

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Mutageneze genu CNT1 v genomu *D. melanogaster*
pomocí programovatelných endonukleáz

Bakalářská práce

Monika Švábová

Školitel: doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

Odborní konzultanti: Houda Ouns Maaroufi

Yu-Hsien Lin

České Budějovice 2019

Švábová, M., 2019: Mutageneze genu CNT1 v genomu *D. melanogaster* pomocí programovatelných endonukleáz [Mutagenesis of the CNT1 gene in the *D. melanogaster* genome by engineered nucleases. Bc. Thesis in Czech] - 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This is an experimental bachelor's thesis whose aim was to find out the effects of two deletion mutations of different size in the *Drosophila CNT1* gene. We assumed that the gene plays important role in testes. We found that a smaller mutation caused reduced male fertility and larger deletion lead to complete male sterility. We also prepared novel CRISPR constructs for the generation of additional *CNT1* mutations.

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

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

České Budějovice, 17. 4. 2019

Monika Švábová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli sepsat tuto bakalářskou práci, za jejich cenné připomínky, rady a podporu. Děkuji svému školiteli Michalovi Žurovcovi za umožnění práce v jeho laboratoři, za jeho odborné vedení a zpětnou vazbu během psaní práce. Dále děkuji MSc. Houdě Ouns Maaroufi a MSc. Yu-Hsienovi Linovi za pomoc při křížení octomilek a vytvoření programovatelných nukleáz typu CRISPR/Cas. V neposlední řadě děkuji všem ostatním členům laboratoře za rady a velmi přátelský přístup.

Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu nejen morální, ale také finanční a to jak při psaní této práce, tak po celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> v genetice	1
1.1.1	<i>D. melanogaster</i> jako modelový organismus	2
1.1.2	Signální znaky (markery) a balancerové chromozomy	3
1.2	Nukleosidy a nukleosidové transportéry.....	5
1.3	Identifikace SLC28 a SLC29 u člověka	5
1.3.1	Koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT).....	6
1.3.2	CNT1 u <i>D. melanogaster</i>	6
1.4	Programovatelné nukleázy.....	7
1.4.1	Programovatelné nukleázy typu CRISPR/Cas.....	8
2	Cíle práce.....	10
3	Materiál a metody.....	11
3.1	Příprava homozygotních jedinců <i>D. melanogaster</i> s malou a velkou delecí v genu <i>CNT1</i> 11	
3.1.1	Kultivace octomilek.....	11
3.1.2	Mouchy „divokého typu“	11
3.1.3	Mutantní mouchy s delecí <i>CNT1</i>	11
3.1.4	Křížení octomilek pro testování fertility samců	12
3.2	Navržení programovatelných nukleáz CRISPR/Cas	14
3.2.1	Příprava konstruktů CRISPR – fosforylace a nasedání oligonukleotidů.....	15
3.2.2	Štěpení plazmidu	16
3.2.3	Defosforylace plazmidu.....	16
3.2.4	Purifikace, gelová elektroforéza	17
3.2.5	Ligace komplementárně nasedlých oligonukleotidů	17
3.2.6	Transformace do kompetentních bakterií	17
3.2.7	Ověřování úspěšnosti ligace (metodou PCR).....	18
3.2.8	Purifikace plazmidové DNA z bakterií a sekvenování.....	18
4	Výsledky.....	19
4.1	Křížení jedinců <i>D. melanogaster</i> s malou a velkou delecí v genu <i>CNT1</i>	19
4.2	Příprava heteroalelických kombinací mutantů <i>CNT1</i> s jedinci <i>Df(2R)PPO2A</i>	20

4.3	Křížení jedinců s heteroalelickou kombinací CNT1 ^S a CNT1 ^B	21
4.4	Navržení programovatelných nukleáz CRISPR pro gen <i>CNT1</i>	22
4.4.1	Ligace oligonukleotidů do plazmidů <i>pBFv-U6.2</i> a <i>pBFv-U6.2B</i>	22
5	Diskuze.....	24
6	Závěr.....	26
7	Seznam literatury.....	27
8	Přílohy	31
8.1	Mapa plazmidu <i>pBFv-U6.2</i>	31
8.2	Mapa plazmidu <i>pBFv-U6.2B</i>	31
8.3	Sekvence genu CNT1 s vyznačenými sekvencemi nukleáz CRISPR	32
9	Seznam zkratek	33

1 Úvod

1.1 *Drosophila melanogaster* v genetice

Octomilka obecná (*D. melanogaster*) je malý hmyz, který náleží do čeledi Octomilkovití (Drosophilidae), řádu Dvoukřídlí (Diptera). Pro svou důkladně prostudovanou genetiku je upřednostňována jako modelový organismus ke studiu většiny problémů ve vývojové biologii (Campos-Ortega et. al, 1985), od základní genetiky až po vývoj tkání a orgánů.

Předním biologem studujícím *D. melanogaster* na počátku 20. století byl Thomas Hunt Morgan, objevitel genetické rekombinace. Zhruba 75% genů zodpovědných za lidská onemocnění má homology v octomilkách (Reiter et al., 2001). Díky výhodným vlastnostem počínaje krátkou generační dobou (10 – 12 dní), nízkými náklady na chov (malé vybavení a minimum místa i pro velké kultury) a dostupností výkonných genetických nástrojů může být *D. melanogaster* využívána k editaci genomu a k rychlejšímu objevování molekulárních mechanismů, které jsou zodpovědné za lidské mutace a následná onemocnění. Pro studium lidských onemocnění pomocí modelu *D. melanogaster* v reverzní genetice lze vytvořit mutace v homolozích lidských genů a jejich fenotypy pak studovat *in vivo* (Ugur et al., 2016). Zásadním přínosem pro provádění editace genomu byl objev programovatelných nukleáz (umělých restrikčních enzymů) v roce 2000, díky kterým je možné zacílit a upravovat specifické sekvence DNA v celém genomu (Liu et. al, 2017) a jsou podrobněji popsány v kapitole 1.4.

D. melanogaster je vhodným kandidátem pro genetické studie a křížení z několika dalších důvodů. Jsou malé a velmi snadno se s nimi manipuluje, vykazují sexuální dimorfismus a je tedy velmi snadné rozlišovat pohlaví. Virginální samice lze snadno získat a oddělit od „zralých“ dospělých, což usnadňuje genetická křížení. Další výhodou genetiky octomilky je možnost používání signálních znaků (markerů) a balancerových chromozomů, které jsou popsány v kapitole 1.1.2.

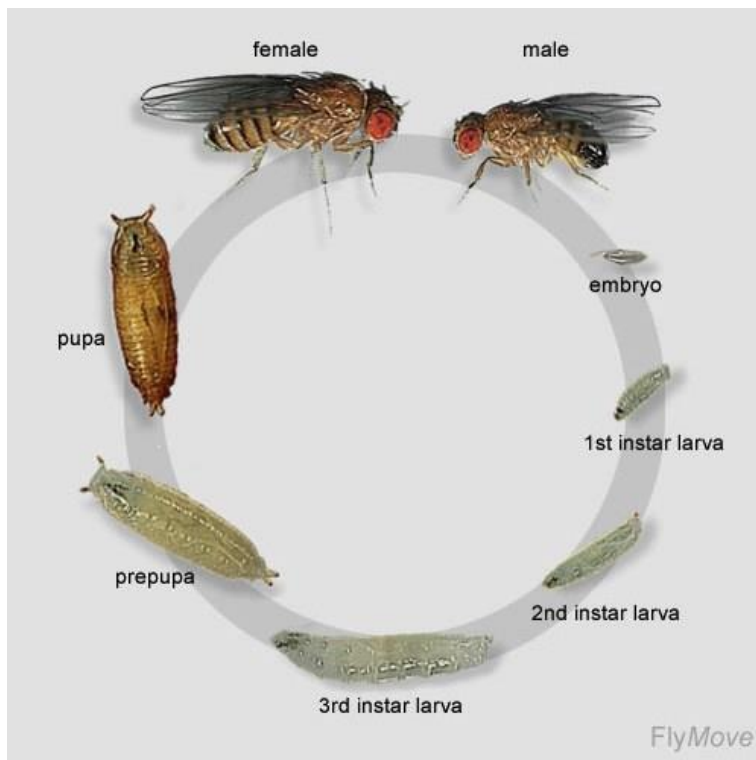
Ve své práci jsem prováděla genetické křížení *D. melanogaster* s předem připravenými dvěma různě velkými delekcemi v genu *CNT1* a připravila jsem rekombinantní konstrukty pro přípravu vlastního mutantního jedince s poškozením tohoto genu pomocí metody programovatelných nukleáz.

1.1.1 *D. melanogaster* jako modelový organismus

D. melanogaster je vhodným modelovým organismem zejména pro svou malou velikost, sexuální dimorfismus a krátkou generační dobu.

Tělo octomilky je tvořeno třemi částmi: hlava, hrudník (thorax) a zadeček (abdomen). Pomocí sexuálního dimorfismu je velmi snadné rozpoznat dospělou samici a samce. Samice je obvykle větší a zbarvení zadních segmentů těla má světlé. U samce jsou tyto segmenty tmavé a lesklé. Samice má abdomen zakončený špičkou, zatímco samčí je zaoblený. Samčí vnější genitálie jsou větší, komplexnější a tmavší než samičí. Samci nesou na předních končetinách „pohlavní hřebínky“ – řady tlustých tmavých štětin (Chyb, Gompel, 2013). Samci jimi zachycují samičí abdomen a genitálie a pomáhají jimi roztáhnout křídla před kopulací (Ng, Kopp, 2008).

Životní cyklus *D. melanogaster* trvá přibližně 10 dní při optimálních podmínkách (teplota 25°C, vlhkost 60%). Teplotou je možné ovlivňovat délku životního cyklu, neměla by však být nižší než 18°C a vyšší než 29°C. Octomilka patří do skupiny hmyzu s proměnou dokonalou a vývojový cyklus zahrnuje čtyři stádia: vajíčko, larva, kukla a dospělec (imago). Dospělci mohou žít několik týdnů a vykazují plodnost po celou délku svého života. Schéma životního cyklu je zobrazeno na obrázku č. 1.



Obr. č. 1: Životní cyklus *D. melanogaster*. Jeden den po naklazení vajíček se vylíhnou larvy. Larva dvakrát svléká kutikulu a v období před a po svlékání se nazývá „instar“. *D. melanogaster* má ve svém životním cyklu tři instary. Kutikula třetího instaru ztvrdne a ztmavne a stane se z ní kukla, uvnitř které probíhá metamorfóza. Po ukončení metamorfózy se vyvine dospělý jedinec. Dva dny po vylíhnutí může samice začít snášet vejce (převzato z <https://www.cherrybiotech.com/>).

