

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Analýza habituace u drozofilích modelů pro
neurodevelopmentální onemocnění**

Bakalářská práce

Bára Kabátová

Školitel: Mgr. Michaela Fencková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Kabátová, B., 2023: Analýza habituace u drozofilích modelů pro neurodevelopmentální onemocnění. [Analysis of „in Drosophila models for neurodevelopmental disease. Bc. Thesis, in Czech] – 53p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Habituation is behaviorally conserved learning process. Defect in habituation is associated with neurodevelopmental disorders. Also there may exist connection between neurodevelopmental disorders and immunity. Genes causing neurodevelopmental disorders have their orthologs in *Drosophila melanogaster*. We manipulated with those genes in immune tissue and made knockdowns or overexpression. Then we tested habituation for those changed genotypes. We wanted to know, if genes in immune tissue will have influence on habituation.

Prohlašuji, že jsem autorem této bakalářské práce Analýza habituace u drozofilích modelů pro neurodevelopmentální onemocnění a že jsem ji vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích, 13. 4. 2023

.....

Bára Kabátová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Michaele Fenckové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři, za užitečné rady pro zpracování a celkově za skvělé vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře za vstřícnost a ochotu pomoci a poradit při práci v laboratoři, zejména pak doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D., Mgr. Lence Chodákové, Ph.D., Ellen McMullen Ph.D, Mgr. Pavle Nedbalové a Lucii Hrádkové za jejich ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

Seznam zkratk a pojmů

ASD = „Autism spectrum disorder“, český překlad - PAS

PAS = Porucha autistického spektra

BDSC = Bloomington Drosophila Stock Center

Dicer = endonukleázový enzym

Driver = nosič sekvence Gal4

dsRNA = dvouvláknová RNA

elav = promotor regulující expresi Gal4 driveru

Fatigue = třetí část experimentu, kde se měří únava

Gal4 = transkripční aktivátor

Habituation = druhá část experimentu, kde se měří habituace

ID = „Intellectual disability“, český překlad - PI

PI = Porucha intelektu

ITI = „inter trial interval“

mRNA = messengerová RNA

miRNA = „micro RNA“, dvouvláknová RNA

MSD = „mean square difference“

NDD = „Neurodevelopmental Disorders“

Ortology = homologické geny u různých druhů

Pulse = první část experimentu, kde se měří reakce na stimuly

Responder = nosič sekvence UAS

RISC = „RNA-induced silencing complex“, způsobuje navázání na mRNA

RNAi = RNA interference

siRNA = „silencing RNA/ small interfering RNA“, dvouvláknová mRNA

Threshold = rozdíl uražené vzdálenosti po stimulu mínus uražené vzdálenosti před stimulem

TriP = Transgenic RNAi Project

TTC = „trials to criterion“

UAS = „Upstream Activation Sequence“, regulační sekvence

VDRC = Vienna Drosophila Resource Center

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Habituační 1	1
1.2 Habituační a neurodevelopmentální poruchy 1	1
1.2.1 Porucha intelektu (PI) 1	1
1.2.2 Porucha autistického spektra (PAS) 2	2
1.2.3 Příčiny poruch PI a PAS a úskalí jejich výzkumu 2	2
1.2.4 Propojení PI/PAS s imunitou a obezitou 3	3
1.3 Alternativní model..... 4	4
1.4 Genetická manipulace s PI/PAS ortology – vytvoření PI/PAS modelů 4	4
1.5 Měření habituační u drozofily..... 7	7
2. Cíle práce 9	9
3. Materiál a metody 10	10
3.1. Chov drozofily..... 10	10
3.2 Systém Zantiks 10	10
3.3 Programy Zantiks 11	11
3.4 Vyhodnocení habituační a fatigue 12	12
3.5 Postup pro testování..... 12	12
3.6 Použité drozofilí linie 13	13
4. Výsledky 17	17
4.1 Optimalizace měření Zantiks systému..... 17	17
4.1.1 První měření časové prodlevy mezi impulsy u částí „pulse“ a „habituation“ 17	17
4.1.2 Druhé měření po přenastavení skriptu v systému Zantiks..... 18	18
4.1.3 Nastavení kritérií pro vyhodnocování pomocí porovnání manuálního a automatického měření..... 18	18
4.1.4 Kritérium Threshold 19	19
4.1.5 Kritérium MSD 20	20
4.1.6 Kombinace kritérií 21	21
4.2 Drozofily pro testování habituační po manipulaci genů v tukovém tělese..... 22	22
4.2.2 Viditelné defekty 24	24
4.2.3 Analýza habituační..... 25	25
4.2.4 Analýza habituační den 1 25	25
4.2.5 Analýza habituační den 2 29	29

4.2.6 Analýza habituace den 3	38
4.2.7 Analýza habituace den 4	41
4.2.8 Výsledek analýzy habituace	45
5. Diskuze.....	46
6. Závěr	49
7. Literatura.....	50

1. Úvod

1.1 Habituaace

Organismy včetně lidí musejí být schopny vybírat z okolního prostředí hlavně důležité a potřebné informace k jejich existenci. K třídění informací existuje proces habituace. Habituaace je všudypřítomný a behaviorálně konzervovaný proces učení, který je řízený mozkem a podílí se na filtrování irelevantních podnětů. Habituaace je snižování reakcí na podněty, které se pravidelně opakují, nejsou důležité ani nebezpečné a jsou tedy pro organismus zcela běžné. V ideálním případě během habituace dochází ke snižování reakčních odezev na takovéto podněty. Zmenšení reakčních odezev nesouvisí se senzorickou adaptací ani motorickou únavou. Jedná se o adaptaci na základě předchozí zkušenosti. Správný proces habituace přispívá k rozvoji složitějších forem učení a paměti. Určitý vliv má i na pozornost, například rozlišením nových podmětů v jinak známém prostředí (Ramaswami, 2014; Barron et al., 2017).

1.2 Habituaace a neurodevelopmentální poruchy

Zdraví jedinci umí dobře ignorovat opakující se, známé, předvídatelné a nedůležité informace. Jedinci s neurodevelopmentálním onemocněním (zkratka NDD, z angl. neurodevelopmental disorders) mají přesně s takovými věcmi problém, habituace u nich probíhá abnormálně (McDiarmid et al., 2017; Blok et al., 2022). Nesprávně fungující habituace je projevem více etiologicky odlišných poruch nervové soustavy (Blok et al., 2022). V této bakalářské práci se zaměřuji pouze na neurodevelopmentální poruchy, konkrétně poruchu intelektu a poruchu autistického spektra. Existují mezi nimi podobnosti v některých genech a molekulárních drahách naznačující společný původ (Aspromonte et al., 2020). Ten by mohl vysvětlovat současný výskyt těchto poruch, který je asi v 30 % (historicky až 70 %) (Lyall et al., 2017).

1.2.1 Porucha intelektu (PI)

Porucha intelektu (PI), v angličtině Intellectual disability (ID) postihuje 1-3 % jedinců na světě (Maia et al., 2021). Podle (Katz & Lazcano-Ponce, 2008) se projevuje absencí schopností řešit problémy, logicky uvažovat či plánovat. Chybí schopnost abstraktního myšlení a učení se na

základě zkušeností. To všechno souvisí i s nižším IQ, které je menší než 70. (Meral & Yalnizoğlu, 2013).

1.2.2 Porucha autistického spektra (PAS)

Celosvětově ji trpí 1 % narozených dětí (Zeidan et al., 2022). Porucha autistického spektra (PAS), v angličtině Autism spectrum disorder (ASD) se projevuje špatným zpracováním smyslových podnětů, což vede k preferování stereotypního života. Pro jedince s touto poruchou je těžké si zvyknout na nové věci, pohybovat se v neznámém prostředí a vystavovat se jakýmkoliv změnám. Nejde pouze o nové předměty, problémy nastávají i s poznáváním nových osob. Celkově sociální projev a domluva s ostatními je pro takového jedince složitá.

Pro zjednodušení budu níže v textu místo rozepisování poruch používat pouze zkratku PI/PAS, která vyjadřuje jak samostatný výskyt poruchy autistického spektra nebo poruchy intelektu, tak i výskyt obou poruch společně.

1.2.3 Příčiny poruch PI a PAS a úskalí jejich výzkumu

Původ neurodevelopmentálních poruch, které postihují asi 2 % novorozenců, může být různý (Kochinke et al., 2016). Nervový systém se vyvíjí před narozením i po něm. Je ovlivněn geneticky i okolním prostředím. Všechny body vývoje by se měly stát ve správnou chvíli, na správném místě a za správných podmínek. Jakékoliv odchýlení od tohoto vývojového plánu může způsobit abnormální projev v nervové soustavě. Sociální prostředí, ve kterém jedinec vyrůstá, má vliv na učení a komunikaci. Nevhodné podmínky v prvních letech jeho života proto mohou mít negativní vliv na vývoj jeho nervové soustavy. Ohrozit ho mohou po narození i před ním, například v době těhotenství. Pro vývoj před narozením jsou důležité geny. Příkladem genetické příčiny může být abnormální struktura chromozomu (asi 15 % PI), nebo varianty v počtu kopií DNA vyskytující se de novo (10 % - 14 %PI). Podíl poruch způsobených vlivem okolního prostředí je minimální počet oproti případům způsobených geneticky. Navíc odhadování příspěvku environmentálních faktorů k povstání PAS je zvláště složité, protože je často obtížné rozlišit jeden faktor od druhého a identifikovat tak konkrétní příčinu (Lyall et al., 2017). Poruchy, které jsou způsobeny defektem ve více genech

označujeme jako polygenní. Pokud je za vznik poruchy zodpovědná mutace pouze v jednom genu, jde o monogenně dědičnou poruchu. Takových to je známých více než 10 000. Monogenních poruch spojených s PI/PAS je známo až 1300 (SysNDD, database of gene disease relationships in neurodevelopmental disorders. Retrieved May 8, 2020, from <https://sysnidd.dbmr.unibe.ch/>).

