

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Katedra molekulární biologie

**Mikro-RNA interference adenosinového receptoru u modelového
organismu *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Vypracoval: Tomáš Gregor

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

České Budějovice 2013

Gregor, T., 2013: Mikro-RNA interference adenosinového receptoru u modelového organismu *Drosophila melanogaster* [Micro-RNA interference of adenosine receptor in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis in Czech] – 38p, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

Anotation

The aim of my bachelor thesis was to test the construct for micro-RNA interference ShmiR2, targeted against drosophila only adenosine receptor *AdoR*. *Drosophila adoR* mutants were proved to be viable and when combined with adenosine deaminase mutation *adgf-a*, the *adoR* mutation fully rescued the *adgf-a* lethality. Previous results also suggest the possibility of tissue specific action of adenosine signalling, therefore our goal was to further examine this phenomenon by tissue specific knockdown of *AdoR* and analyzing it's effect on viability of the flies.

Cílem mé bakalářské práce bylo ověřit funkčnost konstruktů pro mikro-RNA interferenci shmiR2, cílenému proti jedinému adenosinovému receptoru octomilky *AdoR*. Octomilky mutantní v genu pro *AdoR* receptor jsou životaschopné a v kombinaci s *adgf-a* mutací plně zachraňují její negativní efekt. Předchozí výsledky naznačovaly možnost, že adenosinová signalizace může mít rozdílný význam v různých tkáních, naším cílem tedy bylo tento jev více prozkoumat tkáňově specifickým knockdownem *AdoR* receptoru a analýzou jeho efektu na životnost těchto octomilek.

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, 26. 4. 2013

.....

Tomáš Gregor

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D. za příležitost podílet se na jeho výzkumu, za podnětné diskuse, cenné rady a trpělivost, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěl poděkovat mým kolegům z laboratoře, především Adamovi Bajgarovi, Lucii Jonátové a Kateřině Kučerové za jejich ochotu, trpělivost a skvělou pracovní atmosféru. Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za povzbuzení a podporu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Octomilka jako modelový organismus	1
1.2 Adenosin	1
1.3 Adenosinový metabolismus	1
1.4 Adenosin deamináza	2
1.5 Adenosinová signalizace u octomilky	3
1.6 Adenosinové receptory	3
1.6.1 A1 receptor	4
1.6.2 A2a receptor	4
1.6.3 A2b receptor	4
1.6.4 A3 receptor	5
1.6.5 AdoR receptor	5
1.7 Tkáňově specifická interakce adenosinu a předchozí práce	6
2. RNA interference	6
a) siRNA dráha	7
b) miRNA dráha	8
c) piRNA dráha	8
2.1 Off-targetový efekt	9
2.2 Konstrukty ShmiR	10
2.3 RNA interference a protivirová odpověď octomilky	11
2.3.1 RNA interference	12
2.3.2 Toll signalizace	12
2.3.3 JAK-STAT signalizace	13
3. Cíl práce	14
4. Materiál a metody	15
4.1 Chov a křížení octomilek	15
4.2 Příprava diet	15
4.2.1 Standartní dieta	15
4.2.2 Dieta s 5% glukózy	16
4.2.3 Agarová dieta	16
4.3 Použité linie	16
4.4 Příprava na analýzu vitality	16
5. Výsledky	17
5.1 Křížení	17

5.2 Křížení pro ověření exprese shmiR2.....	19
5.3 Analýza vitality při expresi konstruktů shmiR2 proti AdoR receptoru	21
Statistická analýza	23
ShmiR2 indukovaný v adgf-a mutantním pozadí	23
ShmiR2 indukovaný ve wild type pozadí	23
Vliv adgf-a mutace v rámci jednoho Gal4 driveru.....	23
5.4 Časový vývoj kukel a dospělců při aktivaci RNAi proti AdoR receptoru	24
5.5 Fenotypy experimentálních linií.....	26
6. Diskuse	28
Možná vysvětlení	28
7. Závěr	32
8. Literatura	33
Seznam použitých zkratk a symbolů:	37

1. Úvod

1.1 Octomilka jako modelový organismus

Octomilka obecná (*Drosophila Melanogaster*) je malý dvoukřídlý hmyz patřící do řádu dvoukřídlí (Diptera) a čeledi octomilkovití (*Drosophilidae*). Dnes je jedním z nejpoužívanějších modelových organismů v genetice a molekulární biologii. Mezi jeho výhody patří relativně velká genetická podobnost s člověkem, až 77% genů pro lidská onemocnění má homologické geny v octomilce (Reiter et al. 2001), dále je to velké množství genetických nástrojů, které pro octomilku existují a v neposlední řadě je to její snadný chov a poměrně krátká generační doba.

1.2 Adenosin

Adenosin je purinový nukleosid, který se skládá z molekuly adeninu připojené k ribóze pomocí β -N₉ glykosidické vazby. Může se vyskytovat uvnitř buněk (intracelulární adenosin) a v mezibuněčném prostoru (extracelulární adenosin). Slouží jednak jako strukturální komponenta RNA, DNA a dále molekul podílejících se na energetickém metabolismu – ATP, ADP, AMP, cAMP a NADH, po transportu do extracelulárního prostoru ale slouží jako signální molekula, která aktivuje adenosinové receptory. Výsledek této signalizace závisí na místu uvolnění adenosinu a jeho množství, na druhu, lokalizaci a míře exprese adenosinového receptoru (receptorů) a na množství dalších faktorů, pro její komplexnost ji tedy nelze příliš zobecňovat. Zjednodušeně by se ale dalo říci, že množství adenosinu vypuštěného z buňky odráží její metabolický status, jde tedy o významný stresový signál. Dále má například velký podíl na neurotransmisi, regulaci imunity, krevního oběhu, vyvolávání spánku a mnoha jiných funkcích (B. B. Fredholm et al. 2011).

1.3 Adenosinový metabolismus

Pro signalizaci je důležitá extracelulární forma adenosinu. Ta se z buněk dostává pomocí ekvilibrativních nukleosidových transportérů, které zajišťují oboustranný přenos po koncentračním spádu (u octomilky ENT 1-3, z nichž ENT-2 zřejmě hraje významnou roli v CNS, u člověka ENT 1-4, (Knight et al. 2010). Extracelulární adenosin má mnoho regulačních funkcí působením přes adenosinové receptory. Intracelulární adenosin je za normálních okolností v dynamické rovnováze s ADP a ATP, za normálního metabolismu je přítomen v extracelulárním prostoru v malém množství - 0,08 μ M v hemolymfě larvy 3. instaru (Dolezal et al. 2005), 20-200 nm v krevním séru člověka, (B. B. Fredholm et al. 2011) a je používán k syntéze ADP a ATP. Pokud se buňka dostane do metabolického stresu (anoxie, poškození tkáně nebo infekce), dochází k narušení této rovnováhy, která se výrazně posune ve prospěch ADP, který se nemůže regenerovat zpět na ATP, je degradován na AMP a prostřednictvím 5' nukleotidáz na adenosin, který se pomocí ekvilibrativních nukleosidových transportérů dostává do extracelulárního prostoru. Při poškození buněk se z nich

ATP vylévá přímo do extracelulárního prostoru a u savců působí na purinergní P2X/Y receptory, kterým je přisuzován význam pro nocicepci a regulaci cév, polymorfismy v jejich alelách jsou spojovány například s infarktem (Amisten et al. 2006). Extracelulární ATP je také konvertován na adenosin pomocí série ektoenzymů – nukleotid trifosfát deamináz, které konvertují ATP na ADP a AMP (NTPDázy, CG5276 u *Drosophily*) a ekto 5' nukleotidáz, které tvoří adenosin z AMP (NT5E, CG 4827 u *Drosophily*, Fencková M, 2011). Společné působení ATP a adenosinu na okolní buňky zřejmě hraje významnou roli v regulaci imunitní odpovědi - ATP zpočátku funguje jako silný stresový signál stimulující zánět, zatímco později nastupující adenosinová signalizace funguje protizánětlivě a zřejmě slouží k omezení rozsahu škod vytvořených přehnanou zánětlivou reakcí (Bours et al. 2006). U octomilky se však nenachází receptor pro ATP (Kucerova et al. 2012), tento mechanismus u ní tedy zřejmě chybí.

1.4 Adenosin deamináza

Adenosin deaminázy (Ada) jsou enzymy zodpovědné za nezvratnou katalýzu deoxyadenosinu a adenosinu na deoxyinosin a inosin a jsou hojně zastoupené u mnoha organismů zahrnujících rostliny, bezobratlé i obratlovce (Cristalli et al, 2001). Tento enzym je pro člověka zcela zásadní, jeho mutace má za následek rozvoj onemocnění ADA-SCID (Severe combined immunodeficiency), který představuje asi 15 % všech druhů SCID (Hershfield, 2004). Pacienti mají velmi sníženou T i B větev imunity, jsou náchylní k opakovaným infekcím a bez léčby většinou umírají během prvních pár let života. Fyziologická příčina onemocnění zřejmě spočívá v hromadění deoxyadenosinu, který není konvertován a inhibuje enzym ribonukleotid reduktázu, která tvoří z ribonukleotidů deoxyribonukleotidy a která je esenciální pro tvorbu DNA. Lymfocyty při infekci potřebují rapidně proliferovat a inhibovaný enzym zřejmě nestačí tvořit dost dNTP pro syntézu DNA. Přesný důvod lymfotoxicity však není znám, byl ale prokázán negativní vliv na signalizaci nezralých T lymfocytů v thymu, (která je nutná k jejich zrání), což má za následek jejich apoptózu (Apasov et al. 2001). Deoxyadenosin také interferuje s terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT), která přidává N nukleotidy mezi exony při V(D)J rekombinaci ve zrajících lymfocytech (Mahajan et al. 1999).

Analýza u drozofily objevila 6 genů s vysoce konzervovanou adenosin deaminázovou sekvencí, které vznikly pravděpodobně genovou duplikací a následnou divergencí. Tyto geny sdílejí homologii s takzvaným *IDGF* (insect derived growth factor) i adenosin deaminázou, byly tedy nazvány adenosin deaminase growth factors (*ADGFs*), kromě odstraňování adenosinu a deoxyadenosinu také slouží jako důležité růstové faktory (Zurovec et al. 2002; Kucerova et al. 2012). Tyto enzymy mají různé buněčné lokalizace a zřejmě i funkce (některé nemají zachovanou funkční ada doménu). *ADGF-A* a *ADGF-D* jsou u drozofily nejvíce exprimované, *ADGF-A* hlavně ve střevě a

lymfatických žlázách, *ADGF-D* v tukovém tělese a mozku (Zurovec et al. 2002). *ADGF-A2* a *ADGF-B* jsou exprimovány u samců a nejspíš mají vliv na vývoj pohlavních buněk, ke sterilitě u mutantů ale nedochází, *ADGF-C* a *ADGF-E* jsou dominantněji exprimovány u samců, jsou ale přítomny i u samic (Maier et al. 2001).

U člověka se nachází 2 hlavní geny pro adenosin deaminázu – *ADA1* a *ADA2*. *ADA1* funguje jako monomer i dimer, nachází se především uvnitř buněk, je ale známá i jeho sekretovaná forma. Právě jeho mutace souvisí s dědičným onemocněním ADA – SCID. Proteiny *ADA2* byly poprvé popsány u hmyzu jako růstové faktory, až později u nich byla zjištěna *ADA* aktivita, která je esenciální pro jejich funkci růstových faktorů (Zurovec et al. 2002). *ADA2* má oproti *ADA1* asi 100x nižší K_m , má tedy mnohem větší afinitu k adenosinu. Funguje jako homodimer a nachází se hlavně v plasmě a séru (Zavialov et al. 2010). U člověka je tento enzym kódován genem *CECR-1* (cat eye syndrome critical region-1), jehož duplikace má za následek vrozenou malformaci srdce, málo vyvinuté ledviny, poruchy oka a plic (Riazi et al. 2000), což poukazuje na jeho roli ve správném vývoji. Homolog *ADA2* u drozofily je *adenosine related growth factor A (ADGF-A)*, který je popsán dále.

1.5 Adenosinová signalizace u octomilky

Ke zjištění funkce adenosin deaminázy a významu adenosinu u drozofily vytvořil (Dolezal et al. 2003) pomocí homologní rekombinace mutace v genech pro adenosin deaminázu. Mutace *adgf-a* se projevuje úhynem larev a kukel (v závislosti na množství jednoduchých cukrů v jejich potravě), dezintegrací tukového tělesa, asi sedminásobně zvýšeným množstvím (a předčasnou diferenciací) hemocytů, které jsou pak zodpovědné za tvorbu melanotických tumorů. V dalších experimentech byla zjištěna funkce adenosinu jako anti-insulinového hormonu (Zuberova et al. 2010). Adenosin působením přes AdoR receptor způsobuje glykogenolýzu a zvyšuje hladinu glukózy v hemolymfě, *adgf-a* mutantů jsou tedy velmi citliví na množství cukru v potravě - vyšší hladiny jim umožňují relativně normální vývoj, zatímco nižší vedou k jejich úhynu (Zuberova et al. 2010). Interakce adenosinu a adenosin deamináz zřejmě hraje důležitou roli v regulaci imunitní odpovědi, při nahrazení *ADGF-A* sekvence GFP reportérem se GFP exprimovalo nejvíce v místech silné imunitní reakce – při melanizaci vajíčků parazitické vosičky v kuklách, je tedy možné, že adenosin slouží k mobilizaci energie potřebné ke správné funkci imunitních buněk a ke zdárnému překonání infekce (Novakova and Dolezal 2011).

1.6 Adenosinové receptory

Adenosinové receptory jsou třída purinergních receptorů spřažených s G proteinem, pro které je adenosin hlavní ligand. U savců se vyskytují 4 typy těchto receptorů: A1, A2a, A2b a A3 (Bertil B. Fredholm et al. 2001). Jejich afinita k adenosinu, intracelulární přenos signálu i distribuce

v různých orgánech se liší, což dělá adenosinovou signalizaci velmi komplexní. Primární efektor všech 4 receptorů je adenylát cykláza, která je u receptorů A1 a A3 je inhibována prostřednictvím G_i/G_o proteinu, a u receptorů A2a a A2b stimulována prostřednictvím G_s proteinu (spolu s G_q u A2b receptoru) a následována vznikem cAMP.

1.6.1 A1 receptor

Při aktivaci A1 receptoru dochází k vazbě G_i/G_o proteinu, která způsobí inhibici adenylát cyklázy a následné snížení intracelulární koncentrace cAMP a Ca^{2+} a zároveň aktivaci fosfolipázy C, což vede ke zvýšení hladiny inositol trifosfátu (IP3) a diacylglycerolu (DAG) (Fredholm, 2005!). Dochází k aktivaci několika typů K^+ kanálů a inhibici N, P a Q typů Ca^{2+} kanálů. (Bertil B. Fredholm et al. 2001). Mezi fyziologické funkce A1 receptoru patří například neuroprotektce – A1 receptory inhibují vypouštění neurotransmiterů, což může předejít neurotoxickým efektům způsobeným výdejem glutamátu. Dále mezi ně patří například kardioprotektce, která je zprostředkována působením A1 receptoru v kardiomyocytech působí opačně k adrenergní stimulaci sympatikem a zpomaluje srdeční tep (Olsson and Pearson, 1990). Má také význam pro regulaci spánku – po dlouhé době bdělosti je tento receptor upregulován a inhibuje neurotransmisi cholinergních neuronů v předním mozku (Elmenhorst et al. 2007), funguje jako důležitý regulátor savčího embryonálního vývoje (B. B. Fredholm et al. 2011)

1.6.2 A2a receptor

A2a receptor je spřažen s G_s alfa G proteinem a jeho aktivace má za následek aktivaci adenylát cyklázy, tvorbu cAMP a další signalizaci. Spolu s A1 receptorem se podílí na kardioprotekci - působí jako vazodilatátor koronárních arterií, což vede ke zlepšení zásobení srdce živinami a snížení krevního tlaku, myši s mutací v *a2a* receptoru vykazovaly zvýšený krevní tlak i tep (B. B. Fredholm et al. 2011). Jeho důležitou fyziologickou rolí je omezování rozsahu imunitní reakce (imunosuprese) s cílem omezení poškození tkáně rozsáhlou imunitní reakcí (Fuxe et al. 2005). Důležitá vlastnost tohoto receptoru je heteromerizace s dalšími receptory, zejména s dopaminovým D2 receptorem. A2a-D2 heteromer je přítomen hlavně v mozковém striatu a je mu přisuzována role ve fyziologii Parkinsonově nemoci a schizofrenii (Fuxe et al. 2005). Další komplexy tvoří s A1 receptorem a funguje jako regulátor glutaminergních synapsí ve striatu (Ciruela et al. 2006). Nízké hladiny adenosinu vedou k aktivaci A1 receptoru (s větší afinitou k adenosinu), který inhibuje výdej glutamátu, vyšší hladiny vedou k aktivaci A2a receptoru s nižší afinitou, který potlačí A1 a dojde k výdeji glutamátu (Ciruela et al. 2006).