1.1.2 Signální znaky (markery) a balancerové chromozomy

Klíčem k dešifrování genotypu *D. melanogaster* jsou markerové mutace. Markery, neboli signální znaky, se používají k označení chromozomů, které jsou konkrétně sledovány, častěji se jimi však označují sesterské chromozomy, které slouží pro sledování přenosu experimentálních chromozomů na potomstvo. Tyto nápadné znaky mohou ovlivňovat barvu a tvar očí, morfologii žilnatiny křídel, barvu a tvar štětín a pigmentaci kutikuly. Nejpoužívanější markery jsou uvedeny v tabulce I a marker použitý v našich pokusech je zobrazen na obrázku č. 2. Výhodou genetiky *D. melanogaster* na rozdíl od genetiky u ostatních organismů je používání tzv. balancerů (balancerových chromozomů) (Greenspan, 2004). Balancery jsou uměle upravené chromozomy obsahující mnohočetné inverze znemožňující rekombinaci s homologním sesterským chromozomem (nedochází ke crossing-overu, je udržen heterozygotní stav mutací).

Každý typ balanceru má svůj charakteristický dominantní marker. Při našich pokusech byl použit balancer *CyO* (Curly of Oster) na chromozomu II s dominantním markerem *Cy^l* (Chyb, Gompel, 2013).



Obr. č. 2: Použitý marker *Cy^l* (převzato od Chyb, Gompel (2013), *Atlas of Drosophila Morphology*).

Spolu s balancerem *CyO* byl použit také dominantní znak - zelený fluorescenční protein (GFP, z angl. Green Fluorescent Protein). GFP byl izolován z medúzy *Aequorea victoria* a může být použitý pro monitorování genové exprese a lokalizace proteinu v živých organismech, kde zeleně fluoreskuje, pokud je vystaven modrému světlu (Chalfie, et al. 1995).

Tab. I: Nejpoužívanější markery u *D. melanogaster*. Zvýrazněn je marker použitý při této práci

Marker	Zkratka	Chromozom	Fenotyp (viditelné znaky)
<i>Bar</i>	<i>B</i>	<i>X</i>	oko užší než obvykle, oválného tvaru
<i>forked</i>	<i>f</i>	<i>X</i>	krátké štětiny s uštipnutými nebo ohnutými konci
<i>Scutoid</i>	<i>Sco</i>	<i>II</i>	chybějící štětiny
<i>Curly</i>	<i>Cy</i>	<i>II</i>	křídla stočená nahoru
<i>Humeral</i>	<i>Hu</i>	<i>III</i>	kratší štětiny navíc
<i>Serrate</i>	<i>Ser</i>	<i>III</i>	vrubová křídla
<i>Tubby</i>	<i>Tb</i>	<i>III</i>	larvy, kukly a dospělci kratcí a tlustí
<i>Stubble</i>	<i>Sb</i>	<i>III</i>	krátké a tlusté štětiny
<i>Ultrabithorax</i>	<i>Ubx</i>	<i>III</i>	větší a kulatější haltery
<i>eyeless-Dominant</i>	<i>ey^D</i>	<i>IV</i>	velmi malé oči

1.2 Nukleosidy a nukleosidové transportéry

Pro cílenou mutagenезi byl zvolen gen kódující koncentrativní nukleosidový transportér *CNT1*. Nukleosidy jsou glykosylaminy tvořené nukleovou bází a D-ribózou/2-deoxy-D-ribózou, která je vázána N-glykosidickou vazbou k dusíku purinového nebo pyrimidinového kruhu (Scofield, 2011). Purinové a pyrimidinové nukleosidy hrají zásadní roli ve fyziologii. Slouží jako prekurzory nukleových kyselin, kdy jsou převedeny na nukleotidy, z nichž některé slouží i k přenosu volné energie a k vnitrobuněčnému přenosu signálu. Adenosin je také klíčovou extracelulární signalizační molekulou modulující různorodé fyziologické procesy prostřednictvím interakce s proteiny v buněčné membráně (Young, 2013).

Adenosin je purinový nukleosid široce distribuovaný v CNS obratlovců. Je základním metabolitem všech buněk a je zapojen do několika biosyntetických a signálních dráh. Mezi jeho účinky patří regulace toku krve, nocicepce (podráždění nociceptorů, receptorů zprostředkujících vnímání bolesti způsobené např. zánětem, nádorem nebo poraněním tkáně), regulace spánku a neuroprotektce proti záchvatům (Guillén-Gómez et. al, 2004).

Nukleosidy a nukleobázová léčiva jsou široce používána k léčbě rakoviny a virových infekcí. Nukleosidy a jejich deriváty jsou hydrofilní a jejich dostupnost v intracelulárním a extracelulárním prostředí primárně zajišťují specifické membránové nukleosidové transportéry (NT). Podle způsobu transportu rozlišujeme dvě evolučně nesouvisející rodiny: „koncentrativní nukleosidové transportéry“ (CNT), které u člověka odpovídají rodině SLC28 a „ekvilibrativní nukleosidové transportéry“ (ENT) odpovídající rodině SLC29 (Young, 2013).

1.3 Identifikace SLC28 a SLC29 u člověka

Lidský genom obsahuje tři geny tvořící rodinu SLC28 (*SLC28A1*, *SCL28A2* a *SLC28A3*), které kódují tři CNT proteiny (CNT1 – 3) a čtyři geny rodiny SLC29 (*SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* a *SLC29A4*) kódující čtyři ENT proteiny (ENT1 – 4). CNT jsou nukleosidové transportéry zajišťující jednosměrný transport (směrem do buňky) závislý na přítomnosti Na⁺. Vyskytují se převážně v intestinálních a renálních epiteliálních a jiných specializovaných typech buněk. ENT zprostředkovávají obousměrný transport purinových a pyrimidinových nukleosidů bez přítomnosti Na⁺,

snižují jejich koncentrační gradienty a jsou ve většině, popř. ve všech typech buněk. (Young, 2013).

ENT1 je lokalizován na bazolaterální membráně epitelových buněk, ENT2 je exprimován v jádru epitelu a CNT2 je exprimován bazálními buňkami (Klein et. al, 2017). ENT1, ENT2, ENT3, CNT1, CNT2 a CNT3 jsou funkčně zapojeny do přenosu uridinu, ať už za přítomnosti nebo nepřítomnosti Na^+ (Kato et. al, 2005).

Transportní systémy byly mapovány také v centrálním nervovém systému (CNS). Spánková deprivace dramaticky snižuje množství CNT2, zatímco exprese ENT1 zůstává nezměněna. Transportní systémy tedy mají zásadní fyziologickou úlohu v modulaci extracelulární koncentrace adenosinu a cyklu spánku a bdělosti (Guillén-Gómez et. al, 2004).

Mutací genu *SLC29A3* (ENT3) u člověka je způsobena Mendelistická porucha spojená s insulin-dependentní diabetes mellitus (Cliffe et. al, 2009). Diabetes pravděpodobně může být způsoben nezávisle na inzulínu narušením transportu nukleosidu (Rodríguez-Mulero et. al, 2005).

1.3.1 Koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT)

Koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT) zajišťují transport nukleosidů a nukleobází přes cytoplazmatickou membránu do intracelulárního prostoru buněk (Young, 2016) a tento jednosměrný transport je závislý na přítomnosti Na^+ (Atkinson et. al, 2006). Lidský genom obsahuje tři geny tvořící rodinu SLC28 (*SLC28A1*, *SCL28A2* a *SLC28A3*), které kódují tři CNT proteiny (CNT1 – 3). CNT1 vykazuje selektivitu pro pyrimidinové nukleosidy (vč. adenosinu) a u savců se vyskytuje převážně v epitelích, CNT2 je selektivní pro purinové nukleosidy a CNT3 pro purinové i pyrimidinové nukleosidy a vyskytují se téměř rovnoměrně ve všech tkáních. Těmito transportéry jsou přenášeny do buněk i protirakovinné a antivirové nukleosidové léky.

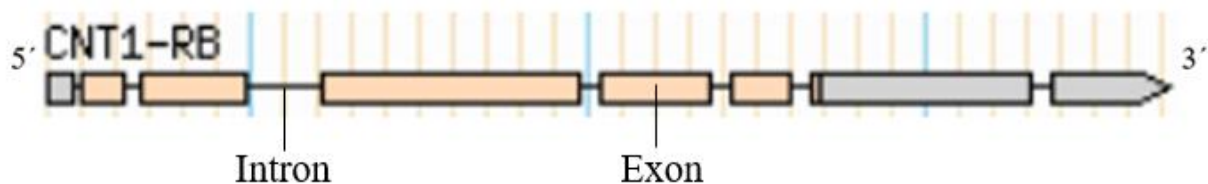
1.3.2 CNT1 u *D. melanogaster*

Dva typy koncentrativních transportérů, CNT1 a CNT2, se také vyskytují u *D. melanogaster* (Machado et. al, 2007). *D. melanogaster* má čtyři páry chromozomů: X/Y, II, III a IV. Většina genů je lokalizována na chromozomech X, II a III (Fernández-Moreno et. al, 2016). *CNT1* se vyskytuje na chromozomu II a jeho produkt se nachází

nejvíce u dospělců ve varlatech. Výskyt CNT1 je schématicky zobrazen na obrázku č. 3, struktura genu *CNT1* je uvedena na obrázku č. 4.

Larval Expression Level	Tissue	Adult Expression Level
NA	Head	1
NA	Eye	2.1
NA	Brain	1.2
0.575	Central Nervous System	NA
NA	Thoracic-Abdominal Ganglion	2.2
NA	Crop	1
0.8	Midgut	1.3
1.2	Hindgut	2
2	Malpighian Tubules	1.3
no informative data	Fat Body	2
1.9	Salivary Gland	2
NA	Heart	2.325
0.9	Trachea	NA
NA	VirginFemale Spermatheca	2
NA	InseminatedFemale Spermatheca	0.6
NA	Ovary	0.5
NA	Testis	151.7
NA	Male Accessory Gland	2.1
2.375	Carcass	2.3

Obr. č. 3: Výskyt transkriptů genu *CNT1* u *D. melanogaster* (převzato z <https://flybase.org/>).



Obr. č. 4: Struktura genu *CNT1* u *D. melanogaster* (převzato z <https://flybase.org/>).

