

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Vytvoření a charakterizace transgenních linií  
drozofil manifestující neurodegenerativní  
onemocnění spinocerebelární ataxie typu 1 (SCA1)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Veronika Jičínská

Vedoucí práce: RNDr. Andrea Bednářová, Ph.D. (ENTÚ)

Místo a rok vydání: České Budějovice, 2021

Jičínská V., 2021: Vytvoření a charakterizace transgenních linií drozofil manifestující neurodegenerativní onemocnění spinocerebellární ataxie typu 1 (SCA1). [Generation and characterization of transgenic lines of *Drosophila melanogaster* manifesting the neurodegenerative disease spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). Bachelor thesis, in Czech] - 56. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotation**

The aim of this thesis was to generate and characterize transgenic lines of *Drosophila melanogaster* manifesting spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1), using GAL4/UAS system. Specific driver lines were used to express ataxin gene in pan neuronal, eye and motor neurons. Adult males from different crosses expressing abnormal ataxin gene with parallel controls aged 5 day and 30 day were used for all experiments. The effects of such expression on mobility, longevity and neurodegenerative changes in the brain was studied. Moreover, specific techniques such are RT-PCR, and western blotting were used to test expression of specific genes and to quantify level of specific proteins. Neurodegenerative changes in transgenic lines were documented using confocal microscopy. The expression of specific genes such as ataxin and matrix metalloproteinase 1 and 2 (dMMP1, dMMP2) was studied in all used fly lines. The results showed that gene expression of hAtXN1 was higher in lines manifesting SCA1 compared to controls. However, the trend of MMP expression was not completely clear and will be the subject of future research.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 13. 4. 2021

.....

## **Poděkování**

Děkuji všem, kteří se podíleli na vzniku této práce, zejména mojí školitelce RNDr. Andree Bednářové Ph.D., za odbornou pomoc, poskytnutí zázemí i materiálu k realizaci praktické části a ochotu při vedení a následném sepisování mé bakalářské práce.

Velké díky patří také kolektivu laboratoře Fyziologie hmyzu ENTÚ za odborné rady a pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé mé rodině za psychickou podporu v průběhu celého studia.

## Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> – octomilka obecná .....	1
1.1.1. Obecné informace .....	1
1.1.2. Morfologie a anatomie .....	1
1.1.1.1. Rozmnožování a vývoj.....	2
1.1.1.2. Anatomie .....	3
1.1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> jako modelový organismus .....	3
1.2. Genové inženýrství .....	4
1.2.1. GAL4/UAS systém .....	4
1.3. Nervová soustava .....	6
1.3.1. Nervová soustava <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
1.3.1.1. Centrální nervová soustava .....	6
1.3.1.2. Struktura mozku <i>Drosophila melanogaster</i> .....	7
1.3.2. Nervová soustava člověka .....	8
1.3.3. Porovnání nervové soustavy člověka a hmyzu .....	9
1.4. Neurodegenerativní onemocnění.....	9
1.4.1. Neurodegenerativní onemocnění obecně .....	9
1.4.2. Spinocerebelární ataxie .....	10
1.4.2.1. Spinocerebelární ataxie typu 1 .....	12
2. Cíle práce.....	13
3. Materiál a metodika .....	14
3.1. Chov modelového druhu .....	14
3.2. Příprava jednotlivých linií .....	14
3.2.1. Obecný princip.....	14
3.2.2. Mutantní linie .....	15
3.3. Sledování vitality a délky života .....	16
3.3.1. Stárnutí .....	16
3.3.2. Test mobility jedinců .....	16
3.4. Genová exprese .....	17
3.4.1. Izolace RNA.....	17
3.4.2. Kvantitativní real – time PCR .....	19
3.5. Western Blot .....	21
3.6. Ověřování vakuolizace mozkové tkáně pomocí konfokální mikroskopie.....	24
3.7. Zpracování výsledků .....	24
4. Výsledky .....	25

4.1. Test mobility jedinců .....	25
4.2. Test délky života .....	29
4.3. Vakuolizace mozkové tkáně .....	30
4.4. Genová exprese .....	31
4.5. Western Blot .....	41
5. Diskuze .....	44
6. Závěr.....	49
7. Seznam použitých zkratk .....	50
8. Seznam použité literatury .....	51

# 1. Úvod

## 1.1. *Drosophila melanogaster* – octomilka obecná

### 1.1.1. Obecné informace

Octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) se řadí do kmene členovců (Arthropoda), podkmene vzdušnicovců (Tracheata), patří do třídy hmyzu (Insecta) a řádu dvoukřídlých (Diptera).

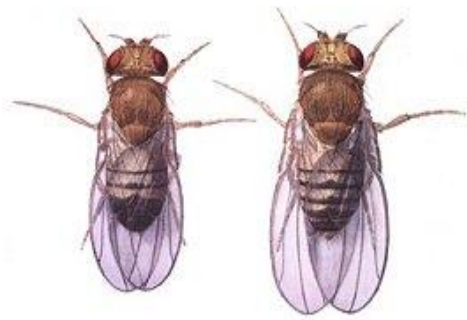
Pro dvoukřídlé je typická přeměna zadního páru křídel v kyvadélka, tzv. haltery, která umožňují efektivněji ovládat letové schopnosti a udávají směr pohybu. Přední pár tvoří blanitá křídla, která zajišťují hybnost během letu. Zástupci dvoukřídlého hmyzu se podle délky tykadel dělí na dlouhorohé (Nematocera) a krátkorohé (Brachycera), mezi které patří i octomilky *D. melanogaster*. Skupinu Brachycera lze dále rozdělit na základě způsobu líhnutí kukel na rovnošvé (Orthorhapha) a kruhošvé (Cyclorhapha). Právě mezi kruhošvé se řadí i čeleď octomilkovití (Drosophilidae).

Původní oblastí výskytu *D. melanogaster* byly pouze Euroasijské tropy, vlivem člověka byla introdukována po celém světě (primárně spolu s ovocem) a v dnešní době je považována za kosmopolitně rozšířený druh. Jedinou lokalitou, kde se octomilky nevyskytují, je Antarktida, a to z důvodu špatné snášenlivosti nízkých teplot.

Primární potravu octomilek tvoří hniјící rostliny, ovoce a houby. Zároveň samy bývají zdrojem potravy pro zástupce jiných čeledí hmyzu (roupci Asilidae, vosy Vespidae, mravenci Formicidae).

### 1.1.2. Morfologie a anatomie

Dospělci octomilky obecné dorůstají velikosti 2-3 mm. Pro geneticky nemodifikované jedince (tzv. wild-type) je typické žlutohnědé až černé zbarvení a červené oči. U mutantních linií dochází ke změně barvy očí (bílé), případně i k jejich redukci, zbarvení těla (žluté) a tvaru křídel (zakrnění křídel nebo zahnutí křídel nahoru). U octomilek můžeme pozorovat výrazný pohlavní dimorfismus, kdy lze determinovat samce a samice na základě vnějších pohlavních znaků (Obr. 1). Charakteristickým rysem u samců je chomáček chlupů u řitního otvoru a genitálu. Dalším determinačním znakem samců je pohlavní hřebínek na předních končetinách (okem pozorovatelný jako černá skvrna). Zároveň samci dorůstají menších rozměrů než samice. Determinace pohlaví je možná už i ve stádiu kukly (Obr. 2), kdy u samců je pozorovatelná výše zmíněná černá skvrna na předních končetinách.



Obr. 1. *Drosophila melanogaster* – wild-type, samec vlevo, samice vpravo. Distinguishing between male and female fruit flies, Tam's Lab Notebook. Dostupné z: <https://cthanitcul15.wordpress.com/category/distinguishing-between-male-and-female-fruit-flies/>.

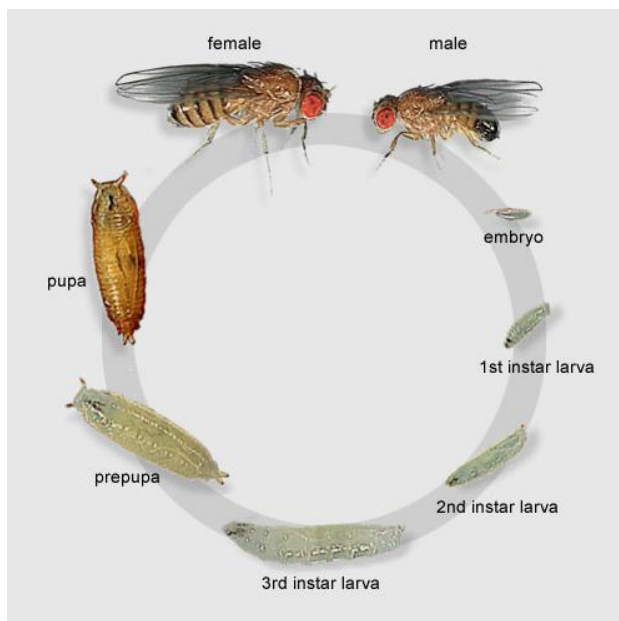


Obr. 2. Kukla *Drosophila melanogaster* – rozlišení pohlaví, samec vlevo, samice vpravo. The Sex Determination Gene transformer Regulates Male-Female Differences in *Drosophila* Body Size (Rideout et al., 2015); Preparation of *Drosophila* Larval and Pupal Testes for Analysis of Cell Division in Live, Intact Tissue (Karabasheva et al., 2020). Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Sex-Determination-Gene-transformer-Regulates-in-Rideout-Narsaiya/f91bd807f70edc62a9c93fa24207940fdefe2893>; <https://www.jove.com/t/60961/preparation-drosophila-larval-pupal-testes-for-analysis-cell-division/>.

#### 1.1.1.1. Rozmnožování a vývoj

Pro jedince *D. melanogaster* je charakteristické pohlavní rozmnožování s proměnou dokonalou. Generační doba se pohybuje okolo deseti dní. Tato doba se může měnit v závislosti na teplotě (s klesající teplotou se délka vývoje prodlužuje). Vajíčka, která dosahují rozměrů okolo 0.5 mm, samice kladou do rozkládajícího se organického materiálu, v laboratorních podmínkách do speciálně připravované diety. Po 12 až 24 hodinách od naklazení dochází k líhnutí larev. Larvy se živí primárně kvasinkami, mikroorganismy a hnilým ovocem. K ekdyzi dochází po jednom, dvou a čtyřech dnech. Následně se larvy mění v kukly a po

uplynutí čtyř dní dochází k vylíhnutí dospělých jedinců. Samice jsou schopné další reprodukce už 12 hodin po vylíhnutí. Octomilky se průměrně dožívají 50-60 dní.



Obr. 3. Životní cyklus octomilky obecné. An introduction to fruit flies, The Berg Lab, UW Departments Web Server. Dostupné z: <http://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>.

#### 1.1.1.2. Anatomie

Anatomie vnitřních orgánů *D. melanogaster* odpovídá obecnému schématu hmyzu. Povrch těla je kryt kutikulou, označovanou jako exoskelet, která plní opornou funkci a zároveň se přímo podílí také na pohybu. Dýchání zajišťují vzdušnice, odpadní látky jsou vylučovány z těla Malpighiho trubicemi. Cévní soustava je otevřená a tvořena trubicovitým srdcem. Zpracování přijaté potravy probíhá v trávicí trubici, která je diferencována na 3 funkčně odlišné části. Všechny procesy v těle jsou řízeny nervovou a endokrinní soustavou. Centrum nervové soustavy je soustředěno v mozku a systému ganglií rozmístěných po těle. Vnější podněty jsou zprostředkovány pomocí mechanoreceptorů, termoreceptorů, chemoreceptorů a fotoreceptorů.

#### 1.1.3. *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus

Octomilka obecná je hojně využívána v laboratořích již od počátku 20. století. Významným podílem k výzkumu tohoto modelového druhu přispěl Thomas Hunt Morgan, který v roce 1910 popsal prvního mutantu *Drosophila melanogaster* s bílými očima (Morgan, 1910). Na základě tohoto objevu se začal zabývat mapováním chromozomů a položil základy genetického výzkumu na jedincích *D. melanogaster*.



Octomilka obecná je jedním z nejvhodnějších modelových organismů hned z několika důvodů. Základním kritériem pro využití octomilek je jejich krátká generační doba a schopnost vyprodukovat velké množství jedinců v jedné generaci za krátký časový úsek. Dalším důvodem je jednoduchý a finančně nenáročný chov, ale také relativně snadná příprava mutantních linií.

Nejpodstatnější se jeví znalost kompletního genomu *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). Celkový genom je tvořen asi 170 Mbp a je soustředěn do čtyř párů chromozomů. První pár jsou gonozomy (X/Y), druhý až čtvrtý pár tvoří autozomy, přičemž poslední pár je velikostně i geneticky spíše nevýznamný. V genomu octomilky bylo popsáno přibližně 13600 genů (pro srovnání člověk má 20-25000 genů). DNA nese velké množství repetitivních sekvencí, 21 %, a mobilních elementů, 9 %. Právě mobilní elementy, konkrétně transpozony, se významně podílí při mutagenезi a v dalších molekulárně-genetických principech. Zároveň se u octomilek nachází řada genů, které mají analogy v lidském genomu. Právě toho využíváme i v naší práci.

## 1.2. Genové inženýrství

Genové inženýrství se využívá k cílené úpravě genomu. Tato úprava spočívá v pozměnění či tvorbě nových genů a jejich následném vložení do organismu. Genové inženýrství se využívá nejen ve výzkumu, ale také v medicíně, genové terapii a v průmyslu (exprese enzymů). Mezi tři základní principy genového inženýrství patří vložení genu, delece genu (knock-out) a výměna genu (knock-in). Mezi nejznámější molekulární metody používající se v genovém inženýrství se řadí TALEN, Crispr – Cas9 a GAL4/UAS systém.

TALEN se primárně využívá pro určení specifické sekvence v daném organismu tak, že vzniká protein transcription – activator like effector protein (TAL) vytvořený podle transkripčních aktivátorů bakterie *Xanthomonas*.

Crispr/Cas9 je prokaryotický imunitní systém, který zajišťuje rezistenci vůči plazmidům nebo fágům. Jde o úseky pravidelně umístěných palindromických repetitiv (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ve spojení se specifickou bílkovinou Cas9.

Pro realizaci naší práce jsme využili metodu GAL4-UAS systému a detailněji o tomto přístupu pojednává následující kapitola.

### 1.2.1. GAL4/UAS systém

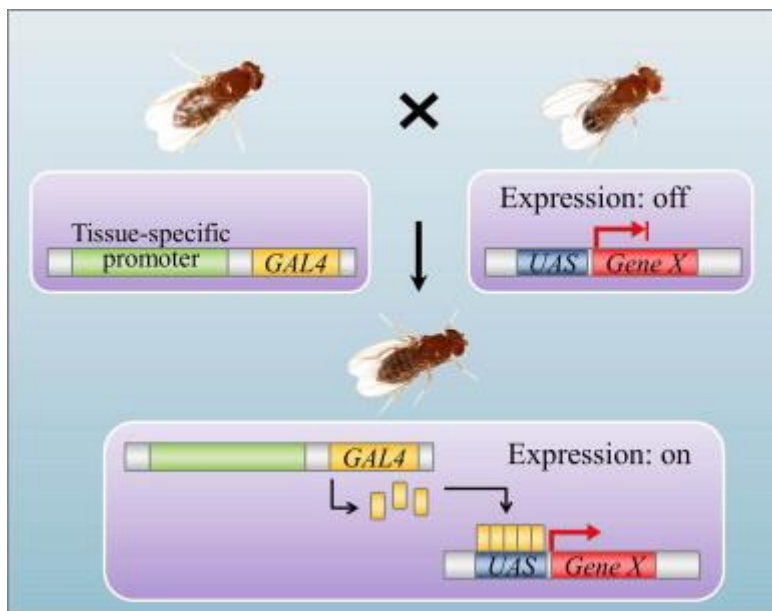
Systém GAL4/UAS byl vytvořen pro cílenou expresi genů u *Drosophila melanogaster* (Obr. 4). Tento systém umožňuje ektopickou expresi daného genu in vivo v různém časovém i tkáňově specifickém kontextu. S pomocí GAL4/UAS systému je možné vytvořit velké

množství stabilních, transgenních linií. Křížením jedinců z těchto dvou linií lze následně získat potomky, kteří vykazují právě výše zmíněnou ektopickou expresi daného genu, a to za předpokladu, že jsou dodrženy vhodné a regulovatelné podmínky. Princip této techniky vychází ze studia regulace genové transkripce u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Hahn and Young, 2011).

GAL4 je protein skládající se z 881 aminokyselin a je velmi důležitým transkripčním faktorem u eukaryotních organismů (Laughon and Gesteland, 1984; Duffy, 2002). Jeho uplatnění spočívá v aktivaci genů, které se podílí na regulaci metabolického okruhu pro zpracování galaktózy výše zmíněného organismu *Saccharomyces cerevisiae* (Hashimoto et al., 1983). Pro realizaci aktivace je potřeba vazba GAL4 proteinu na určitou oblast DNA, která nese označení UAS (Upstream Activating Sequences). Tato oblast DNA je tvořena čtyřmi kopiemi dané sekvence o velikosti 17 párů bází (Giniger et al., 1985).

Výhodou GAL4/UAS systému je schopnost proteinu GAL4 zahájit transkripci každé sekvence, která je opatřena promotorem a nachází se za prvkem UAS. U druhu *D. melanogaster* nebyl prokázán žádný negativní dopad na fenotyp při použití GAL4 (Duffy, 2002). Je známé mimo jiné také zavedení systému pro cílené řízení genové exprese libovolných genů u *Drosophila melanogaster* (Brand and Perrimon, 1993).

Hlavním důležitým faktorem aktivity GAL4 je jeho závislost na teplotě (Duffy, 2002). Nejnižší aktivity dosahuje tento protein při teplotě 16 °C a s rostoucí teplotou se aktivita GAL4 proteinu zvyšuje. Cílená genová exprese s použitím GAL4/UAS systému se jeví jako široce využitelná, hlavně díky kompletně popsanému genomu druhu *D. melanogaster*. Dalšími důležitými předpoklady pro využití tohoto systému u octomilek jsou cílená mutagenese a transgeneze.



Obr. 4. Schéma principu GAL4/ UAS systému pro *Drosophila melanogaster*. A schematic diagram of the UAS-GAL4 system. Induction of the expression of the gene of interest, X, at the specific tissue of interest is enable. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124105270000260>.

### 1.3. Nervová soustava

#### 1.3.1. Nervová soustava *Drosophila melanogaster*

Nervová soustava *D. melanogaster* je velmi dobře prozkoumána a je hojně využívána ke studiu v laboratořích. Základní prvky nervové soustavy tvoří ganglia, ve kterých jsou soustředěny nervové buňky. V gangliích se nachází dva typy neuronů – motorické neurony a interneurony (speciální spojení senzoryckých a motorických neuronů). Rozlišujeme dva typy interneuronů v závislosti na jejich umístění – intragangliové a intersegmentální (intergangliové). Zvláštním typem intergangliových interneuronů jsou tzv. obří neurony, které zajišťují rychlé vedení informace na dlouhé vzdálenosti, a to i bez přítomnosti synapsí. Zároveň se obří neurony uplatňují při rychlých a stereotypních reakcích (například únik). Tato obří vlákna byla nejlépe popsána u švábů, v menším zastoupení se nachází právě i u rodu *Drosophila* (Kodrík, 2000).

U hmyzu se nervová soustava dělí na centrální, periferní a viscerální (útrobní) soustavu.

##### 1.3.1.1. Centrální nervová soustava

Centrální nervovou soustavu hmyzu tvoří mozek, subesofageální ganglium a břišní nervová páska. Mozek je tvořen ze tří částí – protocerebrum, deutocerebrum (čichové centrum) a tritocerebrum (inervace svrchního pysku a čela).

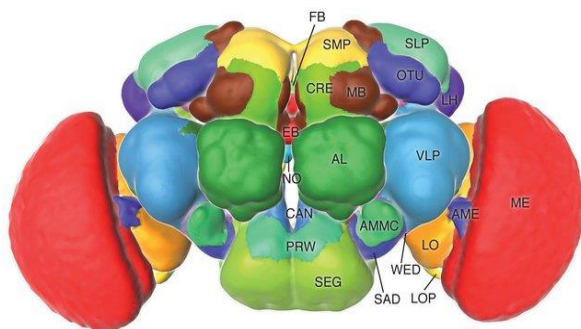
Nejdůležitější část mozku tvoří protocerebrum, které se nachází na vrchní straně hlavy. Protocerebrum je tvořeno dvěma laloky, které následně vybíhají v laloky optické. V této části mozku se nachází oblast zvaná pars intercerebralis, kde jsou umístěny neurosekretorické buňky, které dále pokračují do žlázy s endokrinní funkcí (corpora cardiaca). Velmi důležitou část protocerebra tvoří houbovitá tělesa (corpora pedunculata), která představují hlavní asociační centra u hmyzu. Velikost houbových center odpovídá složitosti a komplexnosti hmyzího chování. U některých druhů hmyzu (také u *Drosophila melanogaster*) dochází v průběhu života k jejich zvětšování (Kodrík, 2000).