1.2.4 Propojení PI/PAS s imunitou a obezitou

U jedinců s poruchou PI/PAS se často vyskytují infekce, záněty, autoimunitní poruchy a většina trpí obezitou. Ta se objevuje u téměř 60 % jedinců (Neumeier et al., 2017). Obezita způsobuje další potíže. Vede k rozvoji diabetu a metabolického syndromu. Způsobuje také zánětlivé reakce a přispívá k autoimunitním potížím. Přesná příčina obezity ani imunitních problémů u PI/PAS není známá. Často je přisuzována špatné životosprávě a nedostatku tělesné aktivity. To jsou mediátory sedavého životního stylu a přispívají k chronickým onemocněním spojeným s nadváhou a obezitou. Potíže s komunikací a sociální interakcí limitují jedince s PI/PAS v začleňování a vedou k osamocenímu stylu života. Nedostatek pohybu může být způsoben fyzickým handicapem, špatnou schopností zobecňovat naučené fyzické dovednosti (Rutkowski & Brimer, 2014). Na obezitě a zánětlivosti se podílejí kromě stylu života i určité molekulární procesy v imunitních a nervových tkáních. Genetickou analýzou lze předpovědět, zda jedinec bude trpět obezitou, anebo záněty. Tak jako geny mohou za poruchu autistického spektra, mohou i za poruchu metabolismu a imunitního systému (Fencková, nepublikováno). Použití protizánětlivých kortikosteroidů vedlo ke snížení autistických projevů chování. Potlačení imunity vedlo kromě odstranění zánětů i ke snížení projevů ID (Gładysz et al., 2018). Existuje tedy možnost, že imunitní a metabolické potíže přispívají ke kognitivních dysfunkcích u PI/PAS. Jejich eliminace by mohla snížit negativní projevy neurodevelopmentálních onemocnění. U jedinců s PI/PAS bylo prokázáno propojení mezi dysfunkcí imunitního systému a abnormálním chováním, nebo propojení zánětlivého stavu s centrálním nervovým systémem.

1.3 Alternativní model

Způsobem, jak se dá pracovat na výzkumu neurodevelopmentálních onemocnění u člověka, je práce s alternativními zvířecími modely. Mezi ně patří octomilka *Drosophila melanogaster*. Používá se déle než sto let. Za tak dlouhou dobu na ní bylo provedeno mnoho pokusů, díky kterým o ní existuje mnoho dostupných dat a informací. Je běžným modelem pro výzkumy ve vývojové biologii či genetice. Má poměrně malý genom, který je kompletně osekvenovaný. Je tvořen třemi páry autosomů. Gonozomy má X a Y stejně jako člověk. Mezi genomem člověka a drozofily existuje poměrně velká homologie.

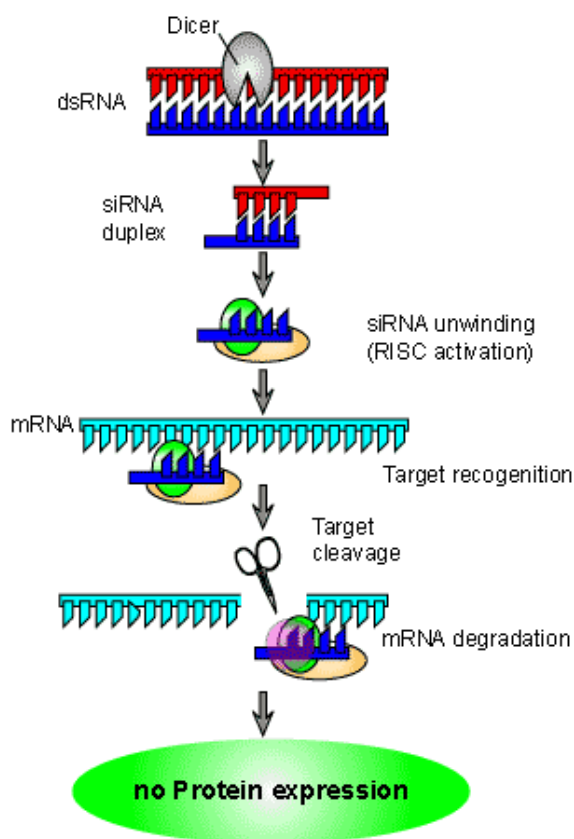
Okolo 75 % genů, které způsobují poruchy v nervovém systému, má své ortology (homologické sekvence genů u různých živočišných genů) u drozofily. Nervosvalové spojení u drozofily má mnoho podobných vlastností, jako mají nervové excitační synapse v mozku většiny obratlovců včetně člověka. Celý drozofilí mozek je dobře prozkoumán a svým fungováním je podobný lidskému. Další podobnosti se týkají také konzervovaných procesů regulujících synaptickou plasticitu, homeostázu či vývoj. To z ní dělá dobře použitelný model pro studium neurodevelopmentálních poruch (Coll-Tané et al., 2019).

Výhodou práce s drozofilou je snadné křížení, rychlá generační doba, nenáročný chov, nebo citlivost na teplotu. Jejím snížením dokážeme zpomalit vývoj. Za standardních podmínek je životní cyklus drozofily asi 10 dní. Drozofila patří mezi hmyz s proměnou dokonalou. Během svého životního cyklu projde formou vajíčka, třemi larválními stádii, kuklou a dospělcem. Se všemi zmíněnými vývojovými stádii lze pracovat (Roote & Prokop, 2013). Pro svou bakalářskou práci jsem využila pouze stádium dospělého.

1.4 Genetická manipulace s PI/PAS ortology – vytvoření PI/PAS modelů

Oblíbeným nástrojem pro snížení funkce genů je RNA interference (RNAi), posttranskripční mechanismus, který se nachází u většiny eukaryot. Jeho funkcí je podílení se na syntéze proteinů, díky čemuž může tvořit součást antivirové obrany buněk. Celý průběh RNAi závisí na několika po sobě jdoucích dějích, kdy výsledkem je zabránění genové exprese. V prvním kroku dochází k tvorbě nekódujících molekul RNA. Ty mohou být ve dvou variantách siRNA nebo miRNA. siRNA se syntetizuje tak, že endonukleázový enzym dicer rozstříhá původní dvouvláknovou RNA (dsRNA) na malé nukleotidové sekvence, které se mohou slučovat s dalšími enzymy. To je ukázáno v horní části obrázku 1, společně s celým procesem RNA interference. Vzniku miRNA předchází vznik pre-miRNA, který tvoří více vlásečkových

smyček. Ty jsou rozpoznány enzymem, který je odstříhne z primárního transkriptu a převede je z jádra do cytoplazmy, kde jsou následně rozštěpeny enzymem dicer na konečnou jednovláknovou miRNA (Filipowicz et al., 2005). siRNA a miRNA mají společnou délku, a to přibližně 22 nukleotidů. Společně s dalšími proteiny a RNA vytváří proteinové komplexy a aktivují je. Nejznámějším komplexem pro připojení je RISC komplex (RNA-induced silencing complex). Po vzniku RISC komplexu se celý tento komplex může navázat na cílovou mRNA. Ta může být vlastní, ale i virová. Navázání na virovou mRNA se děje při napadení eukaryotní buňky virem a cílem je zabránit syntéze virových proteinů, a tím i celému jeho rozmnožení. Zabránění tvorby proteinů je smyslem i pro navázání komplexu na vlastní mRNA. Tím, že se komplex navázal na mRNA zabrání syntéze proteinu v ribosomech. Následně se spustí degradace mRNA. (RNAi handbook experiments. Retrieved April 8, 2023, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/rnai-handbook-brochure.pdf>).



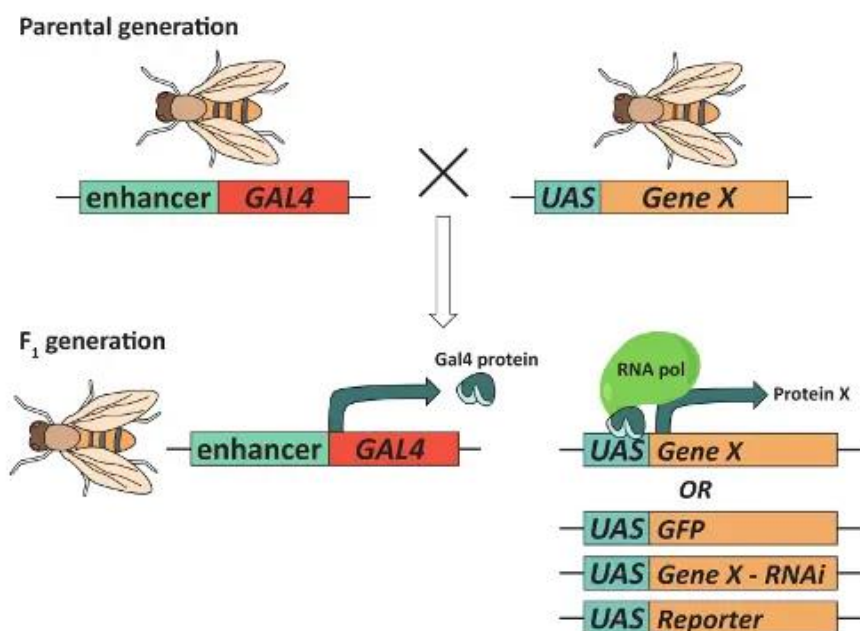
Obr. 1 - RNA interference. siRNA vytváří RISC komplex, který se naváže na mRNA, a tak zabrání syntéze proteinu. (<https://www.intechopen.com/chapters/35611>, April 8, 2023)

Využití RNAi pro manipulaci s genovou expresí u drozofily se provádí za pomoci UAS-Gal4 systému (Brand & Perrimon, 1993). Na regulační sekvenci UAS (Upstream Activation Sequence) na DNA se naváže protein Gal4. Ten se normálně nachází jen v kvasinkách a do

genomu drozofilí linie, kde chceme provést RNA interferenci, je integrován uměle. Existuje více linií Gal4. Některé jsou tkáňově specifické, řídí expresi genu jen v konkrétní tkáni. Gal4 umí aktivovat transkripci sekvence umístěné za UAS, což může být sekvence kódující dvouvláknovou RNA, komplementární ke genu, jehož expresi chceme zabránit.