1.6.3 A2b receptor

Signalizace přes tento receptor probíhá stejně jako u A2a receptoru, A2b však vykazuje nižší afinitu k adenosinu než A1 i A2a receptor. Může se pojit s G_s i G_q alfa G proteinem. Je mu

přisuzována role v aktivaci žírných buněk, ve fyziologii astmatu, regulaci buněčného růstu a modulace neurosekrece (Feoktistov and Biaggioni 1997). Byla zjištěna jeho vysoká exprese v myších alveolárních buňkách typu II (fungují jako bariéra proti vstupu toxinů a podílejí se na tvorbě surfaktantů) a spekuluje se, že adenosin může hrát důležitou roli v regulaci těchto buněk během infekce nebo zranění (Cagnina et al. 2009).

1.6.4 A3 receptor

A3 receptor je spojený s G_i nebo G_q G proteinem a při aktivaci inhibuje adenylát cyklázu a zvyšuje hladinu IP3. Pomocí syntetického agonisty A3 receptoru CI IB MECA Byla u myší prokázána jeho funkce jako inhibitoru růstu tumorů (zastavením buněčného cyklu v G_0/G_1 fázi) a zároveň jako induktoru granulocytového colony stimulating faktoru (CSF) a následné proliferaci buněk kostní dřeně (Fishman 2001). Ve středním mozku se často vyskytuje ve formě komplexu se serotoninovým transportérem (5HT SERT) a po aktivaci rapidně zvyšuje jeho aktivitu (Zhu et al. 2011). Změny v promotoru *SERT* transportéru jsou asociovány s výskytem neuropsychiatrických onemocnění jako autismus a obsedantně kompulzivní porucha (Homberg and Lesch 2011), v důsledku tedy může adenosinová signalizace ovlivňovat i chování a mozkovou činnost. Jeho velký význam zahrnuje i stimulaci glykolýzy a glukoneogeneze v krysích játrech při nedostatku kyslíku, nejspíš za účelem poskytnutí energetického substrátu (na anaerobní glykolýzu) buňkám se sníženým přísunem O_2 (Cortés et al. 2009). Tato funkce je zřejmě analogická signalizaci přes receptor AdoR u octomilky, která má za následek hyperglykémii a v nepřítomnosti adenosin deaminázy je většinou fatální (Zuberova et al. 2010).

1.6.5 AdoR receptor

U octomilky se nachází jen jediný adenosinový receptor *AdoR*, což zde značně zjednodušuje celý adenosinový model a usnadňuje výzkum. Jeho nejbližší lidský homolog je lidský A2a receptor, má 38,3% sekvenční identitu v N-terminální části a příbuzný mu je i z funkčního hlediska - aktivuje adenylát cyklázu (Dolezelova et al. 2007; Kucerova et al. 2012). Nejvíc konzervovaná mezi druhy je zejména jeho N-koncová část s transmembránovými helixy vázající adenosin, intracelulární C terminální část (350 AK) je ale neobvykle dlouhá a její funkce zůstává neznámá (Dolezelova et al. 2007). Výsledky dále ukazují, že se AdoR může pojit jak s G_s , tak s G_q proteinem, což je zase funkčně analogické se savčím A2b receptorem (Dolezelova et al. 2007). AdoR signalizace má za následek zvýšení cAMP a Ca^{2+} iontů, cAMP je zřejmě fyziologicky preferovaná odpověď na aktivaci receptoru (Dolezelova et al. 2007; Kucerova et al. 2012). Expres *AdoR* u drozofily je za normálních podmínek relativně nízká a jeho zvýšená exprese má za následek letalitu v larválních stádiích, nebo jiné defekty ve vývoji, jako rozdělené scutellum, melanotické tumory a malformace křídel, tento efekt je zřejmě způsobený signalizací cAMP a fosfokinázy A (Dolezelova et

al. 2007). Octomilky s *adoR* mutací jsou normálně životaschopné, vykazují však poruchy asociativního učení a mají sníženou synaptickou plasticitu a sílu synapsí, ke stejnému zhoršení dochází i u hypomorfních mutantů v ENT-2 adenosinovém transportéru (Knight et al. 2010), překvapivě – dvojití mutanti v *AdoR* a ENT-2 tyto poruchy nevykazují. Další výsledky ukazují, že se u *adoR* mutantů více než desetinásobně zvyšuje exprese ENT-2 transportéru, což naznačuje existenci funkčního spojení mezi těmito významnými články adenosinové signalizace (Knight et al. 2010).

1.7 Tkáňově specifická interakce adenosinu a předchozí práce

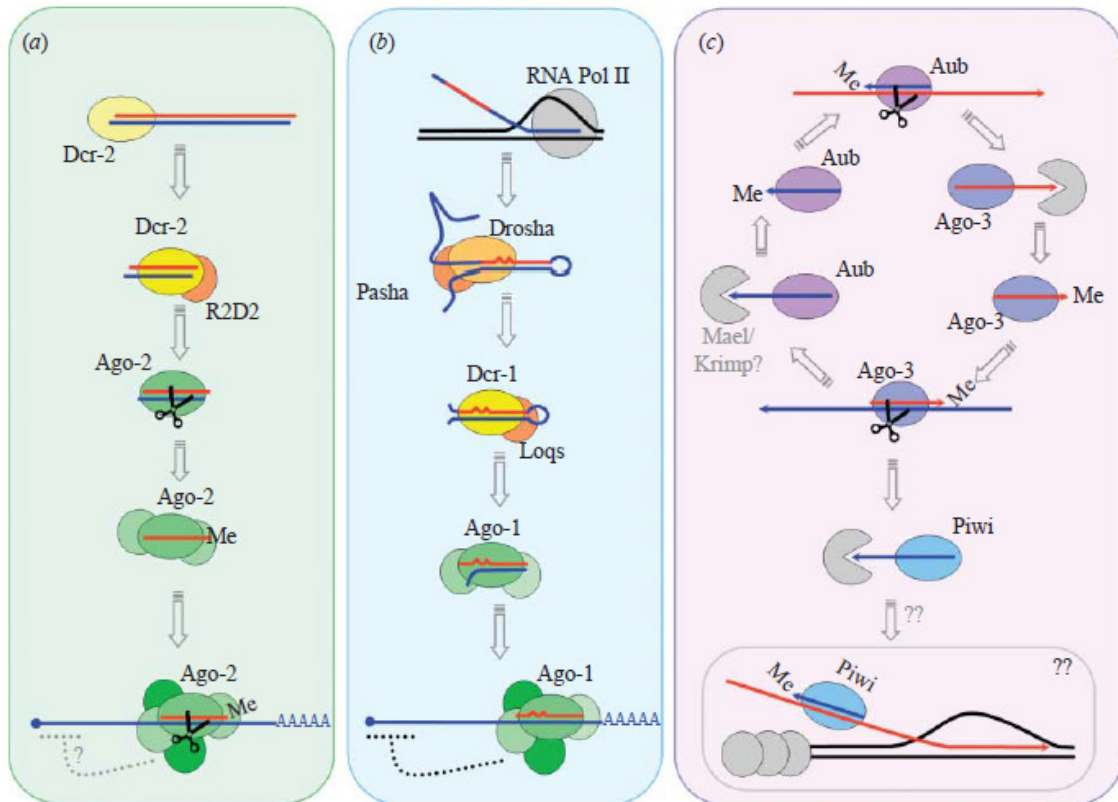
V předchozích pokusech (Dolezal et al. 2005) se zjistilo, že k záchraně ADGF-A mutantů expresí funkční adenosin deaminázy dochází pouze tehdy, pokud je exprimovaná v lymfatické žláze, exprese v jiných tkáních nemá na záchranu tak velký vliv. Jediná výjimka byla exprese adenosin deaminázy pomocí *GawB⁵⁰¹⁵gal4* driveru, který se exprimuje silně a specificky ve slinných žlázách a endokrinním orgánu ring gland. Tyto výsledky nepřímo naznačovaly možnost tkáňově specifického významu adenosinové signalizace a byly důvodem pro vyzkoušení knockdownu adenosinového receptoru pomocí RNA interference a mikro-RNA interference (Fencková M, 2011) za účelem objasnění přesné povahy interakce adenosinu a *AdoR* receptoru v různých tkáních. Mutace *AdoR* receptoru nemá na životaschopnost octomilek negativní vliv (kromě neurologických poruch) a kompletně zachraňuje fenotyp *adgf-a* mutantanta (Dolezal et al. 2005). Předpoklad tedy byl, že knockdown *AdoR* receptoru v určitých tkáních by měl alespoň částečně zachraňovat *adgf-a* mutantanta, což by se mělo projevit zvýšeným kuklením a líhnutím dospělců. Tento předpoklad ale nebyl splněn – indukce RNAi konstruktů ve většině případů ještě více zhoršila *adgf-a* fenotyp. Tento efekt byl vysvětlován nespecifitou RNA interference – 496 bazí dlouhý konstrukt mohl být štěpen na desítky krátkých siRNA molekul, některé z nich mohly negativně ovlivňovat expresi řady jiných genů (tzv. off-targetový efekt). K omezení tohoto efektu se přistoupilo na metodu mikro-RNA interference, jejíž konstrukty (ShmiR1 a ShmiR2) obsahovaly jen jednu 21 nukleotidovou sekvenci (siRNA) proti *AdoR* mRNA. Při indukci konstruktů ShmiR1 k záchraně *adgf-a* ale také nedošlo (Fencková M, 2011) a fenotyp *adgf-a* byl většinou více či méně zhoršován v závislosti na použitém Gal4 driveru. Tato práce se zabývá testováním konstruktů ShmiR2.

2. RNA interference

Pod pojem RNA interference (RNAi, genový silencing) spadají procesy, které organismům slouží jednak k regulaci exprese svých genů a také jako způsob ochrany před virovou infekcí nebo transponovatelnými elementy. Jejich podstatou je inhibice genové exprese prostřednictvím RNA molekul, které degradují nebo zastavují translaci mRNA s komplementární sekvencí. Přestože jsou mechanismy a proteiny RNAi evolučně hodně konzervované, jsou zde velké rozdíly v jejím významu

a využití různými druhy organismů. U rostlin a nematod (*Coenorhabditis elegans*) se může templát pro RNAi amplifikovat pomocí RNA dependentní RNA polymerázy a šířit do sousedních buněk i do vzdálenějších tkání, teoreticky tedy stačí velmi malé množství dsRNA k úspěšné RNA interferenci, tento mechanismus se ale nevyskytuje u živočichů (Fire et al, 1998).

Tři hlavní způsoby RNA interference u drozofily jsou popsány na obr. 1.



Obr. 1: 3 typy RNA interference u *Drosophily* (Obbard et al. 2009).

a) siRNA dráha

Protivirová siRNA dráha je důležitou součástí imunity drozofily. Ribonukleáza Dicer-2 nastříhá molekulu dsRNA na více kratších, 21 až 24 nukleotidů dlouhých siRNA (tzv. small interfering RNA, někdy nazývané viRNA z důvodu jejich virového původu), které jsou prostřednictvím RNA vázajícího proteinu R2D2 přeneseny k hlavnímu efektorovému proteinu Argonaute-2, kolem kterého se následně začne formovat komplex RISC (RNA induced silencing complex), ve kterém dojde k rozštěpení dsRNA a degradaci druhého vlákna nevyužitého k RNAi (passenger strand). Výběr leading a passenger vlákna hodně závisí na termodynamické stabilitě – preferenčně je vybrán jako leading strand ten, který má v 5' oblasti slabší párování bazí (Okamura, Liu, and Lai 2009).

b) miRNA dráha

Mikro-RNA dráha je u *Drosophily* zodpovědná primárně za post transkripční regulaci genové exprese, některé studie ale ukazují, že mohou hrát také roli v protivirové imunitě, zřejmě však mnohem menší než siRNA dráhy (Obbard et al. 2009). miRNA jsou kódovány v genomu a po přepsání RNA polymerázou II tvoří větší vlásenkové struktury nazývané primární miRNA (pri-miRNA). Ta je ještě v jádru zpracovaná proteinovým komplexem obsahujícím ssRNA vázající protein Pasha a RNázu III Drosha, která pri-miRNA sestříhne na asi 70 bazí dlouhou pre-miRNA. Ty jsou transportovány z jádra, kde jsou dále zpracovány enzymem Dicer -1 (s pomocí enzymu Loquacious), který odstříhne ohyb vlásenky a spojí 5' a 3' konce, výsledkem je 20-21 bazí dlouhý miRNA duplex. Ten je poté inkorporován do RISC komplexu s enzymem Argonaute-1, ve kterém dojde k výběru leading strandu a degradaci passenger strandu. Leading strand je většinou komplementární k 3' UTR na cílové mRNA. Pokud je komplementarita mezi miRNA a mRNA úplná, dojde k endonukleotickému štěpení a degradaci mRNA, pokud je komplementarita neúplná, dojde pouze k inhibici translace, což je případ naprosté většiny živočichů (Pillai, Bhattacharyya, and Filipowicz 2007). Přestože jsou dráhy miRNA a siRNA výrazně odlišné, mohou se překrývat – v případě perfektního párování vlásenky miRNA může být preferenčně zpracována enzymem Dicer-2 a následovat siRNA pathway (Okamura, Liu, and Lai 2009). Hlavní rysy interakce miRNA-mRNA u živočichů je párování bazí v 5' proximální oblasti miRNA (tzv. seed region, obvykle nukleotidy 2-8) a následná oblast bez komplementarity u nukleotidů 10-11, která zabraňuje RISC komplexu štěpení mRNA (Pillai, Bhattacharyya, and Filipowicz 2007). Rozdílnost mezi miRNA a siRNA ve způsobu provedení RNA interference podporuje fakt, že linie octomilek s mutacemi v genech pro *Dicer-2* a *Ago-2* jsou životaschopné, jen jsou víc náchylné k určitým virovým infekcím, mutace v genech *Dicer-1* a *Ago-1* jsou letální (Lee et al. 2004).

