní část obsahuje kódující sekvenci enzymu transponasy, který katalyzuje proces transpozice (Karess a Rubin, 1984). Syntéza transponasy podléhá tkáňově specifickému sestříhu, a proto je za přirozených podmínek enzym produkován pouze v buňkách zárodečné linie. Vhodnou úpravou (odstranění intronu mezi 2. a 3. exonem) se dosáhne exprese i v jiném typu buněk (Laski et al., 1986; Ryder a Russell, 2003), což je výhodné při aplikacích uvedených dále.

Transponasové aktivity a terminálním invertovaným repeticím vděčí P-elementy za svou schopnost mobilizace (vystřížení z genomu) a následně víceméně náhodné integrace do genomu. Těchto vlastností se široce využívá při technikách inzerční mutageneze a transgenoze *D. melanogaster*.

Inzerční mutageneze je proces, při kterém se P-elementy náhodně integrují do genomu, čímž mohou způsobit přerušení sekvence určitého genu a tím dát vzniknout novým fenotypům (Cooley et al, 1988; Oh et al., 2002). Následně se provádí prověřování získaných linií na nové fenotypy. Tato metoda představuje klasický přístup v identifikaci a charakterizaci genů.

Na podobném principu je založena P-elementová transformace. Průkopníky vytváření transgenních linií *D. melanogaster* pomocí transpozonů byli Spradling a Rubin (1982). Pro mutagenezi i transgenozu bylo třeba původní transpozony značně modifikovat, aby se dosáhlo kontrolovatelnosti těchto procesů. Upravené P-elementy bývají zbavené kódující

sekvence transponasy, která je nahrazena reportérovým genem (např. genem *rosy* pro zbarvení oka) popřípadě jakýmkoli jiným klonovaným genem, který má být vnesen do genomu.

Za účelem transformace jsou konstruovány vektory založené na upravených P-elementech (Lund et al. 2011). Vzhledem k absenci vlastní transponasy nejsou transgenní konstrukty v těchto vektorech samy o sobě mobilizovatelné. Proto se při transgenozii dodává transponasa z jiného zdroje. V současnosti je obvykle pro tyto účely s určitými úpravami stabilně integrována do genomu (Robertson et al., 1988).

Vlastní vnesení cizorodých konstruktů se podle původního přístupu provádí mikroinjekcí konstruktů do časného embrya a následnou izolací úspěšně transformovaného potomstva. (Rubin a Spradling, 1982; Spradling a Rubin, 1982). Pro účely inzerční mutagenese a na ní navazující techniky pastí na zesilovače (viz 2.3.) je dnes původní technika mikroinjekcí nahrazena podstatně jednodušším křížením transgenních linií nesoucích upravený P-elementový konstrukt s reportérovými geny s liniemi nesoucími stabilní zdroj transponasy (Robertson et al., 1988; Singh, 1995).

Jinou aplikací P-elementů je mutagenese vytvářením delecí pomocí nepřesného vystřížení P-elementů při jejich mobilizaci. Transpozon vložený do genomu může být opět mobilizován přičemž jeho vystřížení z genomu obvykle nebývá přesné a zanechává za sebou delecii (Cooley et al, 1988; Singh, 1995). Takto je možné generovat mnoho různých mutantních alel.

Jako novější technika vytváření transgenních linií *D. melanogaster* se v současnosti rozvíjí homologní rekombinace (Rong et al., 2002), která představuje možnost vysoce specifického vnášení cizorodých konstruktů do genomu.

2.2. Pastí na zesilovače

Studium genů pomocí náhodné mutagenese a následného prověřování na nové fenotypy má svá značná omezení. Jedním z nich je skutečnost, že většina genů *D. melanogaster* nemá žádný zvláštní fenotyp, který by vznikl jejich inaktivací (Miklos a Rubin, 1996), takže jejich mutováním nemusí být získána požadovaná informace o funkci daného genu. Tato omezení překonává technika tzv. pastí na zesilovače (angl. *enhancer traps*), která umožňuje identifikaci a funkční charakterizaci genů na základě jejich expresního vzoru. Přístup využívá inzerce konstruktů na bázi P-elementů s reportérovými geny k vizualizaci specifických expresních vzorů daných regulačními

sekvencemi (zesilovače transkripce) oblasti inserce konstruktů a tím umožňuje detekci a charakterizaci genů podléhajících těmto regulačním sekvencím.

Zesilovače transkripce (enhancery) jsou regulační sekvence eukaryotické DNA, které se podílejí na regulaci transkripce přilehlých genů a to i na velké vzdálenosti (desítky kb). Působí pomocí transkripčních faktorů, které se vážou na zesilovač a vytvářejí s ním komplex, který se následně za vzniku smyčky váže na promotorové oblasti genů a ovlivňuje tak jejich transkripci. Zesilovače působí na okolní geny bez ohledu na jejich orientaci a mohou být přítomné i uvnitř genu (Blackwood and Kadonaga, 1998; Kolovos et al., 2012).

O'Kane a Gehring (1987) vyvinuli systém umožňující detekci regulačních genomových sekvencí u *D. melanogaster* a tím položili základy následnému dalekosáhlému využití pastí na zesilovače. Autoři vycházeli z metody náhodného vytváření operonových fúzí, která umožňuje izolaci a charakterizaci genů na základě vzorů jejich exprese u bakterií. Metoda je založena na náhodné integraci reportérového genu bez promotoru. Exprese tohoto genu je poté řízena některým z bakteriálních promotorů (Casadaban a Cohen, 1979). S uvážením některých odlišných aspektů regulace transkripce u eukaryotních organismů (závislost aktivity promotoru na okolních sekvencích, např. zesilovačích) aplikovali O'Kane a Gehring (1987) obdobný přístup u *D. melanogaster* k detekci enhancerových sekvencí.

Autoři využili P-elementové transformace (viz 2.1.), aby zavedli do mušičího genomu konstrukt sestávající z reportérového genu *LacZ* (kóduje enzym β -galaktosidasu u *E. Coli*; viz 2.4.1.) a P-elementového promotoru (*P-lacZ*), který se pro potřeby této studie ukázal vyhovujícím.

Za tímto účelem zkonstruovali transpozon $P[lac,ry^+]A$, který obsahoval ve správném čtecím rámci translační fúzi reportérového genu *lacZ* ve druhém exonu transpozonu, P-elementové konce nutné pro transpozici, gen rosy (*ry*) jako fenotypovou značku (zbarvení očí) a na 3' konci trailerové sekvence a polyadenylační místo genu *hsp70*. V plazmidovém vektoru byl tento transpozon vpraven mikroinjekcí do embrya *D. melanogaster* společně s vhodným zdrojem transponasy (pomocný vektor). Tím byl tento P-elementový vektor mobilizován, což umožnilo jeho následnou inserci do široké řady různých genomových lokalizací. Potom byly izolovány úspěšně transformované linie.

Studie ukázala, že integrací tohoto konstruktů přechází slabý promotor pod kontrolu některého z okolních zesilovačů, což se může projevit zvýšenou expresí reportérového genu. To bylo předvedeno získáním transformovaných linií, jejichž embrya exprimovala β -galaktosidasu v mnoha různých prostorových vzorech. Vizualizace tohoto reportérového

genu bylo dosaženo pomocí substrátu β -galaktosidasy X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid), jehož oxidací vzniká modré barvivo. Studium jednotlivých insercí následně umožnilo identifikaci a charakterizaci velkého počtu nových lokusů.

Omezením tohoto původního přístupu byly složité a náročné procedury mikroinjekcí. Tato překážka byla překonána postupným vytvořením transgenních linií nesoucích konstrukty potřebné pro mobilizaci stabilně integrované v genomu. Mobilizace je tak možné dosáhnout pouhým křížením linie nesoucí zdroj transponasy (imobilizované odstraněním jedné z terminálních repetice) s linií nesoucí vhodně modifikovaný transpozon. Mobilizace potom probíhá stejně jako u inserční metagenese (viz 2.1.) (Cooley et al., 1988; Robertson et al., 1988; Bellen et al., 1989; Wilson et al., 1989; Singh, 1995).

Cooley et al. (1988) integrovali transponasový gen do genomu pod kontrolu tepelným šokem indukovaného promotoru genu *hsp70*. Mobilizace byla poté dosažena tepelným šokem. Robertson et al. (1988) vyvinuli jiný stabilní zdroj transponasy schopný stálé exprese v somatických i zárodečných buňkách bez potřeby aktivace tepelným šokem. Této všudypřítomné exprese transponasy bylo dosaženo odstraněním druhého a třetího intronu jejího genu (element $\Delta 2-3$; Laski et al., 1986). Vytváření nových linií pomocí P-elementové mobilizace tak přestalo být závislé na mikroinjekcích.

Toto zdokonalení techniky pastí na zesilovače umožnilo její využívání ve velkém měřítku. Bylo identifikováno a charakterizováno velké množství nových lokusů podílejících se na různých vývojových procesech od embryonální segmentace po diferenciaci řady orgánů a tkání (Singh, 1995).

Vhodnost a věrohodnost tohoto přístupu byla potvrzena důležitým zjištěním, že vzory exprese reportérového genu *lacZ* odpovídají vzorům exprese endogenních genů, ačkoli v některých případech není vyloučena možnost ovlivnění výsledků např. insercí transpozonu do některé důležité oblasti genu (Kassis, 1990; Singh, 1995).

Významným využitím techniky pastí na zesilovače je vytváření linií, u nichž specifická exprese vloženého reportérového genu označuje určité buňky, tkáně nebo orgány s vysokým rozlišením (Bellen et al., 1989). Získání těchto vysoce specifických buněčných značek poskytuje možnost sledování označených souborů buněk v průběhu vývoje. To umožnilo poznání vývojových procesů v podrobnostech dříve nedosažitelných.

Techniku pastí na zesilovače je také možné použít k inserční mutagenезi s výhodou označení inaktivovaného genu reportérem. To umožňuje např. sledovat expresní vzor mutovaných genů, které jsou homozygotně letální, v heterozygotní konstituci (Singh, 1995).

Nevýhodou systému pastí na zesilovače může být možný nesoulad mezi detekovanou expresí reportérového genu a skutečnou transkripcí daného lokusu způsobený např. přetrváváním reportéru po určitý čas i po ukončení transkripce lokusu v rámci vývoje (Singh, 1995). Jinou překážku představují sekvenční preference P-elementů. Ačkoli se o P-elementové inzerci pojednává jako o náhodném procesu, byly ukázány preference pro určitá místa inzerce (Hama et al., 1990), což může činit část genů touto technikou jen obtížně zachytitelnými.

Modifikací techniky pastí na zesilovače, která má potenciál do značné míry řešit uvedený problém nenáhodnosti P-elementové transpozice, je využití jiného typu transponovatelných elementů. Za tímto účelem byly zkonstruovány vektory na bázi elementů *hobo* (*hobo lacZ*), jejichž sekvenční preference je mírně odlišná od P-elementů, což dává perspektivu odhalení nových lokusů, které se nepodařilo zachytit pomocí P-elementových enhancerových pastí (Smith et al., 1993; Singh, 1995).

Využití techniky se neomezuje pouze na *D. melanogaster*. Pastí na zesilovače představují účinný nástroj např. pro studium genomu obratlovců (Korzh, 2007).

Vedle pastí na zesilovače byl vyvinut obdobný systém zvaný pastí na geny (angl. *gene traps*; Lukacsovich, 2001). V tomto přístupu je exprese vektoru genové pasti řízena endogenním promotorem, zatímco vektory konvenčních pastí na zesilovače nesou vlastní promotor. Vektor je poté exprimován pouze v případě, že dojde k jeho integraci ve správné orientaci do oblasti podléhající promotoru endogenního genu.

Po technikách mutageneze, které umožňují studovat funkci genů na základě fenotypů získaných jejich inaktivací, znamenal nástup pastí na zesilovače velký pokrok, neboť umožnil přímo sledovat expresi genů, aniž by bylo bývalo potřeba o daných genech předem něco vědět. Tím umožňuje tato technika geny současně identifikovat i charakterizovat z hlediska jejich expresních vzorů. Nicméně znalost přesné prostorové lokalizace a časové proměnlivosti exprese genu *in vivo* obvykle poskytuje jen omezenou informaci o jeho funkcích a regulačních mechanismech. Dalším způsobem, jak získat požadovanou informaci o studovaném genu, bylo zavedení úspěšných technik, které umožňují řídit expresi genu podle potřeby.

2.3. Řízení genové exprese: Systém GAL4

Jedním z důležitých přístupů k analýze funkce genů se ukázala být tzv. ektopická exprese. Je to exprese genů v odlišné prostorové nebo časové lokalizaci, než jaká nastává

za přirozených podmínek. Jak je uvedeno výše, většina genů *D. melanogaster* nemá žádný zvláštní fenotyp spojený se ztrátou funkce (*loss-of-function phenotype*; Miklos a Rubin, 1996), který by vznikl jejich inaktivací. Ektopická exprese může pomoci se o takových genech dovědět více (Elliot a Brand, 2008).

Obzvláště užitečným a rozšířeným nástrojem pro studie založené na ektopické expresi se stal systém GAL4/UAS převzatý z genetiky kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Tento systém poskytuje rozsáhlou škálu možností a technik regulace a vysoce přesného selektivního cílení genové exprese v prostoru a čase.

2.3.1. Princip fungování systému GAL4

GAL4 je eukaryotický transkripční faktor sestávající z 881 aminokyselin (Laughon a Gesteland, 1984; Duffy, 2002). Funguje jako transkripční aktivátor genů zapojených v kvasinkovém metabolismu galaktózy (Hashimoto et al. 1983; Elliot a Brand, 2008). Aktivace je zajišťována vazbou proteinu GAL4 na cílovou oblast DNA zvanou UAS (*Upstream Activating Sequences* – protisměrně aktivující sekvence), sestávající původně ze čtyř kopií sekvence o sedmnácti párech bází (Giniger et al. 1985), která je pro aktivaci transkripce nezbytná. GAL4 je analogický zesilovačem transkripce (enhancery) ostatních eukaryot (Duffy, 2002).

2.3.2. Využití systému

Využitelnost systému spočívá ve schopnosti GAL4 aktivovat transkripci jakékoli promotorem opatřené sekvence umístěné za prvkem UAS. Takto může být aktivována kódující sekvence jakéhokoli genu nebo také např. konstrukty RNAi (Elliot a Brand, 2008). GAL4 u *D. melanogaster* pravděpodobně nemá žádný škodlivý fenotypový účinek (Duffy, 2002).

Brand a Perrimon (1993) zavedli systém GAL4 do výzkumu genové exprese u *D. melanogaster* a navrhli metodický aparát pro cílení genové exprese zvolených genů podle potřeby. Tím poskytují experimentátorovi nebývalé možnosti téměř libovolně řídit expresi genů v široké řadě tkáňově a buněčně specifických vzorů.

Uvedení autoři demonstrovali využití systému GAL4 při identifikaci funkce proteinu *even-skipped* v embryonálním vývoji. Ukázali, že systém GAL4 je možné využít k řízeným změnám osudů buněk ve vývoji.