RNAi linie pocházejí z výzkumných center, kde byly také vytvořeny. V mé bakalářské práci jsem používala kolekci VDCR, která je spolu s sTriP jednou ze dvou hlavních kolekcí. Od sebe se liší místem vzniku. VDCR (VDCR, <https://www.viennabiocenter.org/vbcbf/vienna-drosophila-resource-center/>, April 8, 2023) pochází z rakouského zásobovacího centra. TriP – (DRSC/TRiP Functional Genomics Resources, <https://fgr.hms.harvard.edu/>, April 8, 2023) pochází ze zásobovacího centra v USA.

Pro využití tohoto systému potřebujeme 2 samostatné transgenní linie. Jedna linie nese sekvenci Gal4 a je označována jako driver. To, že nese samostatný Gal4, většinou nemá fenotypový projev. Druhá linie-responder nese konstrukt UAS a dvouvláknovou RNA pro indukci RNAi studovaného genu, který je ale bez proteinu Gal4 neaktivní. RNAi je aktivována až vzájemným křížením těchto linií. Pouze u jejich potomstva dochází k vazbě Gal4 proteinu na UAS sekvenci a zpuštění transkripce dvouvláknové RNA, tak jak je ukázáno na obrázku 2 (Roote & Prokop, 2013).



Obr. 2 – UAS-GAL4 systém. Nejdříve se musí zkřížit rodičovská generace. Až u potomků dochází k vazbě UAS a Gal4 proteinu. (https://www.researchgate.net/figure/The-GAL4-UAS-system-can-be-used-for-targeted-gene-expression-To-obtain-flies-expressing_fig2_320896002, April 8, 2023)

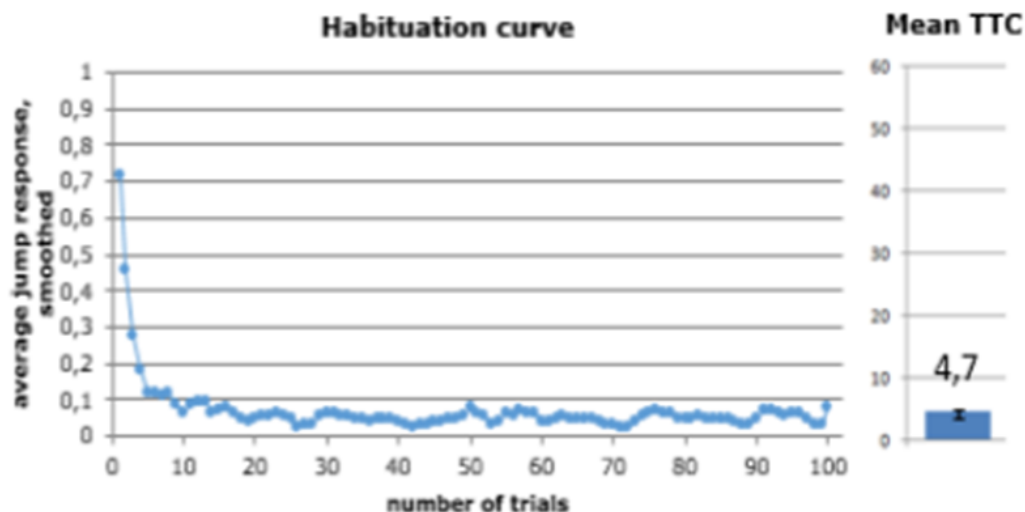
1.5 Měření habituace u drozofily

Snížení genové exprese pomocí RNAi může vést k fenotypovému projevu. Tím může být třeba změna barvy očí. Změny ve vnímání, pozorování, zorientování se v okolí a ostatní kognitivní funkce jsou také projevem fenotypu, nejen much ale i lidských jedinců. Porucha habituace je v tomto případě vhodným fenotypovým indikátorem, protože je relevantní pro kognitivní funkce, a je častá u jedinců s PI/PAS (McDiarmid et al., 2017; Blok et al., 2022) i u jejich drozofilích modelů (Fenckova et al., 2019).

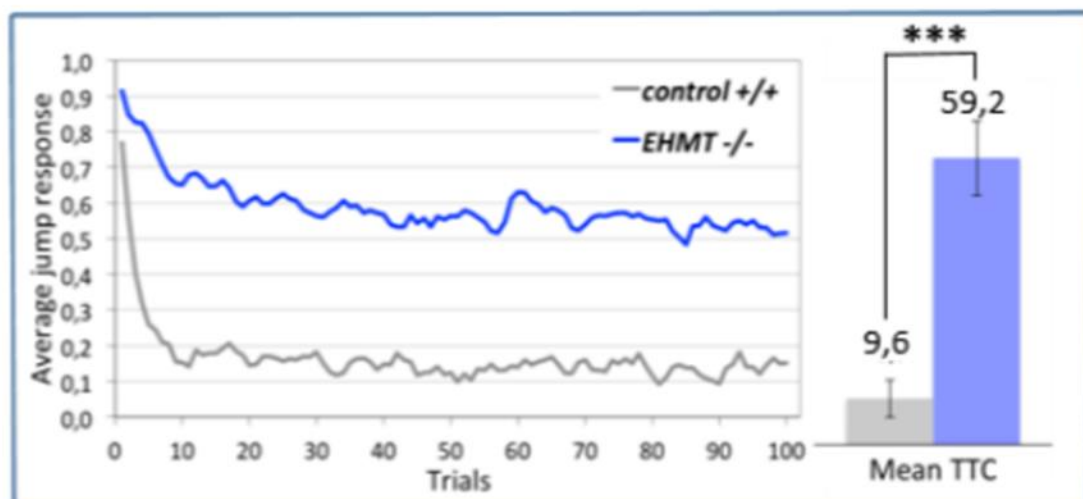
Habituaci u drozofily detekujeme snížením skokové odpovědi na opakující se zrakový stimulus. V experimentu jsou drozofily vystaveny konstantnímu světlu, které zhasíná, a to je podnět, který vyvolává skokovou reakci. Zhasnutí světla označujeme jako „light-off“ stimulus.

Počáteční zhasnutí světla způsobuje únikovou skokovou odpověď. Ta se díky habituaci, tedy přivyknutí si na tento stimulus, s počtem jeho opakování snižuje. Úspěšný proces habituace proběhne, pokud drozofila přestane odpovídat v pěti po sobě jdoucích skocích. Toto označujeme jako „no-jump criterion“. Ve chvíli, kdy drozofila tohoto kritéria dosáhne, se habituovala. Proces habituace je posuzován podle počtu stimulů, které jsou nutné k dosažení „no-jump criterion“ a označujeme ho jako „trials to criterion“ (TTC) (Fenckova et al., 2019).

Popis habituace je vidět v následujících grafech z práce (Fenckova et al., 2019). Obrázek 3 zobrazuje snižující se křivku, tedy správný průběh habituace, kdy postupem času drozofily přestávají reagovat na stimuly. Je vidět, že při prvních stimulech na začátku experimentu reagovaly a přestaly odpovídat až v průběhu experimentu. Obrázek 4 zobrazuje dvě křivky. Jednu, kde opět vidíme habituaci, protože křivka s rostoucím počtem stimulů klesá. Tato křivka patří kontrolním drozofilám bez změněného genotypu. Druhá modrá křivka patří drozofilám s upraveným genotypem pomocí RNAi. Při začátku experimentu nedochází k náhlému poklesu reakcí. Nedochází k habituaci, protože se křivka nepřiblížila k nule ani během všech 100 stimulů.



Obr. 3 - Přirozený průběh habituace. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu znázorňuje, jak se skoková reakce drozofil mění v čase.



Obr. 4 – Porovnání experimentální linie s kontrolou. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Šedivá křivka zobrazuje kontroly, které se v průběhu času habituovaly. Modrá křivka patří testovaným drozofilám. V porovnání s kontrolou se v průběhu času nehabituuji.

2. Cíle práce

Podle dosavadních pozorování existuje propojení mezi zhoršenými kognitivními schopnostmi, které může být znázorněno zhoršenou habituací a metabolickými, endokrinními nebo imunologickými problémy. Pacienti s PI a PAS často trpí obezitou a slabší imunitou. Nejsou ale známy konkrétní geny, které by měly negativní vliv na imunitu a zároveň by snižovaly kognitivní funkci v habituaci. Moje školitelka testovala ve své práci Fenckova et al., (2019), 286 genů v nervových tkáních, které jsou zapojeny do PI/PAS a mají své ortology u člověka. Z těchto 286 genů zjistila, že vliv na habituaci má 104 genů. Asi 50 % ze 104 genů s vlivem na habituaci způsobuje navíc imunometabolické potíže. To bylo zjištěno na základě lékařských pozorování, kde u jedinců s PI/PAS byla pozorovatelná obezita či imunometabolické problémy (například zánětlivost), nebo u nich byla zaznamenána zvýšená exprese takového genu (Kochinke et al., 2016). Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány geny, které splňují obě podmínky a to, že mají vliv na imunometabolické potíže nebo obezitu a zároveň u nich byla zaznamenána zvýšená exprese v nervových tkáních. U drozofilích ortologů je při infekci pozorovatelná zvýšená exprese genů v tukovém tělese nebo v hemocytech. Tato analýza byla provedena pouze na genech z tukového tělesa na datech z RNA sekvenování, GSE1333662 - tukové tělesu u larev a GSE56013 – tukové těleso u dospělců. Záměrem této bakalářské práce je ověřit, zda funkce daných genů v tukové tkáni také dokáže ovlivnit habituaci.