Houbovitá tělesa představují důležitou roli v procesech učení, paměti, ale také při lokomoci nebo zpracování čichových signálů.

V protocerebru jsou umístěna také centra, která regulují nastavení a činnost biologických hodin. Biologické rytmy můžeme rozdělit na ultradiánní, cirkadiánní a infradiánní. Nejzajímavější a nejvíce probádanou skupinu tvoří právě cirkadiánní rytmy, které mají periodu přibližně 24 hodin. Tyto rytmy se dále dělí na individuální (charakteristické pro jednoho jedince) a populační (účastní se jich více jedinců dané populace). Mezi nejběžnější cirkadiánní děj se řadí aktivita spojená s pohybem – u jedinců *Drosophila melanogaster* je zaznamenána pouze denní pohybová aktivita (v porovnání u švába amerického převládá aktivita noční). Mezi další individuální rytmy patří například růst kutikuly, uvolňování hormonů, spotřeba kyslíku, změny v nervové soustavě a další. U jedinců *Drosophila melanogaster* jsou také velmi dobře prozkoumány populační rytmy. U octomilek existuje tzv. časové okno, během kterého probíhá líhnutí imag z kukel. Pokud jedinci nejsou v tuto dobu připraveni k líhnutí, musí setrvat ve stádiu kukly do následujícího dne (Kodrík, 2000).

#### 1.3.1.2. *Struktura mozku Drosophila melanogaster*

Mozek *Drosophila melanogaster* je členěn na tři hlavní části: protocerebrum, deutocerebrum, tritocerebrum (viz výše). Nejvíce prozkoumanými částmi mozku octomilky jsou ty, které mají výraznou morfologii a jsou zřetelně ohraničené. Patří mezi ně antenální laloky (AL), houbovitá tělesa (MB), elipsoidní tělo (EB), vejcovité tělo (FB), antenální mechanoreceptory a motorická centra (AMMC), dřeň (AME), subesofageální ganglion (SEG) a některé další (Obr. 5).



Obr. 5. Struktura mozku *Drosophila melanogaster*. The 68 major brain regions shown in false color. (Jenett et al., 2012). Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/232246270\\_A\\_GAL4\\_Driver\\_Line\\_Resource\\_for\\_Drosophila\\_Neurobiology](https://www.researchgate.net/publication/232246270_A_GAL4_Driver_Line_Resource_for_Drosophila_Neurobiology).

### 1.3.2. Nervová soustava člověka

Nervová soustava všech obratlovců, včetně člověka, se od hmyzí nervové soustavy výrazně liší. Její základ tvoří trubice s centrálním kanálem, která je umístěna na hřbetní straně těla a která se dále rozšiřuje v hlavové části v mozek.

Nervová soustava obratlovců je členěna na centrální (CNS) a periferní (PNS) nervovou soustavu (Catala and Kubis, 2013). CNS je tvořena mozkem a míchou, základní stavební jednotkou jsou neurony a gliové buňky. Mícha vede páteřním kanálem a vychází z ní 31 párů míšních nervů. Mícha představuje centrum reflexního řízení fyziologických dějů (vyprazdňování, regulace šířky zornic, patelární reflex, pohlavní funkce).

Mozek tvoří celkem šest částí – prodloužená mícha, Varolův most, mozeček, střední mozek, mezimozek a koncový mozek. Prodloužená mícha navazuje na míchu hřbetní a tvoří centrum pro řízení dýchacích, sacích, polykacích a dávivých reflexů (Valenta et al., 2012). Nachází se zde také centrum pro rytmické chování (spánek). Varolův most propojuje mozkovou kůru s mozečkem (Valenta et al., 2012). Mozeček tvoří druhou největší část mozku a je členěn na dvě hemisféry. Podílí se na řízení koordinace pohybu a udržování postoje. Střední mozek tvoří nejmenší část mozku a řídí činnost kosterních svalů, zrakové reflexy a souhru očí (Valenta et al., 2012). Mezimozek je tvořen třemi částmi (thalamus, hypothalamus a epithalamus). Thalamus zprostředkovává příjem smyslových informací a umožňuje vnímání pocitů. Hypothalamus je reflexním centrem činnosti vnitřních orgánů, termoregulace a homeostázy. Epithalamus se podílí na řízení cirkadiánních rytmů. Koncový mozek je tvořen čtyřmi laloky, konkrétně se jedná o lalok čelní, temenní, týlní a spánkový. Tyto laloky tvoří centra pro zpracování informací ze smyslových orgánů (čichové, zrakové, sluchové a Broccovo centrum řeči).

### 1.3.3. Porovnání nervové soustavy člověka a hmyzu

Ačkoliv by se na první pohled zdálo, že nervová soustava člověka a hmyzu se ve velké míře liší, po důkladnějším zkoumání lze najít řadu podobností. Obě nervové soustavy jsou velmi konzervované a nepodléhaly silnému evolučnímu tlaku. Struktury mozku u hmyzu i člověka jsou podobně uspořádané, přesto zde nacházíme některé odlišnosti. Nervová soustava hmyzu není centralizovaná – řídicí centra se nachází nejen v mozku, ale také v postranních gangliích, což umožňuje hmyzu přežít několik dní i bez hlavy. Oproti tomu u člověka jsou řídicí centra soustředěna pouze v mozku a míše. Pokud dojde u lidí k poruše funkce bazálních ganglií, může nastat řada mentálních poruch, jako jsou autismus, schizofrenie, ale také neurodegenerativní onemocnění jako Parkinsonova choroba a spinocerebelární ataxie. V případě, že dojde k poškození části centrálního komplexu u jedinců *Drosophila melanogaster*, vykazují jedinci podobná poškození.

Mezi další odlišnosti u hmyzu a člověka patří velikost nervových buněk, kdy u hmyzu dosahují větších rozměrů, ale jsou zastoupeny v menším počtu než u člověka. U hmyzu se nachází neurony monopolární, zatímco u člověka neurony multipolární. Pro zajištění reflexů a rychlých stereotypních reakcí se u hmyzu uplatňují obří axony, u člověka tuto funkci plní myelinizované pochvy.

## 1.4. Neurodegenerativní onemocnění

### 1.4.1. Neurodegenerativní onemocnění obecně

Neurodegenerativní onemocnění je spojené s úbytkem množství neuronů, narušením jejich funkce a současným zmnožením gliových buněk. Právě to má za následek vznik vážných psychických a neurologických poruch. Po psychické stránce se jedná ve většině případů o ztrátu paměti a rozumových schopností spojených s poruchami chování a osobnosti. Mezi neurologické příznaky patří špatná koordinace pohybu i problémy s řečí. Podstatnou nevýhodou těchto onemocnění je špatná prognóza a velmi omezené možnosti léčby. Příčina vzniku neurodegenerativních onemocnění je spojená se vznikem mutací, které mohou být dědičné do dalších generací. Tato mutace následně způsobí biochemické poruchy, dojde ke změně metabolismu daných proteinů a následnému narušení funkce neuronů, což má za následek projev konkrétních klinických příznaků. Neurodegenerativní onemocnění se liší v závislosti na lokalizaci neuronů, které postihují. Na základě umístění poškozených neuronů je možné pochopit a popsat konkrétní příznaky daného onemocnění. Podle dopadu mutace lze rozdělit neurodegenerativní onemocnění na dvě základní skupiny: polyglutaminová onemocnění a taupatie + alfa – synukleinopatie (Hardy and Gwinn - Hardy, 1998).

Mezi neurodegenerativní onemocnění se řadí mimo jiné Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, prionové choroby, spinální svalová atrofie a spinocerebelární ataxie.

U člověka se nachází přibližně 100 genů, které jsou zapojené do specifických lidských onemocnění. Přibližně 75 % z těchto genů má minimálně jeden analog právě u výše zmíněného organismu *Drosophila melanogaster* (Rubin et al., 2000; Reiter et al., 2001). Tento fakt poukazuje nejen na příbuznost s člověkem, především nám ale umožňuje studovat funkce genů neurodegenerativních onemocnění ve spojení s generováním mutací v homologu u *Drosophila melanogaster* a následné zkoumání dopadu těchto mutací na fenotyp. Tyto výsledky je poté možné interpolovat na lidskou populaci a získat tak lepší představu o neurodegenerativních onemocněních.

#### 1.4.2. Spinocerebelární ataxie

Ataxie je pojem vyjadřující špatnou koordinaci těla, většinou souvisí s poškozením mozečku (David and Aminoff, 2005). V některých případech může být ataxie spojená s poruchou vestibulárního aparátu, mozkového kmene, páteře nebo periferní nervové soustavy (Manto, 2005). Ataxie dělíme v závislosti na dědičnosti na autozomálně dominantní spinocerebelární ataxie, autozomálně recesivní spinocerebelární ataxie a ataxie vázané na chromozom X (Bird, 1998).

Autozomálně dominantní spinocerebelární ataxie je vzácné dědičné neurodegenerativní onemocnění spojené se současným poškozením míchy a mozečku. Tato porucha způsobuje problémy s koordinací pohybu a ztrátu rovnováhy. Konkrétně se jedná o skupinu heterogenních onemocnění, v současné době je popsáno více než 40 geneticky odlišných podtypů. Každý podtyp nese označení SCA s číslem, které představuje pořadí identifikace daného lokusu onemocnění nebo původce genu (Harding, 1983; David and Aminoff, 2005). Celosvětově je nejvíce zastoupen výskyt podtypů SCA3, SCA1, SCA2, SCA6 (Perlman, 2007). Prevalence je závislá nejen na etniku, ale také na zeměpisné lokalitě (Sequeiros et al., 2012). V České republice je nejvíce zaznamenán výskyt SCA2, SCA8, SCA1, SCA17 (Musova et al., 2013).

Onemocnění SCA je způsobené expanzí nestabilních CAG tripletů kódujících polyglutaminový řetězec daných proteinů. Některé z těchto proteinů jsou označovány jako ataxiny (Matilla-Dueñas, 2012). Ataxin se uplatňuje především při poruše řízení transkripce z mRNA, při syntéze proteinů, ale také v bioenergetickém metabolismu a apoptóze neuronů

právě během rozvíjejícího se neurodegenerativního onemocnění. Exprese ataxinu probíhá nejen v místech centrální nervové soustavy, ale také v dalších orgánových soustavách. Z důvodu expanze CAG tripletů dochází k prodloužení polyglutaminového řetězce, to vede ke změně sekundárních struktur proteinů. Zároveň dochází k narušení proteolytického štěpení a vzniku fragmentů, které nesou prodloužený polyglutaminový řetězec.

U spinocerebelární ataxie způsobené expanzí CAG tripletů pozorujeme tzv. anticipaci. To znamená, že v každé další generaci roste počet CAG tripletů a zkracuje se doba manifestace daného onemocnění. Zároveň s delší expanzí CAG dochází k dřívějšímu propuknutí spinocerebelární ataxie a závažnějšímu průběhu (David and Aminoff, 2005). Kromě výše zmíněné expanze CAG tripletů, může být SCA způsobena také expanzí v nekódující oblasti nebo bodovými mutacemi – inserce, delece, substituce (Bird, 1998).

Klinické příznaky jsou iniciovány neurodegenerativními změnami na mozečku a jeho spojích (Matilla-Deñas, 2012). U všech známých typů spinocerebelární ataxie je hlavním projevem ztráta rovnováhy, porucha koordinace pohybu (David and Aminoff, 2005), problémy s řečí (Duffy, 2000; Love and Webb, 2009) nebo intenční třes. Tento třes je spojený s cílenými pohyby (uchopení hrnku) a zhoršuje se při přiblížení se k danému cíli. Typickými projevy jsou také skolióza páteře a deformace nohy (Nevšimalová, 2002). U některých typů SCA se můžeme setkat s charakteristickými symptomy – degenerace sítnice (SCA7), epilepsie (SCA10), příznaky připomínající Huntingtonovu poruchu (SCA17). Všechny podtypy spinocerebelární ataxie patří do skupiny onemocnění s progresivním vývojem – 15 let od manifestace daného onemocnění se pacienti stávají imobilními a přibližně 20-25 let od prvních projevů umírají (Brust, 2006).

Prevalence spinocerebelární ataxie se pohybuje přibližně okolo 1 až 5 případů na 100 000 obyvatel (Perlman, 2007; Manto, 2005). K prvním projevům onemocnění dochází okolo třicátého až čtyřicátého roku života (Manto, 2005), tato doba se v následujících generacích zkracuje a ve výjimečných případech může docházet k manifestaci již v dětském věku.

K diagnostice neurodegenerativního onemocnění spinocerebelární ataxie se využívá magnetická rezonance mozku, která odhalí případné atrofie nebo redukci mozečku. Magnetická rezonance musí být vždy doplněna genetickým vyšetřením pomocí analýzy DNA. Právě díky pokročilým metodám molekulární biologie je možné odhalit a diagnostikovat konkrétní podtyp SCA v časném stádiu onemocnění (Matilla-Deñas, 2012).



#### 1.4.2.1. *Spinocerebelární ataxie typu 1*

První mutace genu způsobující vznik spinocerebelární ataxie byla popsána roku 1993 vědci Zoghbi a Orrem. Tato mutace dostala název spinocerebelární ataxie typu 1 (Orr et al., 1993).

Spinocerebelární ataxie typu 1 je neurodegenerativní onemocnění s nástupem obvykle okolo třicátého roku života. Tento podtyp způsobuje 6-27 % všech autozomálně dominantních dědičných ataxií (Perlman, 2007). SCA1 je progredující onemocnění, pacienti s touto diagnózou se dožívají pouze 10–20 let od nástupu prvních příznaků (Zoghbi and Orr, 2009; Kang and Hong, 2009). U pacientů s SCA1 se v dospělosti vyvíjí kromě změn na mozečku také postižení periferního systému spolu se strukturním i funkčním narušením senzitivních i motorických vláken. Toto poškození je způsobené prodlouženými CAG tripletovými repeticemi lokalizovanými na N – koncové kódující oblasti genu pro ataxin – 1, což způsobí prodloužení polyglutaminového řetězce mutantního proteinu z běžných 6–35 repetic na 38–85 (Klockgether et al., 2019). Tento gen pro ataxin – 1 způsobuje nemoc lokalizovanou na chromozomu 6p23 (Donato et al., 2012).

V 68 % případů u onemocnění SCA1 byla vždy přítomná porucha koordinace pohybu při chůzi (Rossi et al., 2014). S nastupujícím onemocněním se začínají postupně projevovat další klinické příznaky – dysfagie (porucha polykání), dysfonie (porucha tvorby hlasu v hlasivkách), atrofie jazyka, pes cavus (deformace nožní klenby), amyotrofie (ubývání svalové hmoty), fascikulace (samovolné záškuby svalů). Ve výjimečných případech se vyskytuje rigidita (ztuhlost svalů), třes a záškuby těla. Nemoc je provázena také zrakovými problémy – nystagmus (kmitavý pohyb očí), porucha očního reflexu, omezený pohled nahoru a do stran, v pokročilých stádiích onemocnění se projevuje také ochrnutí očních svalů, tzv. oftalmoplegie (Matilla-Deñas, 2012).

U spinocerebelární ataxie typu 1 se vyskytují kromě neurologických příznaků také psychické problémy, zejména emoční labilita a neklid (Bürk et al., 2007).

Spinocerebelární ataxie typu 1 je výhradně lidské onemocnění, které lze manifestovat u modelových organismů – myši, octomilky, nebo in vitro na buňkách kulturách (Chan and Bonini, 2000; Sang and Jackson, 2005).

## 2. Cíle práce

Cílem práce bylo:

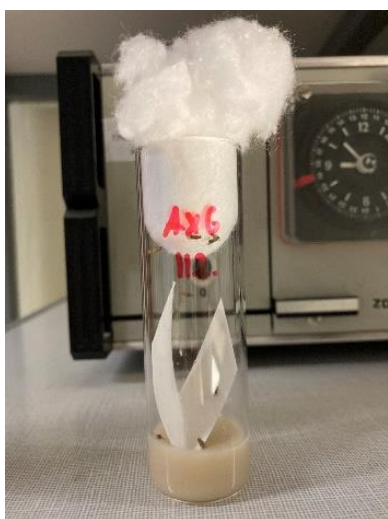
1. Naučit se pracovat s modelovým druhem *Drosophila melanogaster*, zajistit jejich chov a genetické křížení pomocí GAL4/UAS systému.
2. Vytvořit linie jedinců *Drosophila melanogaster*, které budou manifestovat symptomy neurodegenerativního onemocnění spinocerebelární ataxie typu 1 a vytvořit vhodné kontroly.
3. Analyzovat změny související s neurodegenerativním onemocněním SCA1 pomocí fyziologických a molekulárních metod.
4. Osvojit si tyto laboratorní metody a také následné statistické zpracování získaných dat.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Chov modelového druhu

Pokusní jedinci *Drosophila melanogaster* byli chováni ve skleněných válcích, tzv. vialkách, o průměru 2.5 cm a výšce 9 cm. Dno každé vialky bylo vyplněno speciální kukuřičnou dietou, horní část vialky byla opatřena vatovou zátkou, která umožňovala daným jedincům dýchat a zároveň sloužila jako neprostupná bariéra (Obr. 6).

Chovy jedinců *D. melanogaster* byly udržovány při konstantní teplotě 25 °C a fotoperiodě 12 hodin světlo/12 hodin tma. Octomilky byly překlápány do nových vialek vždy dvakrát týdně, a to z důvodu zajištění čerstvé potravy a lepším reprodukčním podmínkám.



Obr. 6. Jedinci *Drosophila melanogaster* chováni ve skleněných vialkách. Zdroj vlastní foto.

Jako zdroj potravy pro octomilky byla připravována výše zmíněná speciální kukuřičná dieta. Základní suroviny použité na přípravu byly kukuřičná mouka, kvasnice, voda, cukr a agar rozpuštěný ve vodě. Takto připravená potrava byla nalita do jednotlivých vialek. Vialky byly po vychladnutí umístěny do chladné místnosti k dalšímu použití.

#### 3.2. Příprava jednotlivých linií

##### 3.2.1. Obecný princip

Octomilky, které byly použity pro následující experimenty, musely být po celou dobu vývoje chovány v konstantních podmínkách. Pokud by došlo ke změně těchto optimálních podmínek, mohlo by ku příkladu nastat prodloužení generační doby. Před samotnou realizací experimentů bylo třeba zajistit dostatečné množství jedinců. Pro další experimenty bylo důležité kromě kontrolních jedinců připravit také mutantní linie. K vytvoření mutantů bylo využito křížení jedinců z různých linií pomocí GAL4/UAS systému. Takto vzniklí jedinci vykazují za vhodných a regulovatelných podmínek ektopickou expresi určitých genů.

Ke křížení byly použity samice z GAL4 linie. Samice byly vždy vytrženy ve stádiu kukly, aby se zabránilo případnému oplození samcem. K samotnému třídění byla použita binolupa – pohlaví lze rozlišit na základě sexuálního dimorfismu (viz kapitola 1.1.2.). Následně byli do stejných vialek přidáni předem vytržení samci z UAS linie. Po vylíhnutí samic došlo k oplození a k následnému nakladení embryí do potravy. Po uplynutí generační doby (cca 10 dní) docházelo k líhnutí nových imag a tím ke vzniku první filiální generace mutantních linií.

### 3.2.2. Mutantní linie

Jak bylo výše zmíněno, mutantní linie byly vytvořené pomocí GAL4/UAS systému. Pomocí tohoto systému jsme chtěli vytvořit transgenní linie manifestující spinocerebelární ataxii typu 1 a k nim odpovídající kontroly. Bylo vytvořeno více linií, u kterých jsme chtěli zjistit, do jaké míry dochází k projevu neurodegenerativních změn. Byly vytvořené celkem 3 linie, které by měly manifestovat SCA1 (AxG, ExG, DxG), 3 linie sloužící jako kontroly k manifestujícím (AxJ, ExJ, DxJ) a linie kontrolní (w<sup>1118</sup>). Vytvořené linie jsou zobrazeny níže.