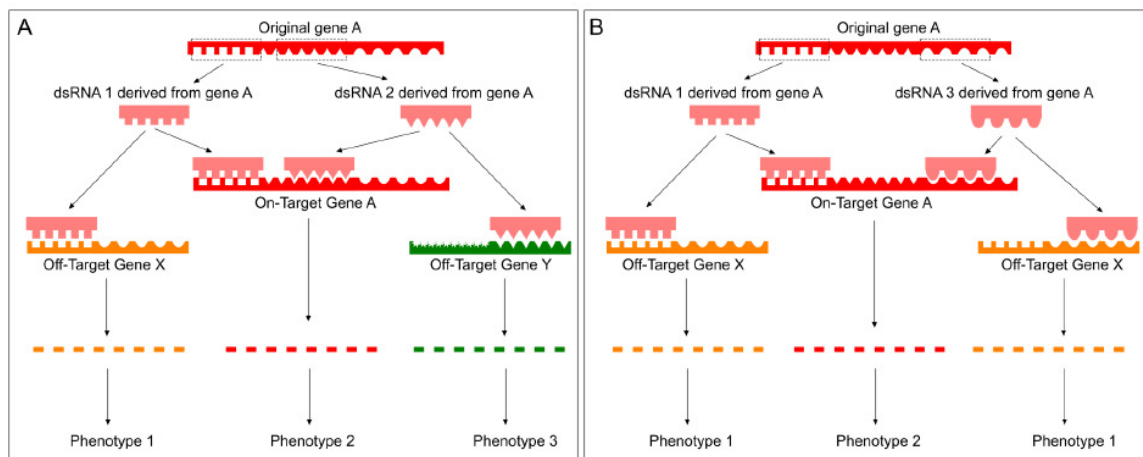
c) piRNA dráha

Piwi interacting RNA pathway – Tato modifikace RNAi slouží jako ochrana před transponovatelnými elementy (transpozony, retrotranspozony, retroviry), které by mohly narušit stabilitu genomu. Zde je tzv. ping-pongový model silencingu transpozónů v zárodečné linii u *Drosophily*. Transkribované piRNA komplementární k mRNA transpozónů se spojí s proteiny Aubergine (antisense vlákno) a tento komplex zahájí štěpení sense mRNA transpozónu, čímž vytváří fragmenty, které jsou zastříhnuty na 3' konci a po spojení s proteinem Ago-3 štěpí i sense vlákno transpozónu, jehož fragmenty se také sestřihují na 3' konci a spojí se s proteiny Aubergine, čímž se cyklus dokončuje, zastřihávání zde zřejmě hraje důležitou roli v amplifikaci RNAi (Khurana and Theurkauf 2010).

2.1 Off-targetový efekt

Používání dsRNA k RNA interferenci může vést k problémům se specifitou knockdownu na jeden konkrétní gen. Konstrukty pro RNAi jsou většinou dost dlouhé (více jak 300 bazí), jejich štěpení enzymem Dicer tedy může tvořit desítky siRNA, které mohou být komplementární k mnoha jiným mRNA a jejich knockdownem způsobovat falešně pozitivní výsledky. Bylo zjištěno, že v tomto efektu hraje velkou roli komplexita směsi siRNA vyštěpených enzymem Dicer z dsRNA – naprostá většina siRNA by měla cílit požadovanou mRNA, počet siRNA proti jiným mRNA by měl být relativně malý a neměl by provádět účinný knockdown (Myers et al. 2006). Studie (Haley, Foys, and Levine 2010) se zabývala otázkou jak rozsáhlé párování mezi siRNA a mRNA je nutné k jejímu úspěšnému knockdownu. Exprimovali tedy konstrukty ShmiR proti luciferáze v kulturách S2 buněk a v transgenních octomilkách a měnili počet nespárovaných bazí mezi siRNA a luciferázovou mRNA. Výsledek byl, že i s 5 nespárovanými bazemi (16 bazové párování mezi siRNA a mRNA) docházelo k 75% degradaci mRNA luciferázy. Obdobný experiment prováděli na octomilkách – exprimovali siRNA proti genu zodpovídajícímu za morfogenezi křídla *dpp* a měnili počet nespárovaných bazí, čím bylo párování přesnější, tím byl knockdown efektivnější a mutantní fenotyp očividnější, 17ti bazové párování bylo dostatečné k vytvoření viditelného fenotypu (Haley, Foys, and Levine 2010). Tato studie tedy tvrdí, že významná zkřížená reaktivita mezi siRNA a off-targetovou mRNA může nastat při kontinuálním párování 16-18 bazí, zřejmě však záleží na dalších faktorech jako sekundární struktury mRNA, správné rozpoznání a zpracování siRNA správnými proteiny apod. (Haley, Foys, and Levine 2010). Tato studie se však zabývala pouze párováním siRNA a mRNA v kódujících oblastech. Další studie (Aimee L. Jackson and Linsley 2004; A. L. Jackson 2006) zjistily, že silencing pomocí siRNA je méně specifický, než se původně myslelo. Provedli transfekci HeLa buněk 6 siRNA konstrukty proti 6 různým genům a následná microarray analýza zjistila, že ke knockdownu stačí pouze 6-7 bazová homologie tzv. seed regionu (nukleotidy 2-8 na 5' konci siRNA) s 3' UTR částí mRNA, k dalším významným off-targetům docházelo při 7-11 bazové komplementaritě ve střední části siRNA. Tato relativně malá homologie tedy stačí k tomu, aby siRNA ovlivňovaly větší množství transkriptů, což doménou miRNA interference a její regulace transkripce. (Seinen et al. 2010) navrhuje k řešení problému off-targetů používat dva sekvenčně odlišné dsRNA konstrukty cílené na jeden gen, díky jejich odlišnosti by každý z nich měl mít svoje unikátní off-targetové mRNA, zatímco by oba prováděli knockdown požadovaného genu, jak je popsáno na obrázku 2. A. Tím pádem by bylo možné předpokládat, že jakýkoliv společný fenotyp při použití konstruktů nezávisle na sobě je efekt knockdownu námi požadovaného genu (=on-target effect), hypoteticky je ale možné, že by i dvě nepřekrývající se dsRNA měly společnou off-targetovou mRNA, v tomto případě by při srovnání fenotypů těchto dvou konstruktů mohl být fenotyp vzniklý knockdownem off-targetové mRNA chybně interpretován jako knockdown námi požadované mRNA (viz obr. 2B). Tato studie prokázala,

že případ společných off-targetů může být relativně hojný a navrhuje design a analýzu dsRNA tak, aby k efektu společného off-targetu nedocházelo (Seinen et al. 2010).



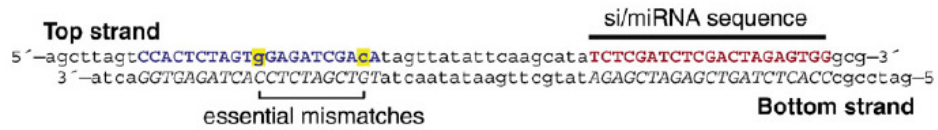
Obr. 2: **A:** Schéma RNAi, při které mají dsRNA 1 a 2 společný on-target a zároveň má každá vlastní specifický off-target, budou tedy tvořit rozdílné fenotypy a off targetový efekt bude možné odhalit. Fenotyp 2 je důsledkem knockdownu požadovaného genu (on-target), fenotypy 1 a 3 jsou důsledkem off targetu. **B:** schéma RNAi, při které mají dsRNA společný gen pro on-target i off-target – tím pádem se při nezávislém použití těchto dsRNA objeví navíc fenotyp 1, který bude chybně interpretován jako knockdown požadovaného genu (Seinen et al. 2010)

2.2 Konstrukty ShmiR

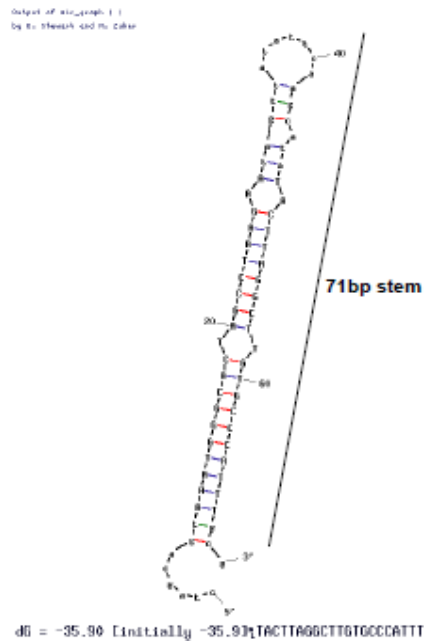
Předchozí pokusy o tkáňově specifický knockdown adenosinového receptoru v naší laboratoři zahrnovaly RNA interferenci a mikro-RNA interferenci. Konstrukty pro mikro-RNA interferenci ShmiR1 a ShmiR2 byly navrženy pomocí Dharmacon „siDesign“ centra a Ambion siRNA „target finger“ algoritmu. K minimalizování možnosti off-targetového efektu vycházejícího z podobnosti designovaných 21-merů byly konstrukty porovnány s databázemi všech miRNA sekvencí *Drosophily* (targetsca.org) (Fencková M, 2011). Vlastní vlásenková struktura byla navržena pomocí interaktivního ShmiR design webu (<http://flybuzz.berkeley.edu/cgi-bin/constructHairpin.cgi>), který přidává specifické mismatch báze u nukleotidů 2 a 11 k napodobení standardní pre-miR-1 struktury u *Drosophily* (Fencková M, 2011), viz obrázek 5. Konstrukty byly zaklonovány do vektoru pattB-ftz^{IN}-mCherry, který umožňuje současnou expresi konstruktu ShmiR a červeného fluorescenčního reportéru mCherry (Haley, Foys, and Levine 2010). Na obrázku 3. jsou sekvence oligonukleotidů konstruktu ShmiR2 a na obr. 4. Je naznačena poloha siRNA v této sekvenci.

5'-ctagcagtTACTTAGGCTAGTGCCCATATtagttatattcaagcataAAATGGGCACAAGCCTAAGTAgcg-3'
 5'-aattcgcTACTTAGGCTTGTGCCATTTtatgcttgaatataactaATATGGGCACTAGCCTAAGTAactg-3'

Obr. 3: Sekvence ShmiR2 oligonukleotidů



Obr. 4: Poloha siRNA sekvence ve ShmiR oligonukleotidu (červeně) před vložením do vektoru. Modře je znázorněná sekvence siRNA, co nebude provádět RNAi (tzv. „star“ miRNA“) s esenciálními nespárovanými bazemi, které napodobují pre-miR-1 vlásenkovou strukturu u drosophily.



Obr. 5: konstrukt ShmiR2

2.3 RNA interference a protivirová odpověď octomilky

V Jedna z možných teorií vysvětlující mé výsledky je možnost, že RNA interference může v octomilkách indukovat komplexní protivirovou odpověď, proto zde uvádím nejdůležitější způsoby antivirové imunity drozofily.

Drožofila je významným modelovým organismem pro studium imunity k virům, pomocí mutantních linií v genech pro RNAi, antivirové pathway, toll signalizaci a dalších, se testuje jejich náchylnost k infekci. Transkripční odpovědi hostitele na infekci se můžou měřit například pomocí microarray analýz. Na základě těchto výzkumů byly identifikovány 3 nejdůležitější způsoby protivirové obrany u octomilky: RNA interference, Toll signalizace a JAK STAT signalizace (Sparks, Bartolomay and Bonning – insect immunity to viruses, Insect immunology).

2.3.1 RNA interference

RNAi je zřejmě nejefektivnější způsob boje proti virové infekci u organismů, které postrádají adaptivní imunitu (bezobratlí, rostliny). Při virové infekci se zvyšuje hladina siRNA odvozených z virů, které cílí vlastní vznikající virovou mRNA. Ty na RNA interferenci často odpovídají produkcí virulenních faktorů nazývaných VSR - Viral suppressor of RNA silencing (Ding and Voinnet 2007), tyto souboje jsou tedy hnací silou koevoluce mezi viry a hostiteli. Jako senzor virové infekce zřejmě slouží helikázová doména DExD/H, která je u octomilek součástí proteinu Argonaut-2 (Kemp and Imler 2009). Po navázání dsRNA dojde k její konformační změně a Ago-2 zahájí štěpení dsRNA a tvorbu siRNA, zároveň také zřejmě dosud neznámým způsobem před následnou signalizací stimuluje expresi genu *Vago*, který navozuje antivirový stav (Kemp and Imler 2009). Přestože se RNA interference u drožofily vždy považovala za autonomní proces probíhající pouze na buněčné úrovni, nové výsledky ukazují význam šíření dsRNA z lyzovaných buněk a jejich příjem buňkami v okolí. Tento proces je dokonce esenciální v boji proti určitým druhům virů (C virus a Sindbis virus), což naznačuje možnost systémové RNAi odpovědi jako u nematod a rostlin, akorát bez kroku amplifikace siRNA (Saleh et al. 2009).

2.3.2 Toll signalizace

Geny Toll signalizace byly objeveny jako významné regulátory dorso-ventrální segmentace u drožofily, až později byl zjištěn její význam v aktivaci imunitní odpovědi. Její spuštění při infekci parazitickou vosičkou aktivuje buněčnou imunitní odpověď, která zahrnuje zvýšenou produkci cirkulujících plasmacytů, ty dále mohou diferencovat na lamellocyty, které slouží k enkapsulaci parazita a jeho zabití (Hultmark 2003). K aktivaci této dráhy je třeba navázání ligandu Toll receptoru Spatzle. Ten musí být napřed převeden do aktivní formy pomocí Spatzle processing enzymu (SPE), který je v imunitní odpovědi aktivován 3 různými způsoby na základě druhu infekce. Následující kaskáda zahrnuje proteiny MyD88, Tube a Pelle a jejím výsledkem je degradace proteinu Cactus, čímž dojde k uvolnění na něj vázaných transkripčních faktorů Dorsal a Dif, které poté indukují expresi genů, které slouží k omezení rozsahu infekce (antimikrobiální a antifungní proteiny, například Drosomycin) (Valanne, Wang, and Ramet 2011). Studie (Nakamoto et al. 2012) zjistila velký význam receptoru Toll 7 pro antivirovou odpověď u drožofily, která navíc neprobíhá přes výše

popsanou toll kanonickou dráhu (ztráta jejích klíčových genů neměla na infekci Vesicular stomatitis virem žádný vliv). Pomocí RNAi proti 9 toll-like receptorům drozofily byl zjištěn Toll 7 jako nejdůležitější pro omezení replikace a degradaci VSV viru mechanismem autofagie, což bylo potvrzeno in vitro i in vivo. Studie dále zjistila, že Toll 7 je lokalizován pouze v plazmatické membráně, v intracelulárním prostoru nebyl nalezen. Byla prokázána genetická interakce Toll signalizace s *ADGF-A*, (Dolezal et al. 2005) prokázal, že overexprese adenosin deaminázy *ADGF-A* výrazně zlepšuje fenotyp nulového mutantu pro inhibitor Toll signalizace Cactus.

2.3.3 JAK-STAT signalizace

U mutantů v genu *Hopscotch* pro JAK-STAT signalizaci byla zjištěna zvýšená citlivost vůči infekci virem DCV (Dostert et al. 2005), což ukazuje na to, že tato dráha je další evolučně konzervovaná dráha s antivirovým účinkem. Signalizace začíná u pre-dimerizovaného komplexu dvou transmembránových receptorů Domeless spojených s JAK kinázou (nazývanou Hopscotch), který je navázáním ligandu aktivován, což má za následek fosforylaci JAK kináz, které poté fosforylují molekuly STAT proteinu, který se vyskytuje volně v cytoplazmě. Fosforylovaný STAT protein může dimerizovat a tento dimer je poté translokován do jádra, kde funguje jako transkripční aktivátor (Arbouzova 2006). Genetické analýzy potvrdily, že kináza JAK a cytokinový receptor Domeless jsou potřebné k indukci genu *Vir-1* a k navození antivirového stavu. Kromě imunitní odpovědi je JAK STAT také důležitá pro buněčnou proliferaci, hematopoezi a růst imaginálních disků (Arbouzova 2006). Opět zde ale neexistují důkazy pro možnost aktivace této dráhy prostřednictvím RNA interference, tato možnost tedy zůstává čistě spekulativní.

3. Cíl práce

1. Ověřit přítomnost konstruktů ShmiR2 v daných liniích pomocí exprese markeru mCherry, který bude po indukci Gal4 driverem detekovatelný podle červené fluorescence
2. Vykřížit konstrukt ShmiR2 do *adgf-a* mutantního pozadí a indukovat ho pomocí různých Gal4 driverů
3. Provést analýzy vitality a zjistit, jestli indukce ShmiR2 a následná RNA interference proti *AdoR* receptoru potlačuje *adgf-a* fenotyp, tj. jestli dochází k záchraně octomilek. To samé provést pro linie bez *adgf-a* mutace (zjistit samotný efekt RNAi na wild type octomilkách)

4. Materiál a metody

4.1 Chov a křížení octomilek

Linie octomilek se v laboratoři chovají ve skleněných vialkách – zkumavkách s plochým dnem vysokých asi 10 cm a opatřených vatovou zátkou. Na dně vialek je tuhá směs z kukuřičné mouky, cukru a kvasnic, která slouží jako potrava a samicím zároveň jako substrát pro kladení vajíček. Při chovu v inkubátoru s teplotou 25°C je generační doba octomilek asi 9-10 dní, při chovu v 18°C se prodlouží na 19 dní. Asi 24 hodin po naklazení se z vajíčka vylíhne larva 1. instaru, která roste a prochází dvěma svlékáními, po asi 5.5–6 dnech larva vyleze z potravní směsi, zakuklí se a prochází metamorfózou, která je po 3–4 dnech zakončena vylíhnutím dospělé.