Pro určení konkrétních genů v imunitních buňkách s vlivem na habituaci bylo zapotřebí provést následující 2 cíle práce:

1. Optimalizace light-off jump habituace v systému Zantiks a analýza skoků z dat získaných automatickým vyhodnocením,
2. Manipulace s vybranými geny v tukové tkáni za účelem ověření jejich vlivu na habituaci.

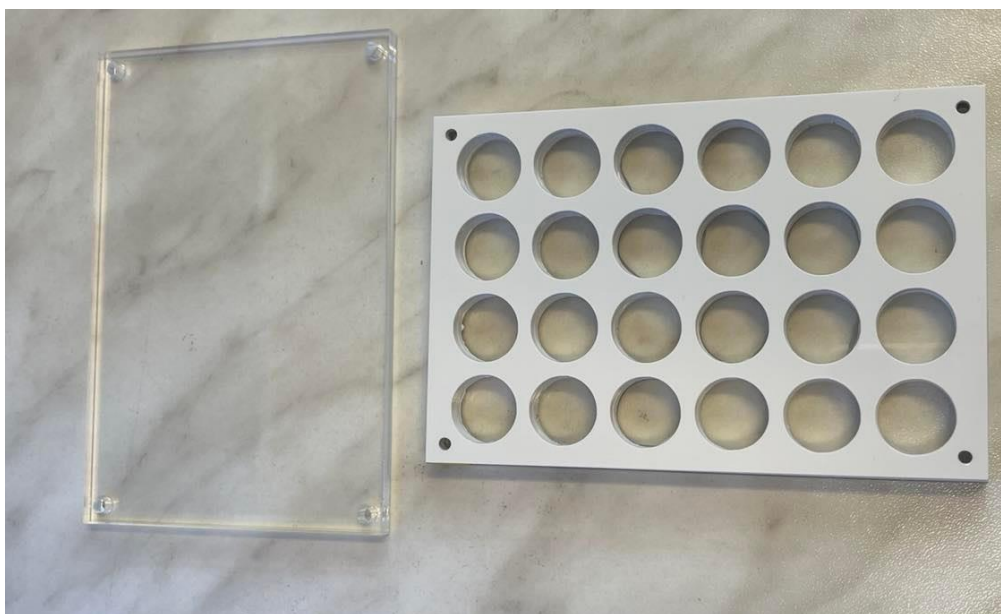
3. Materiál a metody

3.1. Chov drozofily

Drozofily pro experimenty byly chovány ve skleněných nebo plastových vialkách ucpaných vatovým špuntem. V každé vialce byla na dně potrava složená z těchto ingrediencí, voda, kukuřičná mouka, agar, instantní kvasnice a sacharóza. V noci a během dne byly drozofily udržovány v inkubátoru s řízenou vlhkostí (60 %-70 %), střídáním světla a tmy (12h:12 h) a stálou teplotou (25 °C). Panny byly před zkřížením umístěny v 18°C.

3.2 Systém Zantiks

Společnost Zantiks (<https://zantiks.com/>, April 8, 2023) se zaměřuje na měření behaviorálních odpovědí u modelových organismů včetně drozofily. Pro měření habituace se používá jednotka Zantiks MWP. Tento typ umožňuje testovat malé organismy, umístěné individuálně ve více komůrkách na jedné destičce (obrázek 5), pomocí stimulů světla. Zde byla použita destička s 24 kruhovými komůrkami. Rozměr destičky je 8,8 cm x 13 cm, průměr jedné komůrky je 1,7 cm.



Obr. 5 - Destička pro testování chování drozofil v systému Zantiks.

3.3 Programy Zantiks

Jednotka se ovládá pomocí uživatelské konzole ve webovém prohlížeči Google Chrome. Experimenty jsou naprogramované uživatelem pomocí vlastního programovacího jazyka zanscript. Každý experiment má 3 části: „Pulse“, „Habituation“, „Fatigue“ (tabulka 1). Pro minimalizování chyb jsem v první části své práce měřila části samostatně. Pomocí 3 samostatných programů a později pomocí jednoho programu, který všechny experimenty integroval.

Před samotným experimentem jsou drozofily v přístroji Zantiks 5 minut, aby si navykly na světlo, které na ně neustále svítí. Během experimentu se světlo vypíná, vždy na 15ms, a poté se zase rozsvítí. Drozofily na toto zhasnutí zareagují skokovou odpovědí. Proto tento signál označujeme jako light-off jump stimulus (případně stimulus).

Experiment začíná částí „Pulse“. Při měření „Pulse“ se stimulus opakuje 10x v 5 sekundových intervalech, které nevyvolají habituaci. Informuje nás o tom, jak dobře drozofily reagují na stimulus. Nejdůležitější částí experimentu je „Habituation“. Zde se stimulus opakuje 100x v 1 sekundových intervalech, které u zdravých, kontrolních much vedou k habituaci skokové odpovědi (Engel & Wu, 1996; Fenckova et al., 2019). Část „Fatigue“ slouží k ověření, zda snížení skokové odpovědi na opakovaný light-off stimulus není důsledkem (např. svalové) únavy (Fenckova et al., 2019). Mezi jednotlivými částmi je pauza 90 sekund.

Část experimentu	Doba trvání impulsu	Světlo-počet impulsů	Popis
Pulse	5 sek.	10	Nemá docházet k habituaci. Sleduje se frekvence skokové odpovědi na stupnici 0 – 1 (1 = 100 %, tj. 10 skokových odpovědí na 10 stimulů)
Habituation	1 sek.	100	Nejdůležitější část experimentu, měla by být viditelná habituace- postupné snížení skokové odpovědi.
Fatigue	5sek.	50	Nemá docházet k habituaci, ověřuje se, jestli únava nepřispívá ke snížení skokové odpovědi.

Tab. 1 - Popis částí experimentu.

3.4 Vyhodnocení habituace a fatigue

Habituace drozofil se vyhodnocuje na základě kritéria TTC, „trial to criterion“. Pokud drozofila z jedné komůrky nevyskočí v 5 po sobě jdoucích light-off stimulech, je považována za habituovanou. Habituace je určena množstvím light-off stimulů, které jsou potřebné k 5 po sobě jdoucím nevyskočením. Potřebné množství light-off stimulů udává kritérium $TTC \pm SEM$. Vyhodnocené $TTC \pm SEM$ pro kontroly i experimentální drozofily se zlogaritmuje. Poté se zlogaritmované $TTC \pm SEM$ kontroly porovná se zlogaritmovaným $TTC \pm SEM$ experimentální drozofily pomocí lineárního modelu. Tato analýza je plně integrovaná v analytickém softwaru a provede se automaticky po změření příslušného experimentu. Pokud je rozdíl statisticky průkazný tak pravděpodobnost musí být menší než 0,05. Stejně vyhodnocení platí i pro fatigue experiment (Fenckova et al., 2019).

3.5 Postup pro testování

Drozofily se nejprve uspaly ve vychlazené vialce a přenesly pomocí aspirátoru (obrázek 6) do vychlazené destičky, která ležela několik minut na ledu. Do každé komůrky se přendala 1 drozofila. Naplněná destička se uzavřela pomocí šroubků a před testováním se nechala 20 minut ležet mimo led. Začátkem samotného experimentu bylo správné vložení destičky do přístroje Zantiks. Na počítači se nastavil program pro testování a spustil se samostatný experiment. Zantiks vyhodnotil a zaznamenal data v podobě datasetu v programu Excel a zároveň zaznamenal i videonahrávku (s rychlostí 30 snímků za sekundu). Data obsahují údaje o vzdálenosti, kterou drozofily ujdou za interval, který trvá 500 milisekund (měřeno v pixelech), střední kvadratickou odchylku (v angličtině mean square difference, MSD), která indikuje velikost rozdílu v pixelech mezi jednotlivými video snímky a polohou jednotlivých much v XY souřadnicích pro každý videosnímek.



Obr. 6 – Aspirátor.

3.6 Použité drozofilí linie

V tabulce 2 jsou uvedeny linie, které byly použity pro první experimenty a optimalizaci testovacího programu a následné analýzy. V prvním sloupečku je uveden interní číselný kód. Podrobnější popis je udán ve sloupečku číslo 2. Sloupec původ udává místo vzniku linie. Linie pro mou bakalářskou práci pocházejí z VDCR a z university v Indianě v USA Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, <https://bdsc.indiana.edu/>, April 8, 2023). V posledním sloupečku je celý genotyp dané linie.

Číslo	Popis	Původ	Genotyp
9311	kontrola	VDCR	w^+
2056	kontrola, společný genetický základ pro linie z VDRC (Vienna Drosophila Stock Center, stockcenter.vdrc.at)	VDCR	$y,w[1118];P\{attP,y[+],w[3']\}$
2055	kontrola, společný genetický základ pro linie z VDRC (Vienna Drosophila Stock Center, stockcenter.vdrc.at)	VDCR	w^{1118}
1498	kontrola, společný genetický základ pro linie z TriP (Transgenic RNAi Project, www.flyrnai.org)	BL-36303	$y[1] \ v[1] ; P\{y[+t7.7]=CaryP\}attP2$
1499	kontrola, společný genetický základ pro linie z TriP (Transgenic RNAi Project, www.flyrnai.org)	BL-36303	$y[1] \ v[1] ; P\{y[+t7.7]=CaryP\}attP40$

Tab. 2 - Linie použité pro testování Zantiks přístroje a pro optimalizaci analýzy skokové odpovědi.