1. AxG (1104x33818): w<sup>[\*]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=GAL4-ninaE.GMR}12 X w<sup>[1118]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=UAS-Hsap\ATX1.82Q}M6 -> potomci budou exprimovat PolyQ, a proto předpokládáme, že budou manifestovat onemocnění SCA1.
2. ExG (8765x33818): P{w<sup>[+mC]</sup>=GAL4-elav.L}2/CyO X w<sup>[1118]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=UAS-Hsap\ATX1.82Q}M6 -> abnormální ataxin je exprimován ve všech nervových tkáních, nejenom v mozku, a tak by mělo docházet k výraznému ovlivnění mobility těchto jedinců.
3. DxG (64199x33818): P{w<sup>[+mW.hs]</sup>=GawB}OK6 X w<sup>[1118]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=UAS-Hsap\ATX1.82Q}M6 -> tato mutace působí na motorické neurony, a proto může být negativně ovlivněn i vývoj těchto jedinců.
4. AxJ (1104x39741): w<sup>[\*]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=GAL4-ninaE.GMR}12 X y<sup>[1]</sup> w<sup>[\*]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=UAS-Atx-1.T}MBR/TM6B, Tb<sup>[1]</sup> -> tato linie by měla sloužit do určité míry jako kontrola, protože dochází ke standardní expresi ataxinu v mozku.
5. ExJ (8765x39741): P{w<sup>[+mC]</sup>=GAL4-elav.L}2/CyO X y<sup>[1]</sup> w<sup>[\*]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=UAS-Atx-1.T}MBR/TM6B, Tb<sup>[1]</sup> -> standardní typ ataxinu je exprimován v celém nervovém systému, do určité míry slouží opět jako kontrolní linie.
6. DxJ (64199x39741): P{w<sup>[+mW.hs]</sup>=GawB}OK6 X y<sup>[1]</sup> w<sup>[\*]</sup>; P{w<sup>[+mC]</sup>=UAS-Atx-1.T}MBR/TM6B, Tb<sup>[1]</sup> -> v motorických neuronech dojde k expresi normálního typu ataxinu, a tak neočekáváme žádné vývojové nebo motorické defekty, do určité míry slouží jako kontrolní linie.

7. K- W<sup>118</sup>-> standardní kontrolní linie.

### 3.3. Sledování vitality a délky života

Pomocí těchto důležitých fyziologických metod jsme se snažili ověřit, zda mutace daných linií ovlivňují délku života a mobilitu jedinců. K těmto pokusům byli použiti pouze samci, protože u samic by mohlo docházet ke zkreslení výsledků v důsledku ovariálního cyklu.

#### 3.3.1. Stárnutí

Tato metoda je známá také pod cizím názvem Longevity. Samci mutantních linií byli po celou dobu vývoje a stárnutí chováni v plastových válcích s předem připravenou kukuřičnou dietou na dně nádoby (Obr. 7). Každý den byla do tabulky zaznamenávána mortalita jedinců mutantních i kontrolních linií, a to až do úmrtí všech jedinců dané linie. Data byla následně sepsána a statisticky vyhodnocena.



Obr. 7. Plastový válec používaný pro sledování délky života jedinců *D. melanogaster*. Zdroj vlastní foto.

#### 3.3.2. Test mobility jedinců

Mobilita jedinců byla testována pomocí metody RING Assay (Rapid iterative negative geotaxis; Gargano et al., 2005). Tato metoda byla prováděna s mladými (maximální stáří 5 dní) i starými jedinci (stáří cca 30 dní).

Testování jedinci daných linií byli nejprve uspáni pomocí CO<sub>2</sub> a následně vloženi do dlouhých plastových vialek s vatovým uzávěrem. Tyto vialky byly součástí speciální dřevěné aparatury (Obr. 8). Po probuzení octomilek bylo třeba dostat všechny jedince na dno vialek. Toho bylo dosaženo opakovaným klepnutím aparatury o pevnou podložku. Bylo sledováno (natočeno na video), kolik jedinců z celkového počtu překoná předem stanovenou vzdálenost za určitý časový úsek – konkrétně se jednalo o vzdálenost 3 cm za časový úsek 5 sekund a vzdálenost 7 cm za dobu 10 sekund. Získaná data byla převedena na procentuální stupnici – poměr počtu

jedinců, kteří danou vzdálenost překonali ku celkovému počtu jedinců, násobených stem. Data byla následně statisticky zpracována.



Obr. 8. Aparatura na RING Assay. Zdroj vlastní foto.

### 3.4. Genová exprese

K analýze míry genové exprese byla použita celá těla octomilek. Každý vzorek obsahoval 30–40 jedinců dané linie, každá linie byla testována ve třech bioreplikacích. Nejprve bylo třeba získat reprezentativní vzorek pro metodu kvantitativní PCR, která bývá též označovaná jako real – time PCR. V první fázi probíhala izolace RNA. Vyizolovanou RNA bylo potřeba přepsat do cDNA pomocí reverzní transkripce. Získaná cDNA byla kvantifikována pomocí kvantitativní real – time PCR.

#### 3.4.1. Izolace RNA

Před samotným procesem bylo potřeba očistit pracovní plochy inhibitorem RNáz RNaseZAP (Sigma-Aldrich, USA), tím se brání potenciální kontaminaci a poškození izolované RNA. Samotné vzorky byly homogenizovány v 500 $\mu$ l TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA) v mikrozkuvkách (objem 1.5 ml) značky Eppendorf pomocí mechanického homogenizátoru. Tím došlo k rozmělnění vzorků a rozvolnění nukleové kyseliny. Do každé Eppendorfky bylo přidáno 100 $\mu$ l chloroformu. Vzorky byly následně protřepány, inkubovány 3 minuty v pokojové teplotě a centrifugovány (12 000 g, 15 minut, 4 °C). Tímto krokem došlo k rozdělení vzorků na dvě fáze, kdy horní vrstva obsahovala právě RNA, a proto byla tato vrstva přepipetována do nových mikrozkuvek. Do každé bylo přidáno 250 $\mu$ l Isopropanolu, vzorky se promíchaly a nechaly stát 20 minut v pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky opět centrifugovány (14 000 g, 15 minut, 4 °C).

Zbývající kroky bylo potřeba provádět v laminárním boxu. Cirkulující vzduch v boxu brání případné kontaminaci vzorků cizorodými částicemi. Po centrifugaci byl odlit supernatant a

vzniklý pelet byl dvakrát promyt pomocí 75 % etanolu. Po třetím promytí bylo potřeba odebrat zbytky etanolu pomocí mikropipety. Vzorky se nechaly po dobu 15 minut sušit v uzavřeném laminárním boxu. Po vysušení bylo ke každému vzorku přidáno 80 $\mu$ l Nuclease free H<sub>2</sub>O. Vzorky se nechaly dále inkubovat 15 minut v pokojové teplotě. Mezitím byla připravena sada malých Eppendorfek (objem 200 $\mu$ l). V dalším kroku bylo potřeba námi vyizolovanou RNA zbavit případné kontaminace genomickou DNA působením Dnázy. K odstranění gDNA z RNA byl použit komerčně dodávaný Master Mix – 10X reakční pufr s MgCl<sub>2</sub> (ThermoFisher Scientific, USA), DNase I, Nuclease Free H<sub>2</sub>O a námi vyizolovaná RNA. Eppendorfky obsahující reakční mix byly vloženy do termocycleru Mastercycler Nexus eco (Eppendorf; Obr. 9). Po skončení předdefinovaného programu byl obsah mikrozkušavek přepipetován do připravené sady velkých mikrozkušavek (o objemu 1.5 ml). Následně bylo ke každému vzorku přidáno 250 $\mu$ l etanolu a 10 $\mu$ l 3M acetátu sodného. V této fázi bylo potřeba dát vzorky do -20 °C, kde byly ponechány přes noc.



Obr. 9. Termocycler Mastercycler Nexus eco (Eppendorf). Zdroj vlastní foto.

Druhý den byly vzorky nejprve centrifugovány (19 300 g, 30 minut, 4 °C). Po stočení byly vzorky promyty 75 % etanolem a poté nechány v laminárním boxu po dobu 15 minut. V dalším kroku bylo do každé mikrozkušavky připipetováno 40 $\mu$ l Nuclease free H<sub>2</sub>O. Mikrozkušavky byly inkubovány dalších 15 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly promíchány, stočeny a následně byla ověřena koncentrace námi vyizolované RNA na Nanodropu. Po změření bylo potřeba vzorky naředit na danou koncentraci 100ng/ $\mu$ l s použitím Nuclease free H<sub>2</sub>O.

Vyizolovanou RNA bylo třeba pro další kroky přepsat do cDNA pomocí reverzní transkripce. K tomuto kroku se používá Nuclease free H<sub>2</sub>O, 5X Iscript reakční mix (Bio-Rad), vyizolovaná RNA a reverzní transkriptáza. Po napipetování výše zmíněných reagentů byly vzorky vloženy do termocycleru Mastercycler Nexus eco (Eppendorf) s již předem optimalizovaným protokolem. Po skončení programu byl obsah malých Eppendorfek přepipetován do velkých



mikrozkumavek. Následovalo naředění cDNA na potřebnou koncentraci 5ng/μl. Takto připravené vzorky byly uloženy do -80 °C k jejich dalšímu použití.

#### 3.4.2. Kvantitativní real – time PCR

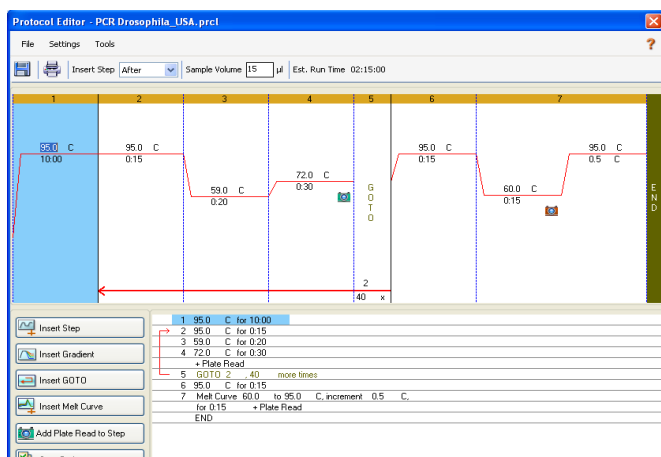
Kvantitativní PCR sloužila k určení míry exprese vybraných genů. Tato metoda je postavená na průběžném sledování množství amplifikovaného produktu vždy po skončení daného cyklu. Kvantita daného produktu je monitorována jako přírůstek v závislosti na změně intenzity fluorescenčního záření – tato intenzita je přímo úměrná množství daného produktu. K prokázání množství DNA v našich vzorcích byl použit *PowerSYBR Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific, USA), který slouží jako interkalační barvivo a zároveň nemá vliv na průběh dané reakce. SYBR Green se nespecificky váže na molekulu DNA a následně dochází k vyzáření určité míry fluorescence.

Vlastní vzorky o objemu 2μl (koncentrace cDNA odpovídá ekvivalentu 10 ng) byly nanесeny na 96jamkovou destičku spolu s Master Mixem, který obsahoval již výše zmíněný SYBR Green, Nuclease free H<sub>2</sub>O a specifické primery pro následující geny – dMMP1, dMMP2, hAtXN1 a referenční gen rp49 1. Primery pro specifické geny zájmu byly navrženy pomocí veřejně dostupného serveru <https://www.flyrnai.org/FlyPrimerBank>. Měli jsme několik setů různě navržených primerů pro všechny naše geny zájmu, abychom ověřili, které primery zafungují nejlépe (Tab. 1). Zároveň byla pro ověření případné kontaminace vytvořena negativní kontrola, která neobsahovala žádnou cDNA. Celkový objem v každé jamce činil v součtu 15μl. Po nanесení reakční směsi bylo třeba destičku překrýt ochrannou folií. Samotná reakce byla následně provedena v termocycleru CFX Connect RealTime system (Bio-Rad, California, USA), který monitoruje množství DNA po každém cyklu. Amplifikace byla provedena dle následujícího protokolu – počáteční denaturace po dobu 10 minut při teplotě 95 °C, následovalo 40 cyklů, ve kterých se opakovala 15s denaturace při 95 °C, 20s nasedání primerů při 59 °C a 30s elongace při 72 °C. V průběhu měření docházelo po každém cyklu k odečtení míry fluorescence. Po skončení 40 cyklů došlo ke snížení teploty na 60 °C, a to na dobu 15s. Následně bylo potřeba vytvořit křivku tání, kdy se postupným zvyšováním teploty o 0.5 °C dosáhlo hodnoty 95 °C (Obr. 10).



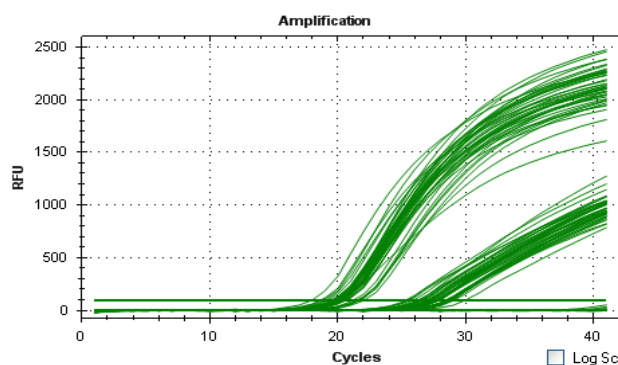
Tab. 1. Seznam a sekvence použitých primerů; F = forward, R = reverse primer. AdMMP1/2 a BdMMP1/2 - různé sety primerů.

Název	F/R	Sekvence 5' - 3'
<b>AdMMP1</b>	F	TCAGTGTTTCATAGTCGTAGGCA
	R	GGTAGATAGCCGAACTGGGAC
<b>AdMMP2</b>	F	ATGGTACCAGAATAACGAGGTGG
	R	ATGGCCAGTAGGCCGGTTTATCTG
<b>BdMMP1</b>	F	TCAGTGTTTCATAGTCGTAGGCA
	R	GGTAGATAGCCGAACTGGGAC
<b>BdMMP2</b>	F	AAAAACCGCTATCTCCGAGGA
	R	TGTAATGTTGCCAAAAGACTGGA
<b>hAtXN1</b>	F	GTGGCCGTGATACAGTTCG
	R	AGCCGTTCTTCAGGTTCTTG
<b>rp49 1</b>	F	ACGTTGTGCACCAGGAACTT
	R	CCAGTCGGATCGATATGCTAA



Obr. 10. Optimalizovaný protokol qRT-PCR pro *Drosophila melanogaster* používaný v této práci. Zdroj vlastní foto.

Výsledky reakce byly následně analyzovány pomocí programu Bio-Rad, CFX Manager 3.1. Cyklus, ve kterém nárůstem fluorescence došlo k překročení prahu pozadí, byl brán jako hodnota Ct (Obr. 11). Relativní množství daného genu bylo určeno výpočtem z účinnosti reakce a hodnoty Ct.



Obr. 11. Průběh amplifikace referenčních a testovaných genů zaznamenaný v programu Bio-Rad, CFX Manager 3.1. Zdroj vlastní foto.

### 3.5. Western Blot

Western blot je metoda, která se využívá k detekci určitého proteinu v daném vzorku (např. homogenizovaná tkáň). Základem této metody je elektroforetická separace proteinů, jejich přenos na membránu a následná detekce proteinů.

Nejdříve bylo potřeba pomocí BCA metody určit, jaké množství proteinů je obsaženo v každém vzorku. V prvním kroku byli jedinci *Drosophila melanogaster* homogenizováni pomocí mechanického homogenizátoru v 200 $\mu$ l 50mM K-PO<sub>4</sub> fosfátového pufru, vzorky byly centrifugovány (10 000 g, 10 minut, 4 °C) a poté následovalo odebrání supernatantu do nových mikrozkuhavek. K samotnému stanovení proteinů bylo použito 10 $\mu$ l ze vzorku, který byl ještě desetkrát naředěn pomocí fosfátového pufru. Dále bylo důležité si připravit reakční směs, která obsahovala 12.5ml Bicinchoninic Acid solution a 250 $\mu$ l Copper sulfate solution (ředění 50:1).

Do 96jamkové destičky bylo napipetováno 10 $\mu$ l již naředěného vzorku, ke kterému bylo přidáno 200 $\mu$ l reakční směsi. Zároveň bylo potřeba sestavit standardní křivku pro BSA. Poté se destička z důvodu citlivosti směsi na světlo zabalila do alobalu a nechala se inkubovat 45 minut ve tmě. Po skončení inkubace byla destička změřena na spektrofotometru SpectraMax 340 PC (Molecular Devices, USA) při vlnové délce 562nm. Z naměřených absorbancí bylo na základě kalibrační křivky zjištěno celkové množství proteinů v každém vzorku. Zásobní

vzorky bylo potřeba naředit tak, aby výsledná koncentrace byla shodná pro všechny vzorky, což bylo potřeba pro následnou elektroforetickou separaci proteinů.

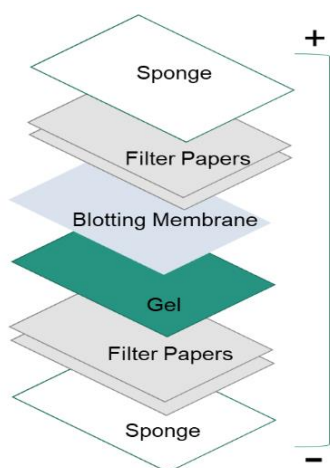
Po naředění byl ke vzorkům přidán komerčně vyráběný Laemmliho pufr NuPAGE LDS Sample buffer 4x (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky byly následně 10 minut zahřívány při teplotě 95 °C.

Před samotnou elektroforézou bylo nutné připravit separační pufr o daném složení: 3g TRIS BAZE 0.25M, 14.14g Glycine 0.192 M a 1g SDS doplněných do objemu 1l destilované vody. Pro samotnou separaci byl využit komerčně dodávaný gradientový gel 4–20 % Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio-Rad). Do každé jamky bylo naneseno vždy 10 $\mu$ l vzorku. Kromě vlastních vzorků byl do jedné jamky nanesen také Standard Protein Marker (5 $\mu$ l). Do aparatury byl následně nalit výše zmíněný separační pufr tak, aby byl celý gel v tomto pufru ponořen. Následně byla aparatura (Obr. 12) napojena na zdroj elektrického napětí o počáteční hodnotě 40 V, tato hodnota se v 30minutových intervalech zvyšovala vždy o 40 V, a to až na hodnotu 120 V. Po skončení separace našich vzorků na základě molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů byla aparatura odpojena a gel vyjmut z krycích skel.



Obr. 12. Aparatura na elektroforézu se zdrojem napětí (Bio-Rad). Zdroj vlastní foto.

K detekci proteinů bylo následně potřeba přenést gel na PVDF membránu. Membránu bylo potřeba nejprve vložit do 100 % metanolu, následně do destilované vody a na závěr do přenosového pufru (TRIS BAZE, Glycin, doplněno do 1 l destilované vody). Poté byla sestavena přenosová aparatura viz. schéma (Obr. 13), která byla připojena ke zdroji.



Obr. 13. Schéma přenosové aparatury na Western Blot. *Proteomics services, including protein identification, protein quantification, protein modification etc.* - Creative Proteomics. Dostupné z: <https://www.creative-proteomics.com/blog/wp-content/uploads/2018/03/WB-transfer.png>.

Samotný přenos probíhal přes noc ve 4 °C při stálém napětí 35 V. Druhý den bylo potřeba připravit 5 % mléko (ředěno v PBS – 45 g NaCl, 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, doplněno do 500 ml destilované vody), které brání interakci membrány s proteiny. Následovalo 10minutové promývání v 6 cyklech. Po důkladném promytí byla testována primární protilátka Mmp1 catalytic domain, ve které se nechala membrána inkubovat do druhého dne. Primární protilátka slouží k označení hledaných proteinů. Následující den byla pomocí pipety primární protilátka odebrána a membrána byla opakovaně promyta pomocí PBS v 6 cyklech po 10 minutách. Na membránu byla po promytí přidána sekundární protilátka, ve které probíhala 2hodinová inkubace ve tmě. Sekundární protilátka Goat Anti-Mouse nese enzym, který umožňuje následnou vizualizaci. Po skončení inkubace bylo potřeba membránu znovu promýt pomocí PBS a následně i pomocí destilované vody.