Studie využívá GAL4/UAS jako dvoustranný systém. Základem je vytvoření dvou oddělených transgenních linií, z nichž jedna nese kódující sekvenci GAL4 exprimovanou

v určitém vzoru (tzv. *driveru*) daném okolními regulačními sekvencemi a druhá nese konstrukt sestávající z transkripčního aktivátoru UAS a sledovaného genu (tzv. *responderu*; často reportérový gen). Linie *driveru* exprimuje GAL4 v určitém vzoru, což samo o sobě nemá fenotypový projev. Linie *responderu* nese sledovaný gen pod kontrolou sekvence UAS, ale v nepřítomnosti aktivátoru GAL4 je tento gen transkripčně neaktivní. Spuštění exprese sledovaného genu (*responderu*) je pak dosaženo křížením těchto linií mezi sebou za vzniku potomstva, které exprimuje *responder* ve vzoru daném expresí GAL4 (*driveru*). Tato exprese je umožněna vazbou proteinu GAL4 na regulační prvek UAS a následnou aktivací transkripce genu, který se nachází pod jeho kontrolou (Brand a Perrimon, 1993; Duffy, 2002; Elliot a Brand, 2008).

Možnost držet linie *responderu* a *driveru* odděleně přináší velké výhody (Duffy, 2002; Elliot a Brand, 2008). Umožňuje např. udržovat geny, jejichž produkty jsou toxické nebo snižují životaschopnost, což je umožněno transkripční nečinností genu řízeného prvkem UAS v nepřítomnosti GAL4. Patrně nejvýznamnější výhodou systému GAL4/UAS je možnost selektivně vyvolat expresi sledovaného genu v konkrétním vzoru buněk a tkání, která dosahuje zejména s pomocí různých modifikací vysoké přesnosti v prostoru i v čase. Z toho vyplývá současně také hlavní omezení systému, kterým je omezený počet expresních vzorů (*driverů*), které jsou k dispozici. Linie jsou uchovávány ve *stock-centrech*, jaké je např. v americkém Bloomingtonu. Popisy mnoha linií jsou dostupné v databázi FlyBase.

Za účelem charakterizace expresního vzoru určitého GAL4 *driveru* jsou tyto transgenní linie nejdříve kříženy s *responderovými* liniemi, které nesou pod kontrolou prvku UAS nějaký reportérový gen (fluorescenční proteiny, β -galaktosidasu). Vzor exprese reportéru však nemusí být totožný s expresním vzorem *responderového* genu, který chceme studovat. Proto bývá potřeba analyzovat vzor exprese indukované GAL4 *driverem* přímo pro studovaný gen (např. imunohistochemicky). Novým východiskem by mohlo být přímo použití variant genů značených fluorescenčními reportérovými proteiny (Duffy, 2002).

Expresi reportéru ve vzoru daném regulačními sekvencemi GAL4 je potom možné snadno sledovat. Při tom je velmi důležité, aby reportérové geny neměly škodlivé fenotypové účinky na studovaný proces. Phelps a Brand (1998) ukázali, že některé reportérové konstrukty mohou mít v kombinaci se specifickými GAL4 *driver*y letální účinky.

Důležitým funkčním aspektem GAL4 je také závislost jeho aktivity na teplotě (Duffy, 2002). Při 16°C je aktivita proteinu GAL4 minimální a roste se zvyšující se teplotou. To umožňuje předejít možným škodlivým účinkům *responderu* v časných stádiích vývoje.

Znalost sekvence genomu *D. melanogaster* společně se zvládnutím technik mutagenese a transgenozie umožnilo široké využití systému GAL4/UAS jako flexibilního prostředku cílené genové exprese.

Brand a Perrimon (1993) vyvinuli několik vektorů pro vytváření transgenních linií *responderů* a *driverů*. Za účelem umístění studovaného genu pod kontrolu GAL4 zkonstruovali vektor pUAST, který nese prvek UAS, promotor (*hsp70*), mnohačetné klonování místo, intron (SV40) a polyadenylační signál. Sledovaný gen je klonován do vektoru a ten je následně použit k vytvoření transgenní linie.

Při vytváření různorodých vzorů exprese GAL4 se uplatňují dva přístupy (Brand, 1999). Jeden je založen na připojování známých specifických promotorů k sekvenci genu GAL4. Vzor exprese GAL4 je potom dán zvoleným promotorem. Druhý využívá pastí na zesilovače (viz 2.2.). Konstrukt GAL4 je náhodně integrován do genomu, čímž se dostává pod specifickou kontrolu některého z genomových zesilovačů.

Pro tvorbu konstruktů sestávajících z regulačních sekvencí a genu GAL4 vytvořili Brand a Perrimon (1993) vektory pGAWB, pGATB a pGATN. Tyto konstrukty umožňují vložení známých regulačních sekvencí za účelem získání specifických vzorů exprese GAL4. Možnosti využití systému GAL4/UAS se významně rozšířily s řadou modifikací těchto vektorů.

Jistá rozmanitost exprese cílového genu pod kontrolou UAS je dána také místem inzerce konstruktů UAS-gen v genomu. Stejný cílový gen může být po křížení se stejnou linií *driveru* GAL4 exprimován v různé míře v závislosti na genomové lokalizaci konstruktů UAS-gen (Brand, 1999).

2.3.3. Modifikace a aplikace systému GAL4/UAS

Jak vektory pro vytváření transgenních linií, tak postupy využívání systému GAL4/UAS byly různě modifikovány. Vektor pGAWB byl zkonstruován pro techniku pastí na zesilovače (*enhancer traps*; viz 2.2.), která našla široké využití jako nástroj pro identifikaci genů. Úpravami vektoru pUAST byl získán podobný vektor pUASP vhodný především pro řízení exprese *responderu* v maternální zárodečné buněčné linii (Duffy, 2002).

Při využívání systému GAL4/UAS pro přesné cílení genové exprese se ukázalo, že specifita exprese driverů není v některých případech dostatečná a tak vznikla potřeba modifikace postupů směrem ke zvýšení přesnosti a rozlišení cílení genové exprese v prostoru a čase. Duffy (2002) a Elliot a Brand (2008) shrnují několik hlavních postupů zavedených ke zdokonalení možností regulace systému.

Regulace exprese sledovaného genu (*responderu*) v čase může být dosažena použitím represoru aktivity GAL4, kvasinkového proteinu GAL80, který se váže na GAL4 a zabráňuje tak aktivaci transkripce. Schopnost GAL80 inhibovat aktivitu GAL4 u *D. melanogaster* předvedli Lee a Luo (1999). Dosažení vyššího stupně časové regulovatelnosti systému pomocí GAL80 dalo společně s některými jinými technikami vzniknout dalším přístupům, jako jsou analýzy využívající vytváření geneticky mozaikových jedinců. To může být užitečné zejména pro studium genů, které způsobují časnou letalitu. Omezením jejich exprese pouze na vybrané části může být jejich letální účinek potlačen, což umožní studium jejich chování *in vivo*. Při vytváření mozaikových jedinců se uplatňuje řízená mitotická rekombinace zprostředkovaná kvasinkovou FLP-rekombinací.

Jednou z modifikací systémů regulace genové exprese pomocí represorového proteinu GAL80 je využití jeho teplotně citlivé varianty (GAL80^{TS}; Matsumoto et al., 1978). Aktivace transkripce je potom možné dosáhnout vhodnou změnou teploty. Tento přístup je základem metody zvané „TARGET“ (*temporal and regional gene expression targeting*) (McGuire et al., 2003). Pro studie tohoto typu byly vyvinuty balancerové chromosomy nesoucí sekvenci GAL80 (Vef et al., 2006).

Regulace exprese sledovaného genu v čase je také možno dosáhnout pomocí hormonálně indukovatelných forem GAL4. Jedná se o fúzní proteiny sestávající z GAL4 a hormonálního receptoru, jejichž aktivace nastává až po navázání vhodného ligandu (hormonu). Aktivace transkripce je tak dosaženo jednoduše podáním příslušného hormonu ve stravě. Výhodou tohoto systému je možnost předejít možným škodlivým účinkům předčasné exprese sledovaného genu. K dispozici jsou dvě varianty těchto fúzních proteinů, GAL4-estrogenový receptor a GAL4-progesteronový receptor zvaný také „GeneSwitch“ (Han et al., 2000; Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001).

Duffy (2002) a Elliot a Brand (2008) uvádějí řadu dalších modifikací systému GAL4. Jeden z přístupů využívá systém, ve kterém je aktivita GAL4 indukována tetracyklinem (tzv. systém *Tet-On*). Jiná metoda rozděluje protein GAL4 na dvě domény, které jsou drženy odděleně jako proteinové chiméry s heterodimerními podjednotkami tzv.

leucinových zipů. Pouze pokud se obě podjednotky vyskytnou ve stejných buňkách, jejich spojení dá vzniknout heterodimeru s funkční aktivační aktivitou („*Split GAL4*“). Jiné metody spojují systém GAL4 s potlačováním exprese genů pomocí RNA interference.

Využití systému GAL4 se neomezuje pouze na *D. melanogaster*, ale nachází stále širší využití u celé řady jiných organismů, jako např. u myši nebo huseníčku *Arabidopsis thaliana* (Lewandoski, 2001; Engineer et al., 2005; Elliot a Brand, 2008). Kromě přístupů *in vivo* bylo využití systému rozšířeno také na buněčné kultury (Duffy, 2002).

Systém GAL4 navazuje na techniky P-elementové mutagenese a představuje mocný prostředek pro techniku pastí na zesilovače nebo pastí na geny (viz 2.2.).

Jmenované modifikace a speciální metodické přístupy představují pouze výběr z existujících možností. Systém GAL4 poskytuje mocný a flexibilní nástroj pro studie založené na ektopické expresi genů, avšak nachází využití v řadě dalších oblastí. Využívá se např. při identifikaci a charakterizaci lokusů, které modifikují fenotyp vyvolaný řízenou expresí. Je pravděpodobné, že škála modifikací i možností využití systému GAL4 se bude dále rozšiřovat.

2.4. Vizualizace genové exprese. Reportérové geny

Existuje několik způsobů vizualizace genové exprese. Přímými metodami jsou hybridizace molekulárních sond nebo imunohistochemická detekce produktů pomocí protilátek. Tyto přístupy mají svá omezení. Jednou z nevýhod je skutečnost, že poskytují jen statický obraz genové exprese, takže neumožňují sledovat dynamické změny genové exprese *in vivo*. Tyto metody navíc vyžadují relativně složité manipulace, které zahrnují pitvání studovaných tkání a jejich fixaci, což může indukovat zkreslení. Jinou nevýhodou přímé detekce produktů genové exprese může být omezená propustnost tkání pro protilátky. Např. kutikuly larev a dospělých jedinců *D. melanogaster* jsou pro protilátky nepropustné (Brand, 1999; Yeh, 1995).

Nepřímé přístupy využívají detekci produktů genové exprese pomocí reportérových genů. Reportérový gen je sekvence DNA kódující nějaký snadno rozpoznatelný produkt nebo fenotypový znak. Rekombinantní konstrukty nesoucí reportérové geny jsou zaváděny technikami transgenozy do cílových organismů. Tyto geny jsou využívány širokou řadou různých způsobů a k různým účelům. Příkladem využití reportérových genů je detekce a charakterizace lokusů na základě jejich přirozené nebo ektopické exprese (viz 2.2. a 2.3.),

charakterizace exprese genů pomocí fúzních proteinů, značení specifických typů buněk nebo jsou používány jako selekční fenotypové značky.

Využití reportérových genů je velmi široké a přesahuje rámec studia genové exprese. Možným použitím je např. identifikace a selekce pozitivně transformovaných buněk v buněčné populaci při procesech přenosu genetického materiálu.

Mezi nejvýznamnější reportérové geny používané u *D. melanogaster* patří β -galaktosidasa a zelené fluorescenční proteiny.

2.4.1. β -galaktosidasa

β -galaktosidasa je enzym ze skupiny hydrolas, který hydrolyticky štěpí laktózu a jiné β -galaktosidy na monosacharidy. Jako reportér je široce využívána β -galaktosidasa z bakterie *E. coli* kódovaná genem *lacZ* laktózového operonu. Protein je tetramer sestávající ze čtyř stejných podjednotek o celkové hmotnosti 464 kDa, takže se jedná o relativně velkou molekulu (Matthews, 2005; Fowler a Zabin, 1970; Rouwenhorst et al., 1989; Jacobson et al., 1994).

Vizualizace exprese β -galaktosidasy je dosahováno pomocí chromogenního substrátu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid), jehož oxidací vzniká modré barvivo. Buňky a tkáně, ve kterých se enzym exprimuje, je tak možné rozeznat po dodání substrátu podle přítomnosti barviva.

Rozsáhlé využití našla β -galaktosidasa u *D. melanogaster* při identifikaci genů metodou pastí na zesilovače (viz 2.2.). Existuje také řada dalších způsobů využití, např. při studiu vývojových procesů pomocí fúzních genů (Shiga et al., 1996; Timmons et al., 1997).

Nevýhody použití β -galaktosidasy jsou obdobné nevýhodám použití protilátek. Enzym vyžaduje dodání substrátu a vizualizace jeho exprese štěpením tohoto substrátu je možná jen ve fixovaných tkáních. Z toho vyplývá nutnost relativně složitých procedur pitvání a fixace. β -galaktosidasa tedy neposkytuje možnost studovat dynamické změny genové exprese *in vivo*.

2.4.2. Zelený fluorescenční protein (GFP)

2.4.2.1. Charakteristika

Zelený fluorescenční protein (angl. *green fluorescent protein*, GFP) je protein izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*. Chalfie et al. (1994) poprvé předvedli využití GFP

jako reportérového genu a od té doby našel rozsáhlé využití v molekulárně biologických a biotechnologických vědách.

GFP je relativně malý protein (hmotnost monomeru je přibližně 27 kDa) sestávající z 238 aminokyselinových podjednotek (shrnuje Tsien, 1998). Molekula cylindrického tvaru (tzv. β -barel) sestává z jedenácti řetězců s antiparalelním uspořádáním, které vytvářejí barel, a z centrální helikální struktury uvnitř barelu. Na vnitřní šroubovici je uprostřed molekuly připojený chromofor, struktura zodpovědná za fluorescenční chování proteinu. Molekuly GFP agregují do dimerů pomocí několika hydrofobních aminokyselinových zbytků, přičemž tato schopnost dimerizace je různá v závislosti na typu a koncentraci proteinu (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996; Tsien, 1998; Zimmer, 2002).

Důvodem širokého využití GFP jsou jeho unikátní fluorescenční vlastnosti. Byla popsána řada různých fluorescenčních proteinů z různých organismů. Mnoho z těchto proteinů na rozdíl od GFP využívá jako chromofory externí kofaktory, což je učinilo méně atraktivní pro využití ve výzkumu (Tsien, 1998). Nativní GFP využívá jako chromofor p-hydroxybenzylidenimidazolin, strukturu ze tří modifikovaných aminokyselin serinu, tyrosinu a glycinu v pozicích 65-67. Existují také různé mutované varianty s jinými aminokyselinami ve chromoforu, avšak glycin v pozici 67 je konzervován u všech forem, které si zachovávají schopnost fluorescence (Prasher et al., 1992; Prasher, 1995; shrnuje Tsien, 1998).