1.4 Programovatelné nukleázy

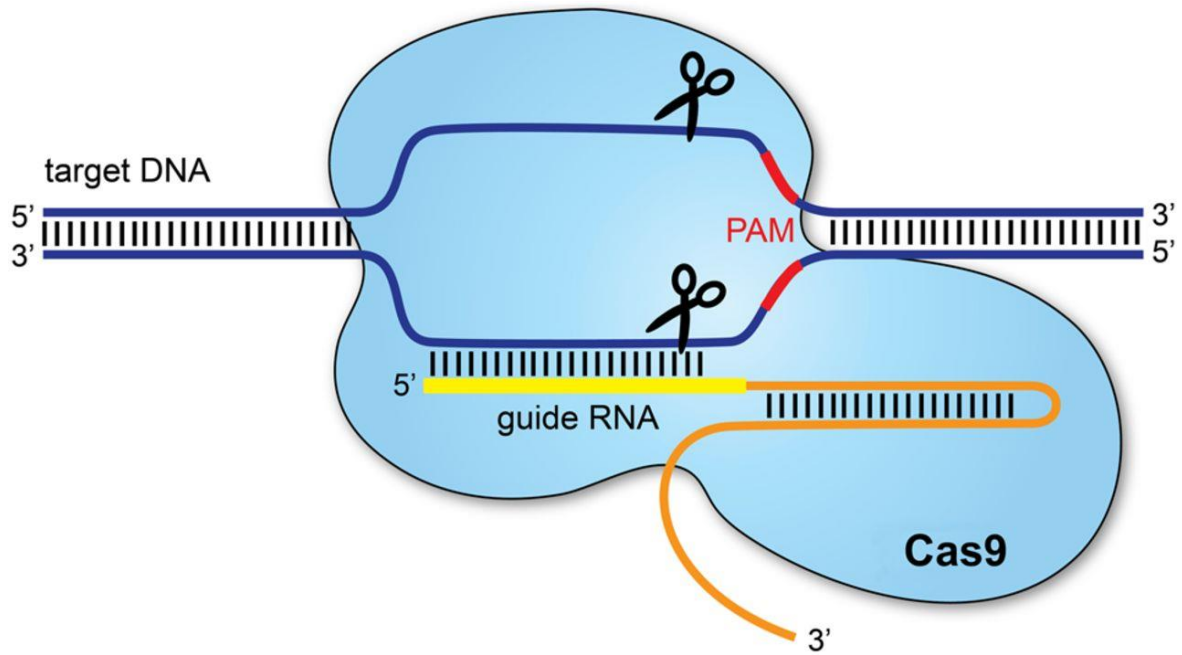
Programovatelné nukleázy jsou rekombinantní enzymy vytvářející místně specifické dvojvláknové zlomy (DSB) v požadovaných místech genomu. Vazbu k určitému místu na DNA lze u nich programovat podle potřeby modifikací vazebné domény a připojená nukleázová podjednotka zodpovídá za štěpení DNA na přilehlém místě. Indukované dvouvláknové zlomy jsou opraveny spojením nehomologických konců (NHEJ) nebo homologní rekombinací (HR), což vede k cílené modifikaci DNA *in vivo*. (Kim et. al, 2014). Programovatelné nukleázy se liší ve složení, schopnosti rozpoznávat cílové úseky na DNA i specifitě. Mají řadu laboratorních aplikací, včetně tvorby buněčných a zvířecích modelů lidských genetických onemocnění a funkčních genomických testů. Další potenciální klinické aplikace zahrnují genovou terapii, léčbu infekčních

onemocnění jako je HIV, jsou potenciálním nástrojem pro léčbu rakoviny i dalších onemocnění.

1.4.1. Programovatelné nukleázy typu CRISPR/Cas

Programovatelné nukleázy typu „Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9“ (CRISPR/Cas) se během krátké doby staly nepostradatelným nástrojem současné molekulární biologie. Systém CRISPR/Cas9 je přirozenou součástí adaptivní imunitní odpovědi bakterií a archaea, který je chrání před invazí virusovou a plasmidovou DNA. Poprvé byl popsán v roce 1987 u bakterie *Escherichia coli* (Ishino et al. 1987), ale jeho funkce v adaptivní imunitě byla objasněna mnohem později (Makarova et al. 2006, Barrangou et al. 2007). CRISPR/Cas se používají u octomilky od roku 2013 (Gratz et al. 2013) a jsou v současnosti nejpoužívatelnějšími umělými nukleázami.

CRISPR/Cas9 je nukleáza, která zahrnuje dvě základní složky: „guide-RNA“ (gRNA), která odpovídá za navádění komplexu nukleázy k požadovanému cílovému genu a Cas9 proteinovou endonukleázu způsobující přerušení dvouvláknové DNA. Nyní je možné používat transgenní linie octomilky, které produkují endonukleázu Cas9 v zárodečné linii a pro indukce mutací stačí mikroinjikovat do časných embryí této linie plazmid produkující příslušnou „guide RNA“ specifickou pro gen, který chceme mutagenizovat. Pro přípravu delecí se obvykle mikroinjikují dvě různé „guide RNA“ specifická pro místa v DNA ohraničující plánovanou delecí. Většina expresních systémů CRISPR/Cas9 pro zajištění produkce gRNA používá promotor RNA polymerázy III (Pol III), jako je U6 (Jiang and Doudna 2017). Schematické znázornění programovatelné nukleázy typu CRISPR/Cas9 je uvedeno na obrázku č. 5.



Obr. č. 5.: *Systém CRISPR/Cas9. Nukleáza Cas9 je na svůj cíl naváděna sekvencí RNA (sgRNA). Tato dvacetinukleotidová sekvence RNA se komplementárně váže na genomovou DNA ve specifickém místě. Aby došlo ke štěpení DNA, musí na 3' konci gRNA ležet ještě specifická sekvence DNA o délce 2 a 5 nukleotidů, „Protospacer adjacent motif“ (PAM), která navazuje za komplementární sekvencí gRNA. Oprava po rozštěpení DNA může nastat dvěma způsoby: nehomologním spojením konců vedoucím k náhodné inserci / delecii DNA nebo může být poškozená DNA opravena pomocí homologické sekvence, jež je použita jako templát pro opravu. Homologní část DNA s požadovanou změnou sekvence může být dodána ve formě donorového plazmidu spolu s nukleázou Cas9 a sgRNA a tím je umožněna přesná editace genomu (Redman et. al, 2016) (převzato z <https://ep.bmj.com/>).*

2 Cíle práce

1. Připravit homozygotní jedince *D. melanogaster* s malou a s velkou delecí v genu *CNT1* a pozorovat jejich fenotypické projevy v účincích plodnosti.
2. Připravit jedince *D. melanogaster* s heteroalelickou kombinací specifické delece *CNT1* a velké delece, postihující celou oblast genů včetně genu *CNT1* a srovnat fenotyp (plodnost) těchto mušek s předchozími fenotypy.
3. Vytvořit programovatelnou nukleázu CRISPR/Cas pro přípravu další delece.

3 Materiál a metody

3.1 Příprava homozygotních jedinců *D. melanogaster* s malou a velkou delecí v genu *CNT1*

3.1.1 Kultivace octomilek

Chov a kultivace *D. melanogaster* je nenáročná a práce nevyžaduje mnoho technických dovedností. V naší laboratoři jsou octomilky chovány ve skleněných vialkách utěsněných vatou, na jejichž dně se nachází „potrava“ (8% kukuřičná mouka, 5% cukr, 1% agar a 4% kvasnice), která slouží jako potrava pro larvy i dospělé, ale také jako živné medium pro kladení vajíček. Vialky s přiměřeným počtem jedinců jsou udržovány pomocí inkubátoru při teplotě 25°C. Jedinci z každé vialky jsou nejpozději po 14 dnech přeneseny do vialky s čerstvou potravou. Při provádění našeho experimentu byly jednotlivé generace přenášeny do nových vialek nejpozději po 9 dnech, aby v původní vialce mohli být vyvinuti pouze jedinci z druhé generace (potomstvo). Každá vialka je označena genotypem a datem, popř. pohlavím.

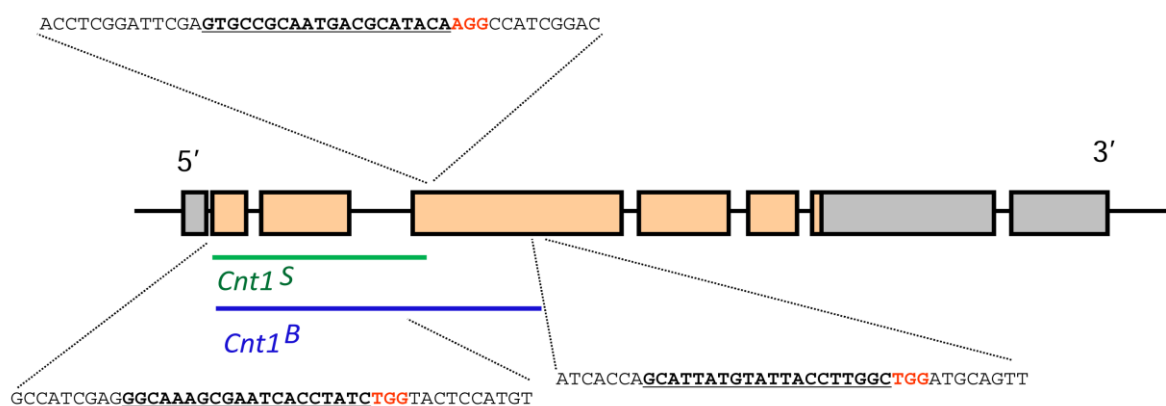
3.1.2 Mouchy „divokého typu“

Pro každý experiment s *D. melanogaster* je nezbytné mít jako kontrolu tzv. mouchy divokého typu (wild-type, WT). Jedná se o mouchu se standardním přírodním fenotypem (vzhledem) ke studovanému genu. Divokým typem může být zvolena jakákoliv populace bez mutací, nicméně nejrepresentativnější jsou mušky ulovené ve volné přírodě. V našem experimentu jsme jako kontrolní divoký typ zvolili kmen „Canton S“ s bílou barvou očí způsobenou mutací v genu pro barvu oka, protože byl mutantním mouchám nejbližší. Tyto mušky byly použity jako kontrolní ke všem provedeným experimentálním křížením.

3.1.3 Mutantní mouchy s delecí *CNT1*

Delece patří mezi základní strukturní aberace, vznikají při chromozomových zlomech nebo rekombinacích buď spontánně nebo působením vnějších mutagenních faktorů. Při delecí je odstraněn jeden či více nukleotidů z nukleotidové sekvence, chybí tedy část DNA a může to mít důsledky na fenotyp a vést ke vzniku různých onemocnění. V této práci byla použita *D. melanogaster* se dvěma delecemi v genu *CNT1*. Mutantní mouchy nesoucí delece v genu *CNT1* byly vytvořeny Mgr. Markem Rennerem v roce

2015 metodou CRISPR/Cas (Renner 2015). Menší delece obsahuje ztrátu 750 bp a zahrnuje celý druhý a třetí exon a malou část čtvrtého exonu a introny 2 a 3. Jedinci nesoucí tuto mutaci produkují zkrácený CNT protein, který ztratil 3 z celkem 13 transmembránových úseků. Větší delece obsahuje ztrátu 1074 bp, obsahuje celý druhý a třetí exon a velkou část čtvrtého exonu. Obě delece jsou zobrazeny na obrázku č. 6.