Membránu bylo potřeba vizualizovat za použití komerčně vyráběného chemiluminiscenčního roztoku Novex ECL – HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen). Roztok byl aplikován na membránu a následovala vizualizace na přístroji LAS-3000 (FujiFilm, Obr. 14).



Obr. 14. Vizualizace membrány na přístroji Las-3000. Zdroj vlastní foto.

### 3.6. Ověřování vakuolizace mozkové tkáně pomocí konfokální mikroskopie

Z každého výše uvedeného křížení bylo nejprve potřeba vytržít 20-25 samců, kteří se nechali následně na dietě stárnout – pro stanovení vlivu daných mutací na CNS byli testováni mladí (stáří max. 5 dní) i staří jedinci (stáří 30 dní). Takto připravení jedinci byli předáni pracovníkům laboratoře Střediska mikroskopie na Entomologickém ústavu Biologického centra, AVČR, kde následovalo jejich další zpracování.

Ze samců byl vypitván mozek, který se nechal inkubovat v blokovacím kozím séru, a následně byla přidána sekundární protilátka s fluorescenčním značením. Navázání pouze sekundární protilátky způsobí vizualizaci celé mozkové tkáně.

Mozky byly následně nafoceny v jednotlivých vrstvách na konfokálním mikroskopu. Jednotlivé snímky byly prohlédnuty a následně byla vyhodnocena přítomnost neurodegenerativních změn na mozkové tkáni u jednotlivých mutantních linií.

### 3.7. Zpracování výsledků

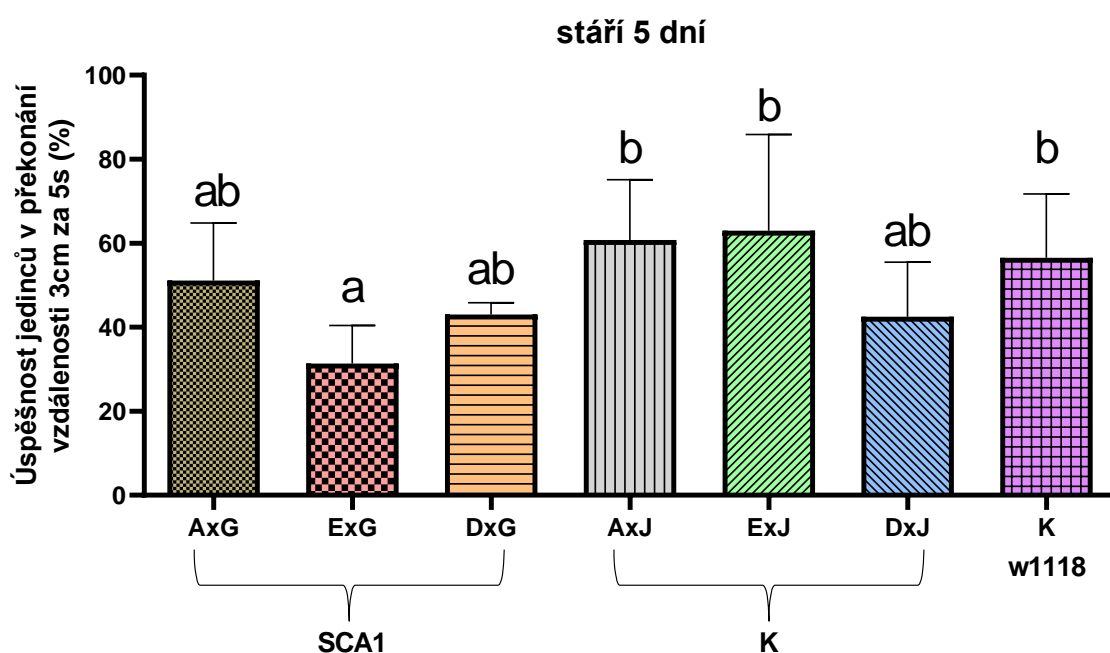
Výsledky byly vyhodnoceny v programu Microsoft Excel a grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Software verze Prism 8 (San Diego, California). Pro srovnání získaných dat byl použit nepárový t-test (porovnání mladých a starých jedinců v dané linii) a jednocestná analýza variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáváním (porovnání linií mezi sebou) na 5 % hladině významnosti. Pro porovnání křivek přežití byl použit Mantel – Coxův test na 5 % hladině významnosti. Zpracování výsledků z konfokální mikroskopie bylo realizováno laboratoří Střediska mikroskopie ENTÚ, snímky byly následně upraveny v programu Adobe Photoshop.

## 4. Výsledky

### 4.1. Test mobility jedinců

V první fázi této práce byla sledována mobilita jednotlivých linií *Drosophila melanogaster* pomocí RING Assay (Rapid iterative negative geotaxis; Gargano et al., 2005).

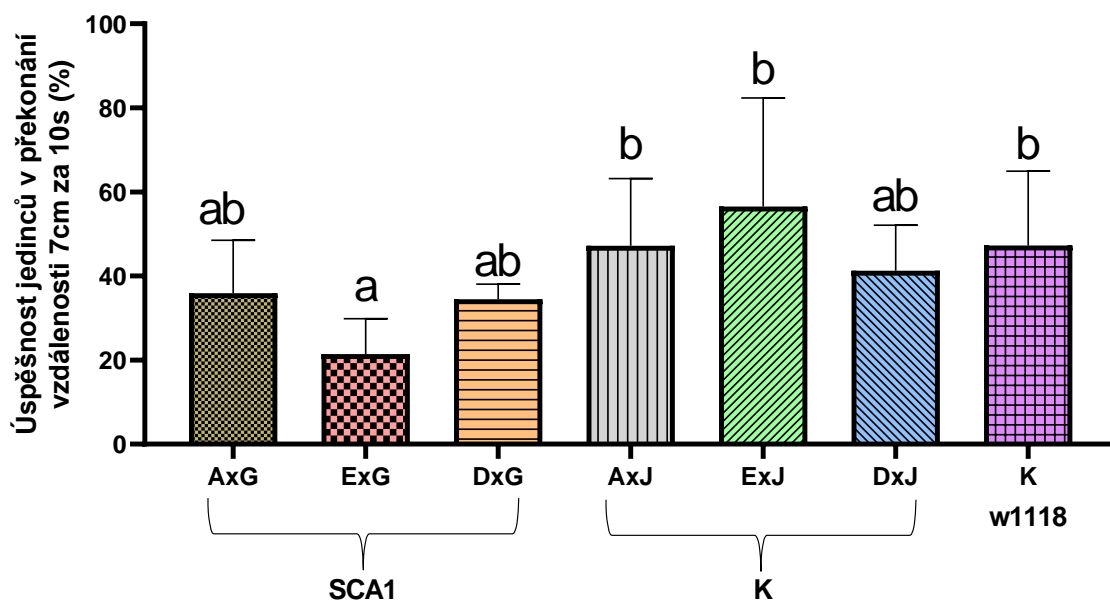
Nejprve byl proveden test pro mladé jedince (stáří 5 dní). Následující graf (Obr. 15) shrnuje výsledky pro výšku 3 cm, kterou jednotlivci vyšplhali během 5 s intervalu (25 % výšky vialky). Statisticky průkazné snížení mobility (více než dvojnásobné) oproti kontrolním liniím (AxJ, ExJ a K) bylo zaznamenáno u mutantní linie ExG. Právě u jedinců z této skupiny se očekával projev neurodegenerativního onemocnění SCA1 spojený s omezením pohybových schopností. U linií AxG i DxG také došlo ke snížení mobility vůči kontrolní linii, výsledky však nebyly statisticky průkazné.



Obr. 15. Sledování mobility jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) ve výšce 3 cm/5 s (25 %). Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáváním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

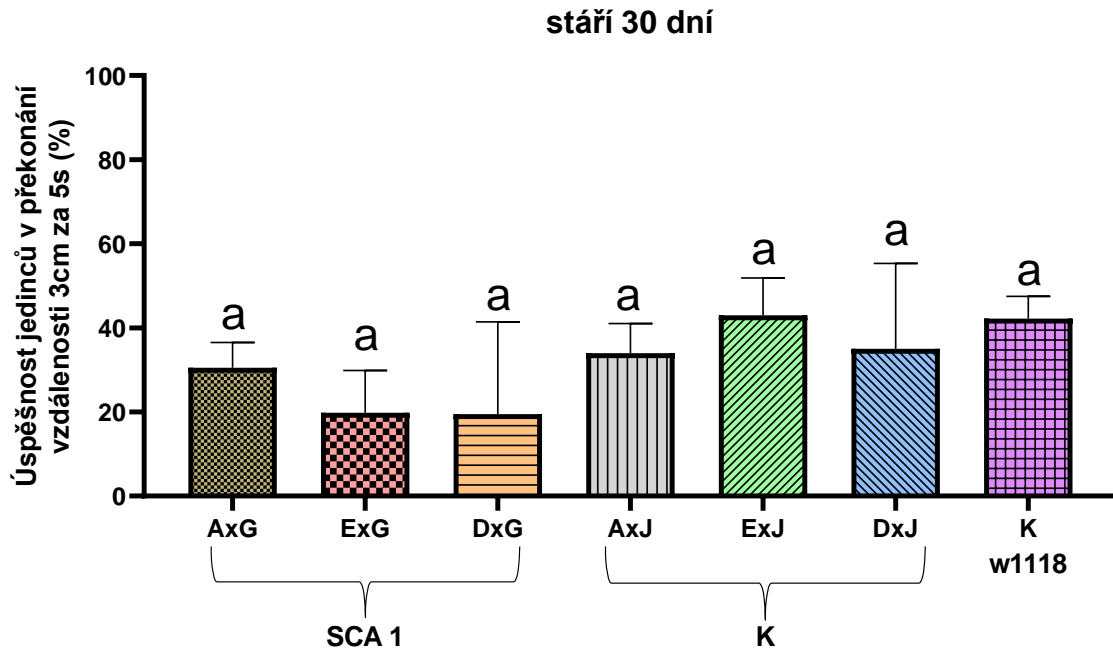
Stejné výsledky pro mobilitu mladých jedinců byly zaznamenány také, když jsme výšku posunuli a měřili jsme, kolik jedinců vyšplhá do výšky 7 cm a to během 10 s intervalu (tedy do 50 % výšky vialky). Z grafu (Obr. 16) je patrné, že k výrazné inhibici mobility došlo u linie ExG v porovnání s liniemi kontrolními (AxJ, ExJ, K).

### stáří 5 dní



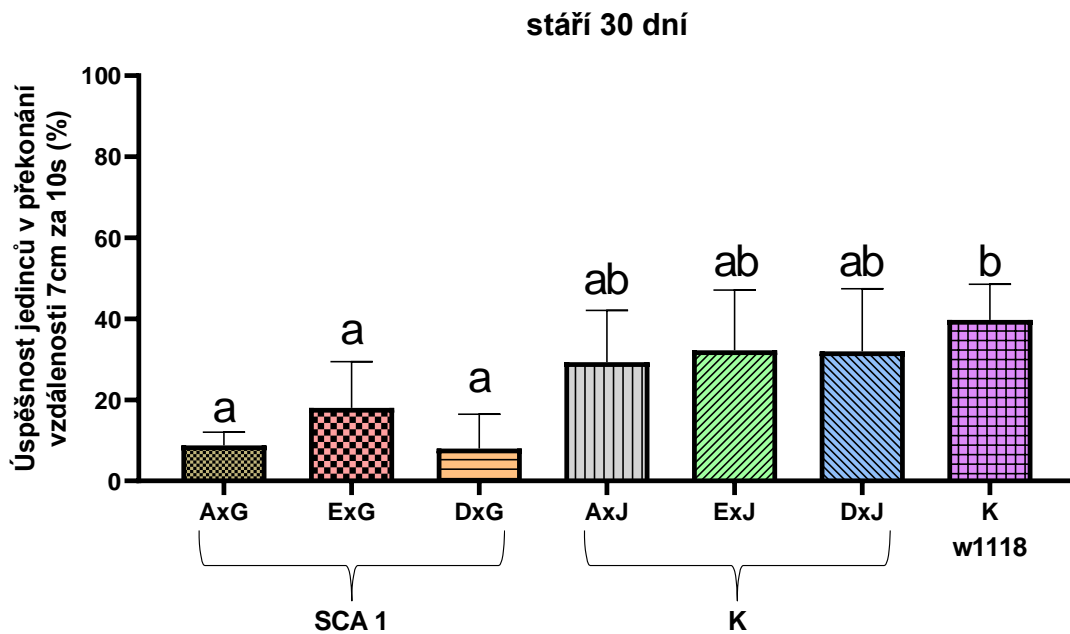
Obr. 16. Sledování mobility jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) ve výšce 7 cm/10 s (50 %). Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáváním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Následně jsme se zaměřili i na staré jedince (stáří 30 dní), abychom zjistili, zda vlivem stáří dojde k narušení mobility výraznějším způsobem u jedinců, kde by se SCA1 onemocnění mělo manifestovat ve srovnání s kontrolními liniemi. Je patrné, že ve výšce 3 cm/5 s (25 %) nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými liniemi (Obr. 17). Na první pohled je patrný mírný inhibiční trend u linií ExG a DxG, který by nasvědčoval kompromitaci mobility u manifestujících linií, ale z důvodu vysoké odchylky není tento rozdíl statisticky průkazný.



Obr. 17. Sledování mobility jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) ve výšce 3 cm/5 s (25 %). Nebyl zaznamenán žádný statisticky průkazný rozdíl mezi liniemi na 5 % hladině významnosti pomocí jednocestné analýzy variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáváním (stejná písmena nad jednotlivými sloupci).

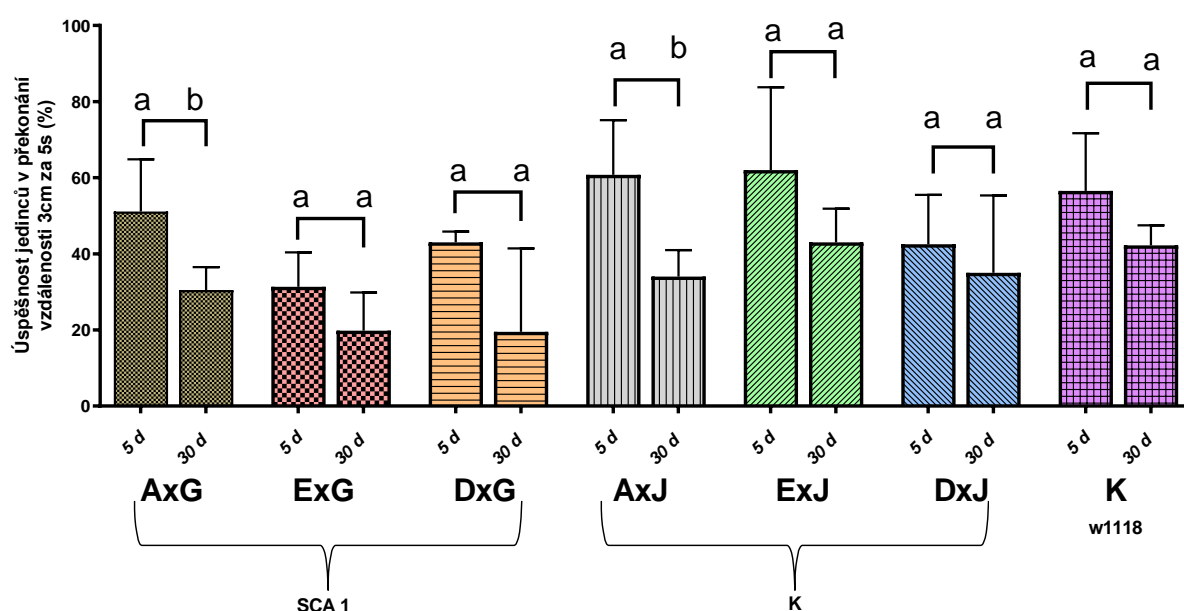
Když jsme se ovšem zaměřili na testování toho, kolik jedinců vyšplhá do výšky 7 cm během 10 s (50 % výšky vialky) u starých jedinců (Obr. 18), došlo k velmi průkaznému snížení mobility u manifestujících linií AxG, ExG a DxG v porovnání s kontrolní linií (K).





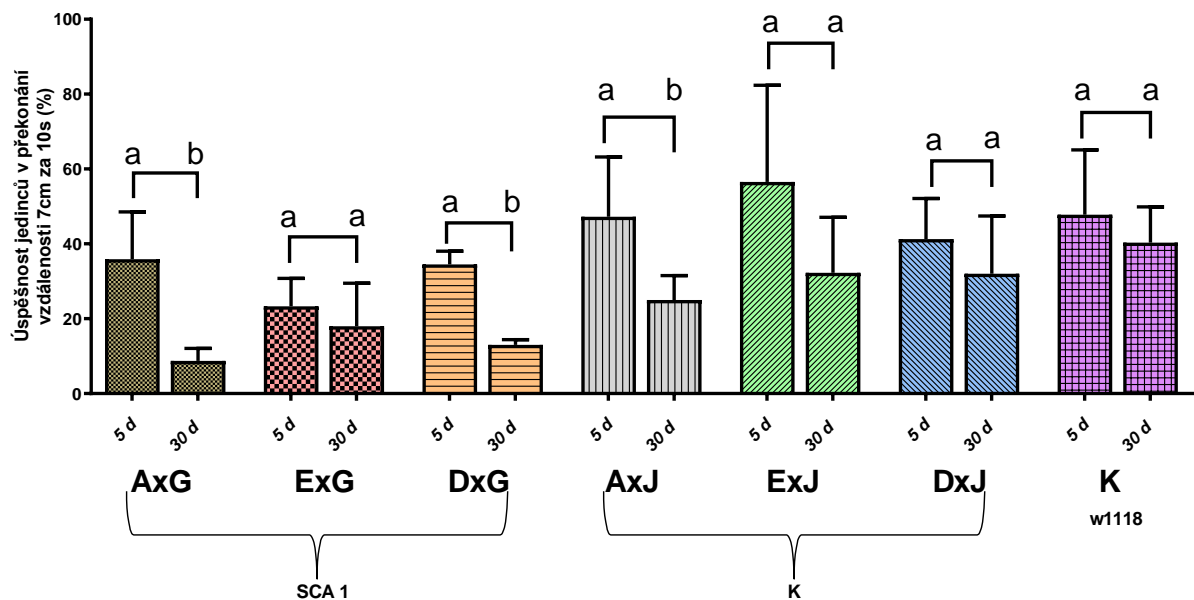
Obr. 18. Sledování mobility jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) ve výšce 7 cm/10 s (50 %). Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáváním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Pro srovnání mobility v závislosti na stáří byly vytvořeny grafy porovnávající jednotlivé linie mezi mladými (5denními) a starými (30denními) jedinci. Ve výšce 3 cm/5 s (25 %) byl zaznamenán rozdíl mezi mobilitou mladých a starých linií u AxG a AxJ. Zároveň je vidět, že u linie DxG došlo k výraznému snížení mobility u starých jedinců v porovnání s mladými, ale z důvodu vysoké odchylky není tento rozdíl statisticky průkazný (Obr. 19).