GFP je produkován jako apoprotein, který získává své fluorescenční vlastnosti po cyklizaci a autooxidaci chromoforu. Potřeba autooxidace vede k určitému zpoždění (v řádu jednotek hodin) mezi expresí proteinu a vznikem jeho fluorescenční formy (Tsien, 1998).

GFP absorbuje modré světlo s maximem absorpčního spektra při 395 nm a sekundárním maximem při 475 nm. Po excitaci emituje světlo v zelené oblasti spektra s maximem o vlnové délce kolem 508 nm. Tvar absorpčního spektra a hodnoty maxim se mění v závislosti na pH roztoku a rozpouštědle (Morin a Hastings, 1974; Morise et al., 1974; Ward et al., 1980; Cubitt et al., 1995; Tsien, 1998).

2.4.2.2. Mutantní varianty

Úpravy zeleného fluorescenčního proteinu metodami genového inženýrství vedly k získání několika mutantních variant s odlišnými vlastnostmi (Heim et al., 1994).

Mezi významné mutantní formy v buněčné biologii patří např. varianta S65T (Serin v pozici 65 je nahrazen threoninem; Heim et al., 1995). Tato mutantní forma má jedno excitační maximum při 490 nm, což zjednodušuje její použití s běžnými sadami GFP-

fluorescenčních filtrů. Dále poskytuje silnější fluorescenci a má zkrácenou dobu zrání (tj. čas potřebný pro posttranslační modifikace).

Jiným příkladem je dvojitě mutantní varianta Y66H/Y145F (Heim et al., 1996), která emituje modré světlo o vlnové délce 445 nm při excitaci světlem o 381 nm. Tato forma se označuje jako modrý fluorescenční protein (angl. *blue fluorescent protein*, BFP). Několik dalších mutantních variant GFP zlepšuje jeho zrání a fluorescenční vlastnosti (mGFP5, mGFP6 a další.) (shrnuje Brand, 1999).

2.4.2.3. Přednosti a aplikace

Schopnost GFP emitovat relativně silnou a jasnou fluorescenci bez nutnosti dodávat jakékoli substráty patří k jeho nejvýznamnějším výhodám. Protein potřebuje pouze zdroj energie a kyslík. Další velkou výhodou GFP je jeho malá velikost (27 kDa) umožňující jeho snadnou difúzi. GFP je netoxický a významně neovlivňuje životaschopnost buněk (Ačkoli možnost, že GFP ovlivňuje některé aspekty životaschopnosti organismu byla oznámena u *D. melanogaster*; Mawhinney a Staveley, 2011). Tyto vlastnosti činí zelený fluorescenční protein ideální vitální značkou pro studie *in vivo* a předznamenaly jeho rozsáhlé využití u řady organismů zahrnující bakterie, hlístice, mouchy, rostliny i savce (Chalfie et al., 1994; Cubitt et al., 1995; Rizzuto et al., 1995; Yeh et al., 1995; Leffel et al., 1997; Brand, 1999; Zimmer, 2002; March et al., 2003).

March et al. (2003) shrnují některé nejčastější obecné aplikace GFP. Nejčastěji je zelený fluorescenční protein využíván jako fúzní gen. Fúze GFP se studovaným genem dá vzniknout chimérickému proteinu, který je možné sledovat pomocí fluorescence. Tento přístup využívá jedné z velkých předností GFP: jeho stability (která by mohla být za určitých okolností i nevýhodou). GFP stabilizuje fúzní protein, čímž umožňuje relativně snadné sledování a kvantifikaci produktu exprese sledovaného genu a přesné monitorování biologických procesů během vývoje.

Dalším přístupem široce využívaným GFP je vizualizace celých organismů, která se uplatňuje při biotechnologických a environmentálních studiích u bakterií. Jinou zajímavou oblastí využití zeleného fluorescenčního proteinu jsou transkripční sondy ke studiu vlivu různých stresových faktorů na genovou expresi. GFP je pro tyto účely spojen s promotorem citlivým k určitému sledovanému stresovému faktoru (toxické látce). Podle intenzity fluorescence je poté stanovována úroveň stresu za daných podmínek.

GFP se stal významným nástrojem při studiu dynamických procesů v buňce a vizualizaci buněčných organel a oddílů. S pomocí fúzních proteinů s GFP byly získány

nové podrobné poznatky o strukturách a procesech jako je např. cytoskelet (*exu*), buněčné dělení, transport proteinů mezi buněčným jádrem a cytoplazmou nebo vesikulární transport spojený s endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem (Rizzuto et al., 1995; Gerdes and Kaether, 1996).

Vizualizace GFP se dosahuje pomocí souprav filtrů při fluorescenční a konfokální mikroskopii.

2.4.2.4. Aplikace u *Drosophila melanogaster*.

Poté, co se ukázalo, že GFP je velmi vhodný k použití jako reportér genové exprese (Chalfie et al., 1994), našel tento protein široké využití také u *D. Melanogaster*. Jedním z prvních využití GFP u octomilky bylo sledování subcelulární distribuce proteinu *exuperantia* pomocí fúze s GFP ve čtecím rámci (Wang a Hazelrigg, 1994)(*exuperantia* je protein, který má význam při ustavování polarity vyvíjejícího se oocytu a při spermatogenezi; Hazelrigg et al., 1990; Cha et al., 2001). Studie ukázala, že fúzní protein *exu*-GFP byl exprimován ve stejném vzoru, jako nativní protein *exuperantia*. Nicméně přístupy využívající fúzní proteiny jsou složité a není vyloučeno, že fúzní produkty s určitými proteiny mohou být nestabilní, neaktivní nebo mohou postrádat schopnost fluorescence (Yeh et al., 1995).

Za účelem zvýšení využitelnosti GFP Yeh et al. (1995) vytvořili transgenní linie pro cílení exprese GFP pomocí systému GAL4 (viz 2.3.). Tyto linie nesly cDNA zeleného fluorescenčního proteinu pod kontrolou prvku UAS, takže po jejich zkřížení s určitým GAL4 *driverem* exprimovalo potomstvo GFP ve specifickém vzoru podle zvoleného GAL4 *driveru*. Uvedení autoři testovali vhodnost GFP jako reportérového genu. Linie nesoucí konstrukt UAS-GFP byly kříženy s několika liniemi exprimujícími GAL4 ve specifických vzorech ve vaječnicích, v imaginálních terčích a v larvální nervové soustavě. Správná exprese GFP byla potvrzena porovnáním s výsledky získanými histochemicky (pomocí β -galaktosidasy) u paralelních křížení. Detekce GFP byla možná v čerstvých i fixovaných tkáních stejně jako v intaktních živých embryích a larvách. Z toho vyplývá, že GFP je možné využít ke sledování dynamických změn genové exprese během vývoje.

Vytvoření systému pastí na zesilovače založeného na GFP je příslibem objevování nových expresních vzorů. Také mohou být vytvořeny vektory pro P-elementovou inzerční mutagenezi využívající GFP pro izolaci nových mutantních linií.

Byly vytvořeny varianty všech tří balancerových chromozomů značené GFP (Casso et al., 1999), což umožňuje snadnou selekci heterozygotů a homozygotů v embryonálním nebo larválním stadiu.

GFP se ukázal jako velmi užitečný nástroj pro specifické značení buněk, což je důležité především při studiu procesu vývoje. Před zavedením GFP bylo značení nervových buněk studováno téměř pouze invazivními technikami, jakými jsou mikroinjekce barviv nebo použití protilátek. Barviva (např. *lucifer yellow* nebo DiI) umožňují sledovat osud jednotlivých buněk v průběhu vývoje *in vivo*. Významnou výhodou použití barviv je jejich schopnost účinné difúze do celé buňky včetně jejich výběžků, což je výhodné např. při studiu vývoje nervové soustavy. Nevýhodou je technická a pracovní náročnost těchto procedur. Rozšířenější možností je použití protilátek, které je však omezené pouze na fixované tkáně. Navíc jsou zde omezení s prostupností kutikuly pro protilátky atd. (Brand, 1995, Brand, 1999).

Při studiu vývoje nervové soustavy *D. melanogaster* Brand (1999) předvádí, že zavedení GFP přineslo významné zdokonalení a zjednodušení vizualizace specifických buněk a tkání. Vysoká schopnost difúze umožňuje GFP vyplňovat celé buňky a pronikat do buněčných výběžků (typických pro nervové buňky). Tato vlastnost umožnila rozlišovat a charakterizovat jednotlivé buňky během vývoje. GFP tak umožnil vizualizovat segregaci buněk nervové soustavy od neurálních prekurzorů přes mateřské buňky ganglií až po diferenciaci neuronů a gliových buněk a synaptogenezi (Brand, 1999; Yeh et al., 1995).

Uvedená studie (Brand, 1999) také využila systému GAL4. Byly vytvořeny transgenní linie, které mohou exprimovat GFP v řadě různých vzorů a typů buněk (Brand, 1995; Brand, 1999).

Jako reportér genové exprese je využíván konstrukt UAS-GFP. Tyto konstrukty byly vytvořeny s několika různými formami GFP lišících se mírně fluorescenčními vlastnostmi. Kromě konstruktů s původním typem GFP byly připraveny např. konstrukty s mutantními variantami GFP s excitačním maximem posunutým z 395 na 475 nm v důsledku změněné aminokyselinové podjednotky ve fluoroforu (UAS-GFP S65T nebo UAS-GFP S65T/I167T; Brand, 1999)

GFP je využíván také jako fúzní protein. Za účelem specifického cílení exprese GFP do jádra byl vytvořen fúzní konstrukt sestávající z GFP a sekvence pro jadernou lokalizaci (NLS)(Shiga et al., 1996). Tento konstrukt však v diploidních jádrech nevykazoval fluorescenci (fluorescence byla zjištěna pouze v polyteních jádrech). Vytvořením

konstrukt spojícího GFP s genem *LacZ* (β -galaktosidasa) a sekvencí NLS se však dosáhlo úspěšného fluorescenčního značení jader.

Timmons et al. (1997) také vytvořili fúzní konstrukt sestávající ze dvou reportérových genů, β -galaktosidasy a GFP. Poté testovali expresi tohoto dvojitého reportéru pomocí systému GAL4. Tím umožnili přímé porovnání expresních vzorů získaných pomocí fluorescence GFP a barvení β -galaktosidasou. Studie ukázala, že expresní vzory obou reportérů lišících se molekulární povahou i technikou analýzy byly ve většině případů podobné, což ukazuje vhodnost použití těchto reportérových genů ke studiu genové exprese. V některých tkáních byly zjištěny mírné rozdíly. S pomocí dvojitého reportéru *LacZ-GFP* izolovali uvedení autoři 120 nových GAL4-*driverových* linií.

Jiným využívaným fúzním produktem je tau-GFP. Proteiny tau se vážou na mikrotubuly, čímž je stabilizují (Weingarten et al., 1979). Tau-GFP tak umožní jejich vizualizaci pomocí fluorescence, což představuje další prostředek vysoce specifické vizualizace celých buněk nebo tkání (Brand, 1995; shrnuje Brand, 1999).

2.4.3. Červený fluorescenční protein *DsRed*

Jak je uvedeno výše (viz 2.4.2.2.), mutováním původního GFP byly získány upravené varianty s odlišnými vlastnostmi. Existují mutantní formy emitující modré nebo žluté světlo. Různě barevné formy fluorescenčních proteinů jsou ceněným prostředkem např. pro vícebarevné značení více genů současně. Žádná z mutovaných variant GFP však neposkytovala fluorescenci v červené oblasti spektra, která by výrazně rozšířila možnosti vícebarevného značení genů (Tsien, 1998).

Tato situace se změnila s výzkumem fluorescenčních proteinů homologických GFP z mořských žahavců. Matz et al. (1999) předpokládali, že homology GFP získané z korálů by mohly mít nové dosud chybějící fluorescenční vlastnosti a klonovali šest proteinů homologických GFP. Předpoklad se ukázal správným a z korálu rodu *Discosoma* byl získán unikátní protein drFP583 známý též pod označením *DsRed*.

DsRed je protein o molekulové hmotnosti 28 kDa s absorpčním maximem 558 nm a emisním maximem 583 nm. Protein má strukturu β -barelu podobnou GFP a také kriticky důležité aminokyselinové podjednotky (Tyr-66, Gly-67) vytvářející chromofor, tj. strukturu zodpovědnou za fluorescenční chování, jsou shodné s GFP. *DsRed* vykazuje podobně jako GFP tendenci vytvářet oligomery. *In vitro* a také *in vivo* byla pozorována

formace tetrametrů, což by mohlo představovat problém při některých aplikacích (Baird et al., 2000).

Jednou z hlavních nevýhod červeného fluorescenčního proteinu *DsRed* je dlouhá doba zrání. Dosažení červené fluorescence trvá řádově několik dnů po syntéze (pro dosažení 90% maximální fluorescence je potřeba 48 hod.). Také *DsRed* byl uměle mutován především ve snaze zkrátit potřebnou dobu zrání, ale toto úsilí nebylo příliš úspěšné. Nicméně varianty se změněnými fluorescenčními vlastnostmi byly získány (Baird et al., 2000).

Příkladem aplikace *DsRed* u *D. melanogaster* je knihovna fosmidových klonů FlyFos (viz 2.5.). Vektor FlyFos nese *DsRed* jako selekční značku pro rozpoznání transgenních jedinců nesoucích klonovaný konstrukt.

2.5. Systematické studium genové exprese: projekt FlyFos

Metoda identifikace genů pomocí pastí na zesilovače (*enhancer traps*) je založena na náhodné inzerci modifikovaných transpozonů. Náhodná povaha tohoto přístupu tak představuje jeho značné omezení. Aby bylo možné studovat genovou expresi systematicky na úrovni celého genomu, Ejsmont et al. (2009) vyvinuli nový přístup, který umožňuje vytváření reportérů genové exprese in vivo pomocí fosmidových klonů a vysoce účinných technik transgenoz. Fosmid je vektor molekulárního klonování. Jedná se o kruhovou molekulu DNA, která na rozdíl od plazmidových vektorů umožňuje nést podstatně větší úseky klonované DNA - až 50 kb.

Uvedení autoři vytvořili genomové fosmidové knihovny pro druhy *Drosophila melanogaster* a *Drosophila pseudoobscura*, které pokrývají většinu genomu těchto druhů. Vyvinuli nový fosmidový vektor pFlyFos, který obsahuje indukovatelné oriV, sekvenci attB pro místně specifickou integraci genu prostřednictvím integrasy ϕ C31 a selekční značku *DsRed* (červený fluorescenční protein; viz 2.4.3.) pro identifikaci transformantů.

Zásadní přínos této práce spočívá v možnosti efektivně modifikovat jakýkoli z klonovaných genů (např. připojením fluorescenční značky) a následné možnosti studia chování tohoto konstruktů in vivo v kontextu jeho původních cis-regulačních prvků (tj. prvků nacházejících se na stejné molekule DNA). To je umožněno právě použitím fosmidových vektorů, které mají dostatečnou kapacitu, aby pojaly celé genomové úseky obsahující geny i s jejich přilehlými regulačními sekvencemi. Vysoké účinnosti modifikace

klonů dosáhli uvedení autoři zdokonalenou technikou „*high-throughput recombineering*“ v tekuté kultuře.