Obr. č. 6: Schematické znázornění velké a malé delece v genu *CNT1*. Malá delece je označena jako *Cnt1^S*, velkou deleci značí *Cnt1^B*. Vyznačeny jsou i sekvence pro konstrukci použitých nukleáz CRISPR/Cas (podle Renner, 2015).

Kromě těchto delecí jsme používali ještě mutanty s rozsáhlou delecí *Df(2R)PPO2A* postihující 90 kb úsek na pravém rameni chromozomu 2, včetně genu *CNT1*. Tato moucha byla životaschopná pouze v heterozygotním stavu (oproti balanceru) a byla získána z Drozofilího centra v Bloomingtonu (USA).

3.1.4 Křížení octomilek pro testování fertility samců

Pro dosažení reprodukovatelných výsledků křížení je nezbytné začít s virginelními samicemi („pannami“). Ty jsou nejsnadněji získávány prvních 8 hodin po vylíhnutí, kdy se ještě nepáří. Podle jejich cirkadiánních rytmů se jich nejvíce vylíhne ráno. Druhá nejvhodnější doba pro odběr panen je 7 – 8 hodin od ranního roztrídění. Rozpoznání panen je velmi snadné. Na první pohled jsou menší než starší samice, mají bledou pigmentaci a tmavou skvrnu v jejich průsvitných břišních dutinách. Tato tmavá skvrna je muší verze *meconia* (zbytky ve střevě od posledního jídla ve stadiu larvy). Účinnou metodou pro získání co největšího počtu panen je umístění kultur přes noc do 18°C, čímž se dostatečně zpomalí jejich vývoj a nedochází k páření po dobu až 16 hodin.

Samci mohou být sbíráni téměř kdykoliv. Jedinou podmínkou je, že musí být staří nejméně 3 dny a nejvíce 10 dní. Jejich rozmnožovací schopnosti jinak nebudou tolik efektivní. V našem experimentu byli samci staří 3 – 5 dní a poté byli kříženi s pannami.

Samice i samci ve vialkách se nejprve uspí. V naší laboratoři se jako anestetikum používá CO₂. Hadička se vloží do vialky a když jsou mouchy uspány, vysypou se na porézní destičku, kde jsou neustále vystavovány působení CO₂ a lze tak snadno pod binolupou roztrdit samce, samice, panny nebo pozorovat markery.

Cílem tohoto křížení bylo získat homozygotní jedince s mutacemi v *CNT1* a sledovat míru plodnosti u heteroalelických kombinací samců s malou delecí (*CNT1^S*) a samců s velkou delecí (*CNT1^B*). Schéma genotypů výchozích linií je uvedeno na obrázku č. 7.

$$\text{cnt1}^S: \quad w; \frac{CNT1}{CNT1}; +$$

$$\text{cnt1}^B: \quad w; \frac{CNT1}{CyO-GFP}; +$$

Obr. č. 7: Schéma výchozích genotypů pro další křížení. Pro *cnt1^S* (*CNT1* s malou delecí) nebyl použit žádný balancerový chromozom, jednalo se o zcela homozygotního jedince. U samce *cnt1^B* (*CNT1* s velkou delecí) se nachází *CyO*, tedy balancer, který se projevuje křídly zahnutými nahoru a expresí *GFP* (Green Fluorescent Protein).

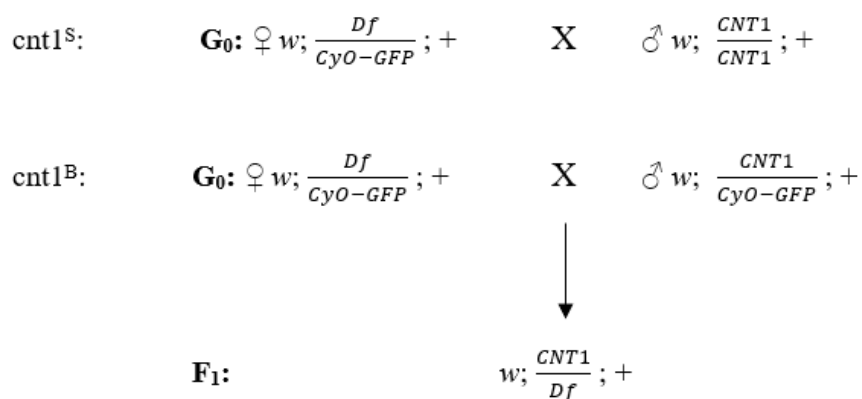
Prvním krokem bylo získání dostatečného počtu homozygotních jedinců pro každou delecí. Z obou kultur byli poté vybráni pouze samci homozygotní pro gen *CNT1* – tzn., že i samci s velkou delecí neobsahovali balancerový chromozom *Cyo-GFP*. Po získání dostatečného počtu těchto samců a virginelních samic divokého typu začíná samotné křížení. Celkové schéma křížení je uvedeno na obrázku č. 8.

$$\mathbf{G_0:} \quad \text{♀ } w^- \quad \mathbf{X} \quad \text{♂ } w; \frac{CNT1}{CNT1}; +$$

Obr. č. 8: Schéma křížení jedinců pro zjištění fertility samců *CNT1^S* a *CNT1^B*. Protože byli kříženi pouze samci homozygotní pro gen *CNT1*, genotypy obou samců se neliší.

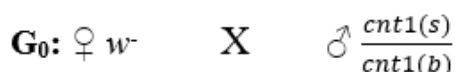
Dále bylo provedeno křížení jedinců *CNT1^S* a *CNT1^B* s jedinci *Df(2R)PPO2Δ* – jedinci s delecí, která zahrnovala kromě delece v genu *CNT1* i odstranění několika ostatních genů. Schéma tohoto křížení je znázorněno na obr. č. 9. Samci z první generace

byli opět zkříženi s virginelními samicemi divokého typu za účelem sledování fenotypických projevů v účincích plodnosti. Protože obě malé delece pocházely z jedné původní muší linie, která mohla obsahovat jinou mutaci na jiném místě, kombinace malých delecí s velkou deficiencí nám sloužila k potvrzení, že pozorovaný fenotyp souvisí skutečně s genem *CNT1*.



Obr. č. 9: Schéma křížení mutantů *CNT1* s jedinci obsahujícími velkou deficienci *Df(2R)PPO2A* pro potvrzení pozorovaných fenotypů.

Byla také vytvořena heteroalelická kombinace vzájemným zkřížením několika mušek s *CNT1^S* a *CNT1^B*. Z potomků tohoto křížení byli vybráni samci s kombinací obou alel, kteří byli při testu fertility kříženi s muškami divokého typu. Křížení sloužící k pozorování fertility je schematicky znázorněno na obrázku č. 10.



Obr. č. 10: Schéma křížení jedince s heteroalelickou kombinací s muškami divokého typu.

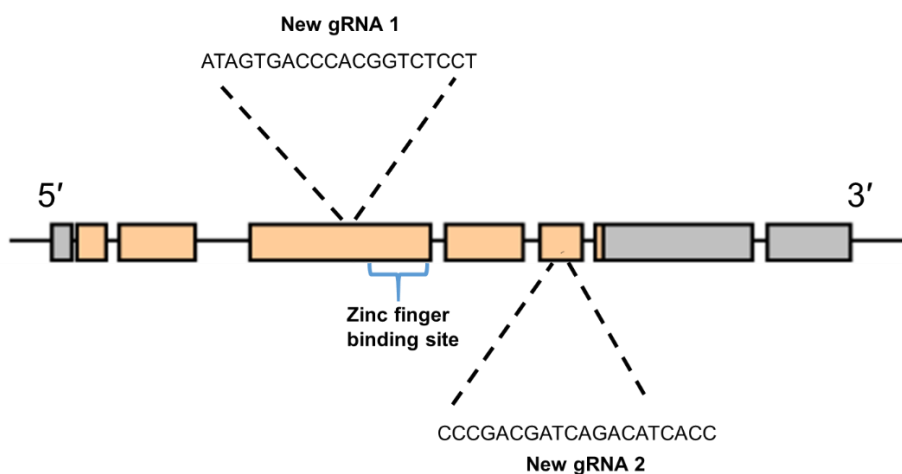
K vlastnímu testování fertility bylo vždy vybráno 10 panen a jeden samec starý 3 – 5 dní. 24 a 48 hodin po zkřížení byly vždy samice po jedné rozděleny do samostatných vialek. Po několika dnech bylo pozorováno, v kolika vialkách se vylíhly larvy, tzn. kolik samic bylo oplozených.

3.2 Navržení programovatelných nukleáz CRISPR/Cas

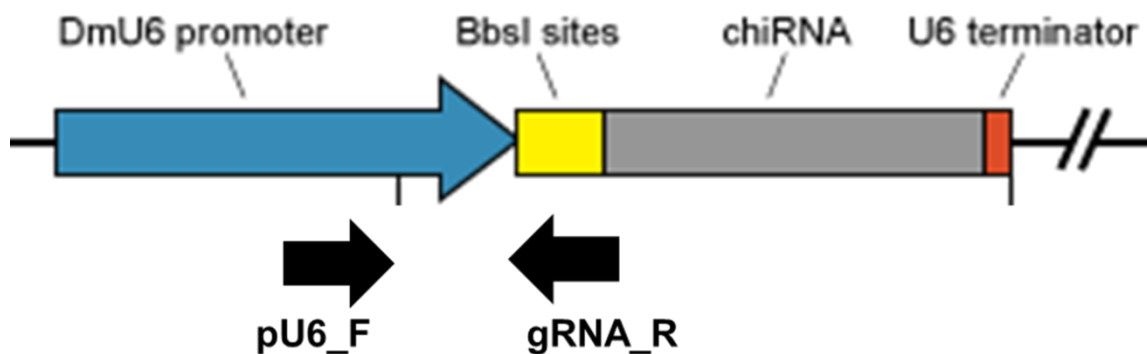
Dalším cílem této práce bylo navržení programovatelných nukleáz CRISPR/Cas pro gen *CNT1*. Genomová analýza ukazuje, že se na konci třetího exonu *CNT1* nachází

vazebné místo zinkového prstu (ZFBS). Abychom zjistili roli ZFBS ve spermatogenezi, připravili jsme nové CRISPR gRNA pro generování nové mutantní mouchy.

K expresi gRNA byly použity plazmidy *pBFv-U6.2* a *pBFv-U6.2B*. Mapa genu *CNT1* s vyznačenými mutagenizovanými místy a schéma konstruktů s promotorem U6 jsou zobrazeny v obrázku č. 11 a 12 (podrobná mapa obou vektorů je v přílohách č. 1 a 2). Jak je a zřejmé z obrázku, pro gen *CNT1* byly navrženy dvě programovatelné nukleázy CRISPR (s použitím webového online programu TAL Effector Nucleotide targeter 2.0), každá s cílovou sekvencí dlouhou 23 nukleotidů. Sekvence genu *CNT1* s vyznačenými nukleázami CRISPR je znázorněna v příloze č. 3.