Obr. 19. Srovnání mobility mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců ve výšce 3 cm/5 s (25 %). Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie byly testovány pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

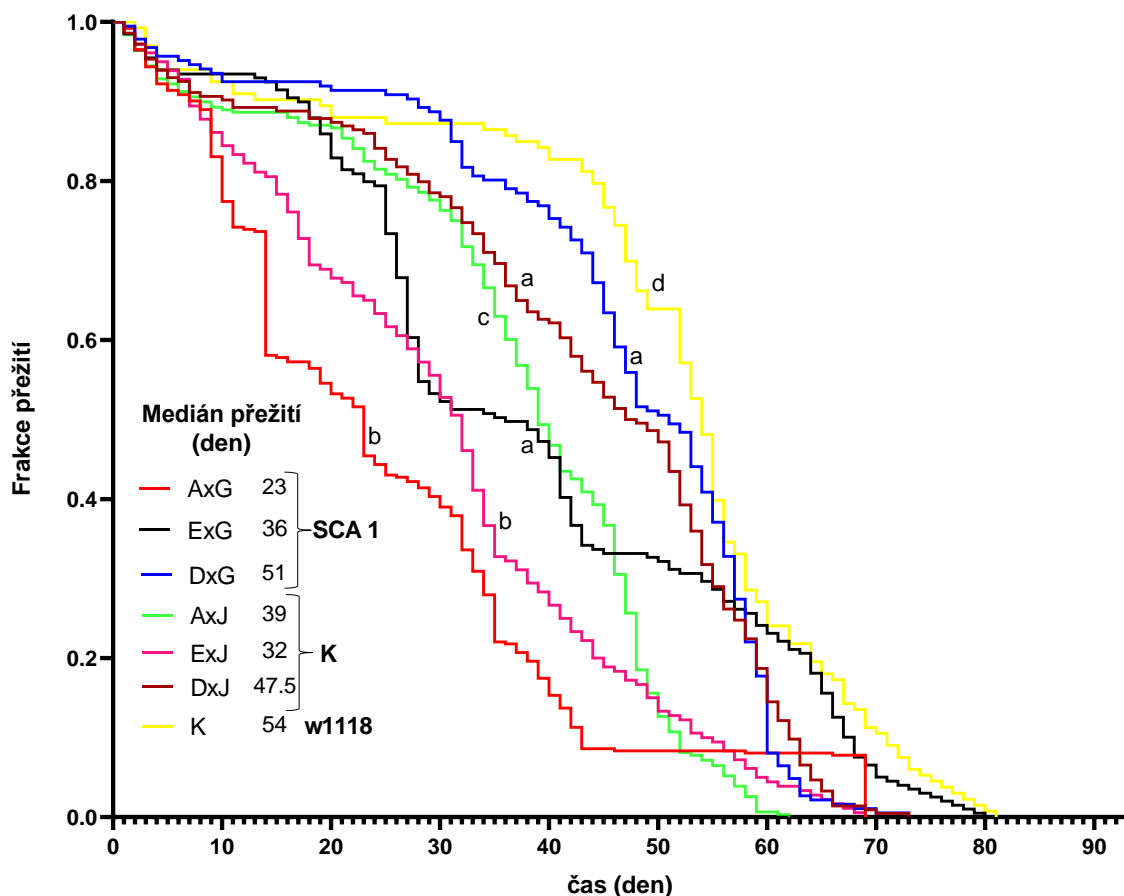
Při srovnání mobility u různě starých jedinců v rámci studovaných linií ve výšce 7 cm/10 s (50 %) byl zjištěn statisticky významný rozdíl a pokles mobility u linií AxG, DxG a AxJ (Obr. 20). Obecně lze říct, že skutečně dochází ke snížení mobility u manifestujících linií AxG, ExG a DxG, a to výrazněji u starých jedinců (30 dní) při výšce 7 cm/10 s.



Obr. 20. Srovnání mobility mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců ve výšce 7 cm/10 s (50 %). Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie byly testovány pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad sloupci.

#### 4.2. Test délky života

Je známo, že neurodegenerativní onemocnění SCA 1 zkracuje život, proto jsme v další fázi této práce sledovali, zda se u manifestujících linií prokáže negativní dopad na délku života. Tento trend byl ověřován pomocí křivky přežití (Survival curve). Na grafu (Obr. 21) můžeme vidět, že křivka přežití pro všechny křížené linie (AxG, ExG, DxG, AxJ, ExJ, DxJ) se liší od kontrolní linie (K). Nejvíce zkrácená délka života byla zaznamenána u linie AxG, kdy medián přežití byl pouhých 23 dní, což znamená, že v tento den zemřela polovina jedinců dané linie. U manifestující linie ExG byl také prokázán negativní vliv na délku života, což potvrdil medián přežití 36 dní. U poslední manifestující linie DxG byl zaznamenán pouze minimální rozdíl v mediánu přežití oproti kontrolám, dosahoval hodnoty 51 dní, zatímco u kontroly 54 dní.



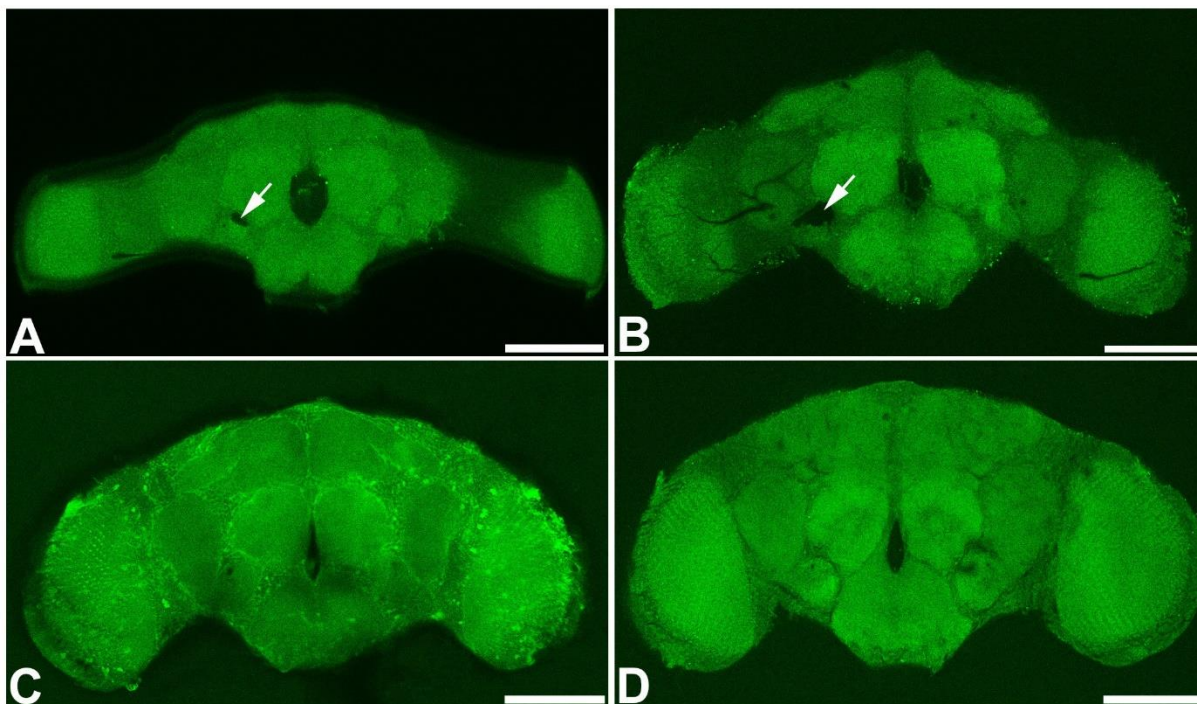
Obr. 21. Křivky přežití pro jednotlivé linie. Statisticky významné rozdíly pro porovnání křivek přežití na 5 % hladině významnosti byly testovány pomocí Mantel – Coxova testu a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými křivkami.

#### 4.3. Vakuolizace mozkové tkáně

Neurodegenerativní onemocnění spinocerebelární ataxie způsobuje tkáňové změny na mozku, které se projevují vakuolizací (Wang et al., 2011). Proto jsme v této práci ověřovali, zda dochází k vakuolizaci i u našich linií manifestujících onemocnění SCA1, testovali jsme ale také linie kontrolní. Snímky z konfokální mikroskopie byly zpracovány laboratoří Střediska mikroskopie Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR (spolupráce s Bc. Lucíí Pauchovou a Mgr. Hanou Sehadovou, Ph.D.).

U mladých jedinců manifestujících linií byly zaznamenány počínající neurodegenerativní změny na mozku (Obr. 22, A), konkrétně v oblasti AMMC (antenální mechanoreceptory a motorická centra – viz kapitola 1.3.1.2.). Oproti tomu u kontrol tyto změny pozorovány nebyly. U starých jedinců, především u linií manifestujících SCA1, byla pozorována výrazná vakuolizace v oblasti AMMC, na obrázku je zástupce manifestující linie AxG (Obr. 22, B). U

kontrolních jedinců bez ohledu na stáří nenastaly žádné neurodegenerativní změny na mozku (Obr. 22, C, D).

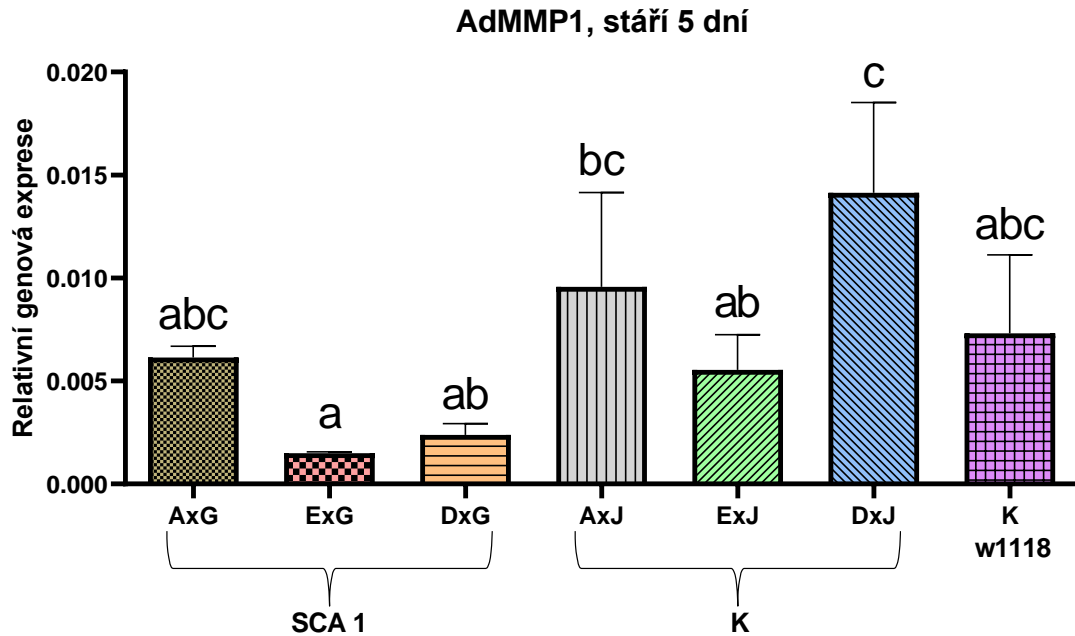


Obr. 22. Snímky zobrazující mozky *Drosophila melanogaster*. A – AxG mladí (5 dní) jedinci. B – AxG staří (30 dní) jedinci. C – kontrola mladí jedinci. D – kontrola staří jedinci. Měřítka (délka úseček) 100 $\mu$ m. Šípky označují vakuolizaci mozkové tkáně. Snímky byly pořízeny na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu FluoView™ FV3000 Olympus v laboratoři Střediska mikroskopie ENTÚ a následně upraveny v programu Adobe Photoshop.

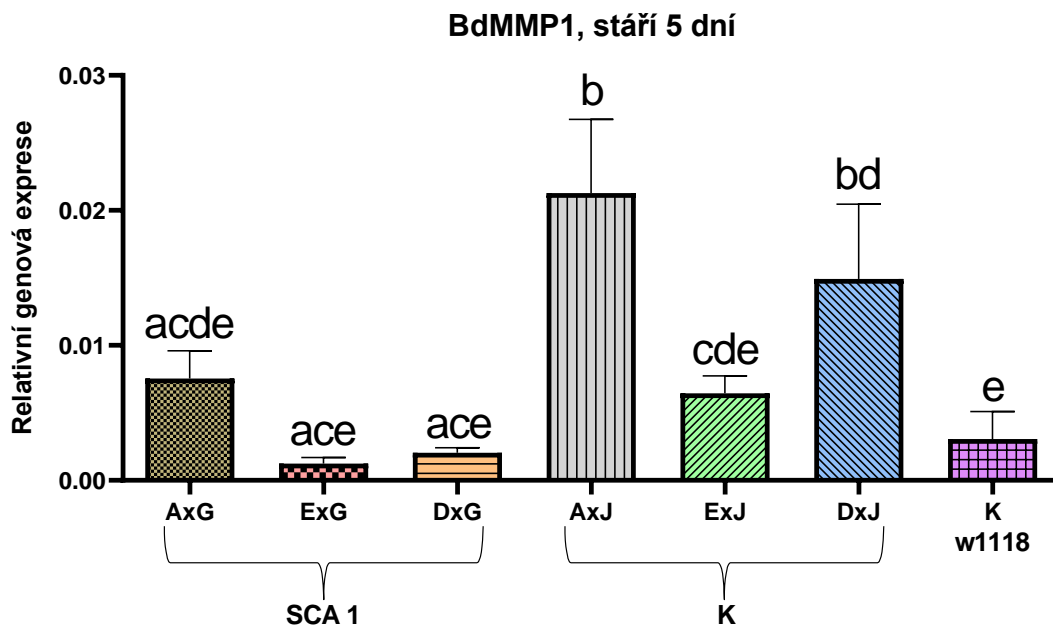
#### 4.4. Genová exprese

Míra exprese sledovaných genů byla určena metodou kvantitativní real – time PCR. V této práci jsme se zaměřili na následující geny – dMMP1 (matrix metaloproteináza 1), dMMP2 (matrix metaloproteináza 2), hAtXN1 (ataxin-1), na které byly navrženy specifické primery (AdMMP1, AdMMP2, BdMMP1, BdMMP2, hAtXN1). Jako referenční gen byl použit rp49 (ribosomální protein 49). Test byl proveden pro mladé (5 dní) i staré jedince (30 dní).

V první fázi jsme se zaměřili právě na mladé jedince, u kterých byly ověřeny všechny výše zmíněné primery. Pro primery AdMMP1 a BdMMP1, které jsou specifické pro gen dMMP1 nebyly zaznamenány žádné statisticky průkazné rozdíly mezi manifestujícími liniemi a linií kontrolní (Obr. 23, 24). Linie AxG, DxG a ExG se liší pouze od linií, které by měly do jisté míry sloužit také jako kontroly (AxJ, respektive DxJ).

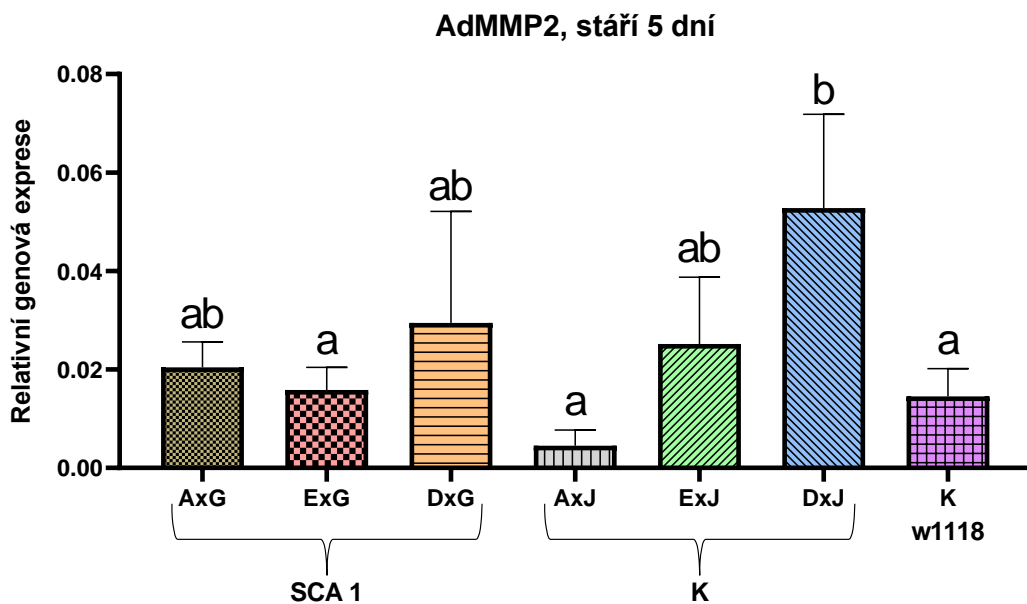


Obr. 23. Relativní genová exprese jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) pro prumer AdMMP1. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

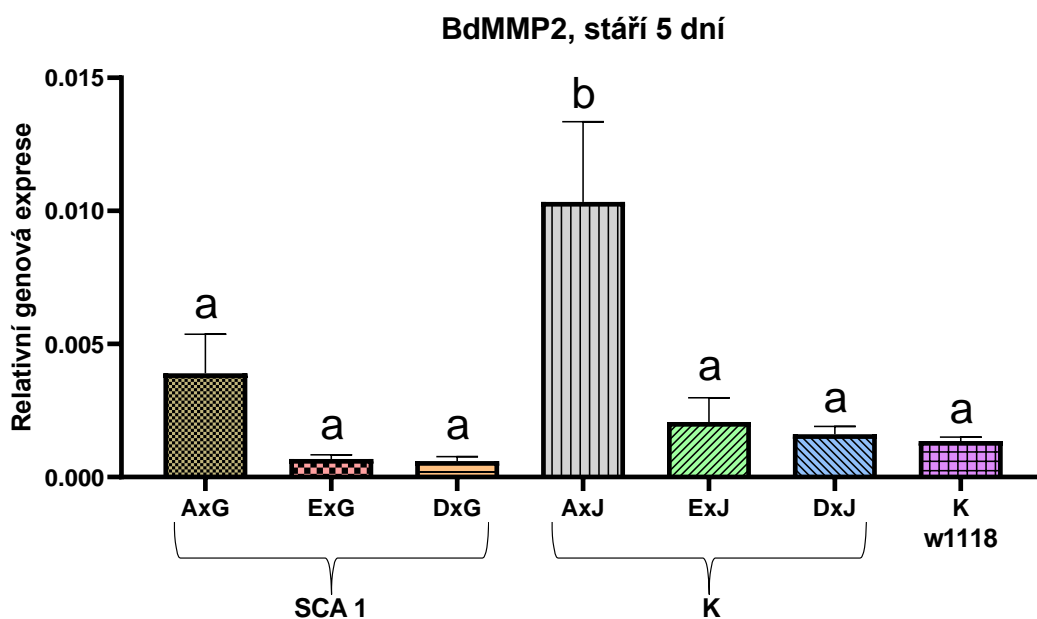


Obr. 24. Relativní genová exprese jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) pro prumer BdMMP1. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Specifický primer pro gen dMMP2, tedy AdMMP2, vykazuje statisticky průkazný rozdíl relativní genové exprese mutantních linií pouze vůči linii AxJ (Obr. 25), v případě primeru BdMMP2 byl rozdíl pouze mezi ExG a DxJ (Obr. 26).

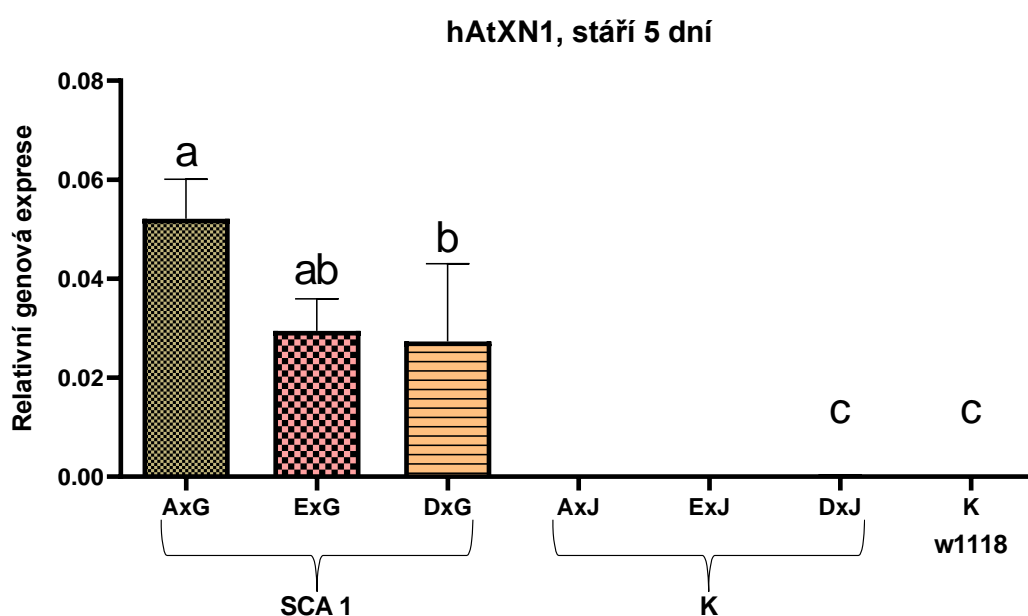


Obr. 25. Relativní genová exprese jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) pro primer AdMMP2. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.