Aby prověřili možnost použít klony FlyFos jako reportéry genové exprese *in vivo*, Ejsmont et al. (2009) zavedli několik fosmidů do *D. melanogaster* a následně sledovali, zda expresní vzory těchto rekombinantních konstruktů odpovídají expresním vzorům divokého typu. Autoři ukázali, že expresní vzory fosmidového transgenu značeného pomocí GFP rekapituluje expresní vzory divokého typu.

Podle uvedené studie byly označené geny ve fosmidech biologicky aktivní, takže mohou být použity k experimentům se záchranou mutantních fenotypů.

Vytvoření fosmidových genomových knihoven spolu s účinnými technikami jejich modifikace a transgenoze představuje velmi perspektivní přístup ke studiu genové exprese, který bude pravděpodobně stále více využíván jako doplnění zavedených metod založených na pastech na zesilovače.

Studium genové exprese představuje velmi důležitý prostředek k porozumění životních projevů buňky a organismu. Příkladem využití fosmidového klonu FlyFos ve výzkumu metabolických kaskád a s nimi souvisejících fyziologických procesů byla identifikace a charakterizace proteinů (genů) zapojených v metabolismu adenosinu (Fencková, 2011), o kterých více pojednává praktická část této práce (viz 3.1.5.).

3. Praktická část

3.1. Úvod do problému

3.1.1. Adenosin

Adenosin je purinový nukleosid s několika významnými funkcemi v buňce a organismu. Molekula adenosinu sestává ze sacharidu ribofuranosy vázaného β -N₆-glykosidickou vazbou s heterocyklickou purinovou bází adeninem. Adenosin je stavební jednotkou nukleových kyselin a meziproduktem syntézy a štěpení adenosintrifosátu, hlavní látky energetického metabolismu buňky, cyklického adenosin monofosfátu, který má význam při přenosu signálu v buňce, a dalších metabolicky významných molekul.

Kromě uvedených strukturních funkcí zastává adenosin významnou úlohu jako extracelulární metabolit v několika procesech zahrnujících neuromodulaci nebo regulaci homeostáze (Cunha, 2001). V některých procesech vystupuje adenosin jako hormon (viz 3.1.4.1.). Obdobný význam a vlastnosti má také deoxyadenosin.

3.1.2. Adenosin deaminasy

Koncentrace adenosinu v buňce a v extracelulárních prostorech podléhá důsledné regulaci. Na této regulaci se podílí několik enzymů, mezi něž patří adenosin deaminasy (ADA), které hydrolyticky štěpí adenosin a deoxyadenosin na příslušné inosinové nukleosidy. Adenosin deaminasy jsou evolučně konzervované proteiny přítomné u všech organismů (Doleželová et al., 2005).

U mnohobuněčných nacházíme dvě rodiny genů kódujících proteiny s adenosin deaminasovou aktivitou. Člověk i *Drosophila* mají v genomu zastoupeny homology z obou genových rodin (Doleželová et al., 2005). První a déle známá je genová rodina tzv. *bona fide* adenosin deaminas (též ADA1). Do této rodiny patří hlavní lidská adenosin deaminasa, jejíž deficeience je jednou z příčin dědičného onemocnění těžké kombinované imunodeficeience (SCID; Giblett et al., 1972). *Drosophila* nese v genomu jeden homolog patřící do této genové rodiny se sekvenční podobností lidskému ADA, avšak tento gen ukazuje pouze nízkou úroveň všudypřítomné exprese a jeho produktem pravděpodobně není funkční adenosin deaminasa (Žurovec et al., 2002; Doleželová et al., 2005).

Druhá genová rodina ADGF/CECR (ADA2) je známa po kratší dobu a zahrnuje lidský homolog CECR1 na chromosomu 22. Duplikace chromosomové oblasti nesoucí tento gen je spojená s dědičným onemocněním zvaným syndrom kočičího oka (Riazi et al., 2001). U *D. melanogaster* bylo nalezeno šest genů spadajících do této rodiny, označených ADGF („*Adenosine deaminase like growth factors*“ – růstové faktory podobné adenosin deaminase; Maier et al., 2001; Žurovec et al., 2002; Doleželová et al., 2005). Těmito geny jsou ADGF-A, ADGF-A2, ADGF-B, ADGF-C, ADGF-D a ADGF-E. Geny se liší intenzitou a lokalizací exprese a lokalizací produktů s tím, že funkce některých z nich se mohou částečně překrývat (Matsushita et al., 2000; Žurovec et al., 2002; Doležal et al., 2003). ADGF-A je nejintenzivněji exprimovanou formou ve všech vývojových stádiích. V larválním stadiu se dále exprimuje pouze ADGF-D. Exprese ostatních ADGF se omezuje na stadium dospělce a v larválním stadiu nemá významný vliv. (Žurovec et al., 2002; Doležal et al., 2003; Doleželová et al., 2005).

Bylo ukázáno, že proteiny ADGF svojí enzymatickou aktivitou stimulují růst buněk v závislosti na přítomnosti extracelulárního adenosinu, který působí na růst buněk negativně. (Žurovec et al., 2002). Jako hlavní úloha adenosin deaminas se ukazuje ochrana buněk a tkání před toxickým účinkem zvýšené hladiny adenosinu. Mezi *D. melanogaster*

a savci existuje podobnost v distribuci adenosin deaminasové aktivity (Doleželová et al., 2005), což podporuje vhodnost použití mouchy jako modelového organismu.

3.1.3. Deficience adenosin deminasy v důsledku mutace

Jak je uvedeno výše, deficience adenosin deaminasy u člověka je jednou z příčin těžké kombinované imunodeficience (Giblett et al., 1972). Obecnou důležitost tohoto enzymu ukazuje skutečnost, že také u myši je mutace v adenosin deaminase letální. Mutantní myši měly zvýšené hladiny adenosinu a deoxyadenosinu, četné orgánové deformace a byly imunodeficientní. Plody se rodily s různými abnormalitami a hynuly v době narození (Abott et al., 1986; Wakamiya et al., 1995; Blackburn et al., 1998).

U *D. melanogaster* byla analýza deficience ADA komplikována větším počtem (6) genů ADGF s předpokládanou adenosin deaminasovou aktivitou. Vyšší dvoukřídlí mají oproti ostatním živočichům větší počet genů pro adenosin deaminasy (ADGF) v důsledku přídavných duplikací v evoluci této skupiny (Maier et al., 2001). Z důvodu možného překrývání funkcí jednotlivých proteinů ADGF nebylo možné analyzovat tyto faktory prostým prověřováním na fenotypy vzniklé inaktivující mutací. Fenotypový efekt mutace jednoho z ADGF mohl být potlačen aktivitou jiného.

Z těchto důvodů Doležal et al., (2003) provedli analýzu této skupiny genů pomocí homologní rekombinace. Byla izolována řada kombinací mutací v jednotlivých ADGF, na základě čehož byly jednotlivé geny charakterizovány z hlediska jejich důležitosti ve vztahu k fenotypu. Studie ukázala, že ADGF-A je hlavní a pro normální vývoj nezbytnou adenosin deaminasou alespoň v larválním stadiu. Mutace v genu ADGF-A se ukázala být letální. Částečná letalita byla pozorována také u mutantních linií pro ADGF-C a ADGF-D, přičemž škodlivý účinek těchto dvou mutací se jevil být kumulativní. Mutace ostatních genů z této skupiny neukázaly žádné významné ovlivnění fenotypu alespoň v larválním stadiu.

3.1.4. Mutace v genu ADGF-A u *Drosophila melanogaster*

3.1.4.1. Mutantní fenotyp

Doležal et al. (2005) charakterizovali fenotypový projev inaktivující mutace v genu ADGF-A. Studie ukázala, že deficience ADA způsobená uvedenou mutací vede k úhynu larev a kukel. Přibližně 60% larev homozygotních pro *adgf-a* dosáhne třetího instaru. 30% homozygotů se zakuklí a kukly brzy hynou. Méně než 2% homozygotních jedinců se vyvine v dospělé. V tělech mutantních larev dochází k formování melanotických tumorů

a rozsáhlému rozpadu tukového tělesa. Kukly vykazují abnormální zakřivení v oblasti abdomenu. Zvýšená hladina extracelulárního adenosinu vede ke zpoždění vývoje a inhibuje kuklení. Mutace má účinek na hormonální regulaci vývoje.

Měřením bylo zjištěno, že deficiencie ADA je provázena zvýšenými hladinami adenosinu a deoxyadenosinu v hemolymfě.

Mutace ovlivňuje vývoj hemocytů. Homozygoti měli v oběhu až sedmkrát více hemocytů než jedinci divokého typu.

K ověření, že pozorovaný mutantní fenotyp je výsledkem mutace v ADGF-A, uvedení autoři připravili transgenní linie nesoucí funkční gen ADGF-A pod promotorem indukovatelným tepelným šokem. Takto vyvolaná exprese adenosin deaminasy v mutantním pozadí vedla k významnému snížení letality. Obdobným způsobem byla vyvolána záchrana mutantních jedinců ektopickou expresí ADGF-A v lymfatických žlázách pomocí systému GAL4, čímž se potvrdila souvislost pozorovaného fenotypu s mutací v ADGF-A.

Doležal et al., (2005) také u *D. melanogaster* identifikovali adenosinový receptor AdoR (u savců A1, A2a, A2b a A3) a testovali účinek jeho mutace na životaschopnost mutantních jedinců ADGF-A. Jedinci nesoucí samotnou mutaci AdoR jsou plně životaschopní. Dvojití mutanti se ukázali být životaschopní, čímž autoři demonstrovali, že alespoň část letálního účinku mutace v adenosin deaminase a některé fenotypové projevy mutace jsou způsobeny signalizací přes adenosinové receptory. Receptor AdoR je spojený s G-proteinem a je kódován genem CG9753 (Doleželová, 2004; Doleželová et al., 2007).

Rozpad tukového tělesa je předčasnou metamorfózní změnou a souvisí s aktivitou hemocytů. Tento proces se zdá být nezávislý na signalizaci adenosinovými receptory. U mutantních jedinců dochází ke zpoždění vývoje a inhibici kuklení. Tyto projevy jsou zřejmě spojené se signalizací receptory AdoR (Doležal et al., 2005).

Žuberová et al. (2010) analyzovali mutantní fenotyp *adgf-a*. Studie ukázala, že mutantní fenotyp je spojený s hyperglykemií a narušením energetického metabolismu. Extracelulární adenosin působí jako hormon, který prostřednictvím receptorové signalizace spouští mobilizaci energetických zásob podobně jako adipokinetický hormon. Projevem mobilizace je zvýšená hladina glukózy v hemolymfě. Proto je adenosin studován jako metabolit, který by mohl být zapojený v tzv. syndromu plýtvání, který provází některá lidská onemocnění.

3.1.4.2. Citlivost mutantních jedinců na složení stravy

Mutantní jedinci *adgf-a* jsou mimořádně citliví na složení stravy. Když byly mutantní larvy pěstované na kvasnicové stravě doplněné 5% sacharózy, projevil se u nich typický mutantní fenotyp (viz 3.1.4.1.). Larvy pěstované na kvasnicové stravě bez přidaného cukru obvykle všechny uhynou během larválních stadií, zatímco strava obohacená o 10% sacharózy umožňuje významně vyšší vitalitu, která se projeví vyšším podílem jedinců, kteří se zakuklí a vylíhnou v dospělce. Tato dietní citlivost je specifická pro mutaci *adgf-a*. Mutantní jedinci se zablokovanou signalizací adenosinovými receptory dietní citlivost nevykazují (Žuberová et al., 2010).

3.1.5. Konstrukt FlyFos-*adgf-a*:GFP

Jak je uvedeno v předcházejících částech (viz 2.5.), pro *D. melanogaster* byla vytvořena fosmidová genomová knihovna pokrývající velkou část genomu. Knihovna je tvořena fosmidovými klony FlyFos, které nesou kromě samotných genů také jejich přilehlé regulační oblasti a současně umožňují účinnou modifikaci těchto konstruktů pro následné studium *in vivo* (Ejsmont et al, 2009).

Fencková (2011) použila knihovnu FlyFos k vytvoření reportérových konstruktů se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP; viz 2.4.2) pro vizualizaci několika proteinů zapojených v metabolismu adenosinu *in vivo*. V této práci bylo několik genů (kromě jiného ADGF-A) označeno C-terminálním GFP. Expresí takto vytvořených konstruktů vznikají fúzní proteiny. Pomocí fluorescence tak bylo možné pozorovat expresní vzory označených genů.

Reportérový konstrukt FlyFos-*adgf-a*:GFP sestávající z kódující sekvence funkční adenosin deaminasy ADGF-A, jejích přilehlých sekvencí, sekvencí fosmidového vektoru FlyFos (viz 2.5.) a kódující sekvence reportérového genu GFP (viz 2.4.2.) byl zaveden do genomu *D. melanogaster* na druhý chromosom, zatímco lokus ADGF-A se přirozeně nachází na třetím chromosomu. Expresí tohoto konstruktů umožnila studovat expresní vzor hlavní adenosin deaminasy u mouchy. Práce kromě jiného ukázala, že exprese fúzního proteinu *adgf-a-GFP* je lokalizována k povrchu buněčné membrány nebo do okolí buněk.

3.2. Cíle práce

Jak je uvedeno v předchozích částech práce (viz 2.), reportéry genové exprese představují mocný nástroj pro studium a funkční charakterizaci genů a jejich mutací ve vztahu k fenotypu. Abychom získali věrohodné výsledky při funkční analýze určitého genu či mutace pomocí reportérů, je velmi důležité vědět, zda používaný reportér sám o sobě neovlivňuje studovaný proces. Fúzní proteiny sestávající ze studovaného proteinu a reportéru (např. GFP) mohou být nestabilní nebo mít ovlivněnou aktivitu (Yeh et al., 1995). Phelps a Brand (1998) uvedli, že některé reportérové konstrukty mohou mít v kombinaci se specifickými GAL4 drivery letální účinky. Pro studium určitého procesu s využitím reportérových genů může být tedy užitečné testovat vliv používaných reportérových konstruktů na studovaný proces.

Praktická část této práce je zaměřena na reportérový konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* (Fencková, 2011; viz 3.1.2). Cílem práce je testovat, zda je fúzní protein *ADGF-A:GFP* vznikající expresí tohoto konstruktů plně funkční adenosin deaminasou nebo zda je aktivita enzymu nějak ovlivněna přítomností reportéru. Toto testování je založeno na sledování mutantního fenotypu *adgf-a* (Snížená aktivita enzymu se projeví především jako snížená vitalita; viz 3.1.4.).