V tabulce 3 jsou uvedeny RNAi linie, které byly použity pro experimenty s UAS-Gal4 systémem. Tabulka 3 obsahuje kromě čísla linie a popisu i název genu drozofily i lidského ortologu (disease genu). Samice panny, pocházely z linie číslo 9459. Ty nesly Gal4 protein v tukovém tělese (tuková tkáň drozofily, FB-Gal4) a byly kříženy se samci s odlišnými UAS-RNAi (obsahují sekvenci kódující dvouvláknovou RNA pro snížení exprese genu oproti kontrole) a UAS-OE (overexprese, obsahují kódující sekvenci pro zvýšení exprese genu oproti kontrole) liniemi, které jsou uvedeny v tabulce 3. Linie pro overexpresi jsou linie 9260 (ta obsahuje za UAS kódující sekvenci pro gen *csw*, jehož exprese se zvětšuje) a linie 9252 (ta za UAS obsahuje kódující sekvenci pro *Ras1* s mutací, která zvyšuje jeho aktivitu a vede ke zvýšení exprese aktivované formy *Ras1*). Vytvoření overexprese bylo použito u vytipovaných genů, které jsou spojovány i s obezitou či chronickými infekcemi a jejich aktivita je neustálá. Vytvoření knockdownů (mutanti se sníženou expresí genů) bylo použito u vytipovaných genů, jejichž aktivita se náhle zvyšovala pouze během infekce, jinak byla normální. Pro můj experiment jsem jejich funkci zabránila úplně. Zbytek pojmenování sloupců zůstává stejný jako pro tabulku č.2.

Číslo	Popis	Původ	Název genu drozofily	Název lidského ortologu	Genotyp
2055	Kontrola	VDRC	N/A	N/A	<i>w¹¹¹⁸</i>
9459	FB-Gal4	VDRC	N/A	N/A	<i>w*</i> ; <i>FB-Gal4</i> ; <i>2xGMR-wIR-1/3-172/1</i>
9068	kontrola	VDRC	N/A	N/A	<i>w-</i> ; <i>GMR-wIR-3/2-25/1</i> ; <i>elav-Gal4</i> , <i>UAS-Dicer2-6</i>
1670	UAS- RNAi	VDRC	<i>G9a</i>	<i>EHMT1</i>	<i>w1118</i> ; ; <i>vdrc 25474</i>
6155	UAS- RNAi	VDRC	<i>Nf1</i>	<i>NF1</i>	<i>w1118</i> ; ; <i>vdrc35877/Sb,Tb</i>
9252	UAS-OE	VDRC 9194	<i>Ras85D</i>	<i>KRAS&HRAS</i>	<i>w1118</i> ; <i>UAS-Ras1-R68Q</i> ;
9260	UAS-OE	VDRC	<i>csw</i>	<i>PTPN11</i>	<i>P{w[+mC]=UAS-csw.WT}CIM</i> , <i>w1118</i>
9405	UAS- RNAi	VDRC	<i>CG14882</i>	<i>MTRR</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD8474}v38838</i>
9419	UAS- RNAi	VDRC	<i>Gk1</i>	<i>GK</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD9566}v52478</i>
9421	UAS- RNAi	VDRC	<i>Gale</i>	<i>GALE</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD7464}v47408</i>
9424	UAS- RNAi	VDRC	<i>Cbs</i>	<i>CBS</i>	<i>w1118 P{GD9407}v32946</i>
9429	UAS- RNAi	VDRC	<i>PEK</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD5584}v16427</i>
9431	UAS- RNAi	VDRC	<i>CG14882</i>	<i>MTRR</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD9500}v20580</i>
9435	UAS- RNAi	VDRC	<i>scu</i>	<i>HSD17B10</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD1528}v37083</i>
9441	UAS- RNAi	VDRC	<i>CG6287</i>	<i>PHGDH</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{GD11878}v40358</i>

Tab. 3 - Linie experimentů.

4.Výsledky

4.1 Optimalizace měření Zantiks systému

4.1.1 První měření časové prodlevy mezi impulsy u částí „pulse“ a „habituation“

Mým prvním úkolem bylo ověřit, zda interval mezi light-off stimuly u části „pulse“ odpovídá intervalu 5 sekund a u části „habituation“ intervalu 1 sekunda. Pracovala jsem s datasety, které vytvořil přístroj Zantiks podle skriptu, kde bylo zadáno jako interval 5 sekund, případně 1 sekunda. Dataset obsahuje časový údaj, který udává (v sekundách) v jaký čas experimentu proběhl stimulus light-off. Abych zjistila, jaký čas uplynul mezi stimuly, vytvořila jsem si sloupeček ITI- „inter trial interval“. V ITI sloupci jsou vypočítány časové intervaly mezi impulsy. Toho se docílí odečtením mezi dvěma časovými údaji a to tak, že od daného časového impulsu se odečte předchozí. To jsem udělala u všech datasetů měřených kontrolních linií a u všech jednotlivě jsem z těchto hodnot vypočítala medián pro „pulse“ i „habituation“. Hodnoty vypočítaných mediánů jsou uvedeny v tabulce 4.

Linie	Medián pulse	Medián habituation
1498-1	7,509	1,007
1498-2	7,514	1,007
2055-1	7,509	1,005
2055-2	7,509	1,005
2056-1	7,508	1,005
2056-2	7,51	1,005
9311-1	7,51	1,005
9311-2	7,509	1,004
1499-1	7,509	1,509

Tab. 4 - Linie a jejich změřený medián pro interval mezi stimuly při „pulse“ a „habituation“.

U měření habituace byla prodleva mezi intervaly přijatelná. Kromě jednoho experimentu (1499-1), kde byla hodnota vyšší, se jinde pohybovala o 4-5 tisícín sekundy nad limitem 1 sekundy. U měření intervalu mezi „pulse“ byla hodnota mezi impulsy light-off moc velká,

pohybovala se až okolo hodnoty 7,5 sekund. Tento interval nevyhovoval postupu měření a muselo se proto změnit zadání ve skriptu v systému Zantiks.

4.1.2 Druhé měření po přenastavení skriptu v systému Zantiks

Provedená změna ve skriptu se týkala nastavení časového intervalu mezi impulsy. Tento experiment byl otestován na prázdných destičkách bez drozofil, protože cílem bylo pouze technické ověření přenastavení intervalu. Při prvním měření se interval ve skriptu snížil o 1 setinu sekundy. Poté se provedlo druhé měření, kde se interval ve skriptu snížil o 5 setin sekundy. Získala jsem 2 datasety. Každý dataset obsahoval všechny 3 části experimentu. V obou datasetech jsem opět pomocí ITI vypočítala časový interval mezi jednotlivými impulsy light-off a vypočítala jejich medián, jak je uvedeno v tabulce 5.

Snížení intervalu	Medián pulse	Medián habituation	Medián fatigue
0,01 sekundy	4.983	0.994	4.999
0,05 sekund	4.999	1	5

Tab. 5 - Porovnání dvou možností snížení časového intervalu.

Podle tabulky 5 je vidět, že obě měření jsou velmi blízko požadovaným časovým intervalům a to ve všech částech experimentu. Jako přesnější se ukázalo snížení o 5 setin sekundy, které pro „fatigue“ a „habituation“ vykazuje přesně požadované hodnoty. U „pulse“ není hodnota přesná, ale prodlení je minimální. Proto jsem se rozhodla pro měření dalších experimentů používat skript se snížením intervalu o 0,05 sekund.

4.1.3 Nastavení kritérií pro vyhodnocování pomocí porovnání manuálního a automatického měření

Hlavním cílem bylo vymezení kritérií, jak rozeznat skokovou odpověď v experimentu a vytvořit zápis výsledků v jednodušší formě, aby výchozí informace odpovídala pouze jedné ze dvou možností, a to, jestli drozofila skočila či neskočila.

Pro optimalizaci se použily drozofilí linie, o kterých se vědělo, že na light-off stimulus zareagují skokovou odpovědí. Během experimentu se automaticky vytvořil data set, který

zaznamenával vzdálenost (v pixelech), kterou každá jednotlivá drozofila urazila během 0,5 s před stimulem a během 0,5 s po stimulu (včetně 15 ms stimulu). Nevytvářel se tedy přímo výsledek, který by jasně znamenal skok nebo to, že drozofila nevyskočila. Mým úkolem bylo vypočítat rozdíl mezi vzdáleností uraženou po stimulu a vzdáleností uraženou před stimulem. Zároveň přístroj Zantiks z experimentu pořídil i video. Mým úkolem bylo video zhlédnout a zapsat si, kdy drozofila skočila. Pro každou z 24 pozorovaných drozofil jsem pro každý stimulus uvedla zda skočila či ne (obrázek 7).

A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	C1	C2	C3	C4	C5	C6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Obr. 7 – Zápisová tabulka manuálního zapsání skoků/neskoků.

Tyto výsledky jsem přepsala do počítače do excelové tabulky. Skoky jsem zaznamenala jako 1. Stimuly bez skokové odpovědi byly označeny 0. Totéž jsem chtěla získat i z vypočtených rozdílů vzdáleností. Vytvořila jsem kritéria, jak převést délkové hodnoty do zápisu 1 a 0, a to tak, aby 1 odpovídala skoku a 0 žádné reakci na stimulus.