U linií octomilek, které jsou true breeding (potomci mají stejný genotyp jako rodiče) nemusíme vybírat potomstvo – linie stačí opatrným sklepaním převést do nových vialek bez uspání, u ostatních linií musíme potomstvo vhodného genotypu vybírat – provádí se tak po uspání much pomocí CO₂ (napřed jehlou ve vialce a po vysypání na diffuseru – destičce s přívodem CO₂). Ke křížení je třeba vybírat panny – nespárené samice, které se poznají podle velkého světlého zadečku a tmavé skvrny na břišní straně – meconia, což jsou zbytky potravy z larválního stadia - vylíhnuté samičky se nepáří dřív jak 6-8 hodin po vylíhnutí, meconium je viditelné v o něco kratším časovém rozmezí. Samce je možné vybírat víceméně kdykoliv, k úspěšnému páření ale musí být starší jak 3 dny.

4.2 Příprava diet

4.2.1 Standartní dieta

voda 1440 ml

kukuřičná mouka 144 g

vařit 1 hodinu při 90°C, potom přidat:

agar 18 g / 360 ml vody (připravíme nejdřív – necháme nabobtnat)

sacharóza..... 90 g

kvasnice..... 72 g

znovu vařit 1 hodinu při 90°C, nechat vychladnout na zhruba 50°C a přidat:

methyl 4-hydroxybenzoate 30 ml (používá se jeho 10% roztok v 96% EtOH)

Po konečném promíchání dávkujeme po 3,9 ml do čistých, předem vyklávaných vialek (180°C, 2 hodiny).

4.2.2 Dieta s 5% glukózy

Pro analýzy vitality se používá dieta s přesně stanoveným množstvím jednoduchých cukrů (5%) z důvodu velké citlivosti *adgf-a* mutanta na jeho množství. Připravuje se stejným způsobem jako standartní dieta, glukóza se ale přidá až do hotové směsi (5g/100 ml), přivede se k varu, rozmíchá a nalévá do vialek.

4.2.3 Agarová dieta

Agarové misky jsem připravoval tak, že jsem udělal 4% roztok agaru v ovocném džusu, po rozmíchání jsem roztok opatrně přiváděl k varu v mikrovlnné troubě a vařil 1 minutu. Po zchlazení na asi 50°C jsem přidal desetiprocentní methyl 4-hydroxybenzoate v poměru 0,7 ml/100 ml, rozmíchal a naléval do misek do výšky asi 1cm.

4.3 Použité linie

Tab.1: Linie octomilek použité při mých experimentech.

Označení v textu	Genotyp	Chromosom
shmiR2	yw; UAS-adoR-shmiR2-attB-FtzIN-mCherry-22A [1]	II
Actin Gal4 Karel	act-Gal4 adgf-a(karel)/TM3 GFP Ser	III
C7 Fat body Gal4	w; C7-Gal4;old karel/TM3 Act-GFP Ser	II+III
Ring gland Gal4 driver	w; P{w+mW.hs=GawB}5015; old-karel/TM3 Act-GFP Ser	II+III
adgf-a ^{Karel}	w; adgf-a (Karel)/TM6B	III
adgf-a ^{Gerda}	w; adgf-a (Gerda)/TM6B	III
	Sco/Cyo;MKRS hsFLP sb/TM6B	II+III
	Sco/Cyo GFP;old-Karel/TM3 Ser GFP	II+III
white	w*	X
UAS-GFP	yw; P{w ^{+mW.hs} =UAS-GFP}	II
adgf-a ^{Karel}	w; adgf-a (Karel)/TM3-Ser-GFP	III

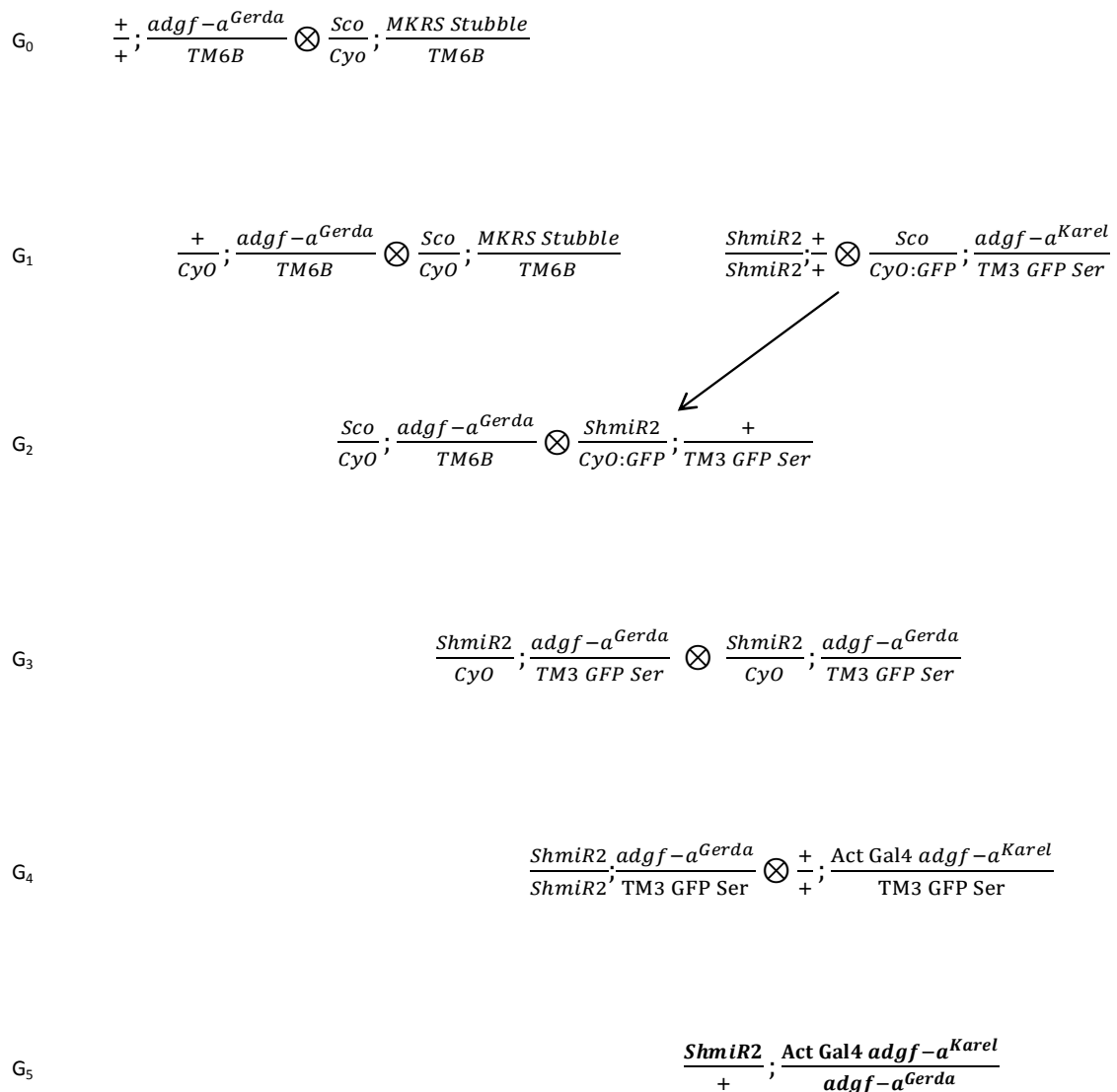
4.4 Příprava na analýzu vitality

Poslední kroky křížení před analýzou vitality jsem prováděl ve valcích, kam jsem nasadil větší množství octomilek požadovaného genotypu a pár dní je nechal rozklást. Poté jsem jim vyměnil misky se standartní dietou za agarové misky a nechal asi 4 hodiny ve tmě klást. Misky jsem nechal v inkubátoru (25°C) a po cca 22 hodinách jsem začal s promýváním embryí – do misek jsem nalil trochu destilované vody a štětcem jsem embrya lehce uvolnil z misky, poté jsem je slil do sítka a promyl slabým proudem vody od kvasnic, nakonec jsem je 30 sekund promýval v 70% etanolu. Takto promytá embrya jsem opatrně přenesl na čisté agarové misky a asi 24 hodin po naklazení jsem pod fluorescenčním mikroskopem vybíral čerstvě vylíhnuté larvy požadovaných genotypů a sterilní jehlou jsem je opatrně přenášel do čerstvých vialek s dietou s 5% glukózy (vždy 20 larev/vialka). U nich jsem poté sledoval počty zakuklených a vylíhnutých jedinců v čase.

5. Výsledky

5.1 Křížení

Všechny geny i konstrukty se nacházely na II. A III. chromosomu (zde odděleno středníkem), pohlaví octomilek tedy nehrálo při jejich výběru roli - výsledky recipročných křížení vycházely stejně. V následující generaci vlevo je vždy genotyp vybraný z předchozího křížení, vpravo je genotyp, se kterým byl křížen. Na obrázcích 6-8 jsou schémata pro křížení konstruktů ShmiR2 do *adgf-a* mutantního pozadí, na obrázku 9 je schéma křížení pro kontrolní linii – *adgf-a* mutant a pozitivní kontrola.



Obr. 6: Schéma křížení pro aktivaci ShmiR2 konstruktů v celém organismu pomocí Actin Gal4 driveru s *adgf-a* mutantním pozadím.

$$\begin{array}{l}
G_0 \quad \frac{+}{CyO}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM6B} \otimes \frac{C7 Gal4; old adgf-a^{Karel}}{C7 Gal4; TM3 Act GFP Ser} \\
G_1 \quad \frac{C7 Gal4}{CyO}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM3 Act GFP Ser} \otimes \frac{C7 Gal4}{CyO}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM3 Act GFP Ser} \\
G_2 \quad \frac{C7 Gal4}{C7 Gal4}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM3 Act GFP Ser} \otimes \frac{ShmiR2; adgf-a^{Gerda}}{ShmiR2; TM3 GFP Ser} \\
G_3 \quad \frac{ShmiR2; adgf-a^{Karel}}{C7 Gal4}; \frac{adgf-a^{Gerda}}{adgf-a^{Gerda}}
\end{array}$$

Obr. 7: Křížení pro expresi ShmiR2 konstruktů v tukovém tělese pomocí C7 fat body Gal4 driveru s *adgf-a* mutantním pozadím.

$$\begin{array}{l}
G_0 \quad \frac{+}{+}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM6B} \otimes \frac{Sco; MKRS Stubble}{CyO}; \frac{MKRS Stubble}{TM6B} \\
G_1 \quad \frac{+}{CyO}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM6B} \otimes \frac{P5015 lg; old adgf-a^{Karel}}{P5015 lg; TM3 Act GFP Ser} \\
G_2 \quad \frac{P5015 lg}{CyO}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM3 Act GFP Ser} \otimes \frac{P5015 lg}{CyO}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM3 Act GFP Ser} \\
G_3 \quad \frac{P5015 lg}{P5015 lg}; \frac{adgf-a^{Karel}}{TM3 Act GFP Ser} \otimes \frac{ShmiR2; adgf-a^{Gerda}}{ShmiR2; TM3 GFP Ser} \\
G_4 \quad \frac{ShmiR2; adgf-a^{Karel}}{P5015 lg}; \frac{adgf-a^{Gerda}}{adgf-a^{Gerda}}
\end{array}$$

Obr. 8: Křížení pro expresi ShmiR2 konstruktů v ring gland pomocí P5015 lg Gal4 driveru s *adgf-a* mutantním pozadím.

$$\frac{ShmiR2}{ShmiR2} ; \frac{adgf - a^{Gerda}}{TM3GFPSer} \otimes \frac{+}{+} ; \frac{adgf - a^{Karel}}{TM3GFPSer}$$

$$\frac{ShmiR2}{+} ; \frac{adgf - a^{Karel(Gerda)}}{TM3GFPSer} \qquad \frac{ShmiR2}{+} ; \frac{adgf - a^{Karel}}{adgf - a^{Gerda}}$$

Obr. 9: Křížení kontrol pro pokus se záchranou *adgf-a* mutantních octomilek – tyto 2 potomstva se vybíraly z jednoho křížení podle GFP fluorescence – vlevo je potomstvo heterozygotní pro *adgf-a* mutaci (což nemá téměř žádný negativní vliv), bylo GFP pozitivní. Vpravo je potomstvo homozygotní *adgf-a* mutací a výrazně sníženou životaschopností, GFP negativní. ShmiR2 zde nebyl indukován pomocí Gal4 driveru a neměl by mít žádný vliv. Jako kontrola u indukce ShmiR2 ve zdravých liniích byla použita linie white.

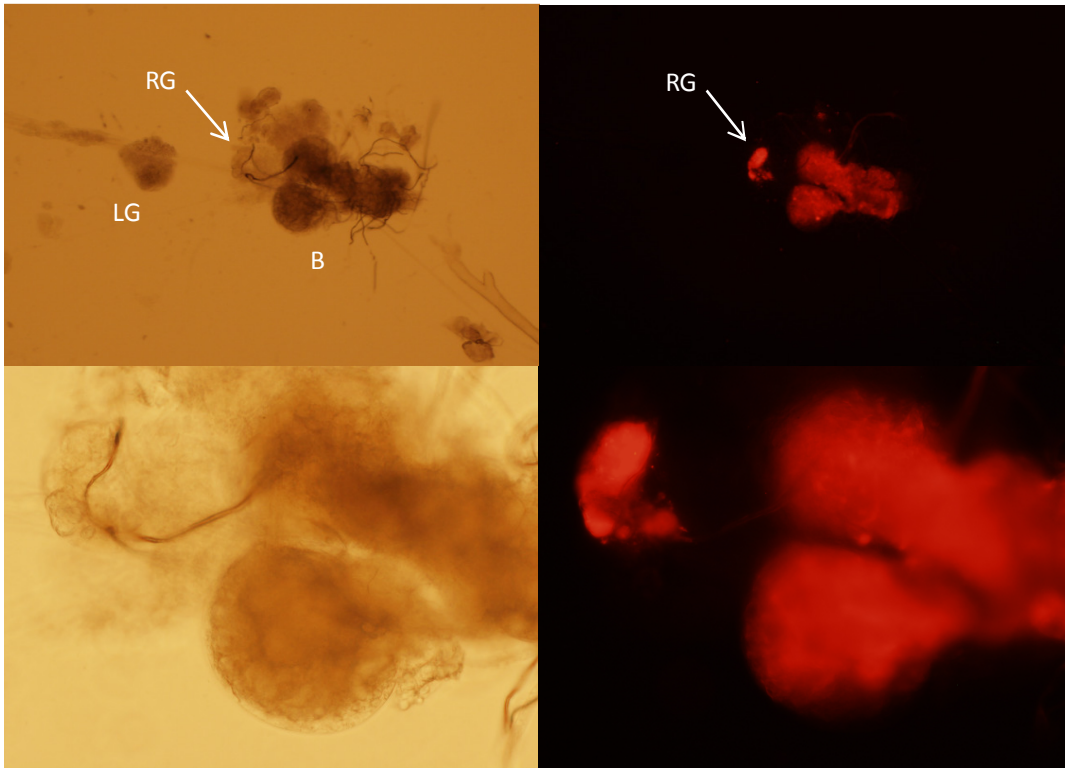
5.2 Křížení pro ověření exprese shmiR2

Po indukci konstruktů ShmiR2 různými Gal4 drivery jsem larvy požadovaných genotypů vypítl a pomocí fluorescenčního mikroskopu jsem detekoval fluorescenci proteinu mCherry, který se exprimuje zároveň s konstruktem ShmiR2. mCherry je monomerní fluorescenční protein (fluorofor), který má excitační maximum při 587 nm (zelená) a emisní maximum při 610 nm (červená). Prováděl jsem také porovnání fluorescence s kontrolou white. Na obr. 10 je křížení pro indukci ShmiR2 pomocí Ring gland Gal4 driveru a na obr. 11 výsledná fluorescence, na obr. 12 a 13 to samé pro Fat body Gal4 driver a na obr. 14 a 15 pro Actin Gal4 driver.