V bodech je možné vyjádřit cíle práce takto:

- Křížením připravit linii much *D. melanogaster* nesoucí konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* (chromosom II) v pozadí mutantní adenosin deaminasy (chromosom III).
- Před získáním vlastní cílové linie ověřit správnost předchozího postupu (tj. otestovat přítomnost konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP* a mutantní alely).
- Testovat vitalitu získané linie proti kontrole bez konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP* heterozygotní a mutantní pro *adgf-a* a to na dvou různých typech stravy.
- Na základě zjištěných údajů stanovit, zda je enzymatická aktivita fúzního proteinu *ADGF-A:GFP* nějak ovlivněna přítomností reportéru GFP.

3.3. Materiály a metody

3.3.1. Chov a zacházení s pokusným organismem

Mouchy octomilky byly laboratorně chovány ve skleněných válcovitých lahvičkách o průměru 2,5 cm a výšce přibližně 9 cm. Na dně lahviček je vrstva krmného média silná 1 – 2 cm (složení a příprava: viz 3.3.6.). V jedné lahvičce bylo obvykle chováno po 20 – 30 jedincích. Přibližně každé dva týdny byly mouchy přemístěny do nové lahvičky s novou

potravou. Přemístění se provádělo prostým sklepaním much bez uspání. Lahvičky byly uzavřeny prodyšnými vatovými zátkami.

Chovy byly udržovány obvykle při teplotě 25°C. V některých případech byly umístěny do prostředí o teplotě 18°C za účelem prodloužení generační doby, ale to se provádělo jen v těch případech, kdy nižší teplota nemohla negativně ovlivnit životaschopnost dané linie much. Generační doba při 25°C trvá přibližně 10 dní, při 18°C přibližně 19 dní.

Za účelem výběru much pro křížení bylo potřeba mouchy uspat. Uspání s provádělo zavedením oxidu uhličitého (CO₂) do lahvičky. Po uspání byly mouchy umístěny na propustnou destičku, kterou proudil oxid uhličitý a udržoval mouchy uspané. Tak bylo možné pomocí stereomikroskopu (Olympus SZ51; zvětšení 8-40x) vybrat požadované jedince (nespášené samice, jedince nesoucí určitou fenotypovou značku atd.). Vybraní jedinci byli umístěni do nové lahvičky.

3.3.2. Výchozí linie

Za účelem získání genotypů pro testování bylo potřeba provést křížení o několika krocích. Při křížení bylo využíváno balancerových chromosomů nesoucích fenotypové značky, aby bylo možné v potomstvu každého kroku křížení spolehlivě rozlišit jedince požadovaného genotypu, kteří byli vybíráni pro další krok.

Genotypy linií použitých v této práci:

- *Sco / CyO GFP ; adgf-a^{Karel} / TM3_{Ser}:GFP*
- *+ / + ; adgf-a^{Karel} / TM6B*
- *FlyFos-adgf-A:GFP / FlyFos-adgf-A:GFP ; + / +*
- *Sco / CyO:GFP ; adgf-a^{Karel} / TM3_{Ser}:GFP*
- *+ / + ; adgf-a^{Gerda} / TM3_{Ser}:GFP*
- *+ / + ; adgf-a^{Karel} / TM3_{Ser}:GFP*

Zápis genotypu vždy sestává ze dvou částí oddělených středníkem: první je uveden genotyp pro II. chromosom, druhý je genotyp pro III. chromosom. Vysvětlení jednotlivých zápisů uvádí tabulka I.

3.3.3. Mutantní alely

Pro přípravu cílové linie mutantní v genu adenosin deaminasy na třetím chromosomu bylo použito dvou mutantních alel tohoto genu. Byly použity alely *adgf-a^{Karel}* a *adgf-a^{Gerda}*, které byly uměle vytvořeny homologní rekombinací v rámci analýzy genů ADGF (Doležal et al., 2003). Obě alely nesou inaktivující mutaci tj. jejich expresí vzniká nefunkční

protein. Každá z těchto alel však byla vytvořena nezávislou mutační událostí a udržována v oddělené linii. Použití takto nezávisle vytvořených alel (fenotypově totožných) je vhodné proto, že se tak výrazně snižuje pravděpodobnost možné vedlejší mutace, která mohla při vytváření a udržování linií vzniknout na třetím chromosomu a přenášet se ve vazbě se sledovanou alelou. Tím se docílí vysoká míra jistoty, že výsledný fenotyp bude pouze projevem mutace v genu ADGF-A s minimálním rizikem vlivu dalších mutací. Jako mutantní genotyp je v této práci označována kombinace $adgf-a^{Karel} / adgf-a^{Gerda}$ vzhledem k fenotypové totožnosti obou alel, pokud není uvedeno jinak.

Tabulka I: Vysvětlení genotypových zápisů

zápis	popis
+	standardní alela nebo chromosom
adgf-a^{Karel}	mutantní alela v genu ADGF-A na III. chromosomu
adgf-a^{Gerda}	mutantní alela v genu ADGF-A na III. chromosomu
CyO	balancerová varianta II. chromosomu nesoucí dominantní fenotypovou značku <i>Curly</i> , která se projevuje křídly zahnutými nahoru
TM3_{Ser}	balancerová varianta III. chromosomu nesoucí dominantní fenotypovou značku <i>Serrate</i> , která se projevuje vykrojenými křídly
TM6B	balancerová varianta III. chromosomu nesoucí dominantní fenotypovou značku <i>Tubby</i> , která se projevuje zhuštěnými chlupy v oblasti humeru a kratšími larvami a kuklami.
Sco	Dominantní značka na druhém chromosomu, která se projevuje absencí chlupů na štítku v zadní části thoraxu.
GFP	Zelený fluorescenční protein: dominantní značka, která se projevuje fluorescencí po ozáření světlem vhodné vlnové délky (viz 2.4.2.).

3.3.4. Křížení

3.3.4.1. Obecný postup

Před prvním krokem křížení se do připravených lahvíček s krmným médiem umístí skupiny jedinců rodičovských linií (obvykle stačí jedna lahvíčka po 20 mouchách pro každou linii), která obsahuje samice i samce. Mouchy se nechají naklást embrya do

krmného média a poté jsou dospělci z lahviček přemístěni (obvykle po dvou dnech nebo později podle potřeby). Když je potřeba zajistit větší počet potomků (např. pokud chceme z potomků vybírat vzácnější genotypovou kombinaci), přemísťujeme skupiny jedinců rodičovských linií opakovaně do dalších lahviček. Po deseti dnech (při 25°C) od nasazení rodičovských linií se v lahvičkách začnou z líhnout nová imaga (dospělci).

Aby bylo možné použít mouchy pro křížení, je nutné vybírat nespářené samice. Při tom se využívá skutečnosti, že přibližně 8 hodin po vylíhnutí nejsou samice schopné páření. Čerstvě vylíhnuté nespářené samice je možné rozlišit podle světlého zbarvení těla a viditelného mekonie. Samce je možné vybrat prakticky kdykoli po vylíhnutí.

Vybrané mouchy vhodných genotypů se dávají křížit. Nespářené samice jedné rodičovské linie a samci druhé jsou postupně umisťováni společně do lahvičky. Pokud nesledujeme znaky spojené s pohlavními chromosomy, většinou nezáleží na tom, od které linie použijeme samce a od které samice. Obvykle provádíme ještě reciproké křížení. Do jedné lahvičky dáváme přibližně 15 – 20 samic a 3 – 5 samců případně méně při zachování tohoto poměru. Abychom měli potomstvo rozložené do více lahviček, bývá vhodné po několika dnech křížené dospělé opět přesunout do nové lahvičky. Po deseti dnech od umístění prvních rodičovských jedinců se začne líhnout potomstvo. V některých případech provádíme selekci pro další kroky křížení už ve stadiu kukel nebo larev. Jedince vybrané z potomstva dáváme dále křížit stejným způsobem.

Při křížení je nutné postupovat tak, abychom získali potomstvo, v němž bude možné spolehlivě rozpoznat genotypy, které nás zajímají. K tomu se využívá balancerových chromosomů nesoucích fenotypové značky. Křížíme-li rodičovské jedince nesoucí recesivní mutace nebo alely nad různě označenými balancery (tzn. mutace nebo alela leží na jednom normálním chromosomu, zatímco jeho balancerový homolog obvykle nese v daném lokusu standardní alelu), potomci takového křížení ponese mutaci od jednoho z rodičů vždy nad balancerem od toho druhého a tak je snadno rozpoznáme podle fenotypové značky použitého balanceru. To je umožněno neschopností balancerů podstupovat rekombinaci. Počet možných genotypových kombinací je tak redukován pouze na kombinace rodičovské pro každý chromosom, zatímco rekombinantní kombinace nevznikají.

3.3.4.2. Příprava cílového genotypu

V rámci této práce bylo prováděno hlavní křížení o čtyřech krocích s cílem zavést konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* do pozadí mutantního *adgf-a* (tedy získat cílový genotyp, který byl podroben testování vitality). Schéma hlavního křížení ukazuje obrázek 1.

V prvním kroku křížení byla zavedena mutantní alela *adgf-a^{Karel}* do pozadí vhodných balancerů. Z šesti genotypových kombinací vznikajících tímto křížením byly vybrány dvě, které byly dále kříženy mezi sebou v kroku 2a. Jelikož dominantní značka *Sco* v rodičovské linii kroku 2a není balancovaná, bylo nutné zabránit rekombinaci. K tomu bylo využito skutečnosti, že u samců *D. melanogaster* k rekombinaci přirozeně nedochází a tak byli od genotypu *Sco/+ ; adgf-a^{Karel}/TM3_{Ser}:GFP* pro křížení vybráni pouze samci.

Současně s krokem 2a byl prováděn krok 2b, který zavedl konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* do pozadí vhodných balancerů. Z každého křížení kroku 2 byli vybráni jedinci jednoho genotypu a kříženi mezi sebou v kroku 3. Tím byla připravena linie o genotypu *FlyFos-adgf-A:GFP / CyO:GFP ; adgf-a^{Karel}/TM3_{Ser}:GFP* pro následný finální krok křížení.

Před finálním (čtvrtým) krokem hlavního křížení a následným experimentem s vitalitou byla tato linie podrobena ověření přítomnosti konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* a mutantní alely *adgf-a^{Karel}* (viz 3.3.4.4.).

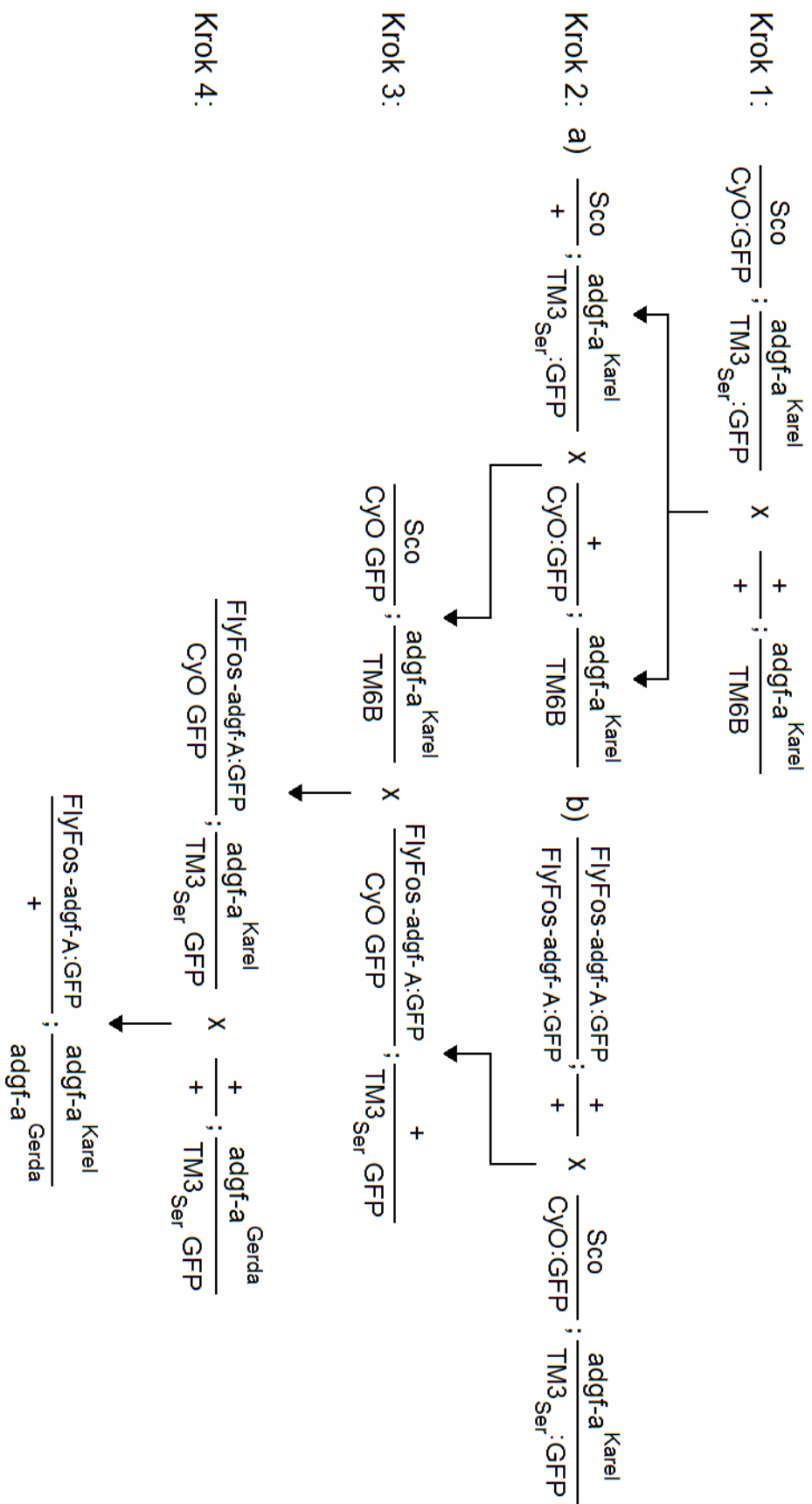
Aby byl z posledního kroku křížení získán dostatečně vysoký počet potomků cílového genotypu pro experiment s vitalitou, bylo nutné před vlastním čtvrtým krokem namnožit rodičovské linie, tj. linii uvedenou výše, získanou ve třetím kroku, a linii nesoucí mutantní alelu *adgf-a^{Gerda}*.

Ve čtvrtém kroku křížení tedy vznikalo potomstvo cílového mutantního genotypu *FlyFos-adgf-A:GFP / CyO:GFP ; adgf-a^{Karel}/adgf-a^{Gerda}*, který byl podroben experimentu s vitalitou.

Současně se čtvrtým krokem hlavního křížení probíhalo jednokrokové křížení pro získání obou kontrol (viz 3.3.4.3.). Také rodičovské linie tohoto křížení byly předtím dostatečně namnoženy.