4.1.4 Kritérium Treshold

Jako první jsem vytvořila kritérium Treshold. Toto kritérium vychází z rozdílu uražená vzdálenost po stimulu mínus uražená vzdálenost před stimulem. Pokud se kritérium nastaví na Treshold 0, znamená to, že pokud rozdíl vzdáleností bude 0, drozofila se po stimulu hýbe úplně stejně jako před ním. Předpokládáme tedy, že nevyskočila. Pokud bude větší než 0, znamená to, že se drozofila po stimulu přesune, tedy vyskočí a zaznamená se skok. Pokud se kritérium nastaví na treshold 3, pouze rozdíly vzdáleností větší než 3 budou označeny jako skok, a vzdálenosti menší než 3 jakože drozofila nevyskočila.

Toto kritérium jsem použila na konkrétní dataset. Ten obsahoval 1200 light-off jump stimulů. Z toho jsem po zhlédnutí videí vypožorovala 1086 skoků a 114 reakcí bez odezvy. Mezi mnou zapsanými hodnotami a hodnotami vygenerovaných ze Zantiks systému byly rozdíly v počtu skoků. Systém některé skoky nerozpoznal (promeškaný skok) a někdy zapsal skok, který se

nestal (falešný skok). V aplikaci excel jsem můj zápis porovnávala pro obě kritéria. Rozdíly špatně vyhodnocených skoků jsou uvedeny v tabulce 6.

	Rozdíl celkem	Falešný skok	Promeškaný skok
Threshold 0	48	17	31
Threshold 3	174	4	170

Tab. 6- Rozdíly ve vyhodnocování skoků mezi manuálním a automatickým vyhodnocením.

Oba rozdíly jsou dost velké. I když výrazně menší rozdíl se generuje u kritéria threshold 0. Celkově udělá méně chyb a oproti threshold 3 mnohem lépe rozpoznává skoky. Při kritériu threshold 3 se sice vytvořily pouze 4 falešné skoky, což je mnohem menší číslo než u použití kritéria threshold 0 se 17 falešnými skoky. Nicméně, množství pomeškaných skoků bylo velké (170 oproti 31 při threshold 0). Pro větší přesnost jsem přidala další kritérium.

4.1.5 Kritérium MSD

Druhým kritériem je MSD, „Mean Square Difference“. Pokud je $MSD > 0$, drozofila se v daném intervalu oproti předchozímu intervalu pohnula celým tělem. Pohyb pouze křídly nebo končetinami vykazuje hodnotu 0, takže parametr větší než 0 nebude splněn. Tabulka 7 udává, jaký byl rozdíl ve vyhodnocených skocích pro $MSD > 0$.

	Rozdíl celkem	Falešný skok	Promeškaný skok
MSD>0	106	102	4

Tab. 7 - Rozdíly ve vyhodnocování skoků mezi manuálním a automatickým vyhodnocením.

Samotné MSD také tvořilo velký rozdíl v celkovém porovnání. Při tomto kritériu jsou velmi dobře rozpoznávány skoky. Systém nepoznal pouze 4, ale zaznamenal větší množství falešných skoků (102).

4.1.6 Kombinace kritérií

Abych docílila jak malého čísla u falešných skoků tak u promeškaných skoků, obě kritéria jsem zkombinovala. Výsledky kombinace jsou v tabulce 8.

	Rozdíl celkem	Falešný skok	Promeškaný skok
Threshold 0 + MSD >0	4	0	4
Threshold 3 + MSD >0	181	7	174

Tab. 8 - Rozdíly ve vyhodnocování skoků mezi manuálním a automatickým vyhodnocením.

Threshold 3 + MSD>0 generuje pořád rozdíl větší než 100, což je pro měření nevyhovující. U kombinace threshold 0 + MSD>0 se velmi dobře podařilo snížit celkový rozdíl. Celkový rozdíl je jenom 4. V tomto případě dochází k velmi nízkému číslu při promeškání skoků. Navíc, kombinace těchto dvou kritérií ani nevede k vytvoření falešných skoků. Přidání kritéria MSD tedy vedlo ke snížení chybovosti.

Kritérium threshold 0 + MSD>0 se prověřilo ještě na jednom datasetu, kde drozofily moc nereagovaly na light-off stimuly. Tyto drozofily byly otestovány proto, aby se prověřila chybovost vytváření falešných skoků. U hůře reagujících drozofil je větší šance pro generování falešných skoků. To se v tomto datasetu, který je v tabulce 9, stalo.

	Rozdíl celkem	Falešný skok	Promeškaný skok
Threshold 0 + MSD >0	43	30	13

Tab. 9 - Rozdíly ve vyhodnocování skoků mezi manuálním a automatickým vyhodnocením.

Při druhém použití kritéria threshold 0 + MSD >0 se ukázalo, že generování falešných skoků je pořád veliké. Podařilo se ale snížit číslo pro promeškané skoky oproti měření pouze s kritériem threshold 0. Přidané kritérium MSD snižuje hodnoty špatně rozeznávaných skoků, ale musí se upravit.

Nově nastavené kritérium je $\text{threshold } 0 + \text{MSD} > 1$. Použilo se na dataset, kde opět bylo 1200 light- off stimulů. Manuálním vyhodnocením jsem změřila 355 skoků a 845 reakcí bez pohybu. Kritérium $\text{threshold } 0 + \text{MSD} > 1$ je zobrazeno v tabulce 10.

	Rozdíl celkem	Falešný skok	Promeškaný skok
Threshold $0 + \text{MSD} > 1$	19	6	13

Tab. 10 - Rozdíly ve vyhodnocování skoků mezi manuálním a automatickým vyhodnocením.

Threshold $0 + \text{MSD} > 1$ se zdá jako nejlepší kritérium. Umí rozpoznat oba typy chyb a zároveň generuje velmi nízké číslo chybovosti. Z 1200 stimulů vyhodnotí správně 98,42 %. Více chyb udělá při pomeškání skoků, než že by vytvořil neexistující skok. Toto kritérium jsem se rozhodla používat při vyhodnocování experimentů.

4.2 Drozofily pro testování habituace po manipulaci genů v tukovém tělese

V této části jsem zkřížila a následně testovala samostatné experimentální drozofily. Aby se mohly otestovat drozofily se sníženou či zvýšenou expresí vybraných genů (tabulka 3), musely se nejdříve vytvořit křížením samic, pocházejících z linie 9459 (exprimuje *Gal4* v tukovém tělese, *FB-Gal4*) a samců pocházejících z UAS linií (UAS-RNAi/UAS-OE). Výsledný genotyp těchto drozofil je v tabulce 11. Potenciální potomky křížení, které jsem chtěla otestovat, jsem označila kódy 13zbk-73zbk. Ne všechny linie se ale povedlo zkřížit a otestovat, proto některé číselné kódy chybí (pokud je v tabulce 11 prázdné místo, tak otestování tohoto konkrétního kódu neproběhlo). Otestované kódy s genotypem jsou zobrazeny v následující tabulce 11. Celkem mělo být provedeno 16 experimentů. Všechny experimenty byly zopakovány 4x, ve 4 dnech. Kontroly se měřily každý den. Pro každé 1 měření v každém dni byl použit jiný kód. Proto pro drozofily se stejným genotypem je uvedeno označení více kódy, protože měření každého kódu probíhalo v jiný den.

Přidělený kód				Název manipulce	Vzniklý genotyp
Den 1.	Den 2.	Den 3.	Den 4.		
13zbn	29zbn	44zbn	59zbn	FB-kontrola	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/+; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
14zbn	30zbn	45zbn		FB-kontrola	<i>w[*]/w[*]; FB-Gal4/+; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
15zbn	31zbn		61zbn	FB- G9a ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/+; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/ vdr25474</i>
16zbn	32zbn	47zbn	62zbn	FB- Nf1 ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/+; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/ vdr25877</i>
				FB- Ras85D- R68Q ^{OE}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/ UAS-Ras1-R68Q; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
18zbn	34zbn	49zbn	64zbn	FB- csw ^{OE}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/P{w[+mC]=UAS-csw.WT}CIM; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
19zbn	35zbn	50zbn	65zbn	FB- CG14882 ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/P{GD8474}v38838; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
20zbn	36zbn	51zbn	66zbn	FB- Gyk ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/ P{GD9566}v52478; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
		52zbn	67zbn	FB- Gale ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/P{GD7464}v47408; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
		53zbn		FB- Cbs ^{RNAi}	<i>w[*]/w1118 P{GD9407}v32946; FB-Gal4/+; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
23zbn	39zbn	54zbn	69zbn	FB- PEK ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/ P{GD5584}v16427, 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
24zbn	40zbn	55zbn	70zbn	FB- Alg1 ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/P{GD9500}v20580 ; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
25zbn	41zbn	56zbn	71zbn	FB- scu ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/ P{GD1528}v37083; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
				FB- CG6287 ^{RNAi}	<i>w[*]/Y; FB-Gal4/ P{GD11878}v40358; 2xGMR-wIR-1/3-172/1/+</i>
27zbn	42zbn	57zbn	72zbn	elav-kontrola	<i>w-/Y; GMR-wIR-3/2-25/1/+; elav-Gal4, UAS-Dicer2-6/+</i>
28zbn	43zbn	58zbn	73zbn	elav- Nf1 ^{RNAi}	<i>w-/Y; GMR-wIR-3/2-25/1/+; elav-Gal4, UAS-Dicer2-6/w1118/ vdr25877</i>

Tab. 11 - Otestované kódy s genotypem.