$$G_0 \quad \frac{P5015 \lg Gal4}{P5015 \lg Gal4} ; \frac{old adgf - a^{Karel}}{TM3ActGFPSer} \otimes \frac{ShmiR2}{ShmiR2} ; \frac{+}{+}$$

$$G_1 \quad \frac{ShmiR2}{P5015 \lg Gal4} ; \frac{old adgf - a^{Karel}(TM3ActGFPSer)}{+}$$

Obr. 10: Křížení pro ověření exprese ShmiR2 pomocí ring gland Gal4 driveru

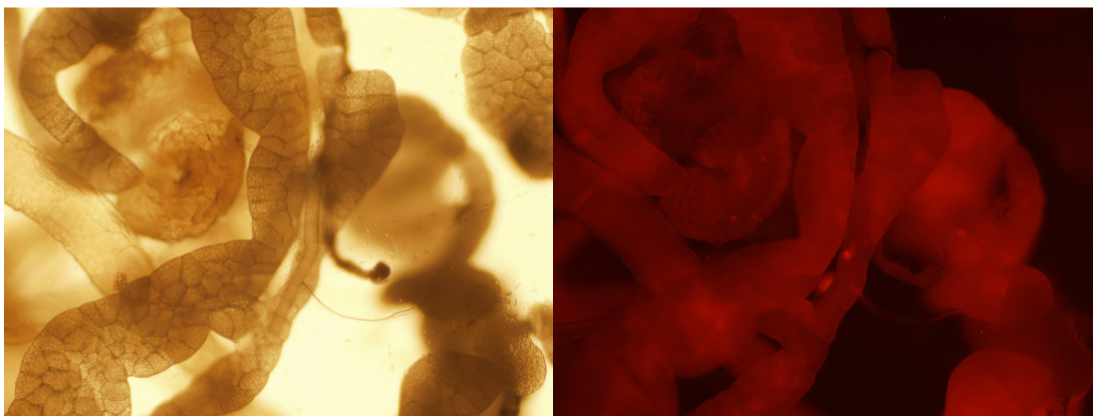


Obr. 11: mCherry fluorescence ring gland žlázy (RG = Ring gland, B = mozek, LG = lymfatická žláza)

$$G_0 \quad \frac{C7 \text{ Fat body Gal4}}{C7 \text{ Fat body Gal4}}; \frac{old \text{ Karel}}{TM3ActGFPSer} \otimes \frac{ShmiR2}{ShmiR2}; \frac{+}{+}$$

$$G_1 \quad \frac{ShmiR2}{C7 \text{ Fat body Gal4}}; \frac{old \text{ Karel}(TM3ActGFPSer)}{+}$$

Obr. 12: Křížení pro ověření exprese ShmiR2 pomocí Gal4 driveru do tukového tělesa

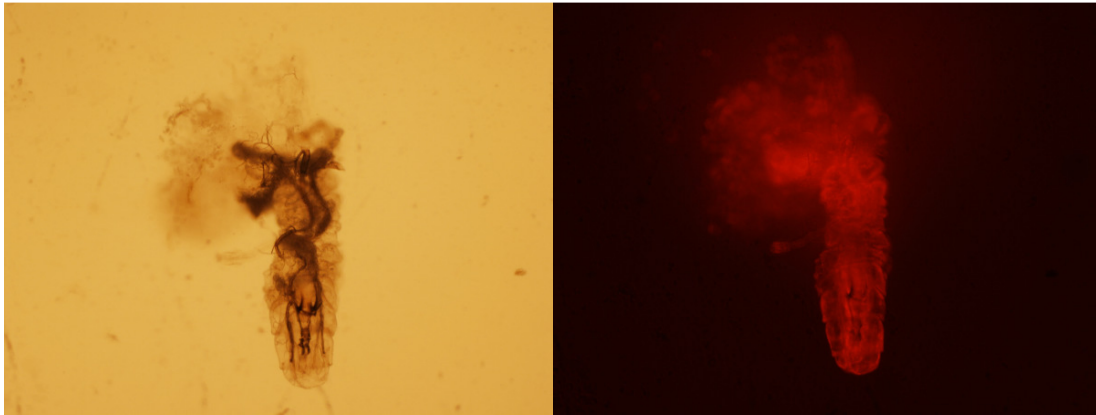


Obr. 13: mCherry fluorescence tukového tělesa

$$G_0 \quad \frac{+}{+}; \frac{actin\ Gal4\ adgf-a^{Karel}}{TM3\ GFP\ Ser} \otimes \frac{ShmiR2}{ShmiR2}; \frac{+}{+}$$

$$G_1 \quad \frac{ShmiR2}{+}; \frac{actin\ Gal4\ adgf-a^{Karel}}{+}$$

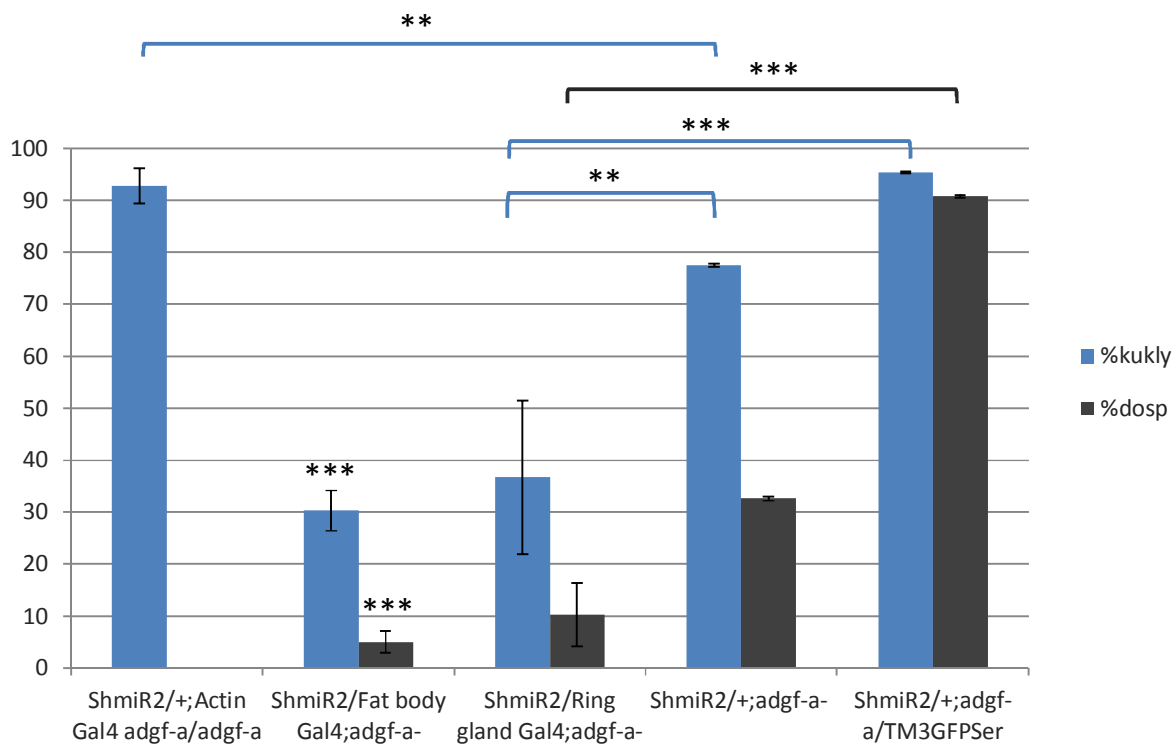
Obr. 14: Křížení pro ověření exprese ShmiR2 pomocí Actin Gal4 driveru (exprese v celém organismu)



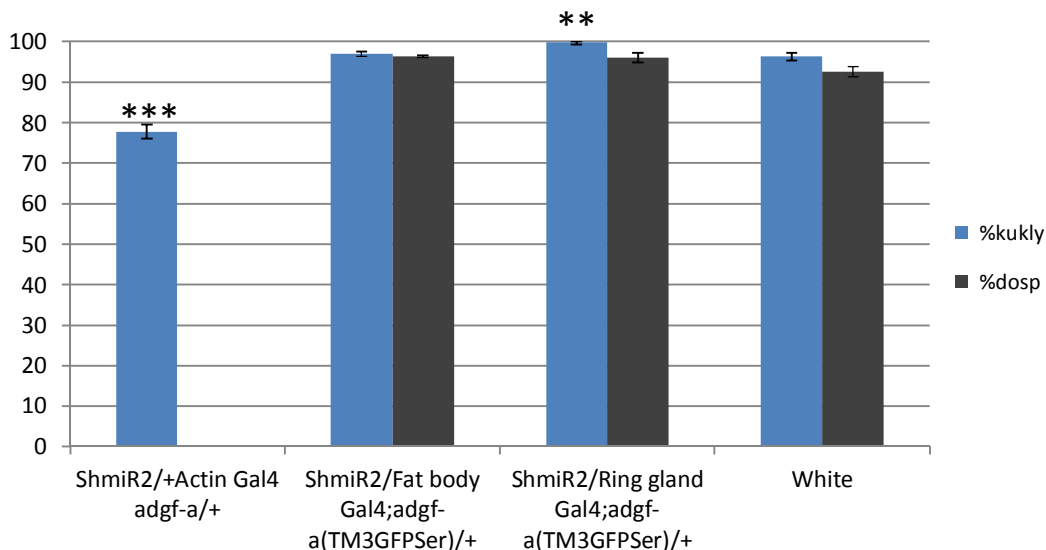
Obr. 15: mCherry fluorescence celé larvičky

5.3 Analýza vitality při expresi konstruktů shmiR2 proti AdoR receptoru

Po provedení kontroly křížení jsem prováděl vlastní experiment – hodnocení vitality těchto linií na základě jejich kuklení a líhnutí. Procentuální hodnoty kuklení a líhnutí jsou porovnány na obr. 16 a 17. Celkový počet larev od každého genotypu byl 120 (20/vialku), všechny pokusy byly prováděny třikrát. Kontroly (ShmiR2/+;adgf-a⁻, ShmiR2/+;adgf-a/TM3GFPSer u obr. 15 a white u obr. 16) byly vybírány pokaždé zároveň s pokusnými larvami, jejich průměr je tedy přesnější díky většímu počtu opakování.



Obr. 16: Vitalita linií s konstruktem ShmiR2 indukovaným Gal4 driverem v *adgf-a* mutantním pozadí – osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Jsou zde znázorněny všechny signifikantní rozdíly, tam, kde nejsou spojnice platí stejný rozdíl pro obě kontroly (*adgf-a* mutant, pozitivní kontrola).



Obr. 17: Vitalita linií s konstruktem ShmiR2 indukovaným Gal4 driverem bez *adgf-a* mutantního pozadí, osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Signifikantní rozdíly jsou zde vztahované pro kontrolu white (kukly a dospělci zvlášť).

Statistická analýza

ShmiR2 indukovaný v *adgf-a* mutantním pozadí

ShmiR2+Actin Gal4: Kuklení tohoto genotypu je signifikantně vyšší než u negativní kontroly ShmiR2/+; *adgf-a*- (Kruskal-Wallisův test, $H(2, N=54) = 26,28, p < 0,01$) a signifikantně se neliší od pozitivní kontroly ShmiR2/+; *adgf-a*/TM3GFP^{ser}, (Kruskal-Wallisův test $H(2, N=54) = 26,28, p = 0,53$), všechny kukly ale uhynuly a nedošlo k líhnutí dospělců.

ShmiR2+Fat body Gal4: počty kukel i dospělců u těchto larev jsou signifikantně sníženy oproti pozitivní kontrole i negativní kontrole (Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=54) = 43,53, p < 0,001$).

ShmiR2+P5015 ring gland Gal4: Zde je počet kukel také významně snížený oproti oběma kontrolám (Kruskal-Wallisův test: $H(df = 2, N = 54) = 41,29, p < 0,01$), počet dospělců se významně liší pouze od pozitivní kontroly ($p < 0,01$), od negativní minimálně ($p = 0,0529$). Larvy tohoto genotypu většinou brzy po vybrání vylezly na stěnu vialky a uhynuly bez toho, aniž by stihly vyrůst a zakuklit se, což by mohlo být například tím, že exprese konstruktů ShmiR2 v ring gland negativně ovlivňuje její funkci a například tvorbu hormonů, což by mohlo tímto způsobem ovlivnit chování. Efekty C7 Fat body Gal4 driveru a P5015 Ring gland driveru na kuklení a líhnutí od sebe nejsou průkazně odlišné, ShmiR2+Actin Gal4 se průkazně liší od obou skupin (Kruskal-Wallisův test: $H(2, N = 54) = 35,90, p < 0,01$).

ShmiR2 indukovaný ve wild type pozadí

ShmiR2+Actin Gal4: kuklení tohoto genotypu je průkazně nižší než u kontroly white (Mann Whitney U test, $N=36, U=8,5, p < 0,01$), k líhnutí dospělců také nedošlo. ShmiR2+C7 Fat body Gal4: Míra kuklení i líhnutí je zde srovnatelná s white kontrolou (Mann Whitneyův U test, $N=36, U=141,5, p=0,52$ pro kukly, $p=0,40$ pro dospělé).

ShmiR2+P5015 ring gland Gal4: Míra kuklení je zde téměř stoprocentní a je průkazně vyšší, než pro White kontrolu (Mann Whitneyův U test, $N=36, U=69, p < 0,01$), počty dospělců se ale mezi sebou průkazně neliší ($p=0,073$).