3.3.4.3. Kontroly

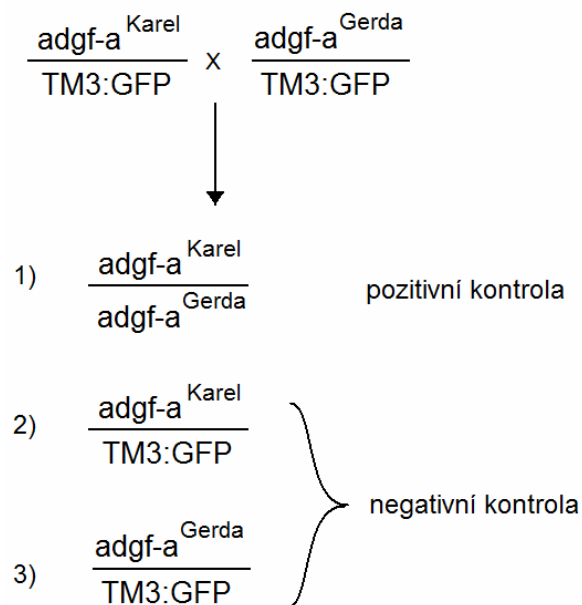
Cílový genotyp *FlyFos-adgf-A:GFP/+ ; adgf-a^{Karel}/adgf-a^{Gerda}* byl podroben experimentu na určení vitality. Aby bylo možné rozhodnout, zda je vitalita jedinců cílového genotypu nějak ovlivněna, bylo nutné připravit kontroly, se kterými mohou být



Obrázek 1: Schéma hlavního křížení.

údaje cílového genotypu porovnávány. Tyto kontroly byly dvě: pozitivní a negativní. Negativní kontrolu představuje heterozygot pro mutantní alelu, jehož vitalita by neměla být nijak ovlivněna. Jako pozitivní kontrola posloužil mutantní genotyp $adgf-a^{Karel} / adgf-a^{Gerda}$, který by měl vykazovat významně sníženou vitalitu.

Za účelem získání obou kontrol bylo prováděno jednokrokové křížení současně s finálním (čtvrtým) krokem hlavního křížení. Byla křížena linie $adgf-a^{Karel} / TM3_{Ser}:GFP$ s linií $adgf-a^{Gerda} / TM3_{Ser}:GFP$ (schéma je na obrázku 2) za vzniku mutantu a heterozygota v poměru 1:2 (alely $adgf-a^{Karel}$ a $adgf-a^{Gerda}$ jsou fenotypově totožné). Potomci tohoto křížení byli podrobeni experimentu s vitalitou současně s testovaným cílovým genotypem hlavního křížení (viz 3.3.5.).



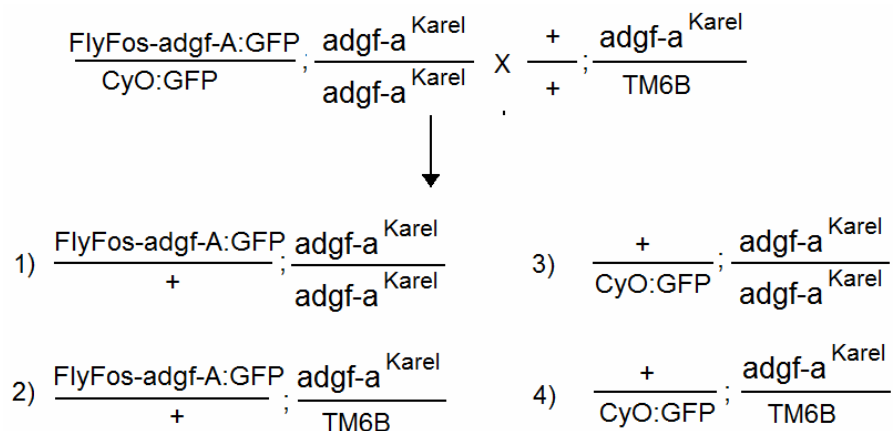
Obrázek 2: Příprava a genotypy kontrol. Křížení probíhalo současně s finálním (čtvrtým) krokem hlavního křížení. Mutantní genotyp sloužil jako pozitivní kontrola a heterozygot jako negativní kontrola. Oba genotypy bylo možné rozpoznat již v časném larválním stadiu podle přítomnosti resp. absence fluorescence GFP.

3.3.4.4. Ověření správnosti křížení

Před posledním (čtvrtým) krokem hlavního křížení byla linie o předpokládaném genotypu $FlyFos-adgf-A:GFP/CyO:GFP ; adgf-a^{Karel}/TM3_{Ser}:GFP$ získaná ve třetím kroku hlavního křížení podrobena testování s cílem ověřit správnost předpokládaného genotypu.

Přítomnost konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP* byla ověřována sledováním přítomnosti červené fluorescenční značky *DsRed*, která je součástí sekvencí vektoru *FlyFos*. Aby se ověřila správnost křížení, bylo nutné, aby tato fluorescenční značka byla pozorována u všech larev testované linie. Její případná nepřítomnost by naznačovala kontaminaci jedinci bez konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP*.

Za účelem ověřit přítomnost mutantní alely *adgf-a^{Karel}* bylo potřeba provést jednoduché křížení. V uvedené testované linii během jejího rozmnožování začalo přibývat jedinců bez balanceru *TM3_{Ser}:GFP* (tj. předpokládaných homozygotů pro mutantní alelu), což mohlo naznačovat buď zachraňující efekt konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP*, který by se prokázal experimentem s testováním vitality, nebo kontaminaci křížení standardní alelou. Toho bylo využito při ověřovacím křížení tak, že byli vybráni jedinci předpokládaného genotypu *FlyFos-adgf-A:GFP/CyO:GFP ; adgf-a^{Karel}/adgf-a^{Karel}*. Tito jedinci byli kříženi s linií o genotypu *adgf-a^{Karel}/TM6B* za vzniku potomstva o čtyřech možných genotypových kombinacích s poměrem 1:1:1:1 (heterozygoti mohli být rovněž použiti, ale za vzniku většího počtu kombinací, což by činilo postup složitějším). ¼ potomstva tedy byla



Obrázek 3: Křížení prováděné za účelem ověření genotypu připraveného hlavním křížením. Pokud bylo hlavní křížení správné, měla by ¼ potomstva vykazovat mutantní fenotyp spojený s významně sníženou vitalitou.

homozygotní pro mutantní alelu *adgf-a^{Karel}* a současně postrádala konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP*. Pokud bylo hlavní křížení správné, měla by tato část potomstva vykazovat významně sníženou vitalitu (dospělců by bylo výrazně méně) a fenotyp spojený s mutací

adgf-a (viz 3.1.4.1.). Ověřovací křížení se provádělo pouze v lahvičkách obvyklým způsobem a určování genotypů potomstva probíhalo ve stadiu dospělců.

3.3.5. Experiment s vitalitou

3.3.5.1. Uspořádání experimentu

Podstatou experimentu je testování vitality cílového genotypu připraveného hlavním křížením proti mutantní a heterozygotní kontrole a to na dvou typech stravy, neboť složení stravy má významný vliv na vitalitu mutantu *adgf-a* (viz 3.1.4.2.).

Rodičovské linie se nechaly křížit (obrázek 1: krok 4 a obrázek 2) a naklást embrya, která se nechala vyvinout v časně larvy. Tyto larvy cílového genotypu a kontrol byly poté vybírány a umístěny do lahviček na příslušnou dietu způsobem popsáným níže (viz 3.3.5.4.).

Testování spočívalo ve sledování počtu jedinců, kteří dosáhnou stadia kukly resp. imaga.

3.3.5.2. Namnožení rodičovských linií

Před vlastním experimentem byly namnoženy všechny rodičovské linie tj. linie pro finální krok hlavního křížení (krok 4 na obrázku 1) a rodičovské linie kontrol (obrázek 2). Tyto linie bylo potřeba namnožit tak, abychom v krátkém čase mohli vybrat dostatečně vysoký počet jedinců (především samic) pro finální krok hlavního křížení a pro křížení prováděné za účelem získání kontrol. Důvodem tohoto vysokého počtu rodičovských jedinců byla nutnost vybrat velký počet potomků finálního křížení a kontrol pro vlastní testování životaschopnosti a následné statistické vyhodnocení. Postupně tedy bylo připraveno 10 – 25 lahviček s mouchami od každé z rodičovských linií.

3.3.5.3. Finální krok křížení a příprava kontrol

Připravené namnožené linie byly nasazeny na čerstvou stravu a po deseti dnech začali být obvyklým způsobem vybíráni samci a nespářené samice pro finální krok křížení a pro křížení na získání kontrol.

Vybrané nespářené samice a samci byli umísťováni do lahviček hned k sobě, aby se stihli spářit.

Přibližně během jednoho týdne byl nasbíráán dostatečný počet jedinců. Finální čtvrtý krok hlavního křížení i křížení pro získání kontrol probíhaly v deseti lahvičkách po přibližně dvaceti samicích a pěti samcích na jednu lahvičku.

Od rodičovské linie získané ve třetím kroku hlavního křížení byly ve finálním kroku použity samice, které tedy byly kříženy se samci linie s mutantní alelou *adgf-a^{Gerda}* (obrázek 1; krok 4).

3.3.5.4. Kladení, přenos embryí a selekce

V této fázi, kdy jsou mouchy vybrány v dostatečném počtu a kříženy, bylo možné pokračovat další fází experimentu, která zahrnovala kladení embryí, následnou selekci a přenos larev a vlastní testování jejich vitality.

Aby se zajistilo, že jedinci testovaných genotypů budou již od začátku živení určenou dietou (0% resp. 5% cukru), nechaly se rodičovské samice klást embrya rovnou do misek obsahujících dietu s příslušným obsahem cukru. Obě diety použité do těchto misek byly kukuřičné (viz 3.3.6.1.). Poté, co mouchy nakladly dostatečné množství embryí, byla tato embrya vhodně ošetřena a následné časné larvy byly vybírány podle genotypu a přenášeny v přesných počtech do lahvíček s příslušnou dietou, kde byla testována jejich vitalita. Přesný postup je popsán níže.

Použité pomůcky a chemikálie:

- Plastové Petriho misky vhodné velikosti.
- Dieta do misek (kukuřičná strava s obsahem 0% resp. 5% glukózy. Příprava: viz 3.3.6.)
- Standardní lahvičky pro chov (viz 3.3.1.)
- Dieta do lahviček (kukuřičná strava s 5% glukózy resp. kvasnicová strava s 0%).
- Duté válce z umělé hmoty o průměru přibližně 6 cm a výšce 10 cm uzavřené z horní strany jemnou sítkou (slouží jako nádoby pro kladení) a ze spodní strany víčkem, do kterého se vkládá Petriho miska se stravou
- Jemná sítko, která zachytí embrya much
- Roztok ethanolu 70%
- Destilovaná a vodovodní voda
- Jemný štětec
- Mikroskop s fluorescenčními filtry pro GFP (Olympus SZX12).
- Preparační jehla

Postup:

- Byly připraveny Petriho misky s kukuřičnou dietou obsahující 5% cukru. Na povrch krmného média bylo namazáno malé množství sušených kvasnic rozmíchaných v destilované vodě (zajistí lepší výživu rodičovským mouchám).
- Všechny mouchy v lahvičkách, kde probíhalo křížení, byly postupně uspány a přesunuty do plastových válců (při tom byly válce sítkou dolů postavené na propustné destičce, kterou proudí oxid uhličitý). Každé křížení bylo přesunuto do jednoho válce (celkem tedy byly dva přibližně po 250 jedincích).
- Válce byly hned přiklopeny Petriho miskou s dietou a nasazeno plastové víčko, které misku drží připevněnou k válci.
- Válce byly umístěny miskami se stravou dolů na tmavé místo (Mouchy se budou dále pářit a začnou v dostatečném množství klást embrya). Takto se nechaly 24 hodin stát (případně i déle; v tom případě je vhodné misku s dietou jednou vyměnit za novou).
- Mezitím byly připraveny misky s dietou, na které se nechají mouchy klást pro následný sběr embryí a selekci larev. Pro první část experimentu byla použita kukuřičná dieta s 5% glukózy, pro druhou část kukuřičná dieta s 0% glukózy (viz 3.3.6.). Na povrch misek se opět daly kvasnice.
- Po uvedených 24 hodinách nebo delší době se daly mouchy klást. Válce byly otočeny a mouchy sklepány na stranu se sítkou (není vhodné uspávat). Opatrně byla vyměněna původní miska za novou misku s příslušnou dietou pro kladení (5% resp. 0% glukózy). Opět byly válce uzavřeny a umístěny jako předtím. Mouchy se nechaly klást 4 hodiny (Krátká doba je důležitá, abychom pracovali s přibližně stejně starým potomstvem).
- Po čtyřech hodinách byly misky s nakladenými embryi odebrány a opět vyměněny za nové misky s výživnou dietou (5% cukru). Válce s mouchami byly umístěny jako předtím.
- Dvojice misek s nakladenými embryi byla přiklopena víčky a nechala se stát 12 hodin.
- Po dvanácti hodinách bylo provedeno promývání embryí a jejich přesun na novou misku. Do misky s nakladenými embryi se nalilo malé množství vody a štětcem byla jemně uvolňována z povrchu krmného média. S vodou byla embrya postupně opláchnuta do jemného sítko, kde se zachytila.

- Embrya byla nejprve propláchnuta destilovanou vodou a poté krátce 70% roztokem ethanolu (hlavní význam tohoto promytí je desinfekce. Dále to pomáhá uvolnění časných larev ze zárodečných obalů).
- Promytá embrya byla štětcem přesunuta na novou Petriho misku se stejnou dietou, ze které budou následně vybírány larvy prvního instaru. Celý postup byl proveden nejprve pro jednu misku (hlavní křížení) a hned poté pro druhou (kontroly).
- Misky s promytými embryi se nechaly stát dalších 12 hodin. Celkem 24 hodin od začátku kladení se z embryí vyvíjejí larvy prvního instaru. V této části tedy byly připravené dvě misky: jedna s potomky finálního kroku křížení (tj. s larvami cílového genotypu) a druhá s larvami obou kontrol. Mohla začít selekce larev.
- Ve stejný čas byly mouchy ve válcích opět nechány na 4 hodiny klást embrya na misky, ze kterých budou vybírána embrya další den při druhém opakování.
- Pro selekci larev bylo nutné připravit si lahvičky s vhodnou dietou, do kterých byly vybrané larvy přenášeny. Pro první opakování bylo připraveno po pěti lahvičkách s dietou pro každý genotyp tj. 5 lahviček pro cílový genotyp, 5 lahviček pro pozitivní a 5 pro negativní kontrolu.
- Selekcce larev probíhala s využitím fluorescenční mikroskopie. Ze všech možných genotypových kombinací, které mohou vzniknout ve finálním kroku křížení, je cílový genotyp možné rozpoznat podle absence fluorescence (tj. absence balanceru označeného GFP. Ačkoli konstrukt FlyFos-adgf-A:GFP také obsahuje zelený fluorescenční protein, exprese tohoto konstrukt se omezuje jen na některé orány a při celkovém pohledu na larvu je její intenzita jen velmi malá). Z misek s potomky finálního kroku hlavního křížení byly tedy vybírány pouze larvy bez jasné fluorescence.
- Z misek s potomky kontrolního křížení byly vybírány oba možné fenotypy tj. larvy s fluorescencí GFP (heterozygoti pro adgf-a; negativní kontrola) i larvy bez ní (mutanti adgf-a; pozitivní kontrola).
- Larvy byly vybírány z misek preparační jehlou pod mikroskopem a přenášeny do lahviček s příslušnou dietou. Do každé lahvičky bylo přenášeno po 25 larvách.
- Na každou dietu byly vybírány larvy ve třech opakováních (vždy po 24 hodinách), tj. procedura od kladení přes promývání po selekci a přenos larev probíhala třikrát pro každou dietu (mouchy ve válcích tedy kladly celkem 6x vždy po 24 hodinách; 3x na stravu s 0% cukru a 3x na stravu s 5%).