Obr. č. 11: Mapa genu *CNT1* s vyznačenými mutagenizovanými místy



Obr. č. 12: Schéma konstruktů gRNA pod promotorem U6 (celé vektory jsou znázorněny v příloze).

3.2.1 Příprava konstruktů CRISPR – fosforylace a nasedání oligonukleotidů

Prvním krokem byla fosforylace syntetických oligonukleotidů, které byly použity k vytvoření gRNA programovatelných nukleáz CRISPR. K fosforylaci byl použit enzym

T4 – polynukleotid kináza (Thermo Scientific), který katalyzuje mimo jiné přenos gama – fosfátu z ATP na oligonukleotidy.

Oligonukleotidy byly na 30 minut zahřívány v inkubátoru ve 37°C, po 30 minutách byla směs na 5 minut vystavena teplotě 95°C a poté byla postupně ochlazována až na teplotu 25°C, což umožnilo nasedání oligonukleotidů. Byla připravena ligační reakční směs o celkovém objemu 10 µl, která obsahovala:

- 100 pmol oligonukleotidu A,
- 100 pmol oligonukleotidu B (oba Generi Biotech),
- 1x reakční pufr pro T4-polynukleotid kinázu
- 10 U T4-polynukleotid kinázy.

Kinázová reakce probíhala půl hodiny ve 37°C.

3.2.2 Štěpení plazmidu

Dalším krokem bylo restriční štěpení plazmidu *pBFv-U6.2* a *pBFv-U6.2B*, aby mohla být následně provedena ligace oligonukleotidů. Pro štěpení byl použit enzym *BbsI*. Štěpení plazmidů probíhalo v inkubátoru ve 37°C po dobu 6 hodin. Štěpení probíhalo v této reakci:

- 1 µl plazmidu (1 µg)
- 15 µl H₂O
- 1 µl BSA (purifikovaný albumin)
- 2 µl 10x reakční pufr
- 1 µl *BbsI* (10 jednotek)

3.2.3 Defosforylace plazmidu

Bylo potřeba zabránit opětovnému ligování vektoru bez jakéhokoliv inzertu. V průběhu šestihodinového štěpení plazmidů došlo k přidání 1 µl enzymu alkalické fosfatázy (CIP). Enzym byl přidán do výše uvedené reakční směsi po 3 hodinách a jeho pomocí nastala defosforylace 5' konce u plazmidu.

3.2.4 Purifikace, gelová elektroforéza

Po naštěpení a defosforylaci plazmidů byla u obou plazmidů provedena purifikace pomocí agarózové gelové elektroforézy. Purifikací došlo k odstranění molekul plazmidu, které nebyly naštěpeny.

Pro přípravu 0,75 % agarózového gelu jsem přidala do 20 ml 1x TAE pufru 0,15 g agarózy, za tepla rozpustila, přidala ethidiumbromid do koncentrace 0,5 µg/ml a gel nalila do formy s rozdělovacími hřebínky. Ztuhlý gel jsem ponořila do elektroforézní nádoby s 1x TAE pufrem a do jamek nanasla připravené vzorky spolu se standardem molekulových hmotností. Gel jsem pouštěla při 65-70 V/cm a výsledky odečetla pomocí UV-transiluminátoru.

Pod UV lampou jsme z gelu vyřízli proužek DNA obsahující štěpený a defosforylovaný plazmid, který jsme pak vyčistili pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

3.2.5 Ligace komplementárně nasedlých oligonukleotidů

Metoda ligace se používá k integraci oligonukleotidů do plazmidů prostřednictvím enzymu T4 DNA ligázy, která katalyzuje spojení volných konců. Reakce probíhala v 16°C a reakční směs obsahovala:

1 µl plazmidu *pBFv-U6.2* nebo *pBFv-U6.2B* (c=80 ng/µl)

1 µl T4 - DNA ligáza (10 u)

2 µl T4 – DNA ligační pufr

1 µl fosforylovaného oligonukleotidu (c=150 ng/µl)

4 µl H₂O

3.2.6 Transformace do kompetentních bakterií

Po provedení ligace byla ligační směs transformována do kompetentních buněk bakterie *E.coli* kmene Zymo 5a. Tyto bakterie jsou schopny přijmout cizorodou exogenní DNA. Kompetentní buňky jsem nechala na ledu rozmrazit, přidala 5 µl ligační směsi na 100 µl buněk a nechala 20 minut inkubovat na ledu. Poté jsem provedla tepelný šok (45 sec při teplotě 42°C) a ihned přenesla buňky zpět na led. K buňkám jsem přidala 0,5 ml tekutého LB média a nechala vše třepat při 37°C po dobu 45 min. Na předem připravené misky s tuhým LB médiem a ampicilinem (100 µg/ml) jsem přenesla asi po 200 µl

bakteriální směsi, rozetřela hokejkou a nechala přes noc inkubovat v 37°C. Narostlé kolonie jsem příští den přenesla na novou agarovou misku.

3.2.7 Ověřování úspěšnosti ligace (metodou PCR)

Ověření kolonie s integrovaným insertem bylo provedeno pomocí PCR s primery „reverse primer“: 5' – GAAGTATTGAGGAAAACATACCTATATAAATG – 3' • a „gRNA forward primer“ (G-frv), který je unikátní pro každý konstrukt.

PCR reakce:	PCR program:	
1,5 µl 10x Taq PCR pufu – MgCl ₂	94°C	2 min 30 sec
1,0 µl MgCl ₂ (25 mM)	94°C	30 sec
1,5 µl dNTP mixu (10 mM)	57°C	30 sec
1,0 µl + 1,0 µl primerů „rev“ a „G-frv“ (10 µM)	72°C	2 min 15 sec
0,3 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl)	kroky 2-4 opakovány 30x	
3,7 µl ddH ₂ O	72°C	7 min

část kolonie rozpuštěné v 5 µl ddH₂O

3.2.8 Purifikace plazmidové DNA z bakterií a sekvenování

Vybrané kolonie jsem přenesla do 3 ml tekutého LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a nechala růst po dobu 12 hod při 37°C za stálého třepání. Narostlé buňky jsem stočila 1 min při 7000 rpm a sediment byl použit na izolaci plazmidů pomocí kitu firmy Qiagen „QIAprep Spin Miniprep Kit“ podle instrukcí výrobce. Správnost klonovaného úseku byla ověřena sekvenováním, které bylo provedeno firmou GATC.

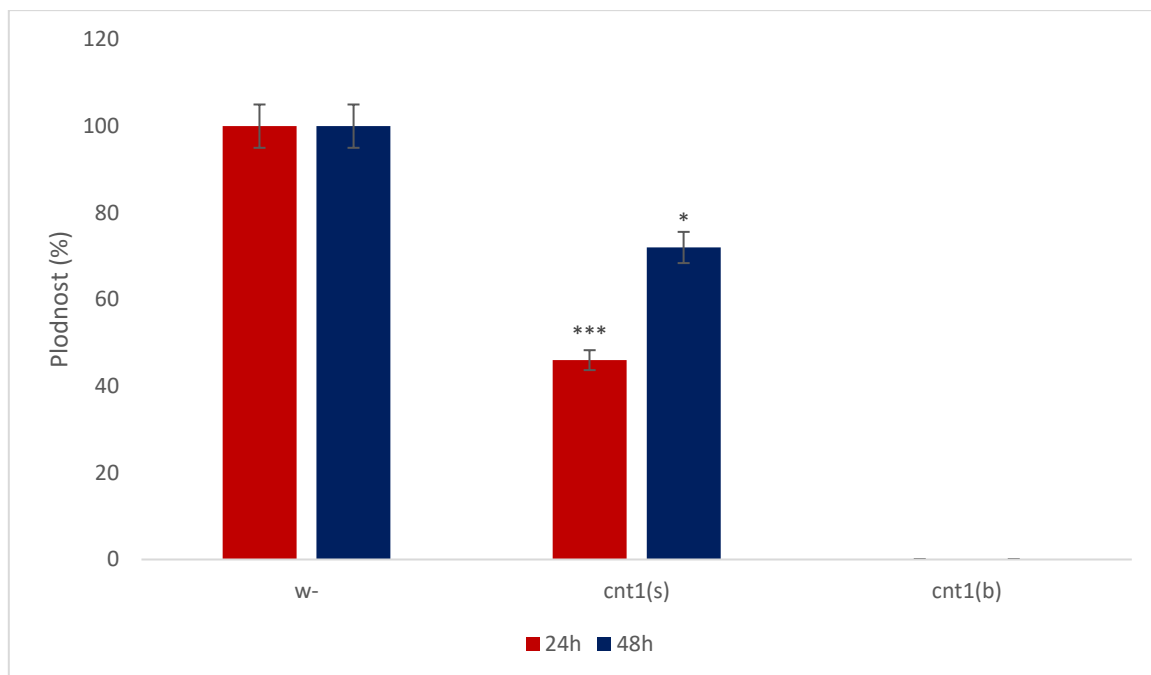
4 Výsledky

4.1 Křížení jedinců *D. melanogaster* s malou a velkou delecí v genu *CNT1*

V genu *CNT1* byla vytvořena mutace odstraněním menší a větší části tohoto genu. Pro křížení byly vybrány virginelní samice divokého typu (w^+) a tato kultura byla použita také pro kontrolní křížení. Bylo zkříženo celkem 10 samic s jedním 3 – 5 dnů starým samcem a po 24 a 48 hodinách byly samice po jedné separovány do jednotlivých vialek. Po několika dnech byla sledována fertilita – spočítaly se vialky, v nichž se vylíhly larvy (tzn. kolik vialek s larvami, tolik samic bylo oplozených). Z celkového počtu vialek (většinou 10, někdy však došlo k úhynu jedné či více samic ještě před samotným oddělením) se vypočetlo procento vialek s vylíhnutými larvami. Pro každé křížení bylo provedeno několik opakování a poté se vypočetl průměr a pomocí párového t-testu bylo zjištěno, jestli se výsledky mutantních much významně liší od kontrolního divokého typu mušek. U kontrolních křížení bylo vždy dosaženo 100% fertility (ve všech vialkách se vylíhly larvy). Vypočítáním průměru a t-testem byla zjištěna míra plodnosti samců a výsledky byly použity pro vytvoření výsledných grafů.

Při prvním křížení bylo u jedinců s malou delecí (*CNT1^S*) procentuální zastoupení fertálních samců po 48 hodinách rovno 72%. Po 24 hodinách byla fertilita samců 46%.

Pro jedince s velkou delecí (*CNT1^B*) nebyla ani v jednom případě prokázána jakákoliv fertilita – procentuální zastoupení fertálních samců bylo v tomto případě 0%. Výsledky testů fertility jsou zobrazeny na obrázku č. 13.