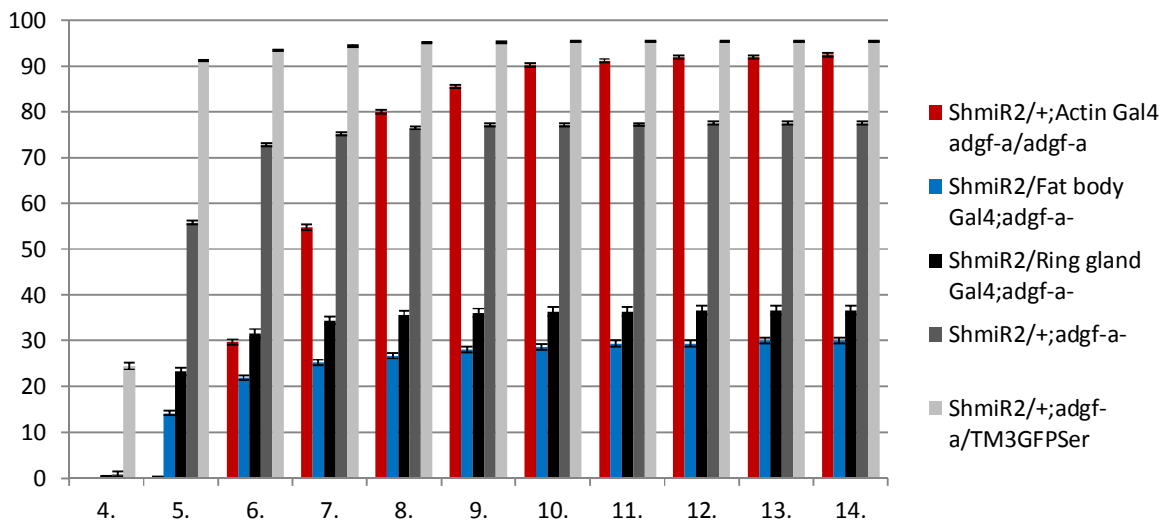
Vliv *adgf-a* mutace v rámci jednoho Gal4 driveru

ShmiR2+Actin Gal4: Bez ohledu na *adgf-a* mutaci se ani u jedné skupiny neobjevili dospělci, překvapivě se larvy více kuklily s *adgf-a* mutací (Mann Whitneyův U test, $N=36, U=39,5, p < 0,001$)

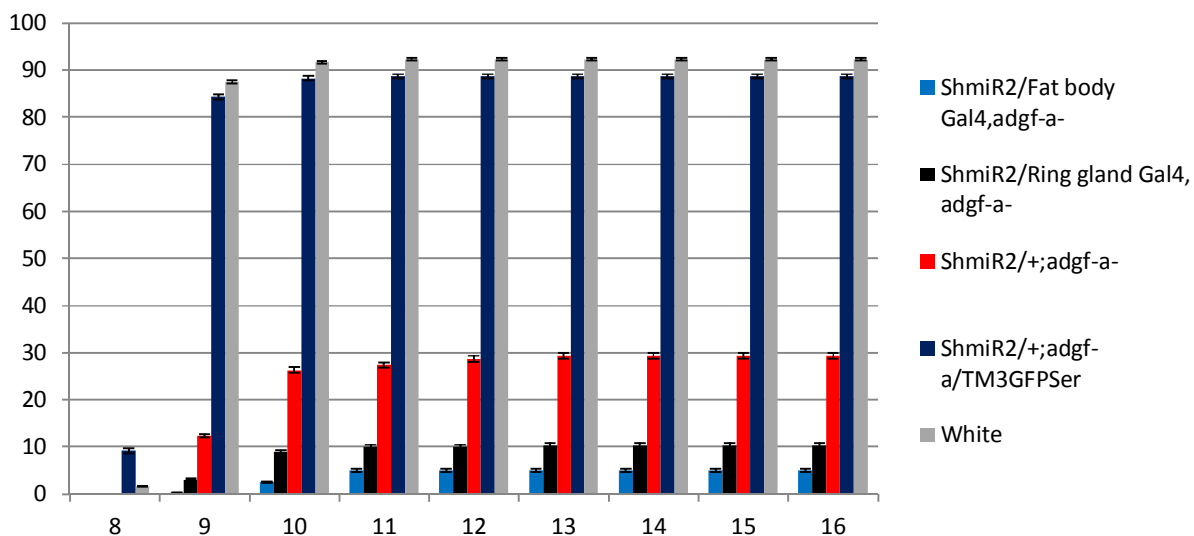
ShmiR2+C7 Fat body/P5015 Ring gland Gal4: Zde má *adgf-a* mutace výrazný negativní efekt na životnost larev i dospělců (Mann Whitneyův U test, $N=36, U=0, p < 0,001$). Bez mutace je kuklení i líhnutí srovnatelné s white kontrolou, mutace snižuje počet kukel o asi 70% a dospělců o asi 90%.

5.4 Časový vývoj kukel a dospělců při aktivaci RNAi proti AdoR receptoru

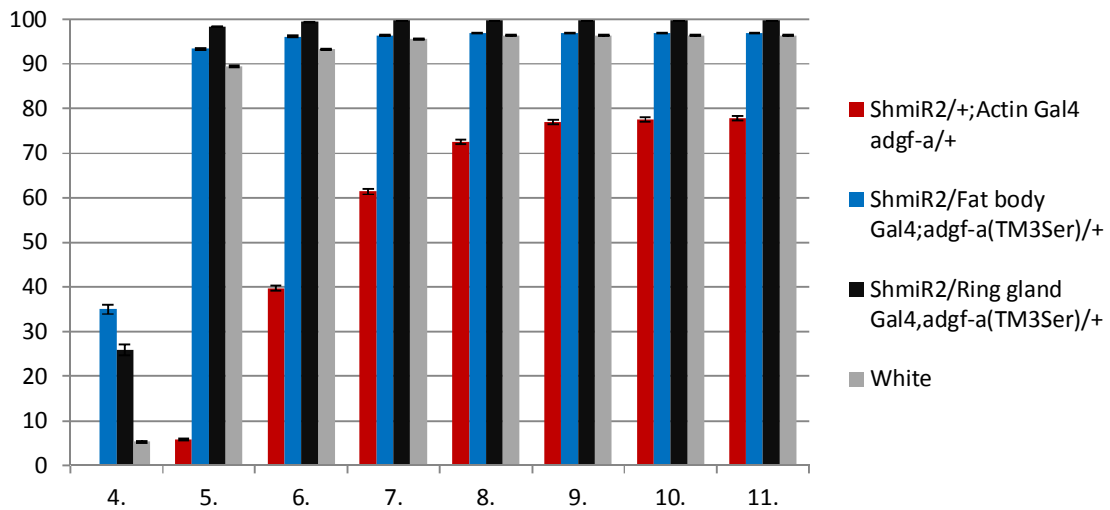
Ke zjištění, jestli bude mít indukce ShmiR2 nějaký vliv na délku vývoje jedinců jsem zaznamenával časový vývoj kuklení a líhnutí všech linií (denně přibližně ve stejnou dobu) výsledky jsou zaznamenány na obrázcích 17-20.



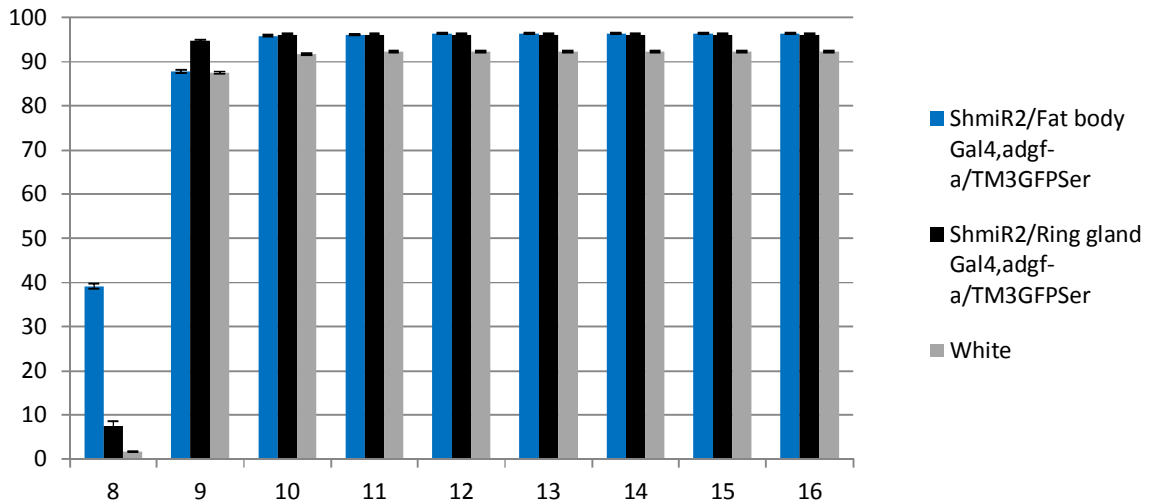
Obr. 18: Časový vývoj kukel – ShmiR2+Gal4 drivery v *adgf-a* mutantním pozadí, osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Z grafu je patrný mírně zpomalený vývoj jedinců s indukovaným ShmiR2 konstruktem, i *adgf-a* mutanta. Oproti tomu pozitivní kontrola ShmiR2/+;adgf-a/TM3 GFP Ser dosahuje téměř maximálního kuklení hned 5. den po nakladení.



Obr. 19: Časový vývoj líhnutí dospělců – ShmiR2+Gal4 drivery, *adgf-a* mutantní pozadí, osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Dospělci s indukovaným ShmiR2 konstruktem se objevují o den až dva později, než první jedinci kontrol (ShmiR2/+;adgf-a/TM3 GFP Ser



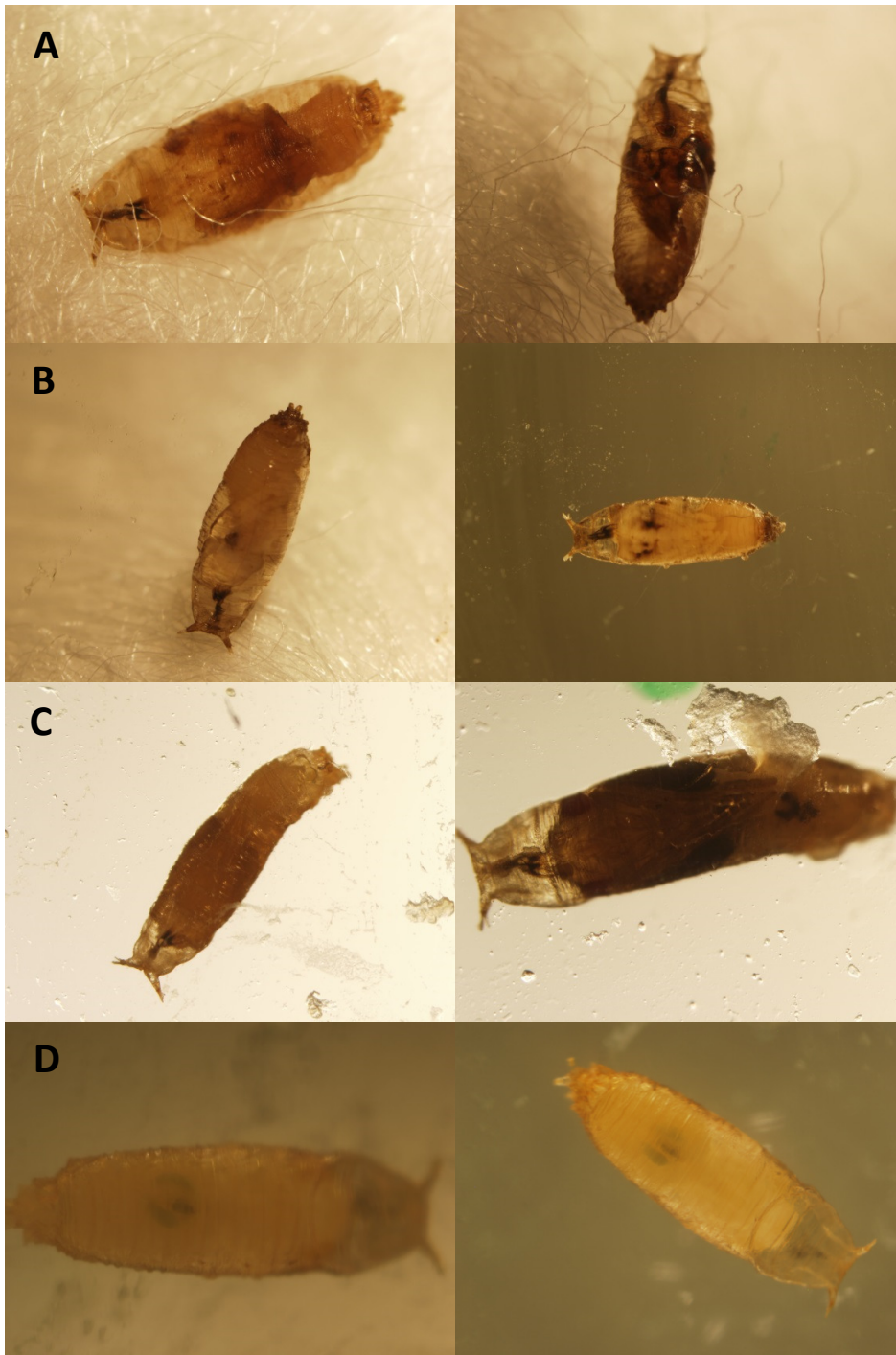
Obr. 20: Časový vývoj kukel – ShmiR2+Gal4 drivery ve wild type pozadí, osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Zde je pozoruhodné, že se některé larvy ShmiR2+C7 Gal4 a ShmiR2+Ring gland Gal4 začínají kuklit ještě o den dříve než pozitivní kontrola white.



Obr. 21: Časový vývoj líhnutí dospělců – ShmiR2+Gal4 drivery, osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Zde vidíme větší předčasné líhnutí u ShmiR2/C7 Fat body Gal4 driveru, u ShmiR2/P5015 Gal4 tento rozdíl není tak zřejmý.

5.5 Fenotypy experimentálních linií

Vliv indukce konstruktů ShmiR2 na fenotyp experimentálních linií jsem zaznamenal na obr. 22, fenotyp kontrolních linií na obr. 23.



Obr. 22: **A:** kukly ShmiR2+ActinGal4 s *adgf-a* mutací **B:** kukly ShmiR2+Actin Gal4 bez *adgf-a* mutace
C: kukly ShmiR2+C7 Fat body Gal4 s *adgf-a* mutací **D:** kukly ShmiR2+C7 Fat body Gal4 bez *adgf-a* mutace



Obr. 23: Fenotypy kontrolních linií **A:** white, **B:** *adgf-a* mutant

Fenotypy linií s indukovaným konstruktem shmiR2 v *adgf-a* mutantním pozadí (ShmiR2+ActinGal4, C7 Gal4 a P5015 Ring gland Gal4) si byly relativně dost podobné – larvy po zakuklení vykazovaly mnohem menší morfogenezi a závažné vývojové poruchy (viz Obr. 21 A: Actin Gal4, 21 C: Fat body Gal4), jen velmi málo jedinců ji prodělalo až dokonce a podařilo se jim vylíhnout. Fenotyp larviček, které se nestihly zakuklit jsem neporovnával, v naprosté většině uhynuly v potravní směsi před tím, než stihly vylézt na stěnu vialky a zakuklit se. Na těch jedincích, kterým se podařilo přežít a dostat se do stadia dospělosti byla patrná jejich snížená vitalita – měly problémy s líhnutím, byly menšího vzrůstu, pomalejší a méně létaly. Larvy linie ShmiR2 indukované Ring gland Gal4 driverem se kuklily pouze výjimečně, dost larviček (1., maximálně 2. instary) ale vylézalo na stěnu vialky a tam uhynulo.

Fenotypy linií s indukovaným ShmiR2 konstruktem ve wild type pozadí se lišily v závislosti na užitém Gal4 driveru. S Actin Gal4 driverem (Obr. 21 B) se většina larev zakuklila bez problémů, poté ale velmi rychle umíraly – je zde také patrná malá morfogeneze a rozpad tkání (podobně jako u *adgf-a* pozadí – Obr. 21. A). Při použití C7 Fat body Gal4 driveru do tukového tělesa byly larvy, kukly i dospělci naprosto vitální, jediný rozdíl oproti white kontrole byly tmavé skvrny na dorzální straně kukel, které se vyskytovaly u všech jedinců (Obr. 21 D). Při použití P5015 Ring gland Gal4 driveru byly larvy, kukly i dospělci také naprosto vitální a nerozeznatelní od pozitivní kontroly.

6. Diskuse

Podařilo se mi vykříždit konstrukt ShmiR2 se třemi liniemi Gal4 driverů ve wild type i *adgf-a* mutantním pozadí. Analýzy vitality v *adgf-a* mutantním pozadí jasně ukazují, že RNA interference tímto konstruktem nevyvolává očekávaný efekt – záchranu *adgf-a* mutantů, naopak jejich vitalitu ještě více snižuje. Tento výsledek je v přímém rozporu s našimi dosavadními znalostmi adenosinové signalizace – dvojití mutanti v *adoR* receptoru a adenosin deamináze *adgf-a* mají téměř normální životaschopnost a nejeví známky stresové reakce způsobované adenosinem (Dolezal et al. 2005).

Z výsledků jsou však patrné další rozpory – indukce konstruktů ShmiR2 ve wild type liniích pomocí C7 Fat body a P5015 Ring gland Gal4 driverů nemá ani minimální negativní vliv (indukce Ring gland Gal4 driverem má za následek dokonce vyšší kuklení, než u pozitivní kontroly white) a z grafů pro časový vývoj je dokonce patrné, že se průměrně začínaly kuklit i líhnout zhruba o jeden den dříve, než pozitivní kontrola white. Kdyby měla mít exprese konstruktů ShmiR2 i sebemenší negativní vliv sama o sobě, mělo by to být vidět i na těchto dvou liniích. Je tedy možné, že ShmiR2 je škodlivý pouze latentně a jeho negativní efekt je třeba nějak spustit – například silnou expresí Actin Gal4 driverem, nebo *adgf-a* pozadím.