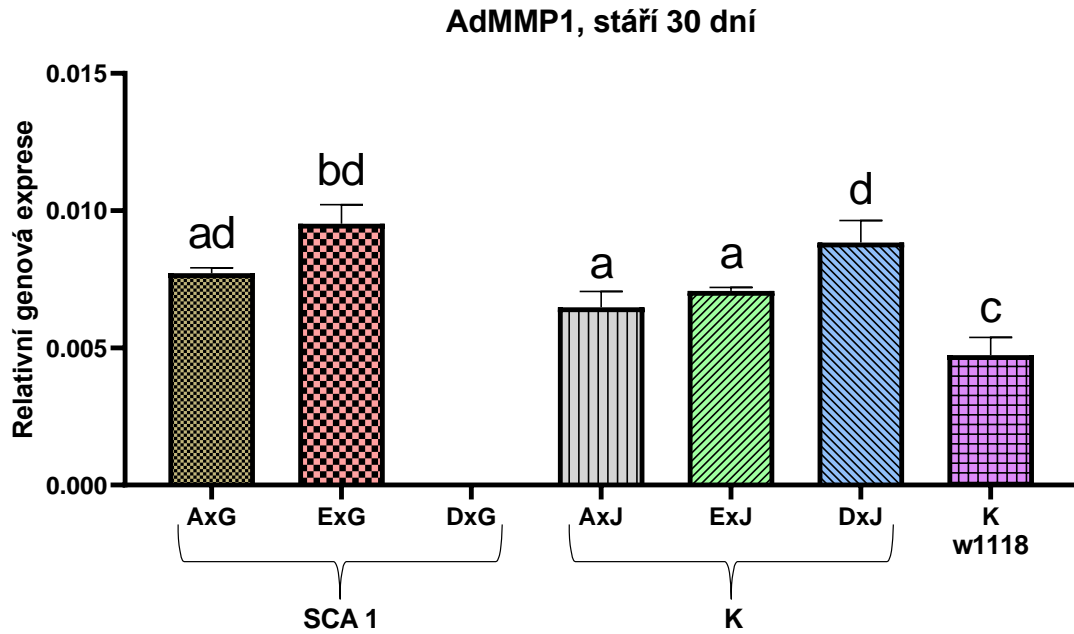
Obr. 26. Relativní genová exprese jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) pro primer BdMMP2. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Dalším genem našeho zájmu byl hAtXN1, který by se měl ve vyšší míře exprimovat u linií manifestující SCA1. Z grafu (Obr. 27) je patrné, že u kontrolních linií (DxJ, K) dochází k pouze k zanedbatelné expresi tohoto genu, zatímco u linií manifestujících je relativní genová exprese mnohonásobně vyšší. U zbývajících linií AxJ a ExJ nebyla zaznamenána žádná exprese tohoto genu.

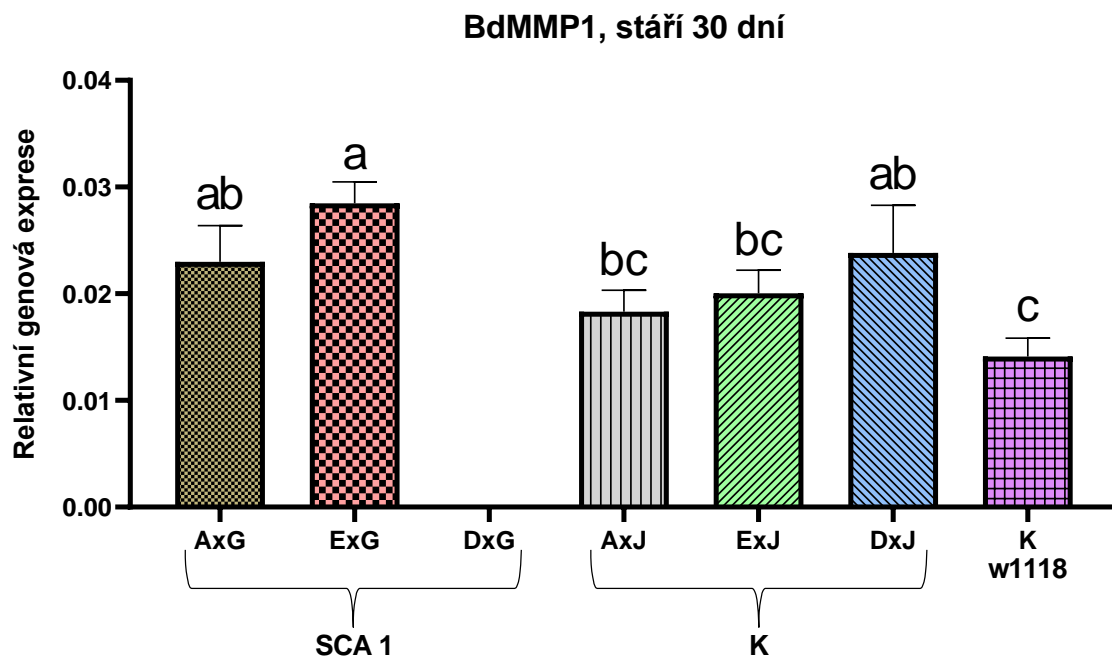


Obr. 27. Relativní genová exprese jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) pro primer hAtXN1. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

V další fázi jsme se zaměřili na sledování genové exprese u starých jedinců (30 dní), abychom měli porovnání, zda se exprese vybraných genů bude lišit s věkem. U manifestující linie DxG došlo v průběhu této práce k zastavení vývoje a nedocházelo k líhnutí nových jedinců, proto nebylo možné ověřit expresi daných genů u této linie. Oproti mladým jedincům zde byly pro všechny testované primery zaznamenány statisticky průkazné rozdíly mezi manifestujícími liniemi a linií kontrolní (Obr. 28, 29, 30).

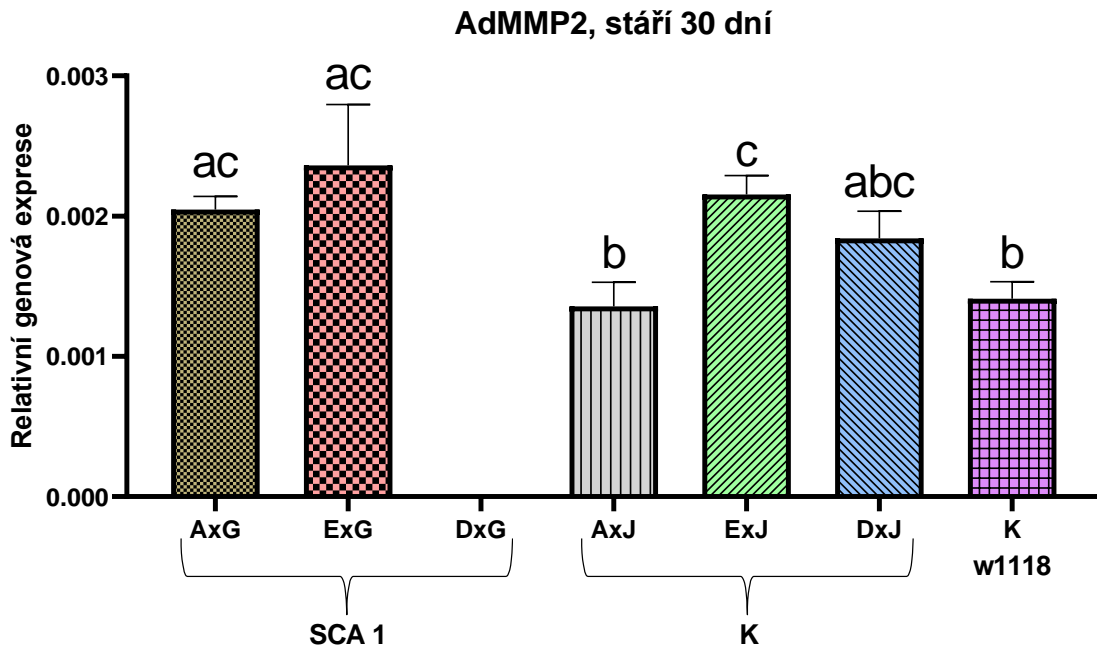


Obr. 28. Relativní genová exprese jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) pro primer AdMMP1. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.



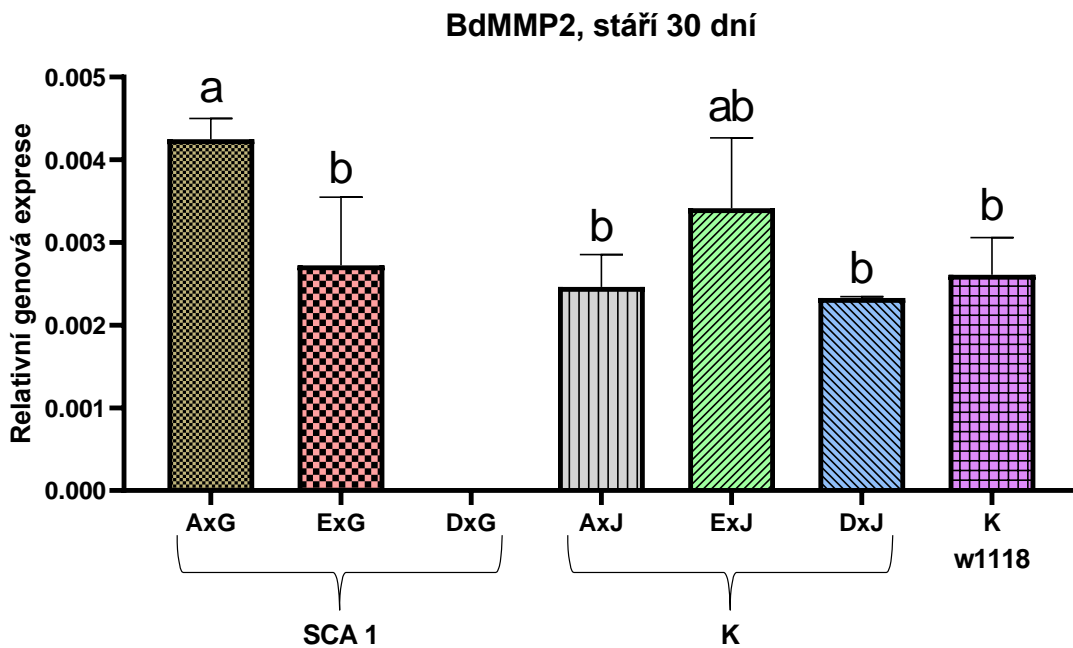
Obr. 29. Relativní genová exprese jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) pro primer BdMMP1. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.





Obr. 30. Relativní genová exprese jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) pro primer AdMMP2. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

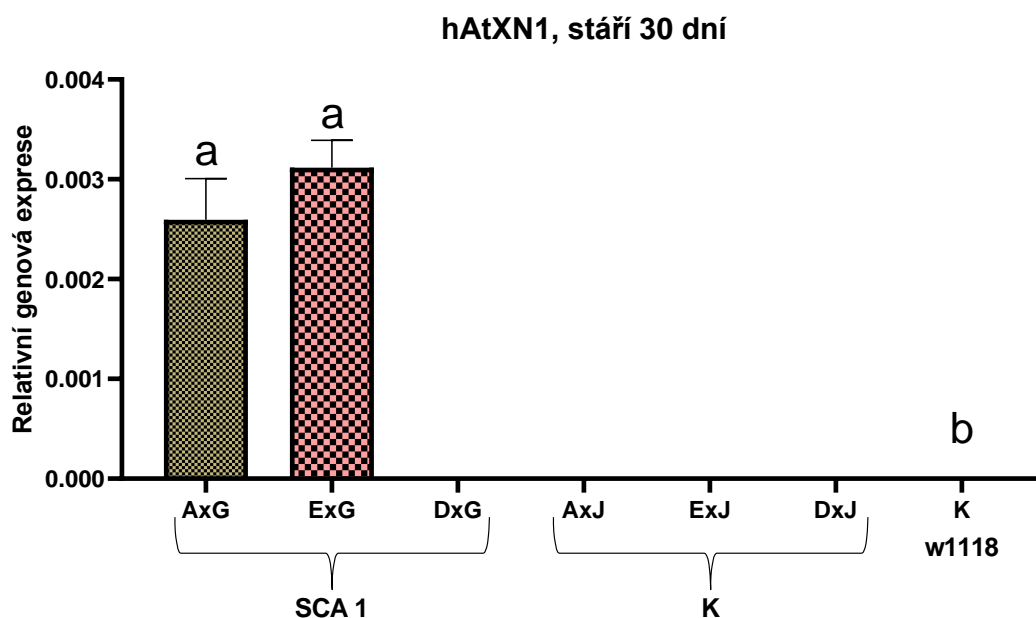
Pro primer BdMMP2 byl prokázán rozdíl pouze u linii AxG vůči kontrole (Obr. 31).



Obr. 31. Relativní genová exprese jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) pro primer BdMMP2. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou

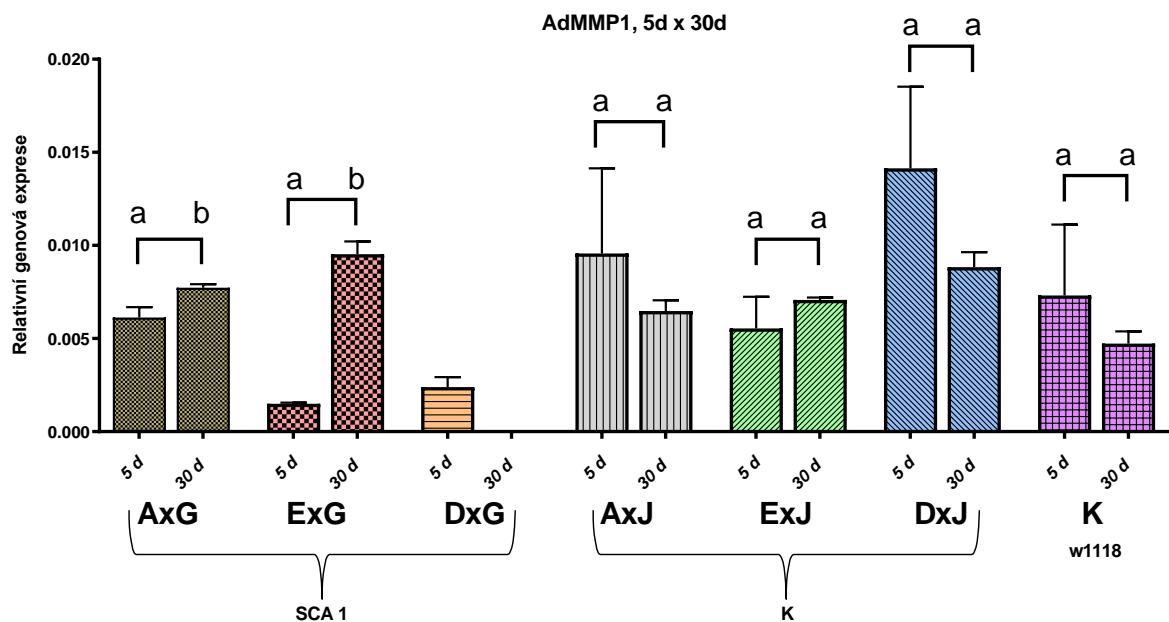
variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Pro gen hAtXN1 byly stejně jako u mladých jedinců výrazné rozdíly mezi manifestujícími a kontrolními liniemi (Obr. 32). U linií AxJ, ExJ a DxJ nebyla zaznamenána žádná exprese testovaného genu.

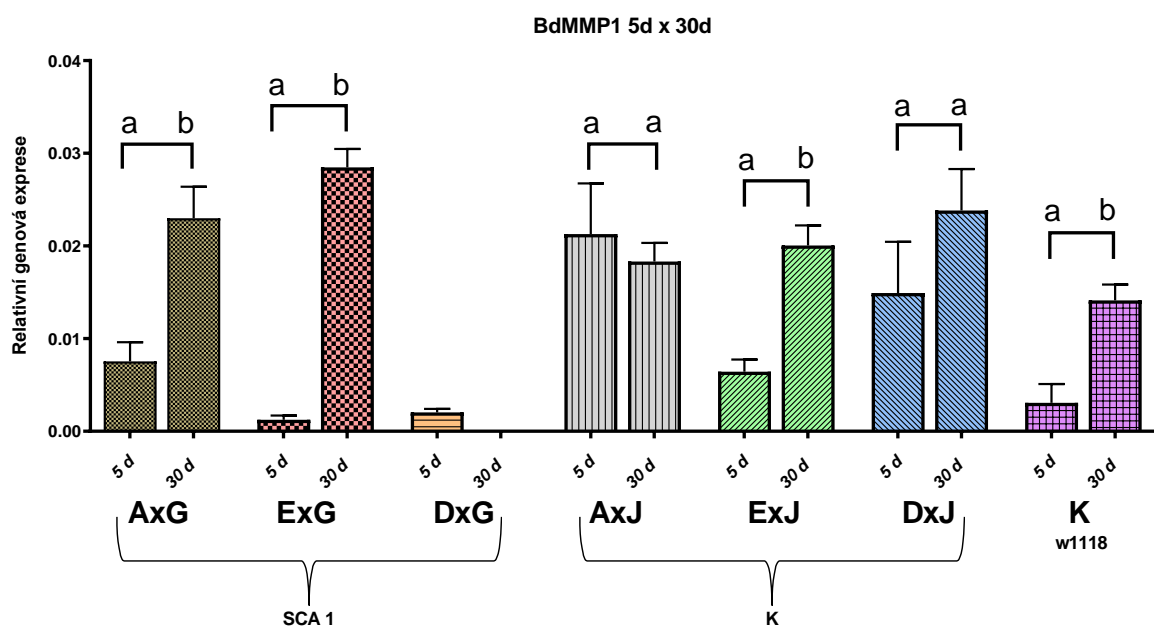


Obr. 32. Relativní genová exprese jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) pro primer hAtXN1. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Pro porovnání míry genové exprese v závislosti na stáří byly vytvořeny také souhrnné grafy, které zobrazují rozdíly mezi mladými a starými jedinci. Exprese genu dMMP1 v závislosti na stáří se u obou testovaných primerů u manifestujících linií lišila, došlo k výraznému a statisticky průkaznému nárůstu genové exprese u starých jedinců (Obr. 33, 34).

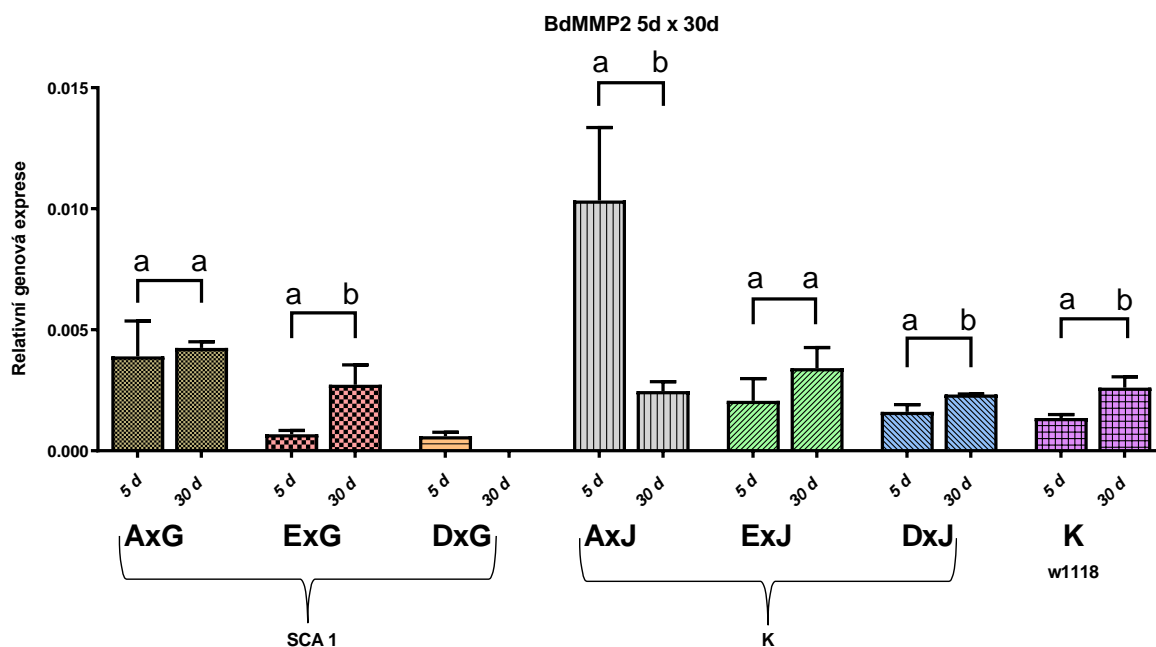


Obr. 33. Srovnání relativní genové exprese mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců pro přímer AdMMP1. Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie byly testovány pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.