- Pro první část experimentu (tj. testování na dietě s 5% glukózy) byla v miskách pro kladení i v lahvičkách na larvy kukuřičná strava s 5% glukózy. Pro druhou část byla v miskách kukuřičná strava s 0% glukózy a v lahvičkách (vlastní testování vitality) byla použita kvasnicová strava s 0% glukózy (Důvodem použití kvasnicové stravy je skutečnost, že kukuřičná strava sama o sobě obsahuje cukry, což by mohlo vést k částečné záchraně mutantních jedinců a ovlivnění výsledků).
- Při jednom opakování bylo tedy vybráno 125 larev od každého ze tří genotypů, což znamená celkem 375 larev každého genotypu v jedné části experimentu s dietou s 5% glukózy. To celé bylo provedeno stejně také v druhé části s dietou s 0% glukózy.
- Přenesené larvy se nechaly v lahvičkách s příslušnou dietou vyvíjet do stadia kukel a dospělců. Při tom byly sledovány případné známky mutantního fenotypu u larev cílového genotypu.
- Relativní vitalita cílového genotypu byla měřena jako počet jedinců, kteří dosáhli stadia kukly a stadia dospělého v porovnání s kontrolami. Byl spočítán počet jedinců, kteří dosáhli stadia kukly a počet dospělců každého z testovaných genotypů. Počty získané pro cílový genotyp, pozitivní a negativní kontrolu byly porovnávány a statisticky testovány.

3.3.6. Diety

Pro experimenty v rámci této práce byly použity tyto typy diet:

- Standardní kukuřičná dieta s 5% sacharózy
- Kukuřičná dieta s 5% glukózy
- Kukuřičná dieta s 0% cukru
- Kvasnicová dieta s 0% cukru

3.3.6.1. Kukuřičné diety

Jako standardní dieta je používáno agarové médium obsahující kvasnice, kukuřičnou mouku a cukr. Současně s přípravou diety se provádí sterilizace chovných lahviček, do kterých je krmné médium následně naléváno.

Pro přípravu 1,5 l standardní diety je potřeba:

- Agar: 15 g
- Instantní kvasnice: 60g
- Kukuřičná mouka: 120 g

- Sacharóza: 75g
- Destilovaná voda
- Konzervans (10% methylparaben v etanolu): 25 ml

Postup při přípravě:

- 1) Lahvičky se nechaly sterilizovat při 180°C po dobu 2 hod.
- 2) Současně se dala vařit kukuřičná mouka v 1,2 l destilované vody 1 hodinu při teplotě 95°C za stálého míchání.
- 3) Agar byl rozmíchán ve 300 ml vody.
- 4) Po jedné hodině vaření se přidal do vařené mouky rozmíchaný agar, cukr a kvasnice. Směs se vařila další hodinu při stejné teplotě a za stálého míchání.
- 5) Před koncem druhé hodiny se snížila teplota na 50°C a přidal konzervans. Směs byla důkladně promíchána. V této fázi byla dieta připravena na rozlití (Při nalévání by lahvičky neměly být už příliš horké ale také ne příliš chladné). Po nalití do lahviček směs vychladla a ztuhla.

Uvedené množství diety postačí pro přípravu přibližně 160 chovných lahviček. Tato standardní dieta byla použita pro chov a křížení much ve všech částech experimentu popsaného výše, kde není uvedeno jinak.

Kukuřičná dieta s 5% glukózy se připravuje stejným způsobem pouze s tím rozdílem, že namísto sacharózy se přidá glukóza. Tato dieta byla použita do misek pro kladení embryí pro následné vybírání a testování vitality na 5% cukru.

Kukuřičná dieta s 0% cukru se připraví rovněž stejným způsobem, ale nepřidá se do ní žádný cukr. Tato dieta byla použita do misek pro kladení embryí pro následné vybírání a testování vitality na 0% cukru.

3.3.6.2. Kvasnicová dieta

Za účelem testování vitality cílového genotypu na dietě bez přidaných sacharidů byla připravena čistě kvasnicová dieta. Tato dieta byla použita pouze do lahviček pro vlastní testování vitality.

Byla připravena dieta o 8% kvasnic a 1,5% agaru podle Žuberové (2011).

Pro přípravu 470 ml 8% kvasnicové diety je potřeba:

- Agar 7,05 g
- Instatntní kvasnice: 37,6 g
- Destilovaná voda

Postup:

- 1) Před vlastní přípravou diety se lahvičky pro chov much sterilizovaly stejným způsobem jako v předchozím případě (viz 3.3.6.1.).
- 2) Navážené množství agaru a kvasnic bylo nasypáno do kádinky s vodou a důkladně promícháno.
- 3) Po doplnění vody na konečný objem 470 ml a promíchání se směs dala vařit do mikrovlnné trouby na 10 minut. Jelikož směs při vaření pěnila, bylo nutné vaření krátce přerušovat (tj. celková doba vaření byla o něco kratší).
- 4) Takto uvařená směs se nechala krátce zchladnout (bez přidávání konzervačních látek) a poté byla rozlita do lahviček, kde dále vychladla a ztuhla.

3.4. Výsledky

3.4.1. Ověření potvrdilo správnost křížení

Pro přípravu cílového genotypu nesoucího konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* bylo prováděno křížení o čtyřech krocích (viz viz 3.3.4.2.; obrázek 1). Ve třetím kroku tohoto křížení byla připravena rodičovská linie cílového genotypu. Předtím, než se tato linie nechala dále křížit za vzniku cílového genotypu, byla podrobena ověření správnosti předpokládaného genotypu (viz 3.3.4.4.), aby se tak vyloučilo riziko případné kontaminace, která mohla nastat chybou v některém z předchozích kroků křížení. Byla testována přítomnost konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* a mutantní alely *adgf-a^{Karel}*.

Pozorování pomocí mikroskopu s fluorescenčními filtry ukázalo, že fluorescenční značka *DsRed* byla přítomna u všech pozorovaných larev testované linie, čímž se potvrdila přítomnost konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP*.

Přítomnost mutantní alely *adgf-a^{Karel}* byla prověřována křížením o jednom kroku (viz obrázek 3) a následným jednoduchým porovnáním vitality dospělců na standardní dietě. Ověřovacím křížením vzniklo potomstvo všech čtyř předpokládaných genotypů. Poměr jednotlivých genotypů výrazně neodpovídal štěpnému poměru 1:1:1:1, který by měl nastat, kdyby se tyto genotypy nelišily životaschopností ($X[P=0,05;df=3] = 128.5$). Z celkového počtu 373 dospělců měli pouze 3 jedinci předpokládaný mutantní genotyp (rozpoznání podle balanceru *CyO:GFP* a současné absence *TM6B*), což odpovídá 0,8%. Tento výsledek je v souladu s poznatkem, že stadia dospělce se dožívají méně než 2% jedinců mutantních v ADGF-A (Doležal et al., 2005).

Ověření tedy neukázalo žádný náznak kontaminace a potvrdilo předpokládaný genotyp linie připravené pro finální krok hlavního křížení.

3.4.2. Konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* zachraňuje mutantní jedince na obou typech stravy

Jak bylo předpokládáno, negativní kontrola představovaná heterozygoty pro mutantní alelu *adgf-a*^{Karel} vykazovala vysokou vitalitu na obou typech diety (85,3% resp. 91,5% pro dospělé na 0% resp. 5% glukózy), přičemž mezi dietami nebyl významný rozdíl. Pozitivní kontrola představovaná mutantem (*adgf-a*^{Karel} / *adgf-a*^{Gerda}) ukázala významně sníženou vitalitu (1,1% resp. 10,4% pro dospělé na 0% resp. 5% glukózy), přičemž vitalita na 5% dietě byla významně vyšší, než na 0% ($p < 0,01$ pro kukly i dospělé) U pozitivní kontroly byly na obou typech diety pozorovány známky mutantního fenotypu (melanózní tumory a rozpad tukového tělesa).

Mutantní jedinci s konstruktem *FlyFos-adgf-A:GFP* (cílový genotyp) rovněž vykazovali vysokou vitalitu. Ani na jednom typu diety nebyl zjištěn významný rozdíl ve vitalitě tohoto genotypu oproti negativní kontrole ($p = 0,87$ resp. $0,96$ pro 0% resp. 5%) a také mezi jednotlivými dietami nebyl významný rozdíl ($p = 0,998$). Rovněž nebyly pozorovány žádné známky mutantního fenotypu. Konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* tedy průkazně zachraňuje mutantní jedince. Výsledky statistického porovnání získaných dat ukazují tabulky II a III. Grafické porovnání jednotlivých genotypů na obou typech stravy je na obrázku 4.

3.5. Diskuse

3.5.1. Neobvykle vysoká vitalita pozitivní kontroly na 5% dietě

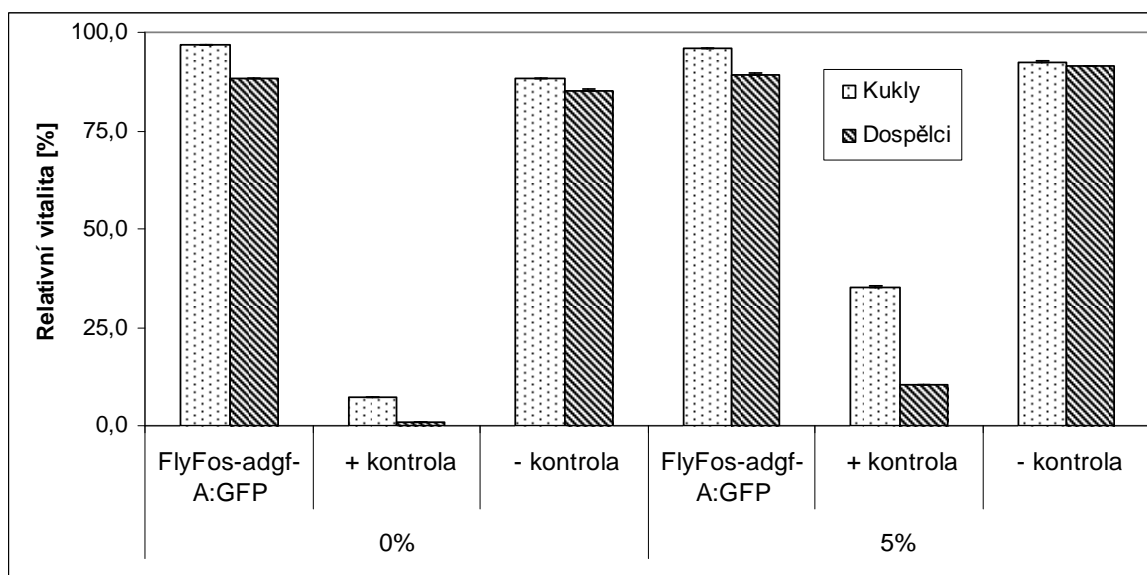
Ačkoli mutantní genotyp *+ / CyO:GFP ; adgf-a*^{Karel} / *adgf-a*^{Karel} připravený při ověřování správnosti křížení (viz 3.3.4.2.; obrázek 3) vykazoval v souladu s očekáváním vitalitu dospělců nižší než 2%, při vlastním experimentu s vitalitou cílového genotypu (viz 3.3.5.) na dietě s 5% glukózy ukázal mutantní genotyp *+ / + ; adgf-a*^{Karel} / *adgf-a*^{Gerda} (+ kontrola) vitalitu dospělců 10,4 %, což je v rozporu s očekávanou hodnotou nižší než 2%. Tento výsledek může souviset se skutečností, že mutantní jedinci získaní při ověřování nesli navíc balancer *CyO*, který mohl dále přispívat ke snížení vitality, zatímco jedinci cílového genotypu byli bez balanceru. Také procedury zacházení s embryi a larvami mohly sehrát jistou úlohu (Promývání etanolem zajistí desinfekci a usnadní časným larvám uvolnění ze zárodečných obalů, což se může pozitivně promítnout na životaschopnosti).

Tabulka II: Výsledky statistického porovnání vitality testovaného cílového genotypu a kontrol na obou typech stravy pro kukly. V horním řádku a v prvním sloupci zleva jsou uvedené testované genotypy; Čísla tučným písmem ukazují, že příslušné genotypy a diety v daném řádku a sloupci se od sebe statisticky významně liší (Tukey HSD test; variable Kukly Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5,8317, df = 84,000).

Kukly	FlyFos- adgf- A:GFP (0%)	+ kontrola (0%)	- kontrola (0%)	FlyFos- adgf- A:GFP (5%)	+ kontrola (5%)	- kontrola (5%)
FlyFos-adgf- A:GFP (0%)		0,00012	0,16158	0,99992	0,00012	0,83106
+ kontrola (0%)	0,00012		0,00012	0,00012	0,00012	0,00012
- kontrola (0%)	0,16158	0,00012		0,25232	0,00012	0,83106
FlyFos-adgf- A:GFP (5%)	0,99992	0,00012	0,25232		0,00012	0,92223
+ kontrola (5%)	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012		0,00012
- kontrola (5%)	0,83106	0,00012	0,83106	0,92223	0,00012	

Tabulka III: Výsledky statistického porovnání vitality testovaného cílového genotypu a kontrol na obou typech stravy pro dospělé. V horním řádku a v prvním sloupci zleva jsou uvedené testované genotypy; Čísla tučným písmem ukazují, že příslušné genotypy a diety v daném řádku a sloupci se od sebe statisticky významně liší (Tukey HSD test; variable Dospělci Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3,1889, df = 84,000)

Dospělci	FlyFos- adgf- A:GFP (0%)	+ kontrola (0%)	- kontrola (0%)	FlyFos- adgf- A:GFP (5%)	+ kontrola (5%)	- kontrola (5%)
FlyFos-adgf- A:GFP (0%)		0,00012	0,86987	0,99855	0,00012	0,82255
+ kontrola (0%)	0,00012		0,00012	0,00012	0,00749	0,00012
- kontrola (0%)	0,86987	0,00012		0,64386	0,00012	0,18573
FlyFos-adgf- A:GFP (5%)	0,99855	0,00012	0,64386		0,00012	0,96351
+ kontrola (5%)	0,00012	0,00749	0,00012	0,00012		0,00012
- kontrola (5%)	0,82255	0,00012	0,18573	0,96351	0,00012	



Obrázek 4: Porovnání relativní vitality cílového genotypu *FlyFos-adgf-A:GFP* / + ; *adgf-a^{Karel}* / *adgf-a^{Gerda}* (zde označeného jako *FlyFos-adgf-A:GFP*) a kontrol na dietách obsahujících 0% a 5% glukózy. Údaje jsou vyneseny v procentech celkového množství vybraných larev \pm SEM.