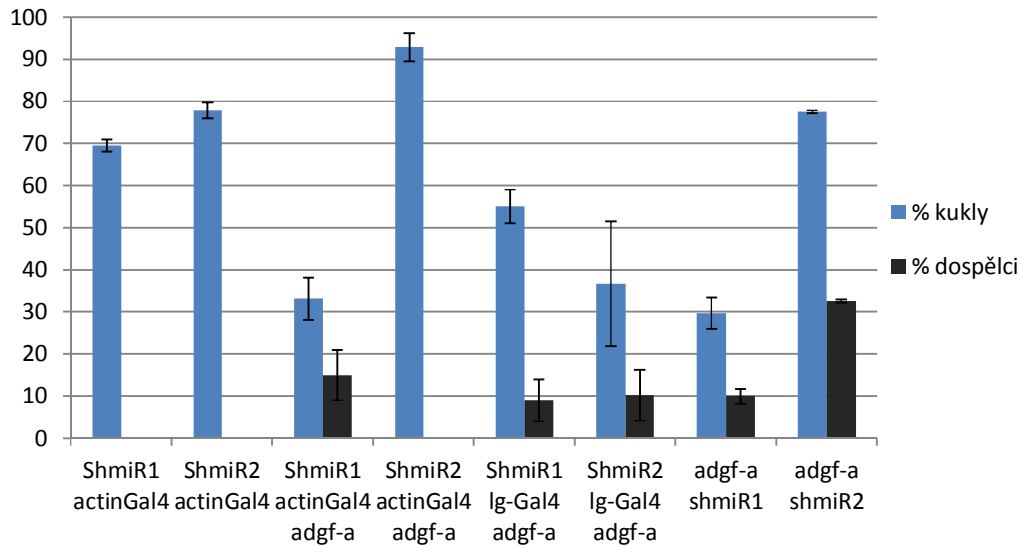
Vliv *adgf-a* mutace na RNAi je také velmi nejasný – u Actin Gal4 driveru se zdá být vliv *adgf-a* zanedbatelný, v obou případech se kuklí relativně stejně larev a neobjevují se dospělci, zde tedy výsledky ukazují na systematický vliv konstruktů ShmiR2. Naproti tomu u C7 Fat body a P5015 Ring gland Gal4 driverů se zdá být vliv *adgf-a* mutace obrovský – linie bez ní jsou naprosto vitální a v některých ohledech i více než white kontrola, s ní je kuklení i líhnutí drasticky sníženo. Nelze tedy jednoznačně říct, jestli za negativní výsledky může přemíra adenosinu a jeho negativní efekt v *adgf-a* mutantech, nebo samotná exprese konstruktů ShmiR2.

Možná vysvětlení

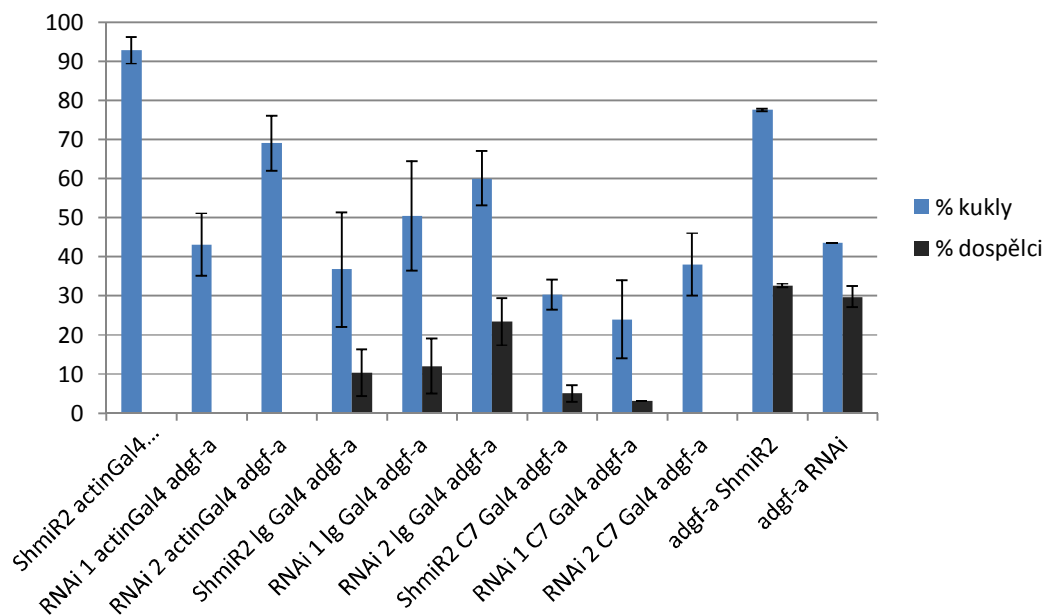
Na výsledném efektu se také může podílet používání UAS-Gal4 systému. Studie (Liu and Lehmann 2008) se pokusila zjistit vliv Gal4 driveru na expresi dalších genů. Pomocí heat shocku tedy u octomilky stimulovali expresi Gal4, poté provedli microarray analýzu transkripční odpovědi ve slinných žlázách a identifikovali asi 1000 genů, jejichž exprese se mění minimálně 1,5x, včetně některých genů kontrolujících apoptózu, genů Toll signalizace a genů pro stresovou odpověď. *adgf-a* mutant by na tyto výkyvy mohl být daleko citlivější a výsledkem by mohl být jejich větší úhyn.

Další možné vysvětlení je off-targetový efekt konstruktů ShmiR2. Tímto efektem se vysvětloval neúspěch v knockdownu AdoR receptoru pomocí RNA interference i pomocí konstruktů ShmiR1. Při tvorbě konstruktů ShmiR1 i ShmiR2 byla jejich sekvence porovnávána s databází všech

mRNA sekvencí drozofily, což by mělo možnost off-targetů snížit na minimum. Na základě metod zjišťování specifity RNA interference u drozofily (tkáňové kultury i transgenní linie) se došlo k závěru, že párování 16 bazemi mezi siRNA a cílovou mRNA je naprosto dostačující k účinnému silencingu genu. Výsledky také naznačují, že může docházet k významné zkřížené reaktivitě mezi siRNA a cizí mRNA, pokud sdílejí 16-18 bazovou homologii. Pomocí NCBI BLAST databáze jsem tedy porovnal 21bp úseky konstruktů ShmiR2 (sekvence AAATGGGCACAAGCCTAAGTA) s databází RNA sekvencí, komplementarita s *AdoR* je úplná (21bazová), další nejpodobnější sekvence mají mRNA pro ferredoxin (*Fdxh*) a transient receptor potential A1 (*TrpA1*), párování pouze 15 bazí, což by tedy k úspěšnému knockdownu nemělo stačit. To, jestli k off-targetovému efektu u drozofily stačí párování seed regionu siRNA s 3' UTR koncem mRNA zatím není známo, tato možnost je tedy čistě spekulativní (Haley, Foys, and Levine 2010). (Seinen et al. 2010) navrhuje jako řešení off-targetového problému použití dvou konstruktů s jinou specifitou na konkrétní gen, což by mohl být případ konstruktů ShmiR1 a ShmiR2, vzhledem k tomu, že mají cílové sekvence ve 3. a 4. exonu. Bohužel se experimenty se ShmiR1 prováděly dříve než se ShmiR2 a tak není možné zhodnotit případné překrývání fenotypů, lze jen porovnat hodnocení vitality. Na základě této studie by se tedy dalo předpokládat, že jejich společný fenotyp je efekt knockdownu požadované *AdoR* mRNA, hypoteticky je zde ale šance, že i tyto dva konstrukty s jinou specifitou by mohli mít společný off-targetový gen, v tomto případě by indukce obou konstruktů měla stejný fenotyp a off-targetový efekt bysme neodhalili – považovali bychom ho za efekt knockdownu námi požadovaného genu *AdoR* (viz úvod, Obr. 2B). Tato možnost by ale neměla být moc pravděpodobná. K hrubému odhadu podobnosti efektů knockdownu jsem své výsledky porovnal s předchozí prací s konstruktem ShmiR1, (viz Obr. 23) a s konstrukty pro RNA interferenci - RNAi 1 a 2, viz obr. 24, (Fencková M, 2011), statistickou analýzu jsem neprováděl.



Obr. 24: Porovnání efektů ShmiR1 a ShmiR2 spouštěných stejnými Gal4 driverly na vitalitu, osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru. Společně užitá Gal4 driverly v obou pracích byly pouze Actin Gal4 a Ring gland Gal4. můžeme vidět, že efekt ShmiR1 a ShmiR2 spuštěného Actin Gal4 driverem u wild type linií je téměř stejný – kuklení je podobné a neobjevují se žádní dospělci, relativně podobné jsou i výsledky exprese pomocí Ring gland Gal4 driveru. Vpravo jsou pro kontrolu porovnány hodnoty *adgf-a* mutantů z předchozího a z mého experimentu.



Obr. 25: Porovnání efektů ShmiR2 a konstruktů pro RNA interferenci (RNAi 1 a 2) spouštěných různými Gal4 driverly na vitalitu– osa y: % kukel a dospělců + střední chyba průměru, lg = Ring gland

Gal4, C7 = Fat body Gal4. Opět je zde patrná alespoň přibližná podobnost mezi výsledky pro jednotlivé konstrukty exprimované pomocí stejného Gal4 driveru

Další teorie je založená na možnosti, že exprese dsRNA v octomilkách může vyvolávat komplexní antivirovou odpověď, která by mohla negativně ovlivnit především *adgf-a* mutanta. Ten má silně zhoršený energetický metabolismus, plýtvá svými zásobami tuku a glykogenu a množství zásob, které mu zbyde před zakuklením zřejmě rozhoduje o jeho přežití. Tato virová odpověď (s ní spojená exprese dalších genů atd.) by pro tohoto mutanta mohla představovat velkou zátěž navíc, která by ještě více zvýšila jeho úhyn. Samotná RNAi a knockdown *AdoR* receptoru by mohly fungovat v pořádku, jejich pozitivní efekt by ale mohl být překrytý právě touto zátěží navíc. Při tvorbě konstruktů ShmiR bylo pomocí koimmunoprecipitace s enzymy AGO-1 a AGO-2 ověřováno přes jaké dráhy byl prováděn knockdown a bylo zjištěno, že jsou téměř přesně rozdělené mezi oba dva proteiny, což znamená, že fungují přes antivirovou siRNA pathway i přes regulační miRNA pathway (Haley et al. 2008), teoreticky by tedy byla možná aktivace nějaké rozsáhlejší odpovědi. U savců se objevila aktivace zánětlivých procesů v souvislosti s podáním siRNA, která byla chemicky modifikovaná (např lipidovým obalem) za účelem větší stability a možnosti dosáhnout cílových buněk, odpovědí byla produkce interferonů a jiných cytokinů (Judge et al. 2006). Na rozdíl od savců se u octomilky interferonová odpověď na dsRNA nenachází. Primární odpovědí na virovou infekci tedy zůstává RNA interference. Studie (Nakamoto et al. 2012) prokázala vliv Toll 7 pro autofagii viru, tento protein se ale nachází na vnější straně plazmatické membrány a endogenně exprimovaná dsRNA by ho neměla aktivovat, navíc se přímo v této studii bez problému používala RNAi ke zjištění významu jednotlivých toll receptorů a nebyl zjištěn její negativní efekt. Z mých výsledků je patrné, že *adgf-a* mutace silně negativně ovlivňuje vitalitu linií s indukovaným ShmiR2 v tukovém tělese a ring gland, což by této teorii mohlo odpovídat. U spuštění ShmiR2 pomocí Actin Gal4 driveru ale *adgf-a* mutant nijak nezhoršuje už původní fenotyp – naopak, dochází k mírně vyššímu kuklení. Pokud by měla RNAi nějak systematicky aktivovat protivirovou odpověď vedoucí ke snížení životaschopnosti, muselo by to být patrné i při aktivaci Actin Gal4 driverem, zde je ale efekt mírně opačný. Vysvětlení mých výsledků aktivací antivirové odpovědi se tedy jeví jako velmi nepravděpodobné.

Vzhledem k velkému množství předchozích pokusů o knockdown adenosinového receptoru začíná být jejich společný neúspěch trochu podezřelý. Je tedy možné, že bylo na předchozí RNAi experimenty nahlíženo jako na neúspěšné, protože výsledky neodpovídaly předchozím studiím, které uváděly, že *adoR* mutant je plně životaschopný. Relativní podobnost všech RNAi a miRNAi experimentů není nezpochybnitelná, například kontroly *adgf-a* mutantů

vykazují relativně velké rozdíly u experimentů se ShmiR1 a s ShmiR2 konstruktem. Určitá variabilita ve vitalitě *adgf-a* mutantů je ale relativně běžná a objevuje se i v rámci práce (Fencková M, 2011), viz obr. 23 – *adgf-a* ShmiR1 versus obr. 24, *adgf-a* RNAi. Podobnostem tedy nelze přikládat přehnaně velký význam, určité společné rysy se zde ale nacházejí a jsou podle mě ale dostatečné k tomu, abychom si kladli otázku, jestli tkáňově specifický knockdown *AdoR* receptoru nemůže mít negativnější efekt, než jeho úplný knockout, při kterém se *AdoR* receptor netvoří vůbec. Například (Fencková M, 2011) spekuluje, že je možné, že u octomilky vzhledem k malým vzdálenostem by adenosin teoreticky mohl fungovat na úrovni celého organismu. Pokud by tomu tak bylo, nerovnoměrný knockdown (v kombinaci s nerovnoměrnou expresí) *AdoR* receptoru by ho v různých tkáních mohl zanechat různé množství. Pokud by se adenosin šířil systémově, v určitých tkáních by mohla být signalizace silnější než v jiných, což by mohlo vyvolávat negativní efekt, který by se nevyskytoval u *adoR* mutantu, u kterého chybí receptor úplně.

7. Závěr

Tkáňově specifická exprese konstruktů pro miRNA interferenci ShmiR2 proti adenosinovému receptoru *AdoR* nevedla k záchraně octomilek mutantních pro adenosin deaminázu *adgf-a*, což je v rozporu s faktem, že mutanti v *adoR* receptoru jsou vitální. Tento rozpor je možné vysvětlit buď negativním efektem exprese konstruktů ShmiR2 a tedy jeho nevhodností k dalšímu použití, nebo tím, že platnost předchozí teorie není úplná. Vzhledem k tomu, že knockout genu je spolehlivější metoda (vede k úplné absenci proteinu, nejsou zde možnosti off-targetů apod.) bych se spíš přikláněl k první možnosti, s jistotou však nelze určit příčinu těchto výsledků. V budoucnu se chceme pokusit o tkáňově specifický knockout *AdoR* pomocí TALEN nukleáz, což by mohlo danou problematiku ještě více objasnit. Pro lepší vzhled do případných dalších RNAi experimentů bych navrhoval, aby se prováděly experimenty s minimálně dvěma konstrukty současně z důvodu lepšího porovnávání RNAi fenotypů pro lepší identifikaci off-targetových a on-targetových efektů.