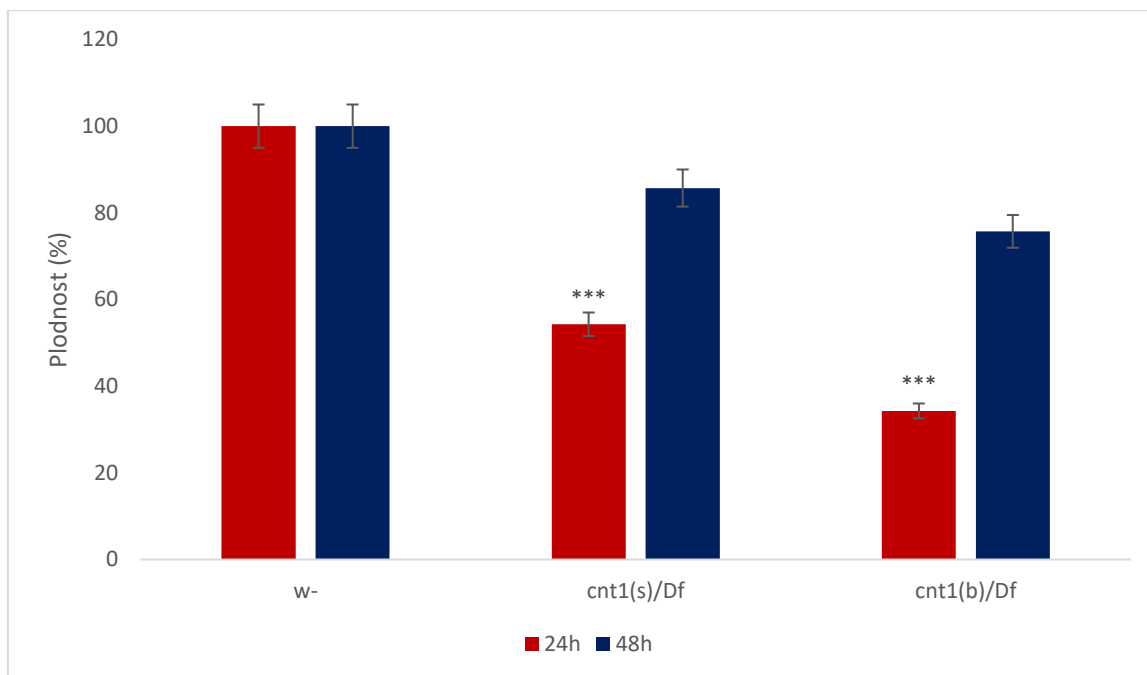
Obr. č. 13: Procentuální zastoupení fertálních jedinců s velkou a malou delecí v genu *CNT1*.

4.2 Příprava heteroalelických kombinací mutantů *CNT1* s jedinci *Df(2R)PPO2A*

Dalším pokusem bylo zkřížení mušek *CNT1^S* s jedinci *Df* a mušky s *CNT1^B* s jedinci *Df* a s potomky provést stejné křížení jako v kapitole 4.1.

Při tomto křížení byla fertilita v obou případech vyšší. Pro *CNT1^S/Df* bylo procentuální zastoupení fertálních jedinců po 48 hodinách téměř 86% a po 24 hodinách lehce přes 54%.

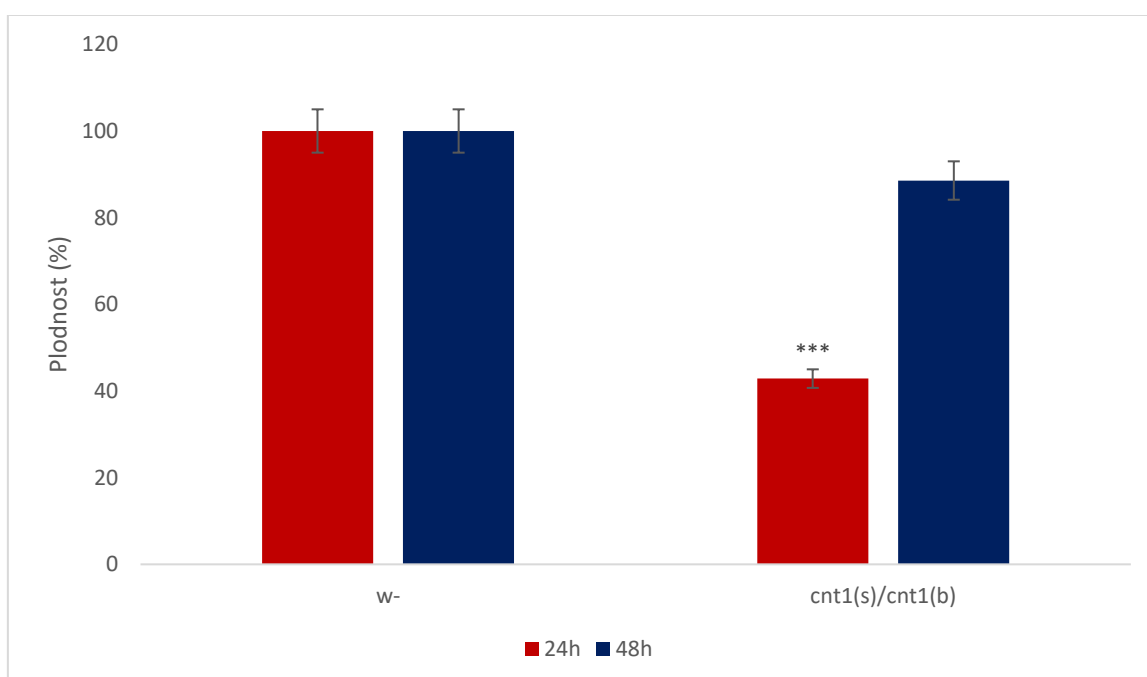
U velké delece se jednalo o 76% po 48 hodinách a o 34% po 24 hodinách. Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 14.



Obr. č. 14: Procentuální zastoupení fertálních jedinců s deficiencí pro gen *CNT1*.

4.3 Křížení jedinců s heteroalelickou kombinací *CNT1^S* a *CNT1^B*

Posledním pokusem bylo získání jedinců s heteroalelickou kombinací (jedinců s malou i velkou delecí) a jejich zkřížení stejně jako v kapitolách 4.1 a 4.2. Výsledkem tohoto křížení je 86% fertálních jedinců po 48 hodinách a 43% fertálních jedinců po 24 hodinách. Výsledný graf je uveden na obrázku č. 15.



Obr. č. 15: Procentuální zastoupení fertálních jedinců s heteroalelickou kombinací *CNT1^S/CNT1^B*.

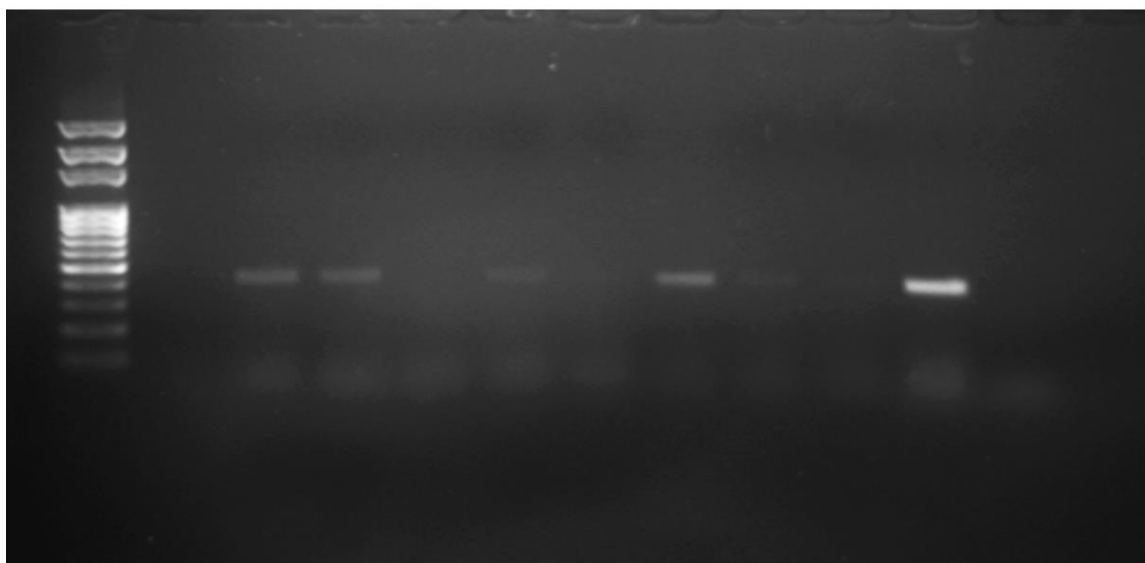
4.4 Navržení programovatelných nukleáz CRISPR pro gen *CNT1*

Během této práce byly také navrženy programovatelné nukleázy CRISPR pro gen *CNT1* k vytvoření nového mutantního jedince. Byly navrženy dvě programovatelné nukleázy CRISPR. Sekvence genu *CNT1* včetně vyznačených cílových sekvencí pro nukleázy CRISPR je zobrazena v příloze na obrázku příloha č. 3.

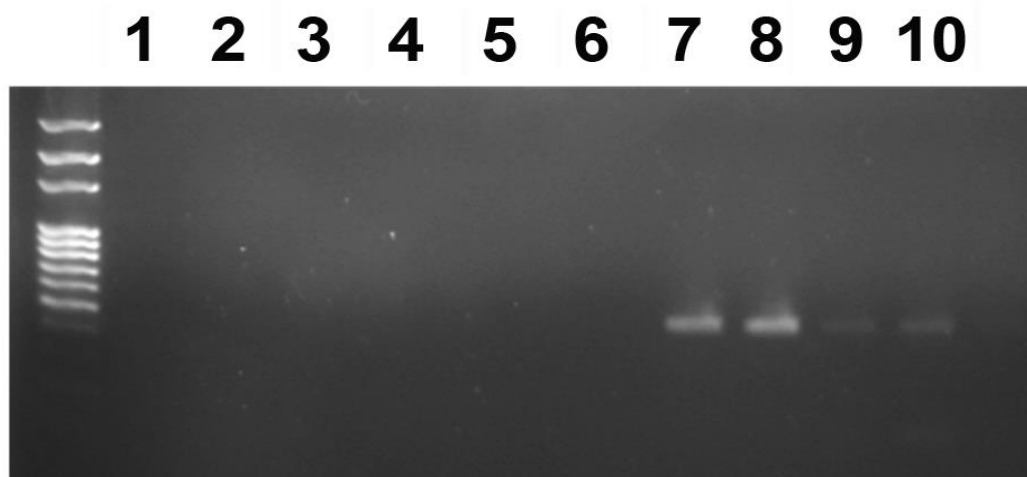
4.4.1 Ligace oligonukleotidů do plazmidů *pBFv-U6.2* a *pBFv-U6.2B*

Ligaci oligonukleotidů do plazmidů *pBFv-U6.2* a *pBFv-U6.2B* jsme ověřili pomocí metody PCR. Ligace dopadla úspěšně a ověření metodou PCR je zobrazeno na obrázku č. 16 a 17 – pro plazmid *pBFv-U6.2* je v drahách č. 1, 2, 6 a 9 zřetelně detekován PCR produkt a pro plasmid *pBFv-U6.2* je produkt PCR detekován v drahách č. 7-10.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Obr. č. 16: Ověření správně vložených oligonukleotidů do plazmidu *pBFv-U6.2* pomocí gelové elektroforézy. Vlevo je marker molekulových hmotností, ve vzorcích 1, 2, 6 a 9 jsou pozitivní signály.