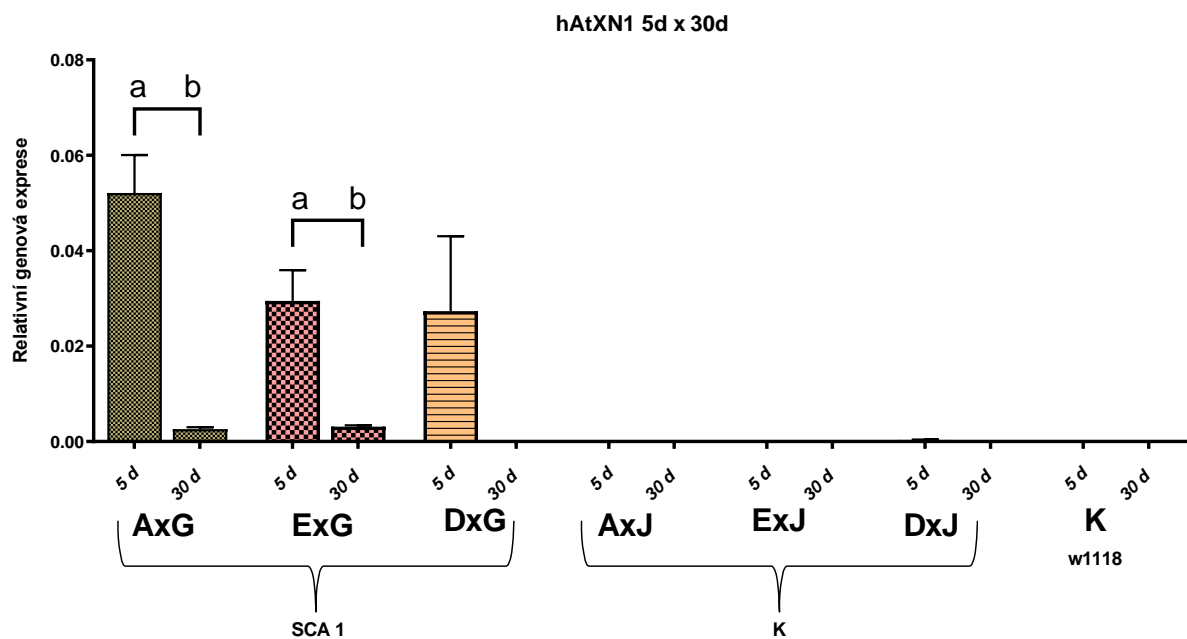
Obr. 34. Srovnání relativní genové exprese mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců pro přímer BdMMP1. Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie byly testovány pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.





Obr. 36. Srovnání relativní genové exprese mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců pro primer BdMMP2. Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie byly testovány pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Stejný trend byl prokázán i u genu hAtXN1, kdy se míra genové exprese u starých jedinců snížila téměř dvacetkrát u linie AxG a desetkrát u linie ExG (Obr. 37).



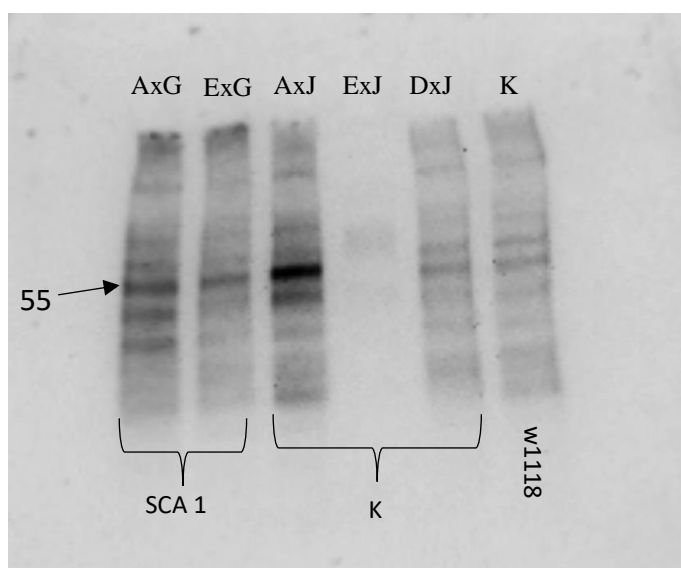
Obr. 37. Srovnání relativní genové exprese mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců pro primer hAtXN1. Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie byly testovány

pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

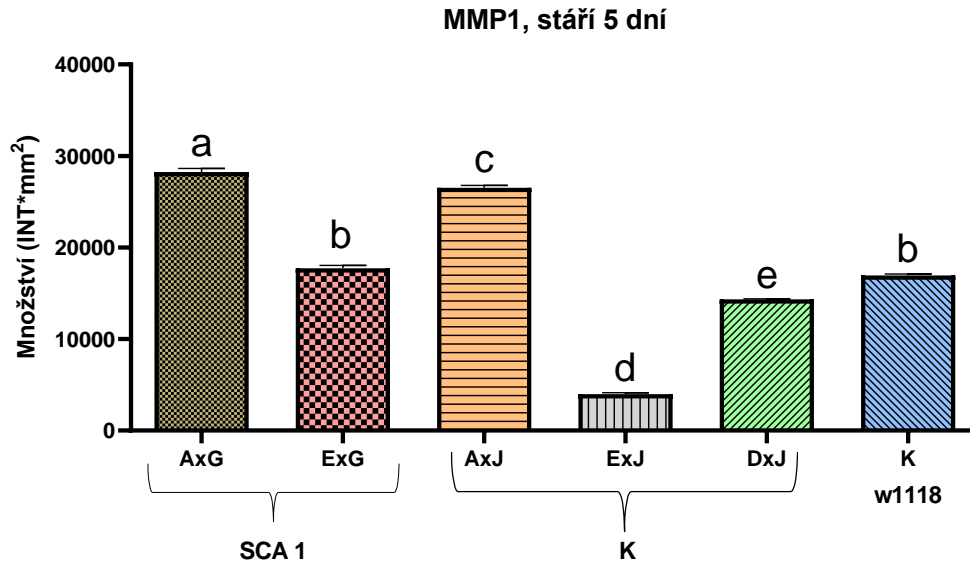
#### 4.5. Western Blot

Námi sledovaný gen MMP1 kóduje endopeptidázu matrix metaloproteinázu 1 (MMP1). K její detekci v daném vzorku byla použita metoda Western Blot. Označení daného proteinu bylo provedeno pomocí primární protilátky Mmp1 catalytic domain, jako sekundární protilátka sloužila Goat Anti-Mouse. Následně byla kvantifikována velikost odpovídajícího bandu.

Nejprve byli testováni mladí jedinci (5 dní) *Drosophila melanogaster* všech studovaných linií kromě výše zmíněné linie DxG, u které přetrvával problém ve vývoji. Nejvyšší detekované množství MMP1 bylo zaznamenáno u manifestující linie AxG, zároveň tato linie vykazovala statisticky průkazné rozdíly oproti všem ostatním liniím. Linie ExG se oproti kontrolní linii nelišila (Obr. 38, 39).

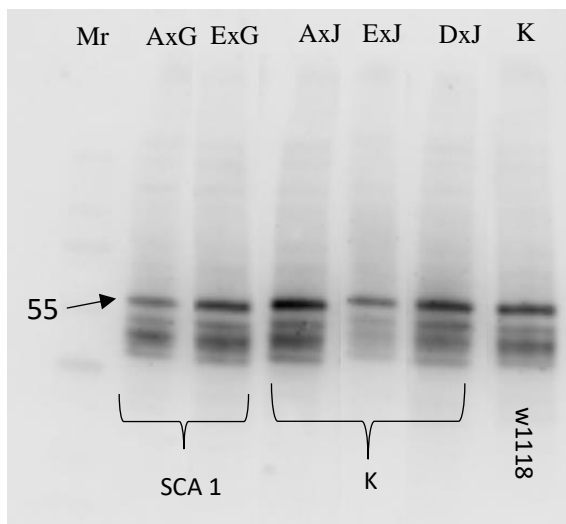


Obr. 38. Analýza MMP1 (Matrix metaloproteináza 1) pomocí metody Western Blot u mladých jedinců (5 dní) *Drosophila melanogaster*, odpovídající band označen šipkou.

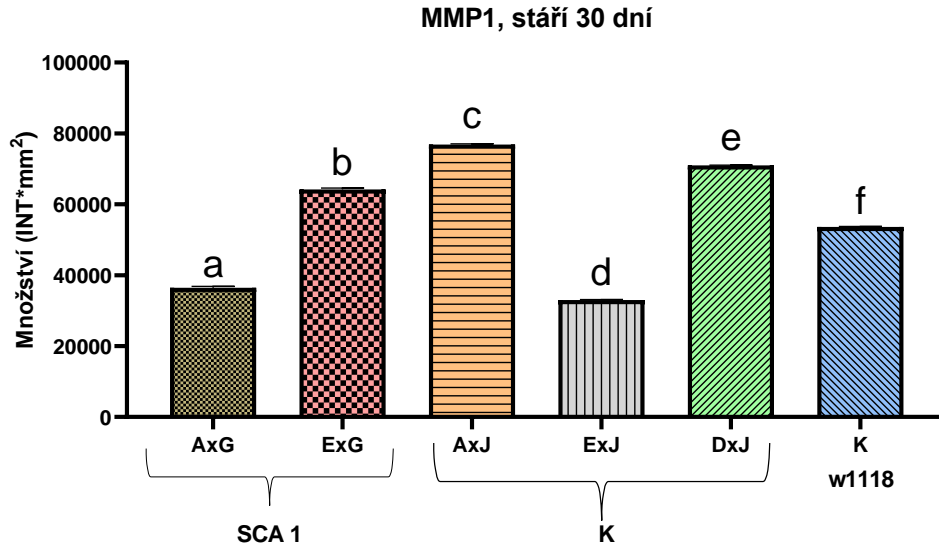


Obr. 39. Analýza množství MMP1 a velikosti bandu jednotlivých linií mladých jedinců (5 dní) *Drosophila melanogaster*. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Následně jsme detekovali množství MMP1 také u všech linií starých jedinců (30 dní) *Drosophila melanogaster* kromě výše zmíněné linie DxG. Oproti mladým jedincům zde nebylo nejvyšší detekované množství proteinu u manifestujících linií, ale u linií, které by měly sloužit do jisté míry jako kontrolní. U linie ExG bylo zaznamenáno statisticky průkazné vyšší množství MMP1 než u linie kontrolní. Všechny testované linie se u starých jedinců vzájemně statisticky lišily (Obr. 40, 41).

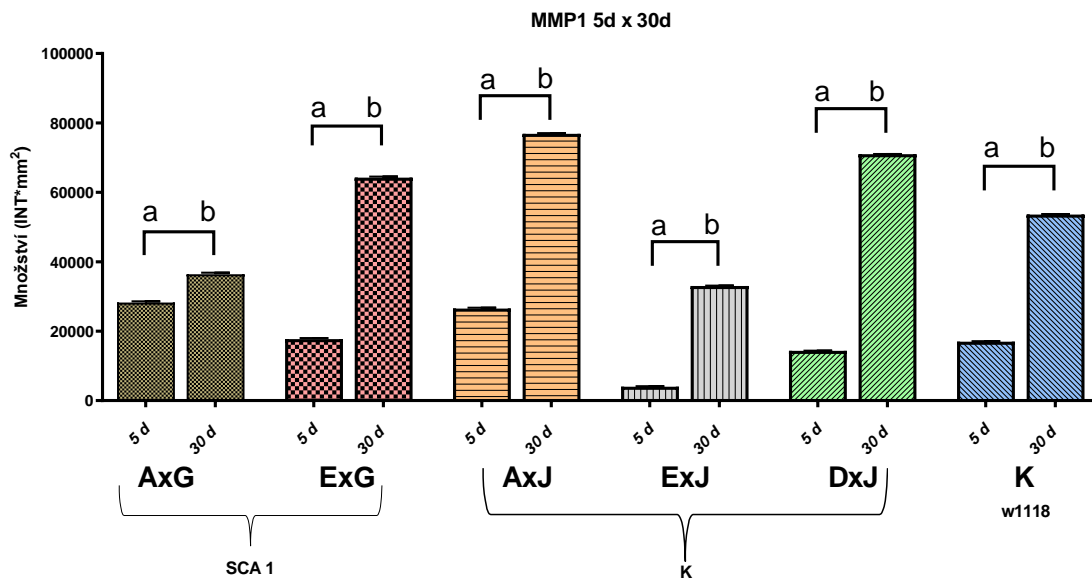


Obr. 40. Analýza MMP1 (Matrix metaloproteináza 1) pomocí metody Western Blot u starých jedinců (30 dní) *Drosophila melanogaster*, odpovídající band označen šipkou.



Obr. 41. Analýza množství MMP1 a velikosti bandu jednotlivých linií starých jedinců (30 dní) *Drosophila melanogaster*. Statisticky významné rozdíly na 5 % hladině významnosti byly testovány jednocestnou analýzou variance (ANOVA) s Tukeyho mnohonásobným porovnáním a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.

Pro srovnání množství dané endopeptidázy MMP1 v závislosti na stáří byly vytvořeny grafy, které porovnávají mladé a staré jedince vždy v dané linii. U všech testovaných linií byl, zaznamenám statisticky průkazný nárůst u starých jedinců (Obr. 42).



Obr. 42. Srovnání množství MMP1 a velikosti bandu u mladých (5 dní) a starých (30 dní) jedinců *Drosophila melanogaster*. Statisticky významné rozdíly mezi mladými a starými jedinci jedné linie, byly testovány pomocí nepárového t-testu na 5 % hladině významnosti a jsou označeny různými písmeny nad jednotlivými sloupci.



## 5. Diskuze

Octomilka obecná, *Drosophila melanogaster*, je jedním z nejznámějších a nejvíce využívaných modelových organismů ve výzkumu. Mezi největší výhody tohoto druhu patří krátká generační doba, finančně nenáročný chov, ale také jednoduchá příprava různých mutantních linií, a v neposlední řadě je znám kompletní genom *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000). Díky těmto poznatkům můžeme provádět různé genetické pokusy, které lze následně interpolovat na lidskou populaci. Z hlediska lidských neurodegenerativních onemocnění přinesla kompletní znalost genomu octomilky *D. melanogaster* nové možnosti zkoumání těchto onemocnění a jejich důsledků. V lidském genomu se nachází přibližně sto genů, které mají přímý vliv na specifická lidská onemocnění, 75 % z nich má analog u jedinců *Drosophila melanogaster* (Rubin et al., 2000; Reiter et al., 2001). Podle Světové zdravotnické organizace, The WHO, představují do budoucna lidská neurodegenerativní onemocnění jeden z největších problémů dopadajících na lidskou populaci (Janca et al., 2006) a je velmi důležité zjistit o nich co nejvíce informací. Proto jsme se v této práci zaměřili na to, jakým způsobem se projeví neurodegenerativní onemocnění spinocerebelární ataxie typu 1 u mutantních linií *Drosophila melanogaster*, u kterých by mělo docházet k produkci nadměrného množství ataxinu – 1. Získané poznatky by bylo možné následně využít právě ve zkoumání dopadu tohoto onemocnění na lidskou populaci.

Mutantní linie manifestující spinocerebelární ataxii typu 1 byly vytvořeny pomocí binárního systému GAL4/UAS. Tento systém umožňuje vytvořit transgenní linie, které obsahují tkáňově specifický promotor s navázaným transkripčním faktorem kvasinek GAL4. Následně dochází ke křížení GAL4 samic se samci, kteří mají požadovaný gen spojený s kvasinkovou upstream aktivační sekvencí – UAS. Tímto způsobem jsou získáni potomci, kteří regulovatelně exprimují gen sledovaného onemocnění, a to pouze v konkrétních tkáních (Brand and Perrimon, 1993; Brand and Dormand, 1995). Tento systém je hojně využíván právě k tvorbě mutantních linií ve spojení s neurodegenerativními onemocněními a jejich dopadu na fenotyp octomilky *D. melanogaster*, jak ukazují některé práce zabývající se spinocerebelární ataxií (SCA3 – Li et al., 2008; SCA1 – Fernandez – Funez et al., 2000; SCA7 – Latouche et al., 2007).

Neurodegenerativní onemocnění SCA1 je spojené s negativním dopadem na pohyblivost a špatnou koordinaci pohybu (Zoghbi and Orr, 2009; Rossi et al., 2014), které progreduje s věkem. Proto jsme zkoumali, do jaké míry dojde k ovlivnění mobility u jedinců *Drosophila melanogaster* v souvislosti se spinocerebelární ataxií typu 1, ale také se stářím. Výsledky

týkající se mobility jedinců v mé práci potvrdily, že se pohybová schopnost s věkem snižuje mírně u kontrolních jedinců, ale mnohem výrazněji u linií mutantních, tedy manifestujících toto onemocnění. Tento test byl prováděn pomocí metody RING assay, která byla vytvořena a popsána v práci Gargano et al. (2005). V této práci se zabývali mimo jiné mobilitou jedinců různého stáří (konkrétně 1 týden a 4 týdny), kdy u starších jedinců se pohybové schopnosti samců *Drosophila melanogaster* snížily téměř dvojnásobně (pro kontrolní linie wild-type). V práci Li et al. (2008) zkoumali dopad spinocerebelární ataxie typu 3 na mobilitu kontrolních (SCA3trQ27) i manifestujících linií (SCA3trQ78<sub>CAG</sub> a SCA3trQ78<sub>CAA/G</sub>) pro stáří 1 den a 12 dní. V této práci se zaměřili na to, jaké procento jedinců nepřekoná předem stanovenou vzdálenost (vyjádřeno v % neúspěchu). Ze získaných dat byl patrný pouze malý rozdíl v procentu neúspěšnosti v mobilitě kontrolních linií v závislosti na stáří, oproti tomu u linií exprimujících ataxin-3 se tato procentuální neúspěšnost zvýšila téměř čtyřnásobně, což znamená, že mobilita daných jedinců se čtyřikrát snížila (Li et al., 2008). Podobné výsledky jsem získala i ve své práci, kdy u mutantních linií manifestujících SCA1 ve výšce 7 cm/10 s byl zaznamenán pokles mobility čtyřnásobně pro AxG a trojnásobně pro DxG, a to v závislosti na stáří (5 dní a 30 dní). Zároveň u manifestujících linií starých jedinců byl zaznamenán výrazný pokles mobility vůči kontrolním liniím (pro AxG téměř 4x), což potvrzuje, že se u manifestujících linií skutečně s věkem projevuje negativní dopad na pohybovou aktivitu.

O dopadu neurodegenerativního onemocnění spinocerebelární ataxie typu 1 na manifestující linie svědčí také výsledky z křivek přežití (tzv. Longevity, Survival curve) a vypočítaný medián přežití. Jak vyplynulo z prací zabývajících se různými typy spinocerebelární ataxie, měl by se medián přežití u manifestujících linií zkracovat, jelikož právě SCA u člověka zkracuje délku života (Zoghbi and Orr, 2009; Kang and Hong, 2009). U spinocerebelární ataxie typu 7 byl u manifestujících linií exprimován ATXN7T – 102Q. U těchto linií byl zaznamenán medián přežití 19.6 dne, oproti tomu u kontrolních linií dosahoval medián hodnoty 43.6 dne (Latouche et al., 2007). Pro spinocerebelární ataxii typu 3 byl zkoumán vliv mutantních linií nejen s expandovanými CAG triplety (SCA3trQ78<sub>CAG</sub>), ale také s CAA triplety (SCA3trQ78<sub>CAA/G</sub>). Medián přežití pro CAG mutantní linii byl 14.5 dne, u CAA linie byl medián 25 dní. Medián přežití pro kontrolní linie z publikovaných dat nelze určit, ale s jistotou nabýval hodnoty vyšší než 34 dní (Li et al., 2008). Pro spinocerebelární ataxii typu 1 byl v práci Barclay et al. (2014) zaznamenán kratší medián přežití pro manifestující linie v porovnání s kontrolní linií. Trend zkracování délky života, a tedy mediánu přežití se u některých manifestujících linií potvrdil také v této práci. Medián přežití pro linii AxG byl 23

dní a pro ExG 36 dní. U kontrolních jedinců tento medián dosahoval hodnoty 54 dní. U linie DxG nebyl zaznamenán rozdíl v mediánu přežití oproti kontrolní linii (w1118).