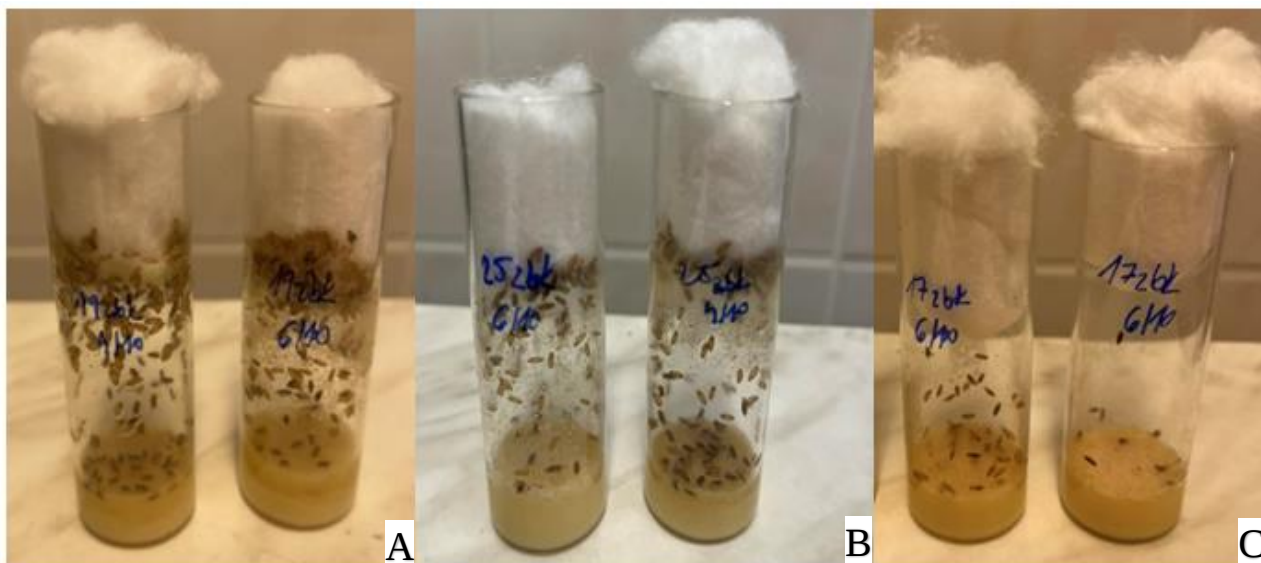
Pro testování se vybírali samci. Výjimkou je křížení z linie 9424, ze kterého vznikly kódy 22zbn, 38zbn, 53zbn a 68zbn. Zde se měří habituace samic, protože UAS inserce se nachází na chromozomu X. Aby se experimentální drozofily měly s čím porovnávat, tak se pro každý den měřily i kontrolní drozofily pocházející z křížení mezi 9459 (FB-Gal4) a 2055 (w^{*}), což

je linie, do které byly všechny UAS inzerce integrovány anebo zpětně prokříženy tak, aby měly stejné genetické pozadí, jako tato kontrolní linie (Fenckova et al., 2019). Kódy kontrol pro samce jsou 13zbc, 29zbc, 44zbc, 59zbc. Kódy kontrol pro samice, které jsou potřeba jenom pro jedno experimentální měření, jsou 14zbc, 30zbc, 45zbc, 60zbc. Podmínky habituace u samců a samic jsou různé, proto potřebují každý svojí vlastní kontrolu, i když genotyp je stejný. U těchto kontrol by měla být pozorovatelná habituace. Kromě toho jsem ještě připravila drozofily pro další 2 experimenty, tzv. pozitivní kontroly. Jednalo se o RNAi genu *Nf1* indukovanou v neuronech pomocí neuronálního *elav-Gal4*. Tato pozitivní kontrola má defekt v habituaci, takže by habituace neměla probíhat (Fenckova et al., 2019). Její kódy jsou 28zbc, 43zbc, 58zbc, 73zbc. Pro porovnání habituace k tomuto experimentu jsem měla genetické kontroly s kódy 27zbc, 42zbc, 57zbc, 72zbc.

4.2.2 Viditelné defekty

Vícekrát během dne, jak se drozofily líhly z kukel, byli vybíráni samci nebo samice panny pro otestování habituace. Pro měření je potřeba minimálně 24 drozofil starých 3-6 dnů.

Už při výběru drozofil před testováním byly vidět rozdíly mezi kontrolami a vytvořenými experimentálními drozofily. Ve vialkách s kontrolami bylo hodně nakladeno a byl i nadbytek vylíhlých drozofil. U některých experimentálních drozofil bylo méně dospělců, menší počet kukel, a i vylíhnutí proběhlo později než u kontrolních much. Pro potomky křížení pro RNAi pro gen *CG6287* se experimentální drozofily vůbec nepodařilo namnožit. Podobně na tom byli i potomci pro overexpresi aktivované formy *Ras85D*, ze kterého sice vznikly kukly, ale dospělé drozofily se z nich nevylíhly. Z tohoto případu byla pořízena jedna z následujících fotografií (obrázek 8C). Pro porovnání jsou přidány i další vialky (obrázek 8A, obrázek 8B), ve kterých byl dostatek kukel a vylíhnutých drozofil.



Obr. 8 - Pořízené fotografie vialek s potomky křížení určené pro testování. A- kontrola 29zbk s nadbytek vylíhnutých drozofil. B- *FB-scu^{RNAi}* v kódu 25zbk s dostatečným počtem vylíhlých drozofil. C- *FB-Ras85D-R68Q^{OE}* s pozorovatelně špatným vývojem drozofil.

4.2.3 Analýza habituace

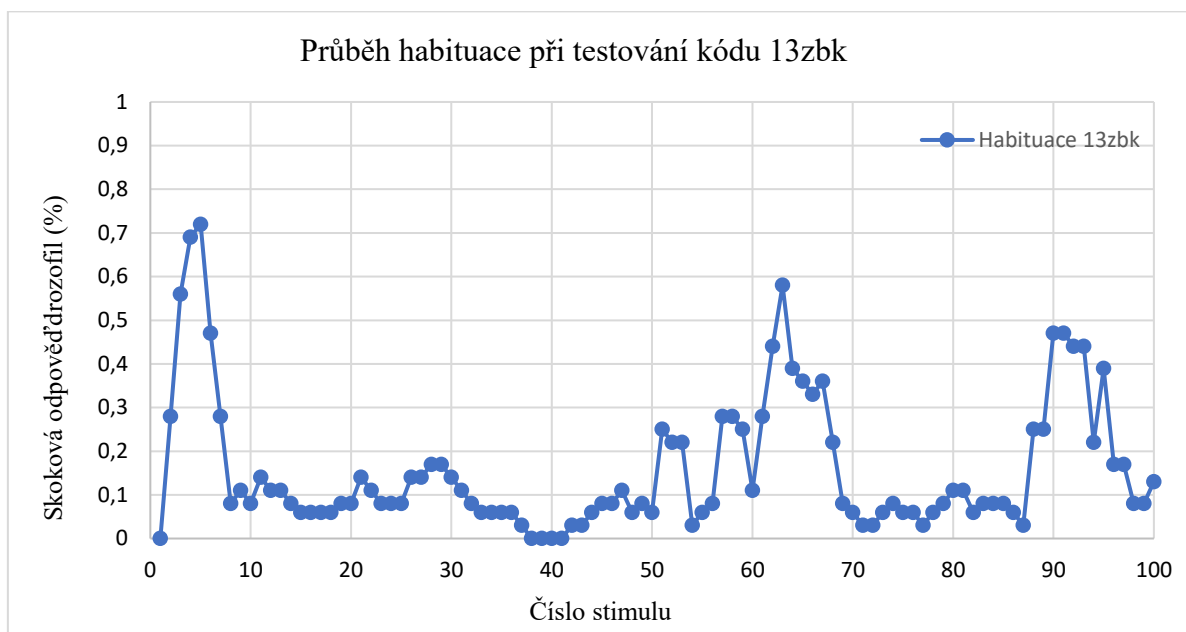
Potomky křížení z jednoho kódu jsem přendala do destičky a nechala je otestovat v přístroji Zantiks. V následujících kapitolách je popsán průběh měření pro každý den. Vždy jsou vyobrazené kontroly, a pokud to bude možné, tak i experimentálních drozofil. V případě, že nedostatečně odpovídaly na light-off stimuly, nebylo možné jejich výsledky vyhodnotit.