Obr. č. 17: *Ověření správně vložených oligonukleotidů do plazmidu pBFv-U6.2B pomocí gelové elektroforézy. Vlevo je marker molekulových hmotností, ve vzorcích 7-10 jsou pozitivní signály.*

Podářilo se navrhnout a vytvořit dvě programovatelné nukleázy CRISPR, k jejich úspěšnému mikroinjektování do vajíček *D. melanogaster* však již kvůli časové náročnosti nedošlo a bude dokončena později (v létě 2019).

5 Diskuze

Použití octomilky jako genetického modelu umožňuje důkladné prozkoumání fyziologické funkce neznámého genu. Jedním z možných genetických nástrojů pro mutagenezi je programovatelná nukleáza CRISPR, která byla v předchozích pokusech použita k vytvoření dvou různých mutací v *CNT1* (Renner, 2015). Generované mutace jsou *CNT1^S*, jež odráží částečnou delecí genu a *CNT1^B*, která obsahuje velkou delecí a považujeme ji za „nulovou“ mutaci. Je zajímavé, že obě delece vykazují problém s plodností u samců, což odpovídá údajům o expresi toho genu z Flybase, jak bylo uvedeno výše. Tyto mutace proto nabízejí výbornou příležitost porozumět regulacím plodnosti u samců.

Mutantní mouchy *CNT1^S* byly částečně fertillní, zatímco mutace *CNT1^B* způsobila plnou samčí sterilitu. Mouchy *CNT1^S* měly významně sníženou fertilitu, jak je zřejmé z pokusů se samicemi do 24 hodin ve srovnání s dobou páření 48 hodin. Je pozoruhodné, že protein CNT1 je schopen částečné funkce i po ztrátě velké části své molekuly, postihující 3 ze 13 transmembránových úseků. Podobná delecí tří N-koncových transmembránových domén byla charakterizována u krysího CNT1 a mutantní protein vykazoval rovněž částečnou funkci (Hamilton et al., 2001) Mutantní samci *CNT1^S* tedy potřebují více času, aby byli schopni všechny samičky oplodnit. Test plodnosti heteroalelických kombinací mutantů také ukázal problém s plodností, což potvrdilo pozorovaný fenotyp. Tyto fenotypy byly dále potvrzeny i kombinací *CNT1^S* i *CNT1^B* s linií nesoucí velkou deficienci *Df(2R)PPO2A*, u které chybí kromě *CNT1* ještě řada dalších genů. Kupodivu byl fenotypický účinek slabší než u homoalelické kombinace *CNT1^B/CNT1^B*. Naznačuje to, že fertilitu ovlivňují v opačném směru zřejmě i další geny uvnitř deletovaného úseku anebo mutant *CNT1^B* obsahuje ještě přídatnou mutaci v jiném místě, která fenotyp zhoršuje.

Protože *CNT1* způsobuje sterilitu u samčích mušek, očekáváme, že má klíčovou úlohu při udržování samčí spermatogeneze. To je v současnosti testováno dalšími pokusy v naší laboratoři pomocí imunohistochemické techniky s cílovými buňkami v testes octomilek. Kromě toho, pomocí protilátek zaměřených na hlavičky spermií lze kontrolovat, zda mutace *CNT1* reguluje organizaci spermií nebo jakýkoli krok spermatogeneze.

Výsledky této práce mohou přispět k pochopení, případně vývoji terapie pro případnou léčbu mužské neplodnosti u člověka. Přítomnost adenosinu v mužském

reprodukčním traktu a receptoru adenosinu na spermiích silně naznačuje funkční úlohu těchto receptorů ve fyziologii a funkci spermií (Bellezza and Minelli, 2017). Bylo například zjištěno, že motilita lidských spermií se zvýší po přidání extracelulárního ATP (Edwards et al., 2007). Pro hledání souvislostí s člověkem je při dalším výzkumu vlivu CNT1 a adenosinu na fertilitu u drozofil potřeba podrobně analyzovat anomálie (počet, funkčnost a vývoj spermií) v mutantních mouchách.

6 Závěr

Pomocí malé a velké delecce *CNT1^S* a *CNT1^B* v genu *CNT1* byl prokázán vliv tohoto genu na fertilitu samců. Jedinci s malou delecí mají prokazatelně nižší plodnost v porovnání s kontrolními jedinci. U jedinců s velkou delecí byla fertilita nulová. Je zajímavé, že tento fenotyp je silnější než kombinace *CNT1^B* s velkou deficiencí *Df(2R)PPO2Δ* s delecí dalších několika genů včetně genu *CNT1*. U mušek *CNT1^B/Df(2R)PPO2Δ* byla rovněž prokázána snížená fertilita samců a podobně u kombinace *CNT1^S* s *Df(2R)PPO2Δ*. Fertilitu ovlivňují v opačném směru zřejmě i další geny uvnitř deletovaného úseku.

Byly vytvořeny nové programovatelné nukleázy typu CRISPR, které budou použity pro další práci a pro vytvoření nového mutagenizovaného jedince umožňujícího další analýzy fenotypu.

7 Seznam literatury

Atkinson, A. Jr., Abernethy, D., Daniels, Ch., Dedrick, R., Markey, S. (2006). *Principles of Clinical Pharmacology*, 2, 205.

Barrangou R., Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

Bellezza, I., Minelli, A. (2017). Adenosine in sperm physiology. *Mol Aspects Med.* 55, 102 – 109.

Campos-Ortega, J. A., Hartenstein, V. (1985). Introductory Remarks. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*, 1, 10.

Cliffe, S. T., Kramer, J. M., Hussain, K., Robben, J. H., Jong, E. K., Brouwer, A. P., Nibbeling, E., Kamsteeg, E.-J., Wong, M., Prendiville, J., James, Ch., Padidela, R., Becknell, Ch., Bokhoven, H., Deen, P. M. T., Hennekam, R. C. M., Lindeman, R., Schenck, A., Roscioli, T., Buckley, M. F. (2009). SLC29A3 gene is mutated in pigmented hypertrichosis with insulin-dependent diabetes mellitus syndrome and interacts with the insulin signaling pathway. *Human Molecular Genetics*, 18, 2257 – 2265.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1995). Green Fluorescent Protein As a Marker for Gene Expression. *Science*. 263, 802 – 805.

Chyb, S., Gompel, N. (2013). *Atlas of Drosophila Morphology. Wild-type and classical mutants*. 1, 18 – 221.

Edwards, S.E., Buffone, M.G., Knee, G.R., Rossato, M., Bonanni, G., Masiero, S., Ferasin, S., Gerton, G.L., Moss, S.B., Williams, C.J. (2007). Effects of Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate on Human Sperm Motility. *Reproductive Sciences*. 14, 655 – 666.

Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology. *Methods Mol Biol.*, 372, 33 – 49.

Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., O'Connor-Giles, K.M. (2013) Genome Engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genetics*. 2013 Aug; 194(4): 1029–1035.

Guillén-Gómez, E., Calbet, M., Casado, J., Lecea, L., Soriano, E., Pastor-Anglada, M., Burgaya, F. (2004). Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *Journal of Neurochemistry*. 90, 883 – 893.

Greenspan, R. J. (2004). *Fly Pushing*. The Theory and Practice of *Drosophila* Genetics. 2, 3 – 15.

Hamilton SR, Yao SY, Ingram JC, Hadden DA, Ritzel MW, Gallagher MP, Henderson PJ, Cass CE, Young JD, and Baldwin SA (2001) Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem* 276:27981–8.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987 Dec;169(12):5429-33.

Jiang, F., and Doudna J. (2017) CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*. Vol. 46:505-529.

Kato, R., Maeda, T., Akaike, T., Tamai, I. (2005). Nucleoside Transport at the Blood-Testis Barrier Studied with Primary-Cultured Sertoli Cells. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 312, 601 – 608.

- Kim, H., Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*. 15, 321 – 334.
- Klein, D. M., Harding, M. C., Crowther, M. K., Cherrington, N. J. (2017). Localization of nucleoside transporters in rat epididymis. *J. Biochem Mol Toxicol*. 1, 1 – 3.
- Liu, T., Pan, S., Li, Y., Peng, N., She, Q. (2017). Type III CRISPR/Cas System: Introduction and its Application for Genetic Manipulations. *The CRISPR/Cas System. Emerging Technology and Application*. 1, 1 – 13.
- Machado, J., Abdulla, P., Hanna, W. J., Hilliker, A. J., Coe, I. R. (2007). Genomic analysis of nucleoside transporters in Diptera and functional characterization of *DmENT2*, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiological Genomics*, 28, 337 – 347.
- Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. 2006 Mar 16;1:7.
- Marraffini, L. A., Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*. 11, 181 – 190.
- Ng, C. S., Kopp, A. (2008). Sex Combs are Important for Male Mating Success in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*. 38, 195 – 201.
- Pattanayak, V., Guilinger, J. P., Liu, D. R. (2014). Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and Other Genome-Editing Enzymes. *Methods in Enzymology*. 546, 48 – 59.
- Petr, J. (2015). CRISPR-Cas9 – průlom v přírodních vědách. *Vesmír*. 94, 288.
- Redman, M., King, A., Watson, C., King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis*

Child Educ Pract Ed. 101, 213 – 215.

Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 6, 1114 – 1125.

Renner, M., 2015: Cílená mutageneze endogenního genu v genomu *D. melanogaster* programovatelnými nukleázami. Diplomová práce – 59 str. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Rodríguez-Mulero, S., Errasti-Murugarren, E., Ballarín, J., Felipe, A., Doucet, A., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M. (2005). Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: Effect of diabetes. *Kidney International.* 68, 665 – 672.

Scofield, M., Enna, S. J., Bylund, D. B. (2011). Nucleic Acids. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. *Elsevier Inc.*, 1, 1 – 15.

Ugur, B., Chen, K., Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*, 9, 235 – 244.

Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC8 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 529 – 547.