8. Literatura

- Amisten, S., O. Melander, A.-K. Wihlborg, G. Berglund, and D. Erlinge. 2006. "Increased Risk of Acute Myocardial Infarction and Elevated Levels of C-reactive Protein in Carriers of the Thr-87 Variant of the ATP Receptor P2Y₁₁." *European Heart Journal* 28 (1) (June 13): 13–18. doi:10.1093/eurheartj/ehl410.
- Apasov, Sergey G., Michael R. Blackburn, Rodney E. Kellems, Patrick T. Smith, and Michail V. Sitkovsky. 2001. "Adenosine Deaminase Deficiency Increases Thymic Apoptosis and Causes Defective T Cell Receptor Signaling." *Journal of Clinical Investigation* 108 (1) (July 1): 131–141. doi:10.1172/JCI200110360.
- Arbouzova, N. I. 2006. "JAK/STAT Signalling in Drosophila: Insights into Conserved Regulatory and Cellular Functions." *Development* 133 (14) (July 15): 2605–2616. doi:10.1242/dev.02411.
- Bours, M.J.L., E.L.R. Swennen, F. Di Virgilio, B.N. Cronstein, and P.C. Dagnelie. 2006. "Adenosine 5'-triphosphate and Adenosine as Endogenous Signaling Molecules in Immunity and Inflammation." *Pharmacology & Therapeutics* 112 (2) (November): 358–404. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013.
- Cagnina, R. E., S. I. Ramos, M. A. Marshall, G. Wang, C. R. Frazier, and J. Linden. 2009. "Adenosine A_{2B} Receptors Are Highly Expressed on Murine Type II Alveolar Epithelial Cells." *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (3) (July 2): L467–L474. doi:10.1152/ajplung.90553.2008.
- Ciruela, F., S. Ferré, V. Casadó, A. Cortés, R. A. Cunha, C. Lluís, and R. Franco. 2006. "Heterodimeric Adenosine Receptors: a Device to Regulate Neurotransmitter Release." *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (21) (October 19): 2427–2431. doi:10.1007/s00018-006-6216-2.
- Cortés, D., R. Guinzberg, R. Villalobos-Molina, and E. Piña. 2009. "Evidence That Endogenous Inosine and Adenosine-mediated Hyperglycaemia During Ischaemia-reperfusion Through A₃ Adenosine Receptors." *Autonomic and Autacoid Pharmacology* 29 (4): 157–164.
- Cristalli, G., Stefano Costanzi, Catia Lambertucci, Giulio Lupidi, Sauro Vittori, Rosaria Volpini, Emidio Camaion. "Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors Medicinal Research Reviews. 2001 Mar;21(2):105-28.
- Ding, Shou-Wei, and Olivier Voinnet. 2007. "Antiviral Immunity Directed by Small RNAs." *Cell* 130 (3) (August): 413–426. doi:10.1016/j.cell.2007.07.039.
- Dolezal, Tomas, Eva Dolezelova, Michal Zurovec, and Peter J. Bryant. 2005. "A Role for Adenosine Deaminase in Drosophila Larval Development." *PLoS Biology* 3 (7): e201. doi:10.1371/journal.pbio.0030201.
- Dolezal, Tomas, Michal Gazi, Michal Zurovec, and Peter J. Bryant. 2003. "Genetic Analysis of the ADGF Multigene Family by Homologous Recombination and Gene Conversion in Drosophila." *Genetics* 165 (2): 653–666.
- Dolezelova, Eva, Hans-Peter Nothacker, Olivier Civelli, Peter J. Bryant, and Michal Zurovec. 2007. "A Drosophila Adenosine Receptor Activates cAMP and Calcium Signaling." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (4) (April): 318–329. doi:10.1016/j.ibmb.2006.12.003.
- Dostert, Catherine, Emmanuelle Jouanguy, Phil Irving, Laurent Troxler, Delphine Galiana-Arnoux, Charles Hetru, Jules A Hoffmann, and Jean-Luc Imler. 2005. "The Jak-STAT Signaling Pathway Is Required but Not Sufficient for the Antiviral Response of Drosophila." *Nature Immunology* 6 (9) (August 7): 946–953. doi:10.1038/ni1237.

- Elmenhorst, D., P. T. Meyer, O. H. Winz, A. Matusch, J. Ermert, H. H. Coenen, R. Basheer, H. L. Haas, K. Zilles, and A. Bauer. 2007. "Sleep Deprivation Increases A1 Adenosine Receptor Binding in the Human Brain: A Positron Emission Tomography Study." *Journal of Neuroscience* 27 (9) (February 28): 2410–2415. doi:10.1523/JNEUROSCI.5066-06.2007.
- 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
- Feoktistov, Igor, and Italo Biaggioni. 1997. "Adenosine A2B Receptors." *Pharmacological Reviews* 49 (4): 381–402.
- Fishman, P. 2001. "The A3 Adenosine Receptor as a New Target for Cancer Therapy and Chemoprotection." *Experimental Cell Research* 269 (2) (October 1): 230–236. doi:10.1006/excr.2001.5327.
- Fredholm, B. B., A. P. IJzerman, K. A. Jacobson, J. Linden, and C. E. Muller. 2011. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update." *Pharmacological Reviews* 63 (1) (February 8): 1–34. doi:10.1124/pr.110.003285.
- Fredholm, Bertil B., Adriaan P. IJzerman, Kenneth A. Jacobson, Karl-Norbert Klotz, and Joel Linden. 2001. "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors." *Pharmacological Reviews* 53 (4): 527–552.
- Fredholm, Bertil B., Ciulia Arslan, Bjorn Kull, Ewa Kontny, Per Svenningsson " Adenosine (PI) Receptor Signalling" 1996 *Drug Development Research* 39:262-268
- Fire, Andrew Xu, SiQun Montgomery, Mary K. Kostas, Steven A. Driver, Samuel E. Mello, Craig C. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391, no. 6669 (February 19, 1998): 806.
- Fuxe, Kjell, Sergi Ferré, Meritxell Canals, Maria Torvinen, Anton Terasmaa, Daniel Marcellino, Steven R. Goldberg, William Staines, Kirsten X. Jacobsen, and Carmen Lluis. 2005. "Adenosine A2A and Dopamine D2 Heteromeric Receptor Complexes and Their Function." *Journal of Molecular Neuroscience* 26 (2): 209–220.
- Haley, Benjamin, Bryon Foys, and Michael Levine. 2010. "Vectors and Parameters That Enhance the Efficacy of RNAi-mediated Gene Disruption in Transgenic *Drosophila*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (25) (June 22): 11435–11440. doi:10.1073/pnas.1006689107.
- Haley, Benjamin, David Hendrix, Vinh Trang, and Michael Levine. 2008. "A Simplified miRNA-based Gene Silencing Method for *Drosophila Melanogaster*." *Developmental Biology* 321 (2) (September): 482–490. doi:10.1016/j.ydbio.2008.06.015.
- Hershfield, M.S. Combined immune deficiencies due to purine enzyme defects. In: Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA, eds. *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2004:480-504.
- Homberg, Judith R., and Klaus-Peter Lesch. 2011. "Looking on the Bright Side of Serotonin Transporter Gene Variation." *Biological Psychiatry* 69 (6) (March): 513–519. doi:10.1016/j.biopsych.2010.09.024.
- Hultmark, Dan. 2003. "Drosophila Immunity: Paths and Patterns." *Current Opinion in Immunology* 15 (1) (February): 12–19. doi:10.1016/S0952-7915(02)00005-5.

- Jackson, A. L. 2006. "Widespread siRNA 'Off-target' Transcript Silencing Mediated by Seed Region Sequence Complementarity." *RNA* 12 (7) (May 18): 1179–1187. doi:10.1261/rna.25706.
- Jackson, Aimee L., and Peter S. Linsley. 2004. "Noise Amidst the Silence: Off-target Effects of siRNAs?" *Trends in Genetics* 20 (11) (November): 521–524. doi:10.1016/j.tig.2004.08.006.
- Judge, A, G Bola, A Lee, and I Maclachlan. 2006. "Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo." *Molecular Therapy* 13 (3) (March): 494–505. doi:10.1016/j.ymthe.2005.11.002.
- Kemp, Cordula, and Jean-Luc Imler. 2009. "Antiviral Immunity in Drosophila." *Current Opinion in Immunology* 21 (1) (February): 3–9. doi:10.1016/j.coi.2009.01.007.
- Khurana, Jaspreet S., and William Theurkauf. 2010. "piRNAs, Transposon Silencing, and Drosophila Germline Development." *The Journal of Cell Biology* 191 (5) (November 29): 905–913. doi:10.1083/jcb.201006034.
- Knight, D., P. J. Harvey, K. G. Iliadi, M. K. Klose, N. Iliadi, E. Dolezelova, M. P. Charlton, M. Zurovec, and G. L. Boulianne. 2010. "Equilibrative Nucleoside Transporter 2 Regulates Associative Learning and Synaptic Function in Drosophila." *Journal of Neuroscience* 30 (14) (April 6): 5047–5057. doi:10.1523/JNEUROSCI.6241-09.2010.
- Kucerova, Lucie, Vaclav Broz, Jana Fleischmannova, Eva Santruckova, Roman Sidorov, Vladimir Dolezal, and Michal Zurovec. 2012. "Characterization of the Drosophila Adenosine Receptor: The Effect of Adenosine Analogs on cAMP Signaling in Drosophila Cells and Their Utility for in Vivo Experiments." *Journal of Neurochemistry* 121 (3) (May): 383–395. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07701.x.
- Lee, Young Sik, Kenji Nakahara, John W Pham, Kevin Kim, Zhengying He, Erik J Sontheimer, and Richard W Carthew. 2004. "Distinct Roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways." *Cell* 117 (1): 69–81. doi:10.1016/S0092-8674(04)00261-2.
- Liu, Yanling, and Michael Lehmann. 2008. "A Genomic Response to the Yeast Transcription Factor GAL4 in Drosophila." *Fly* 2 (2): 92–98.
- Mahajan, Kiran N., Lisa Gangi-Peterson, David H. Sorscher, Jingsong Wang, Karen N. Gathy, Nupam P. Mahajan, Westley H. Reeves, and Beverly S. Mitchell. 1999. "Association of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase with Ku." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24): 13926–13931.
- Maier, Stephanie A., Lynn Podemski, Sean W. Graham, Heather E. McDermid, and John Locke. 2001. "Characterization of the Adenosine Deaminase-related Growth Factor (ADGF) Gene Family in Drosophila." *Gene* 280 (1): 27–36.
- Myers, Jason W., Jen-Tsan Chi, Delquin Gong, Marci E. Schaner, Patrick O. Brown, and James E. Ferrell Jr. 2006. "Minimizing Off-target Effects by Using Diced siRNAs for RNA Interference." *Journal of RNAi and Gene Silencing: An International Journal of RNA and Gene Targeting Research* 2 (2): 181.
- Nakamoto, Margaret, Ryan H. Moy, Jie Xu, Shelly Bambina, Ari Yasunaga, Spencer S. Shelly, Beth Gold, and Sara Cherry. 2012. "Virus Recognition by Toll-7 Activates Antiviral Autophagy in Drosophila." *Immunity* 36 (4) (April): 658–667. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.003.
- Novakova, Milena, and Tomas Dolezal. 2011. "Expression of Drosophila Adenosine Deaminase in Immune Cells During Inflammatory Response." Edited by Pankaj Kapahi. *PLoS ONE* 6 (3) (March 11): e17741. doi:10.1371/journal.pone.0017741.

- Obbard, D. J., K. H.J Gordon, A. H Buck, and F. M Jiggins. 2009. "The Evolution of RNAi as a Defence Against Viruses and Transposable Elements." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1513) (January 12): 99–115. doi:10.1098/rstb.2008.0168.
- Okamura, Katsutomo, Na Liu, and Eric C. Lai. 2009. "Distinct Mechanisms for MicroRNA Strand Selection by *Drosophila* Argonautes." *Molecular Cell* 36 (3) (November): 431–444. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.027.
- Olsson and Pearson "Cardiovascular Purinoceptors" *Physiological Reviews July 1, 1990* 70:(3) 761-845
- Pillai, Ramesh S., Suvendra N. Bhattacharyya, and Witold Filipowicz. 2007. "Repression of Protein Synthesis by miRNAs: How Many Mechanisms?" *Trends in Cell Biology* 17 (3) (March): 118–126. doi:10.1016/j.tcb.2006.12.007.
- Reiter, Lawrence T., Lorraine Potocki, Sam Chien, Michael Gribskov, and Ethan Bier. 2001. "A Systematic Analysis of Human Disease-associated Gene Sequences in *Drosophila Melanogaster*." *Genome Research* 11 (6): 1114–1125.
- Riazi, M.Ali, Polly Brinkman-Mills, Thuan Nguyen, Huaqin Pan, Stacey Phan, Fu Ying, Bruce A. Roe, et al. 2000. "The Human Homolog of Insect-Derived Growth Factor, CECR1, Is a Candidate Gene for Features of Cat Eye Syndrome." *Genomics* 64 (3) (March): 277–285. doi:10.1006/geno.1999.6099.
- Saleh, Maria-Carla, Michel Tassetto, Ronald P. van Rij, Bertsy Goic, Valérie Gausson, Bassam Berry, Caroline Jacquier, Christophe Antoniewski, and Raul Andino. 2009. "Antiviral Immunity in *Drosophila* Requires Systemic RNA Interference Spread." *Nature* 458 (7236) (February 8): 346–350. doi:10.1038/nature07712.
- Seinen, Erwin, Johannes G. M. Burgerhof, Ritsert C. Jansen, and Ody C. M. Sibon. 2010. "RNAi Experiments in *D. Melanogaster*: Solutions to the Overlooked Problem of Off-Targets Shared by Independent dsRNAs." Edited by Michael Polymenis. *PLoS ONE* 5 (10) (October 1): e13119. doi:10.1371/journal.pone.0013119.
- Valanne, S., J.-H. Wang, and M. Ramet. 2011. "The *Drosophila* Toll Signaling Pathway." *The Journal of Immunology* 186 (2) (January 5): 649–656. doi:10.4049/jimmunol.1002302.
- Zavialov, A. V., X. Yu, D. Spillmann, G. Lauvau, and A. V. Zavialov. 2010. "Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2." *Journal of Biological Chemistry* 285 (16) (February 9): 12367–12377. doi:10.1074/jbc.M109.083527.
- Zhu, C.-B., K. M. Lindler, N. G. Campbell, J. S. Sutcliffe, W. A. Hewlett, and R. D. Blakely. 2011. "Colocalization and Regulated Physical Association of Presynaptic Serotonin Transporters with A3 Adenosine Receptors." *Molecular Pharmacology* 80 (3) (June 24): 458–465. doi:10.1124/mol.111.071399.
- Zuberova, M., M. Fenckova, P. Simek, L. Janeckova, and T. Dolezal. 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 (11-12) (October 12): 773–784. doi:10.1242/dmm.005389.
- Zurovec, Michal, Tomas Dolezal, Michal Gazi, Eva Pavlova, and Peter J. Bryant. 2002. "Adenosine Deaminase-related Growth Factors Stimulate Cell Proliferation in *Drosophila* by Depleting Extracellular Adenosine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (7): 4403–4408.

Knižní zdroje:

Beckage, Nancy E. Insect immunology. Elsevier Inc. First edition 2008 ISBN: 978-0-12-373976-62008

Greenspan, Ralph J. Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition 2004 ISBN 978-087969711-2

Internetové zdroje:

<http://flybase.org/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Seznam použitých zkratek a symbolů:

ADA	adenosin deamináza
Ado.....	adenosin
<i>AdoR</i>	adenosinový receptor drozofily
ADA-SCID	kombinovaná imunodeficeience způsobená nefunkční adenosin deaminázou
<i>ADGF</i>	adenosin derived growth factor – růstový faktor příbuzný adenosin deamináze
<i>adgf-a</i> ^{Karel/Gerda}	dva druhy mutace v <i>ADGF-A</i> genu
<i>CECR-1</i>	Cat Eye syndrome Critical Region-1
CSF	colony stimulating factor – aktivátor buněčného dělení
DCV	drosophila C virus
dsRNA.....	double strand RNA
ENT.....	ekvilibrativní nukleotidový transportér
Gal4 driver	transkripční aktivátor Gal4
fat body	tukové těleso
hypomorfa	mutace, která snižuje expresi/projev určitého genu
knockdown	omezení exprese genu
leading strand	jedno vlákno z siRNA, které provádí RNA interferenci

on-target efekt..... efekt cílení požadované mRNA při RNA interferenci

off-target efekt efekt cílení jiné než požadované mRNA

passenger strand jedno vlákno ze siRNA, které je degradované a neprovádí RNAi

ring gland..... neuroendokrinní žláza octomilky nacházející se za mozem

RISC RNA induced silencing complex – komplex pro RNAi

seed region cca 6 bází dlouhá oblast v 5' konci siRNA, která se může párovat s jinými mRNA

ShmiR short micro RNA – krátká mikro RNA

upregulace..... zvýšení exprese genu

UTR..... untranslated region - netranslatovaná oblast mRNA