Navíc cílový genotyp nesl dvě různé mutantní alely (*adgf-a^{Karel}* / *adgf-a^{Gerda}*), zatímco mutant připravený za účelem ověření genotypu byl homozygotní pro alelu *adgf-a^{Karel}*. Nicméně vitalita kukel i dospělců byla průkazně nižší oproti negativní kontrole a byl také pozorován mutantní fenotyp. Navíc na stravě s 5% glukózy je u pozitivní kontroly patrný rozdíl ve vitalitě kukel a dospělců, což v souladu s očekáváním ukazuje vysokou letalitu ve stadiu kukly.

3.5.2. Konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* jako vhodný reportér genové exprese

Jak bylo uvedeno v předchozích částech práce (viz 3.1.2.), konstrukt *FlyFos-adgf-A:GFP* již byl úspěšně použit jako reportér genové exprese při studiu proteinů zapojených v metabolismu adenosinu (Fencková, 2011). Experiment popsany výše ukázal, že fúzní protein sestávající z funkční adenosin deaminasy a GFP, který vzniká expresí konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP*, nahrazuje původní adenosin deaminasu a postačuje k záchraně mutantních jedinců. Experiment neukázal, že by adenosin deaminasová aktivita fúzního proteinu byla jakkoli negativně ovlivněna. Tento výsledek podporuje vhodnost konstruktů *FlyFos-adgf-A:GFP* jako reportéru genové exprese.

3.6. Závěr

Křížením byla úspěšně připravena linie much *D. melanogaster*, která nesla konstrukt FlyFos-adgf-A:GFP na druhém chromosomu v pozadí mutantního genu hlavní a nejdůležitější adenosin deaminasy u tohoto druhu, ADGF-A. Tato linie byla podrobena testování vitality proti kontrolám na dvou typech stravy. Experiment ukázal, že adenosin deaminasová aktivita fúzního proteinu ADGF-A:GFP je dostačující k záchraně jedinců mutantních v původním lokusu. Nebyl pozorován jakýkoli náznak snížené vitality, která by indikovala negativní účinek fluorescenční značky GFP na enzymatickou aktivitu fúzního proteinu. Toto zjištění podporuje vhodnost fúzního proteinu pro použití jako reportéru genové exprese.

4. Použitá literatura

Abbott, C.M., Skidmore, C.J., Searle, A.G. and Peters, J., 1986. Deficiency of adenosine deaminase in the wasted mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 693-695

Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11984-11989

Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Kurth, R., Pearson, R.K. and Gehring, W.J., 1989. P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes and Development*, 3: 1288-1300

Blackburn, M.R., Datta, S.K. and Kellems, R.E., 1998. Adenosine Deaminase-deficient Mice Generated Using a Two-stage Genetic Engineering Strategy Exhibit a Combined Immunodeficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 5093–5100

Blackwood, E.M. and Kadonaga, J.T., 1998. Going the Distance: A Current View of Enhancer Action. *Science*, 281: 60-63

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

Brand, A. 1995. GFP in *Drosophila*. *Trends in Genetics* 11: 324-325

Brand, A., 1999. GFP as a cell and developmental marker in the *Drosophila* nervous system. *Methods in Cell Biology*, 58: 165-181

Casadaban, M.J. and Cohen, S.N., 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4530-4533

Casso, D., Weber, F.A.R. and Kornberg, T.B., 1999. GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 88: 229 – 232

Cha, B.J., Koppetsch, B.S. and Theurkauf, W.E., 2001. In Vivo Analysis of *Drosophila* bicoid mRNA Localization Reveals a Novel Microtubule-Dependent Axis Specification Pathway. *Cell*, 106: 35–46

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802-805

Cooley, L., Kelley, R. and Spradling, A., 1988. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science*, 239: 1121-1128

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20: 448-455

- Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*, 38:107-125
- 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
- Doležal, T., Doleželová, E., Žurovec, M. and Bryant, P.J., 2005. A Role for Adenosine Deaminase in *Drosophila* Larval Development. *PLoS Biology*, 3: 1213-1224
- Doleželová, E., 2004. Adenosine deaminases and adenosine receptors in *Drosophila melanogaster*: Ph.D. Thesis, in English – p61., Faculty of biological Sciences, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic.
- Doleželová, E., Zurovec, M., Dolezal, T., Simek, P., Bryant, P.J., 2005. The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 381-389
- Doleželová, E., Nothacker, H.P., Civelli, O., Bryant, P.J. and Zurovec, M., 2007. A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 318–329
- Duffy, J.B., 2002. GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis*, 34: 1–15
- Ejsmont, R.K., Sarov, M., Winkler, S., Lipinami, K.A. and Tomancak, P., 2009. A toolkit for high throughput, crossspecies gene engineering in *Drosophila*. *Nat Methods*, 6: 345 - 347
- Elliott, D.A. and Brand A.H., 2008. The GAL4 System. A Versatile System for the Expression of Genes. *Methods Mol. Biol.*, 420: 79 – 95
- Engineer, C.B., Fitzsimmons, K.C., Schmuke, J.J., Dotson, S.B. and Kranz1, R.G., 2005. Development and evaluation of a Gal4-mediated LUC/GFP/GUS enhancer trap system in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 5: 1 – 15
- Fencková, M., 2011. Role of extracellular adenosine in *Drosophila*. Ph.D. Thesis. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic
- Fowler, A.V. and Zabin, I., 1970. The Amino Acid Sequence of β -Galactosidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245: 5032-5041
- Gerdes, H. and Kaether, C., 1996. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Letters*, 389: 44-47

- Giblett, E.R., Anderson, J.E., Cohen, F., Pollara, B. and Meuwissen, H.J., 1972. Adenosine-Deaminase Deficiency in Two Patients with Severely Impaired Cellular Immunity. *The Lancet*, 300: 1067 -1069
- Giniger, E., Varnum, S. M. and Ptashne, M., 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, 40: 767–774
- Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T.B., 1990. Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila engrailed* promoter. *Genes and Development*, 4: 1079-1093
- Han, D.D., Stein, D., Stevens L.M., 2000. Investigating the function of follicular subpopulations during *Drosophila* oogenesis through hormone-dependent enhancer-targeted cell ablation. *Development*, 127:573–583
- Hartwell, L.H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E., Silver, L.M. and Veres, R.C.: Genetic portrait of the fruit fly. In: *Genetics: from genes to genomes*. Boston, McGraw-Hill Higher Education, 2000. 1st edition. ISBN 0-07-540923-2. p. 702-730
- Hashimoto, H., Kikuchi, Y., Nogi, Y., and Fukasawa, T., 1983. Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the regulatory gene GAL4. *Mol. Gen. Genet.*, 191: 31–38
- Hazelrigg, T., Watkins, W.S. Marcey, D., Tu, Ch., Karow, M. and Lin, X., 1990. The exuperantia Gene Is Required for *Drosophila* Spermatogenesis as Well as Anteroposterior Polarity of the Developing Oocyte, and Encodes Overlapping Sex-Specific Transcripts. *Genetics*, 126: 607-617
- Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y., 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12501-12504
- Heim, R., Cubitt, A.B. and Tsien, R.Y., 1995. Improved green fluorescence. *Nature*, 373: 663-664
- Heim, R. and Tsien, R.Y., 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelenghts and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6: 178-182
- Jacobson, R.H., Zhang, X.-J., DuBose, R.F. and Matthews, B.W., 1994. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E.coli*. *Nature*, 369: 761 – 766
- Karess, R.E. and Rubin, G.M., 1984. Analysis of P Transposable Element Functions in *Drosophila*. *Cell*, 36: 135-146
- Kassis, J.A., 1990. Spatial and temporal control elements of the *Drosophila engrailed* gene. *Genes & Development*, 4: 433-443

- Kolovos, P., Knoch, T.A., Grosveld, F.G., Cook, P.R. and Papantonis A., 2012. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics & Chromatin*, 5: Article Number: 1
- Korz, V., 2007. Transposons as tools for enhancer trap screens in vertebrates. *Genome Biology*, 8: Suppl 1, Article S8
- Laski, F.A., Rio, D.C. and Rubin, G.M., 1986. Tissue Specificity of Drosophila P Element Transposition Is Regulated at the Level of mRNA Splicing. *Cell*, 44: 7-19
- Laughon, A., and Gesteland, R.F., 1984. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 4: 260-267
- Lee, T. and Luo, L., 1999. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*, 22: 451–461
- Leffel, S.M., Mabon, S.A. and Stewart, C.N., 1997. Applications of Green Fluorescent Protein in Plants. *BioTechniques* 23: 912-918
- Lewandoski, M., 2001. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*, 2: 743-755
- Lukacsovich, T., Asztalos, Z., Awano, W., Baba, K., Kondo, S., Niwa, S. and Yamamoto, D., 2001. Dual-Tagging Gene Trap of Novel Genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 157: 727–742
- Lund, V.K., DeLotto, Y. and DeLotto, R., 2011. A set of P-element transformation vectors permitting the simplified generation of fluorescent fusion proteins in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 5: 255-260
- 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
- March, J.C., Rao, G. and Bentley, W.E., 2003. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 303-315
- Matsumoto, K., Toh-e, A. and Oshima, Y., 1978. Genetic control of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for constitutive expression of the positive regulatory gene gal4. *J. Bacteriol.*, 134: 446–457
- Matsushita, T., Fujii-Taira, I., Tanaka, Y., Homma, K.J. and Natori, S., 2000. Male-specific IDGF, a Novel Gene Encoding a Membrane-bound Extracellular Signaling Molecule Expressed Exclusively in Testis of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of biological chemistry*, 275: 36934–36941
- Matthews, B.W., 2005. The structure of *E. coli* beta-galactosidase. *C.R. Biologies*, 328: 549-556

- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. and Lukyanov, S.A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature biotechnology*, 17: 969-973
- Mawhinney, R.M., Staveley, B.E., 2011. Expression of GFP can influence aging and climbing ability in *Drosophila*. *Genet Mol Res.*, 10: 494 – 505
- McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K. and Davis, R.L., 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science*, 302: 1765–1768
- Miklos, G.L. and Rubin, G.M., 1996. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell*, 86: 521-529
- Morin, J.G. and Hastings, J.H., 1971. Energy transfer in a bioluminescent system. *Journal of Cellular Physiology*, 77: 313 – 318
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., Sonant, J., 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13: 2656–2662
- Oh, S.W., Kingsley, T., Shin, H., Zheng, Z., Chen, H.W., Chen, X., Wang, H., Ruan, P., Moody, M. and Hou, S.X., 2002. A P-Element Insertion Screen Identified Mutations in 455 Novel Essential Genes in *Drosophila*. *Genetics*, 163: 195-201
- O’Kane, C.J. and Gerhing, W.J., 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9123 – 9127
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J., 1996. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science*, 273: 1392-1395
- Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H. and Keshishian, H., 2001. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 12596–12601
- Phelps, C.B. and Brand, A.H., 1998. Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*, 14: 367–379
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233
- Prasher, D.C., 1995. Using GFP to see the light. *Trends Genet.*, 11: 320-323
- Riazi, M. A., Brinkman-Mills, P., Nguyen, T., Pan, H.Q., Phan, S., Ying, F., Roe, B.A., Tochigi, J., Shimizu, Y., Minoshima, S., Shimizu, N., Buchwald, M. and McDermid, H.E., 2000. The human homolog of insect-derived growth factor CECR1, is a candidate gene for features of cat eye syndrome. *Genomics*, 64: 277–285
- Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M. and Pozzan, T., 1995. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Current Biology*, 5: 635 – 642

- Robertson, H.M., Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Bern, W.K. and Engels, W.R., 1988. A Stable Genomic Source of P Element Transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 118: 461-470
- Roman, G., Endo, K., Zong, L., Davis, R.L., 2001. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 12602–12607
- Rong, Y.S., Titen, S.W., Xie, H.B., Golic, M.M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., Brodsky, M., Rubin, G.M. and Golic, K.G., 2002. Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.*, 16: 1568-1581
- Rouwenhorst, R.J., Pronk, J.T. and van Dijken, J.P., 1989. The discovery of beta-galactosidase. *Trends Biochem. Sci.*, 14: 416-418
- Rubin, G.M., Spradling, A.C., 1982. Genetic-transformation of drosophila with transposable element vectors. *Science*, 218: 348-353
- Ryder, E. and Russell S., 2003. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*. *Briefings in functional genomics and proteomics*, 2: 57–71
- Shiga, Y., Tahala-Matakatsu, M. and Hayashi, S., 1996. A nuclear GFP/ β -galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living *Drosophila*. *Develop. Growth. Differ.*, 38: 99 – 106
- Singh, A., 1995. Enhancer trap technique – A novel tool for identification and developmental characterization of *Drosophila* genes. *Current Science*, 68: 517 – 525
- Smith, D., Wohlgemuth, J., Calvi, B.R., Franklinton, I. and Gelbart, W.M., 1993. *hobo* Enhancer Trapping Mutagenesis in *Drosophila* Reveals an Insertion Specificity Different from P Elements. *Genetics*, 135: 1063-1076
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M., 1982. Transposition of cloned P-elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 218: 341-347
- Timmons, L., Becker, J., Barthmaier, P., Fyrberg, C., Shearn, A. and Fyrberg, E., 1997. Green Fluorescent Protein/ β -galactosidase Double Reporters for Visualizing *Drosophila* Gene Expression Patterns. *Developmental Genetics*, 20: 338–347
- Tsien, R.Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem*, 67: 509–44
- Vef, O., Cleppien, D., Loffler, T., Altenhein, B. and Technau, G.M., 2006. A new strategy for efficient in vivo screening of mutagenized *Drosophila* embryos. *Dev. Genes Evol*, 216: 105–108
- Wakamiya, M., Blackburn, M.R., Jurecic, R., McArthur, M., Geske, R.S., Cartwright, J., Jr., Mitani, K., Vaishnav, S., Belmont, J.W., Kellems, R.E., Finegold, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Bradley, A. and Caskey, C.T., 1995. Disruption of the adenosine deaminase gene

causes hepatocellular impairment and perinatal lethality in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3673-3677

Wang, S. and Hazelrigg, T., 1994. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, 369: 400 – 403

Ward, W.W., Cody, C.W., Hart, R.C., Cormier, M.J., 1980. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in renilla and aequorea green-fluorescent proteins *Photochemistry and Photobiology*, 31: 611 – 615

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79: 1858-1862

Wilson, C., Pearson, R.K., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Grossniklaus, U. and Gehring W.J., 1989. P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes and Development*, 3: 1301-1313

Yang, F., Moss, L.G. and Phillips, G.N., 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 10: 1246 – 1251

Yeh, E., Gustafson, K. and Boulianne, G.L., 1995. Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7036-7040

Zimmer, M., 2002. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev*, 102: 759-781

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

Zuberova, M., 2011. The role of adenosine signaling pathway in regulation of metabolic reserves. Ph.D. Thesis, University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic, 76 pp

Zurovec, M., Dolezal, T., Gazi, M., Pavlova, E., Bryant, P.J., 2002. Adenosine deaminase related growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99: 4403–4408