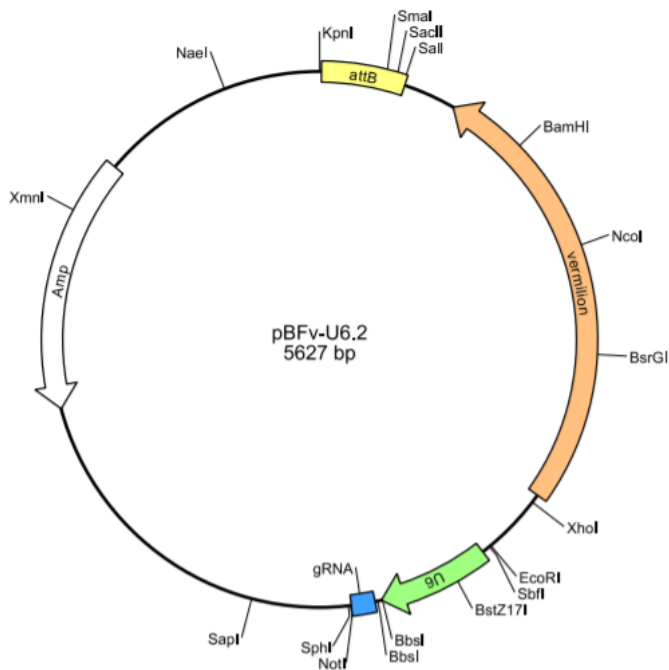
Young, J. D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey. *Biochem. Soc. Trans.*, 44, 869 – 876.

Internetové zdroje

<https://flybase.org>

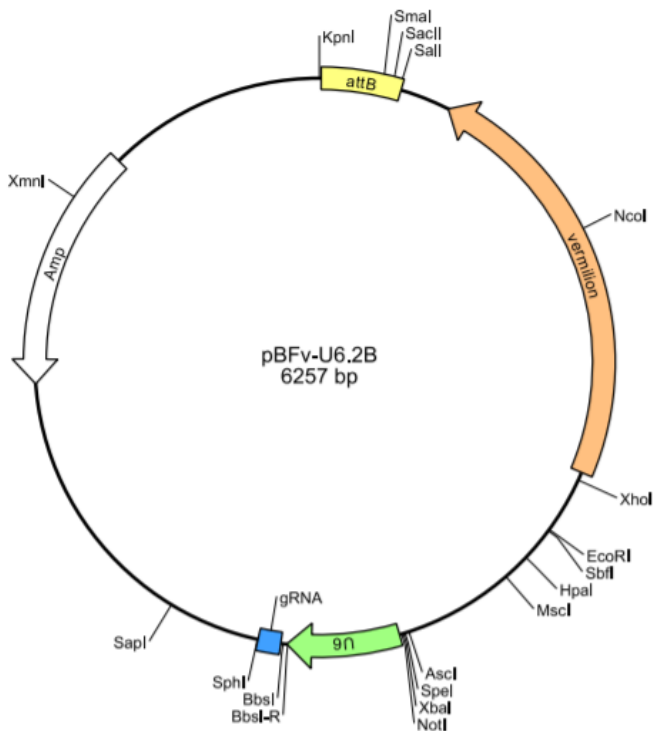
8 Přílohy

8.1 Mapa plazmidu *pBFv-U6.2*



Příloha. č. 1: Mapa plazmidu pBFv-U6.2 (převzato z <https://www.researchgate.net>)

8.2 Mapa plazmidu *pBFv-U6.2B*



Příloha č. 2: Mapa plazmidu pBFv-U6.2B (převzato z <https://www.researchgate.net>)

8.3 Sekvence genu CNT1 s vyznačenými sekvencemi nukleáz CRISPR

TAAGGGGCTGTGGGATATAAGTCATAAGATCCACACAACACTTCTTTTACACTACACACTGTTTCTCATTAT
ACACACAATGGCAGAACCAATAGAAGGGCAACAGGAGGAAAAGCCTCCGCCATCGAGGGCAAAGCGAATCAC
CTATCTGGTACTCCATGTGCTGCTCCATATCATATTCATATCTTACTTTACGGCAGCCACAATCATTTTCAT
CTTTTACGgtaagttaccctttgagttcgaatgtaaagtgttatgaggaaaaaccagACAAGGATTCCAA
AGAATGCTGGCCCAATAGGGGCTCGGAAGCCACAACCGAATCGATAGATAACTCAACCGAAGATGATGATGA
TGATGATTATGACACAGAAGAACTTCTGAGAAGCCAGTGCCAGAGGTTAAGCCAAAACATATTGTGCCAAAT
TAACTGGTGTGATGGATACGGGTTTCTCATCGTCTTGTTTCATCTTGTTTTATATCCTATGGCTGTACTACTG
GGTATTTAAGCCATTCGTGGGCATCAAGCTGTATAATAACTACCTGGAACCAGTGATTGACAAATGGATTGC
GTTTAGTCGCCAGTGgtgagtacaagatcctttgagatgatctcccttcagacttgaacagcagtagaccataa
gtcaaaaaattgtagatgttcaggacctgtaaagattatccattcgaatacaatataatataatattgggtaag
aacttttagctcctgtccacaatgtatttgaggctccaaaagattcttctaaaaagctaaatgctttaatcct
tattttccattttctccaattctagGATAGTGTCCGGCGTAATGCTGGCGATTGTGCTCGCTGTGGTGGTGG
CATACTCGGATTTCGAGTGGCGCAATGACGCATACAAGGCCATCGGACTGCTCGGACCTGTGTGCTTTGTCC
TTATCGGATTTCGCCGTGTCCAAGCACCCTTGCAAGTACCTTGCGCGCATAGTGACCCACGGTCTCCTGGGAC
AGCTGCTGCTGGGCATACTCTGCCCTGCGCCTCCCTTTGGCCGGTCCATCTTTCAATGCCTTGGGGACAAGG
TGACGATATTTCTGAACACTACGCACAGCAGGAGCAGCTTTGTGTACGGGGATCGCATTTCGATGAGTACG
TCTTTGCATTTGCCATACTGGCGGTGGTGTCTTCTTTCAGCGTGATCACCAGCATTATGTATTACCTGGCT
GGATGCAGTTCATCCTGAACGGTTTTGGGTTCCCTCTTGCAGGCCATGGTGGGCACCACCGTTTTGCGAAAGTG
TAAATGCAGCGGGCAACGTGTTTCTAAGCATGACCGAGAGCCCTCTGGTCATCCGGCCGTACATCGAAATAC
TGACCGTCAGCGAGTTGCACGCTATATGCACCTCCGGCTACGCGACAGTGGCCGGTACTGTCTTGGGGGCTT
ATGTGCTCTTCGGTGTCTCCGCCAGCTTTCTTATCGCAGCCAGCGTAATGGCTGCTCCGGGTTCACTGGCTT
TCGCCAAACTGTTCTACCCCGAGACCGAGGAATCTCTGACCAGGTCGGACAACATTAAGCTGGAAAGCTCgt
aagttcctcttcataagagtcaacatttgataatcgcccagacaccttgccaagGACGGATACGCTCTATTTT
GGATGCGGCCCGCCTCGGGAGCTGCAGCAGCCTTGTGATTGTGCTCGGAATCGTCTCGAATATCATCGCCTT
CCTAGCCATTGTGTCTTCTTAGACGCTGTAACGGAGTGGATTTTCGAGCTAATTGGACTGCATAACATCAC
CCTACTCTACATTTCTCCCAGATCTTTATCCCGATTGTCTTCGTGATGGGCGTCCCGTGGCAGCATTGTCA
AGCAATTGGCCTGGTGGTGGCCAAAAGTCGTTTCATAAACGAGTTTGTGGCTTATAGAAAACCTGGGCATATT
GGTTAGCGATAAAAAAGGTTGATgtgagtaccatctgcatattctattcttatagattatthtaaaactagt
attcttatagCCGCGAGCGCTGCCATAGCCACTTTTGCCCTTTGTGGGTTTGCCAATCCCGGATCCCTGGG
CATTGTGATCGCTTCGCTGAGTGCAATGGCACCATCCCGACGATCAGACATCACCAGGTAGCCTTTCGATC
CTATTTTCGAGGCAGTTTCGTTAGCTTTACATCCGCTTCGCTTGCAGgtaaactgtctttatthtacagttta
tttttaaccgccttatcgcaaacatcttaattagGGATTCTTATTCAAAATGAGTACACAGGTGGTAATTA
ATTGATTTAGGTAAGTGAGCGATACGAAAAGCATAGAGCAGGGAGCTAGGGTACAATTCCACTCAAATTTGGC
CATTACCTTCTTGAGCAATTTCCAGTCGGCAGCATCGAAATTCGCGGTGCACCTGGGTCAGTTGAAGAGAAGC
CTCATATATATTACGAAGGATTTCTTTAGGCGCCAATTCACTCCGTCGACGTTTTAGACTAGAGACCGGACA
TTTATGATCTCCATGGCGAATGTAGCTTGATTTACTGAGATCAAATGAACCGTCGACAACAGTTCCGGGTTTC
GACATGCAATGCCTTAAACAATGGGTATATTGCATGGCGGGCACTAAATGCTCTTAGTTGGGCGTCATCGCT
GACTTTGCAGGAGTCGAGGAATTTCTCGCGATACCAGTTTGTGCATCCAGCATTGGAGGCAGTCCCCTAAG
TATAAGTAATTTGGTGGATCCATTCGCACGCGCTAGTAGTTTGAAGTAAACATTAGCAAAGCTAATGCTCTT
GTCAATGCCTAAAAGTTTATTTGGCCATTTCCGATGTCCGCTGAAACCAATGGGAACAGTCGATTTGATCGTG
GTGCACCAAAAGTTCCAGTAGAGCAACCTTTGGGTATAAAAAATCAAGgtatgtatatccattttataagtg
tacttctacttgcttaccacttcatagTACAACCTCAACTTTTGTGGGCGCTGAGGTGGAGATGAGTTCTAAG
CGCTTCAATATCTTCATTTCCACGTGGCCATCTGATTTTGCAGACAGACAGGTGCCGGAAGTTTTGAATG
CTTATGACAGGAAGTTCTGCTTTCCCAAGCAGTGGAAGTACCTAAGGAATCGTTGTACATGCAATTTGGCTT
GGATTTGTGGAAAACATGGCGTAAGAATTATTGCACCTTATGCCAGTGAGCCATAGCCTCTTTTATGGCATGA
TCTGTCCAGCATTGTGGCTCTTTTAGCCTAAAAACATAGAATAGTGAATAAATTTTAAAATGTATGAT
TTATAATTACT

Příloha. č. 3: Sekvence genu CNT1 s vyznačenými nukleázami CRISPR.

9 Seznam zkratek

CNT	„Concentrative Nucleoside Transporter“
ENT	„Equilibrative Nucleoside Transporter“
CNS	„Central Nervous System“ – centrální nervový systém
WT	„Wild-Type“ – divoký typ <i>D. melanogaster</i>
CRISPR	„Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“
TALEN	„Transcription Activator – Like Effector Nucleases“
ZFNs	„Zinc Finger Nuclease“
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“
gRNA	„guide-RNA“
PAM	„Protospacer adjacent motif“
sgRNA	„single guide RNA“
GFP	„Green Fluorescent Protein“