Dalším znakem spojeným s neurodegenerativními onemocněními jsou specifické změny na mozku, které se projevují vakuolizací v postižené oblasti. Tyto změny přímo souvisí s úbytkem množství neuronů a narušením jejich funkce, což má za následek vznik psychických a neurologických poruch. Typ vzniklého neurodegenerativního onemocnění závisí na lokalizaci poškozených neuronů. Spinocerebelární ataxie typu 1, která byla předmětem zkoumání v této práci, souvisí s poškozením mozkové tkáně v motorických centrech. U manifestující linie AxG byla v oblasti AMMC zaznamenána nejvýraznější vakuolizace. Spinocerebelární ataxie typu 1 je onemocnění, které se s přibývajícím věkem zhoršuje, mělo by tak docházet u starých jedinců modelového druhu *Drosophila melanogaster* k výraznějším změnám. Přítomná vakuolizace byla sledována pomocí konfokální skenovací mikroskopie. Potvrdil se fakt, že se stářím dochází u manifestujících linií k poškození mozkové tkáně ve větší míře. To dokazuje také práce Li et al. (2008), ve které zkoumali dopad spinocerebelární ataxie typu 3 na mozkové struktury a přítomnost neurodegenerativních změn v podobě vakuolizací. V této práci se zaměřili pouze na staré jedince (35 dní), u kterých se potvrdila přítomnost vakuol na více místech v mozku. Vakuolizace není spojená pouze s onemocněním spinocerebelární ataxie, ale vyskytuje se také u jiných neurodegenerativních onemocnění. U Alzheimerovy choroby byl popsán četný výskyt mozkových neurodegenerativních změn v podobě vakuolizace u 30denních jedinců *Drosophila melanogaster* (Lee et al., 2017). Dalším onemocněním, u kterého byl popsán výskyt vakuolizací mozkové tkáně, je demence. V práci Marcora et al. (2014) se právě touto problematikou zabývali a zjistili, že u transgenních linií *Drosophila melanogaster*, které by měly exprimovat A $\beta$ 42x2, docházelo k projevům neurodegenerace ve formě vzniku vakuol, oproti tomu u kontrolní linie BRI<sub>2</sub> – 23x2 k těmto změnám nedocházelo. V mé práci se potvrdilo, že skutečně dochází k poškození mozkové tkáně u linií manifestujících SCA1, zejména u linie AxG, a to výrazněji u starých jedinců. Zajímavým zjištěním je, že tyto změny byly v menší míře pozorované i u mladých jedinců, což ve výše zmíněných pracích testováno nebylo. Toho by se dalo potenciálně využít při hledání nových způsobů snížení míry poškození mozku u lidí v časném stádiu onemocnění.

Při vzniku neurodegenerativního onemocnění dochází v organismu ke specifickým tkáňovým změnám, ale také ke změně míry exprese různých genů. Zároveň je během progresu těchto onemocnění organismus vystaven fyziologickému stresu. Během těchto procesů se uplatňují

mimo jiné také matrix metaloproteinázy. Jedná se o tkáňově specifické  $Zn^{2+}$  závislé endopeptidázy, které se uplatňují při různých fyziologických a patologických procesech – cirkadiální rytmy, ovulace, remodelace tkání, buněčná proliferace, ale také v procesech spojených s různými onemocněními (Page-McCaw, 2008). Tyto endopeptidázy jsou přísně regulovány během transkripčních i posttranskripčních úprav. Funkce MMPs spočívá v regulaci buněčné signalizace a degradaci extracelulární matrix proteinů. MMPs jsou nezbytné také při intracelulárních remodelacích, ale jejich funkce v těchto procesech a role při poškození CNS není zcela zřejmá (Sinha et al., 2014). U člověka se nachází přibližně 23 různých MMPs oproti tomu u *Drosophila melanogaster* se vyskytují dva druhy MMP, a to konkrétně MMP1 a MMP2 (Llano et al., 2002), které jsou kódovány stejně označenými geny. Proto jsme se v této práci zaměřili na sledování změn genové exprese těchto konkrétních genů ve spojení s neurodegenerativním onemocněním SCA1. Pokud je organismus *Drosophila melanogaster* vystaven abnormálnímu stresu, mělo by docházet k výraznější expresi MMP genu (Wen et al., 2020). K hypotéze, že by právě MMP mohly být zapojeny při tomto druhu onemocnění, nás vedla spolupráce mé školitelky s americkými univerzitami, kde se zabývali významnou rolí MMPs při onemocněních CNS a jejich práce byla nedávno přijatá do tisku (Hearst et al. 2021). V naší práci se u mladých jedinců (5 dní) tento trend nepotvrdil, naopak docházelo k vyšší produkci u linií, které slouží do jisté míry jako kontrolní (AxJ, ExJ a DxJ). Možným vysvětlením by u mladých jedinců mohla být teprve počínající neurodegenerace, která se neprojevuje na genové úrovni. U starých jedinců již dosahovali manifestující linie nejvyšší míry relativní genové exprese těchto genů. Jedním z cílů v této práci bylo ověřit dva specifické sety primerů AdMMP<sub>1,2</sub> a BdMMP<sub>1,2</sub>, abychom zjistili, který z nich bude vykazovat prokazatelnější výsledky. Vzhledem k tomu, že SCA1 je spojená s nadměrnou produkcí ataxinu-1, byla dále pomocí kvantitativní RT-PCR kvantifikována exprese ataxinu-1. V práci Del Caño Espinel et al. (2015) testovali expresi hAtXN1 u mladých jedinců (5–6 dní), a to u linie kontrolní (gmr>+) a u mutantní linie (gmr> hAtXN1<sup>82q</sup>). Zaznamenali zde čtyřnásobný nárůst u mutantní linie oproti kontrole. V naší práci se tento trend potvrdil, u manifestujících linií došlo k mnohonásobnému nárůstu relativní genové exprese oproti kontrole, u linií, které sloužily do jisté míry jako kontrolní, docházelo jen k minimální amplifikaci tohoto produktu. Zajímavé je zde i srovnání mladých a starých jedinců u manifestujících linií, kdy došlo ke snížení relativní genové exprese dvacetkrát u linie AxG a desetkrát u linie ExG.

Další metodu, kterou jsme použili k charakterizaci námi vytvořených linií drozofil a kterou lze ověřit dopad neurodegenerativního onemocnění SCA1 na organismus, je právě Western

Blot. Na základě této metody jsme mohli určit a kvantifikovat množství výše zmíněné endopeptidázy matrix metaloproteinázy 1 u námi sledovaných linií. Vzhledem k tomu, že i při poranění mozku je detekovatelné vyšší množství MMP1 (Purice et al., 2017), očekávali jsme v naší práci navýšení právě u manifestujících linií. U jedinců těchto linií dochází k neurodegenerativním změnám na mozku, které narušují jeho kompaktní strukturu. U mladých jedinců (5 dní) bylo zaznamenáno skutečně největší množství MMP1 u linie AxG, která manifestuje SCA1. U starých jedinců (30 dní) byly zaznamenány pouze mírně vyšší hodnoty u linie ExG vůči kontrolní linii.

Hlavním cílem této práce bylo vytvořit linie drozofil manifestující SCA1 a charakterizovat především fyziologické změny u *Drosophila melanogaster* způsobené tímto neurodegenerativním onemocněním a optimalizovat metody molekulární biologie (kvantitativní real – time PCR, Western Blot), jejichž podrobnější analýza a upřesnění bude předmětem navazující magisterské práce, spolu s analýzou dat z konfokální mikroskopie.

## 6. Závěr

V této práci jsem se zaměřila na vytvoření linií drozofil, které by měly vykazovat symptomy onemocnění spinocerebelární ataxie typu 1 (SCA1). Vytvořila jsem tři linie (AxG, ExG, DxG), které známky tohoto onemocnění skutečně vykazovaly, další tři linie (AxJ, ExJ, DxJ), které sloužily jako kontrolní k liniím manifestujícím toto onemocnění, a to vše bylo srovnáváno s hodnotami naměřenými pro kontrolní linii w1118. Charakterizace všech těchto linií, a to i s ohledem na věk jedinců, byla uskutečněna pozorováním změn souvisejících s mobilitou, délkou přežívání, vakuolizací mozkové tkáně, změnami v genové expresi a detekcí konkrétních proteinů. Ze získaných dat vyplývá:

1. Mobilita testovaná metodou RING assay se u manifestujících linií zhoršuje, a to výrazněji u starých jedinců (30 dní).
2. U manifestujících linií dochází ke zkrácení délky života.
3. U manifestující linie AxG dochází ke vzniku vakuolizací v oblasti motorických center (AMMC), u starých jedinců jsou viditelné prokazatelně výraznější neurodegenerativní změny. Další linie jsou stále předmětem zkoumání, výsledky budou součástí navazující magisterské práce.
4. Relativní genová exprese MMP1 a MMP2 se liší v závislosti na dané linii a použitém primeru. Pro hAtXN1 byly zaznamenány statisticky vysoce průkazné rozdíly mezi manifestujícími a kontrolními liniemi. Zároveň byl zaznamenán vysoký nárůst exprese hAtXN1 u starých jedinců (30 dní).
5. U starých jedinců (30 dní) bylo pomocí metody Western Blot detekováno mnohem větší množství MMP1 než u mladých jedinců (5 dní) napříč všemi liniemi.

## 7. Seznam použitých zkratek

AMMC	antenální mechanoreceptory a motorická centra
BCA	bicinchoninic acid assay
CAG	cytosin-adenin-guanin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
Ct	prahová hodnota/prahový cyklus
dMMP1	gen pro matrix metaloproteinázu 1
dMMP2	gen pro matrix metaloproteinázu 2
DNA	deoxyribonukleová kyselina
hAtxN1	gen pro ataxin-1
Mbp	milion párů bází
MMP1	matrix metaloproteináza 1
PBS	přenosový pufr Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNS	periferní nervová soustava
PVDF	polyvinylidene difluorid
RING	Rapid iterative negative geotaxis
RNA	ribonukleová kyselina
rp49	ribozomální protein 49
qRT-PCR	kvantitativní reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SCA	spinocerebelární ataxie
SDS	sodium dodecyl sulfát

## 8. Seznam použité literatury

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 24, 287(5461), 2185-95.
- Barclay, S.S., Tamura, T., Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Shimamura, T., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Imoto, S., Miyano, S., Okazawa, H. (2014). Systems biology analysis of *Drosophila in vivo* screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1, *Human Molecular Genetics* 23(5), 1345–1364.
- Bird, T.D. (1998). Hereditary Ataxia Overview. [updated 2018 Sep 27]. GeneReviews(R). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.
- Brand, A.H., Dormand, E-L. (1995). The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 5(5), 572-278.
- Brand, A.H., Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brust, J. C. (2006). Current diagnosis. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, xiii, 601 p. ISBN 978-007-1423-663.
- Bürk, K., Goold, R., Giunti, P. (2007). Cognition in hereditary ataxia. *The Cerebellum* 6 (3), 280-286.
- Catala, M., Kubis, N. (2013). Chapter 3 - Gross anatomy and development of the peripheral nervous system, Editor(s): Gérard Said, Christian Krarup, Handbook of Clinical Neurology. *Elsevier* 115, 29-41.
- Chan, H., Bonini, N. (2000). *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. *Cell Death Differ* 7, 1075–1080.
- David, M. J., Aminoff M. J. (2005). Clinical neurology. 6th ed., New York [etc.]: McGraw-Hill. ISBN 00-714-2360-5.
- Del Caño Espinel, M., Acebes, J., Sanchez, D., Ganfornina, M. (2015). Lazarillo-related Lipocalins confer long-term protection against type I Spinocerebellar Ataxia degeneration contributing to optimize selective autophagy. *Molecular Neurodegeneration* (10), 10.1186/s13024-015-0009-8.



- Donato S.D., Mariotti, C., Taroni, F. (2012). Chapter 25 - Spinocerebellar ataxia type 1, Editor(s): Sankara H. Subramony, Alexandra Dürr. *Handbook of Clinical Neurology, Elsevier (103)*, 399-421.
- Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34, 1 – 15.
- Duffy J.R. (2000). Motor Speech Disorders: Clues to Neurologic Diagnosis. In: Adler C.H., Ahlskog J.E. (eds) Parkinson's Disease and Movement Disorders. Current Clinical Practice. *Humana Press, Totowa, NJ*, 35-53.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Guoyon, B., She, W-Ch., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J., McCall, A., Canal, I., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y., Botas, J. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408, 101-106.
- Gargano, J.W., Martin, I., Bhandari, P., Grotewiel, M.S. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology* 40(5), 386-395.
- Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40(4), 767-774.
- Hahn, S., Young, E.T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* 189(3), 705–736.
- Harding, A.E., Langton Hower, R. (1983). The Heart Disease of Friedreich's Ataxia: a Clinical and Electrocardiographic Study of 115 Patients, with an Analysis of Serial Electrocardiographic Changes in 30 Cases. *QJM: An International Journal of Medicine* 52 (4), 489–502.
- Hardy, J., Gwinn-Hardy, K. (1998). Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease. *Science* 282(5391), 1075-1079.
- Hashimoto, H., Kikuchi, Y., Nogi, Y., Fukasawa T. (1983). Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec Gen Genet* 191, 31–38.
- Hearst, S., Johnson, K., Mills, D., Thomas, C., Scales, J., Bednarova, A., Keenan, E.T., Welcher, J.V., Krishnan, N. (2021). Expression of *Drosophila* Matrix Metalloproteinases in

Cultured Cell Lines Alters Neural and Glial Cell Morphology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, submitted.

Janca, A., Johan, A.A., Prilipko, L., Dua, T., Saxena, S., Saraceno, B. (2006). WHO/WFN Survey of neurological services: A worldwide perspective. *Journal of the Neurological Sciences* 247(1), 29-34.

Jenett, A., Rubin, G.M., Ngo, T-T.B., Shepherd, D., Murphy, Ch., Dionne, H., Pfeiffer, B.D., Cavallaro, A., Hall, D., Jeter, J., Iyer, N., Fetter, D., Hausenfluck, J.H., Peng, H., Trautman, E.T., Svirskas, R.R., Myers, E.W., Iwinski, Z.R., Aso, Y., DePasquale, G.M., Enos, A., Hulamm, P., Lam, S.Ch.B., Li, H-H., Laverty, T.R., Long, F., Qu, L., Murphy, S.D., Rokicki, K., Safford, T., Shaw, K., Simpson, J.H., Sowell, A., Tae, S., Yu, Y., Zugates, Ch.T. (2012). A GAL4-Driver Line Resource for *Drosophila* Neurobiology. *Cell Reports* 2(4), 991-1001. ISSN 2211-1247.

Kang, S., Hong, S. (2009). Molecular Pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 1 Disease. *Mol. Cells* 27, 621-627.

Karabasheva, D., Smyth, J.T. (2020). Preparation of *Drosophila* Larval and Pupal Testes for Analysis of Cell Division in Live, Intact Tissue. *Journal of Visualized Experiments: Jove* (159).

Klockgether, T., Mariotti, C., Paulson, H.L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers* 5, 24.

Kodrík, D. (2000). Fyziologie hmyzu, učební texty, ENTÚ AVČR a PřF JU, Č. Budějovice.

Latouche, M., Lasbleiz, Ch., Martin, E., Monnier, V., Debeir, T., Mouatt-Prigent, A., Muriel, M-P., Morel, L., Ruberg, M., Brice, A., Stevanin, G., Tricoire, H. (2007). A Conditional Pan-Neuronal *Drosophila* Model of Spinocerebellar Ataxia 7 with a Reversible Adult Phenotype Suitable for Identifying Modifier Genes. *Journal of Neuroscience* 27, 27(10), 2483-2492.

Laughon, A., Gesteland, R.F. (1984). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Molecular and cellular biology* 4(2), 260–267.

Lee, B.I., Suh, Y.S., Chung, Y.J., Yu, K., Park, C.B. (2017). Shedding Light on Alzheimer's  $\beta$ -Amyloidosis: Photosensitized Methylene Blue Inhibits Self-Assembly of  $\beta$ -Amyloid Peptides and Disintegrates Their Aggregates. *Sci Rep* 7(1), 7523.

- Li, L.B., Yu, Z., Teng, X., Bonini, N.M. (2008). RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature* 453, 1107-1111.
- Llano, E., Pendás, A., Quesada, V., Sánchez, L., Santamaria, I., Noselli, S., López-Otín, C. (2002). Structural and Enzymatic Characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a Membrane-bound Matrix Metalloproteinase with Tissue-specific Expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 23321-9.
- Love, R.J., Webb, W.G. (2009). Mozek a řeč. Praha: *Portál* 372.
- Manto, M-U. (2005). The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *The Cerebellum* 4(1), 2-6.
- Marcora, M.S., Fernández-Gamba, A.C., Avendaño, L.A., Rotondaro, C., Podhajcer, O., Vidal, R., Morelli, L., Ceriani, M., Castaño, E. (2014). Amyloid peptides ABri and ADan show differential neurotoxicity in transgenic *Drosophila* models of familial British and Danish dementia. *Mol Neurodegeneration* 9, 5.
- Matilla-Dueñas, A. (2012). The Ever Expanding Spinocerebellar Ataxias. Editorial. *The Cerebellum* 11 (4), 821-827.
- Morgan, T.H. (1910). Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science* 32 (812), 120-122.
- Musova, Z., Sedlacek, Z., Mazanec, R., Klempir, J., Roth, J., Plevova, P., Vyhnalek, M., Kopeckova, M., Apltova, L., Krepelova, A., Zumrova, A. (2013). Spinocerebellar Ataxias Type 8, 12, and 17 and Dentatorubro-Pallidoluysonian Atrophy in Czech Ataxic Patients. *Cerebellum* 12, 155–161.
- Nevšímalová, S., Růžička, E., Tichý, J. (2002). Neurologie, 1. vydání. Praha Galén XIV (368).
- Orr, H.T., Chung M-Y., Banfi, S., Kwiatkowski T.J., Servadio, A., Beaudet A. L., McCall, A. E., Duvick, L.A., Ranum, L.P.W., Zoghbi, H.Y. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genetics* 4 (3), 221-226.
- Page-McCaw, A. (2008). Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (1), 14-23.
- Perlman, S. (2007). Evaluation and management of ataxic disorders: an overview for physicians. 1st ed. Minneapolis, MN: *National Ataxia Foundation*, s. 20. ISBN 09-432-1814-4.

- Purice, M.D., Ray, A., Münzel, E.J., Pope, B.J., Park, D.J., Speese, S.D., Logan, M.A. (2017). A novel *Drosophila* injury model reveals severed axons are cleared through a Draper/MMP-1 signaling cascade. *Elife* (21), 6:e23611.
- 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 research* 11(6), 1114-25.
- Rideout, E.J., Narsaiya, M.S., Grewal, S. (2015). The Sex Determination Gene transformer Regulates Male-Female Differences in *Drosophila* Body Size. *PLoS Genetics*. 11.
- Rossi, M., Perez-Lloret, S., Doldan, L., Cerquetti, D., Balej, J., Millar Vernetti, P., Hawkes, M., Cammarota, A., Merello, M. (2014). Autosomal dominant cerebellar ataxias: a systematic review of clinical features. *Eur J Neurol* 21, 607-615.
- Rubin, G.M., Hong, L., Brokstein, P., Evans-Holm, M., Frise, E., Stapleton, M., Harvey, D.A. (2000). A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science* 287, 2222-2224.
- Sang, T.K., Jackson, G.R. (2005). *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 2, 438-446.
- Sequeiros, J., Martins, S., Silveira, I. (2012). Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. *Handb Clin Neurol* 103, 227-51.
- Sinha, S.K., Asotra, K., Uzui, H., Nagwani, S., Mishra, V., Rajavashisth, T.B. (2014). Nuclear 647 localization of catalytically active MMP-2 in endothelial cells and neurons. *American Journal of Translational Research* 6 (648), 155-162.
- Valenta, M., Michalík, J., Lečbych, M. (2012). Mentální postižení: v pedagogickém, psychologickém a sociálně - právním kontextu. Praha: Grada Publishing, a.s., 1. vyd. 352 s. ISBN 978-80-247-3829-1.
- Wang, Y-C., Lee, C-M., Lee, L-C., Tung, L-C., Hsieh-Li, H-M., Lee-Chen, G-Y., Su M-T. (2011). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Contribute to the Pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 12 (SCA12)\*. *Journal of Biological Chemistry* 286 (24),
- Wen, D., Chen, Z., Zhang, Z., Jia, Q. (2020). The expression, purification, and substrate analysis of matrix metalloproteinases in *Drosophila melanogaster*. *Protein Expr Purif* (171):105629.

Zoghbi, H.Y., Orr, H.T. (2009). Pathogenic Mechanisms of a Polyglutamine-mediated Neurodegenerative Disease, Spinocerebellar Ataxia Type 1\*. *Journal of Biological Chemistry* 284(12), 7425-7429.