4.2.4 Analýza habituace den 1

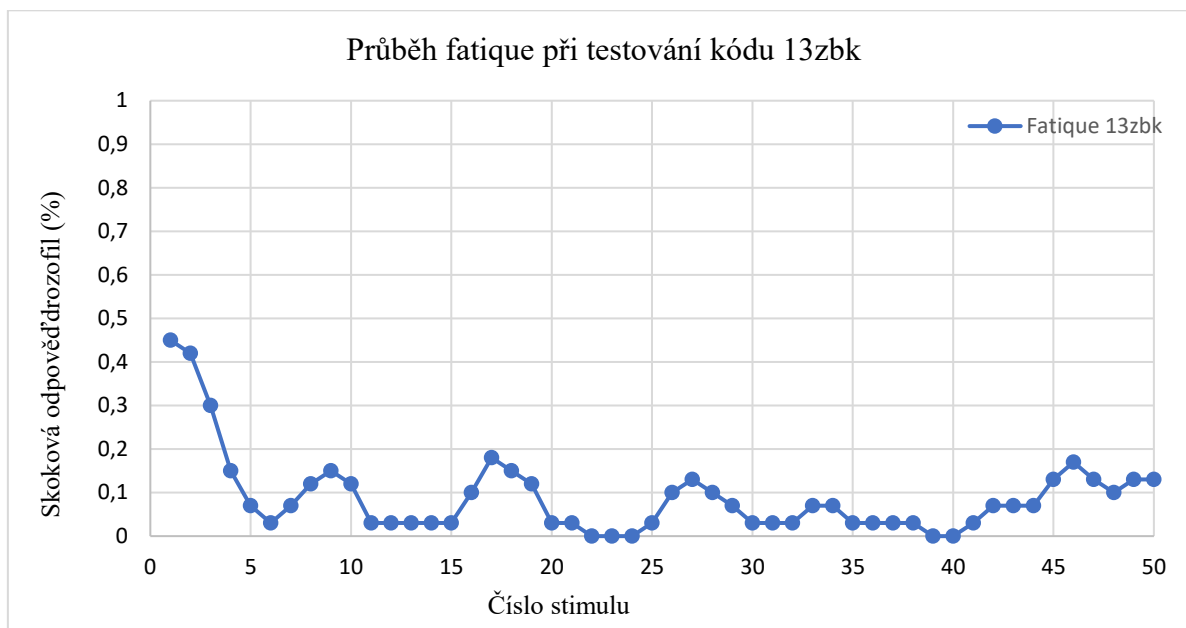
První testování habituace proběhlo v úterý 18.10.2022. Jako první se testovaly kontrolní drozofily 13zbk, 14zbk a 27zbk. V průběhu testování drozofily velmi málo reagovaly skokovou odpovědí na light-off stimuly. V komůrkách byly aktivní, poměrně hodně lezly, ale to byl jejich jediný pohyb. Kontroly musí splňovat podmínku, že během prvních pěti light-off stimulů v experimentu habituace, bude minimálně 50 % drozofil alespoň jednou odpovídat skokem na light-off stimuly, tedy budou označeni jako skokani. Počet skokanů z prvního dne testování je zapsán v tabulce 12.

Habituační	Počet skoků		Fatigue	Počet skoků
13zbc	7		13zbc	7
14zbc	9		14zbc	9
27zbc	11		27zbc	8

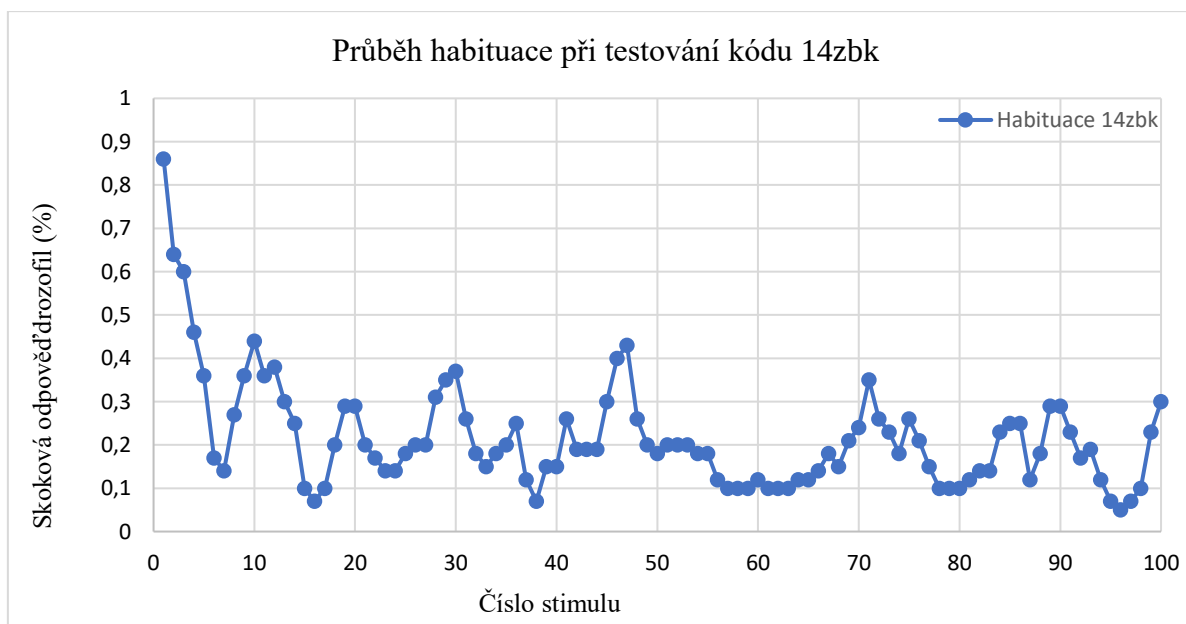
Tab. 12 - Počet skoků pro jednotlivé kontroly.



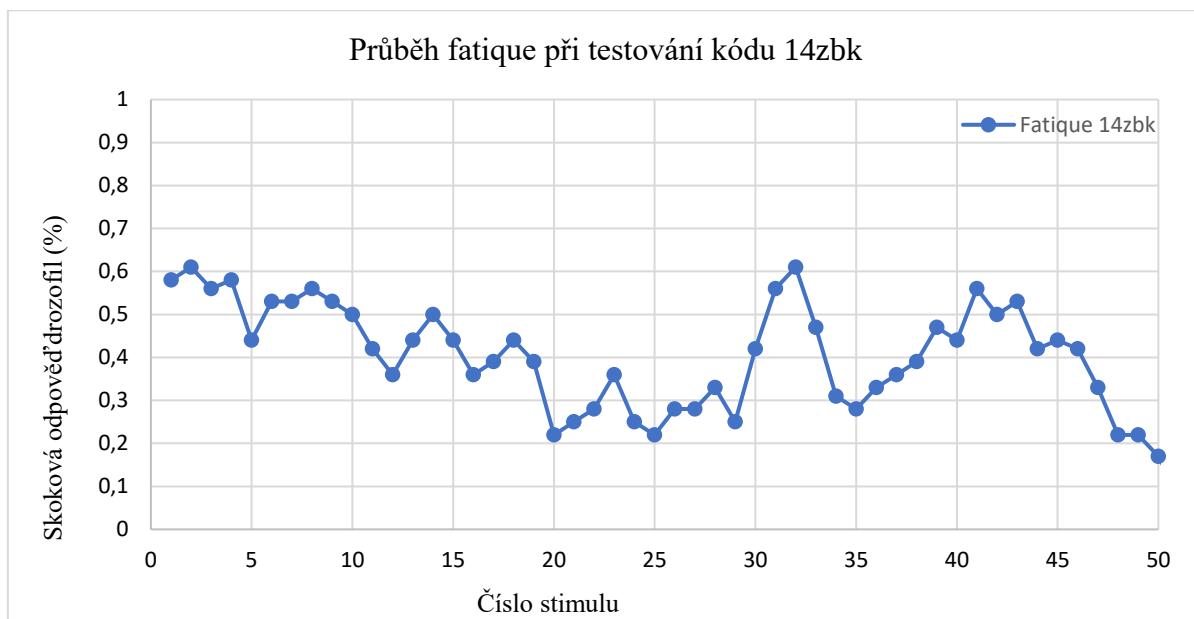
Obr. 9 – Průběh habituace kódu 13zbc. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 7 skoků. Hodnota TTC je 8,75, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 2,75.



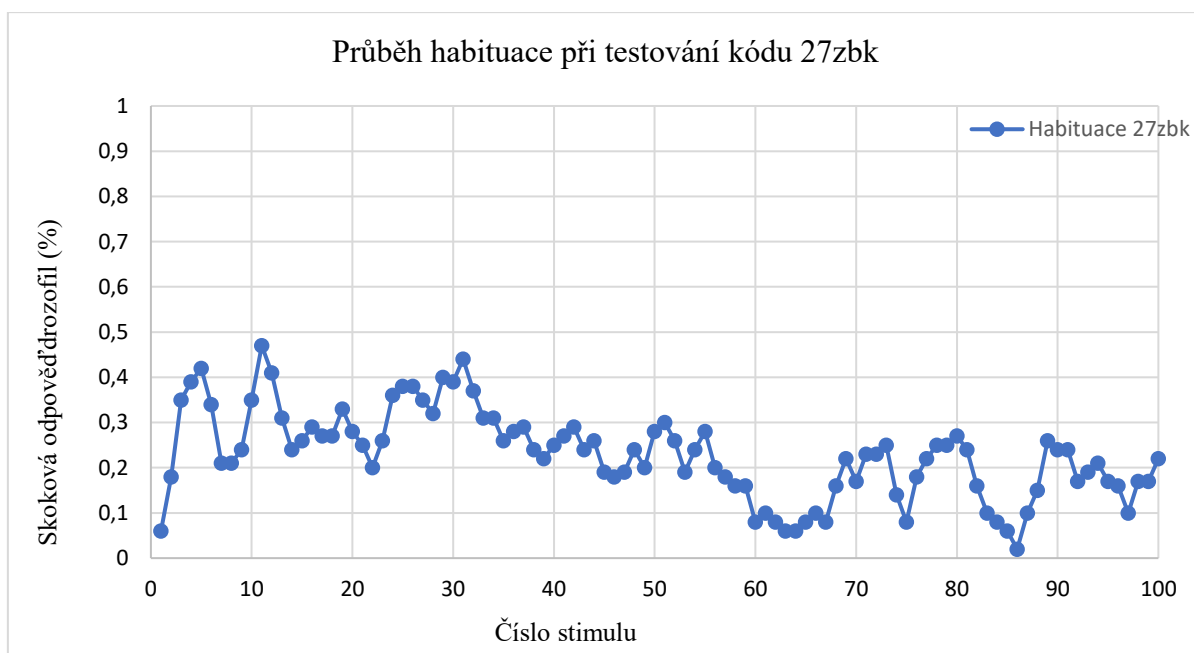
Obr. 10 - Průběh fatigue kódu 13zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 7 skokanů. Hodnota TTC je 3,05, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0,55.



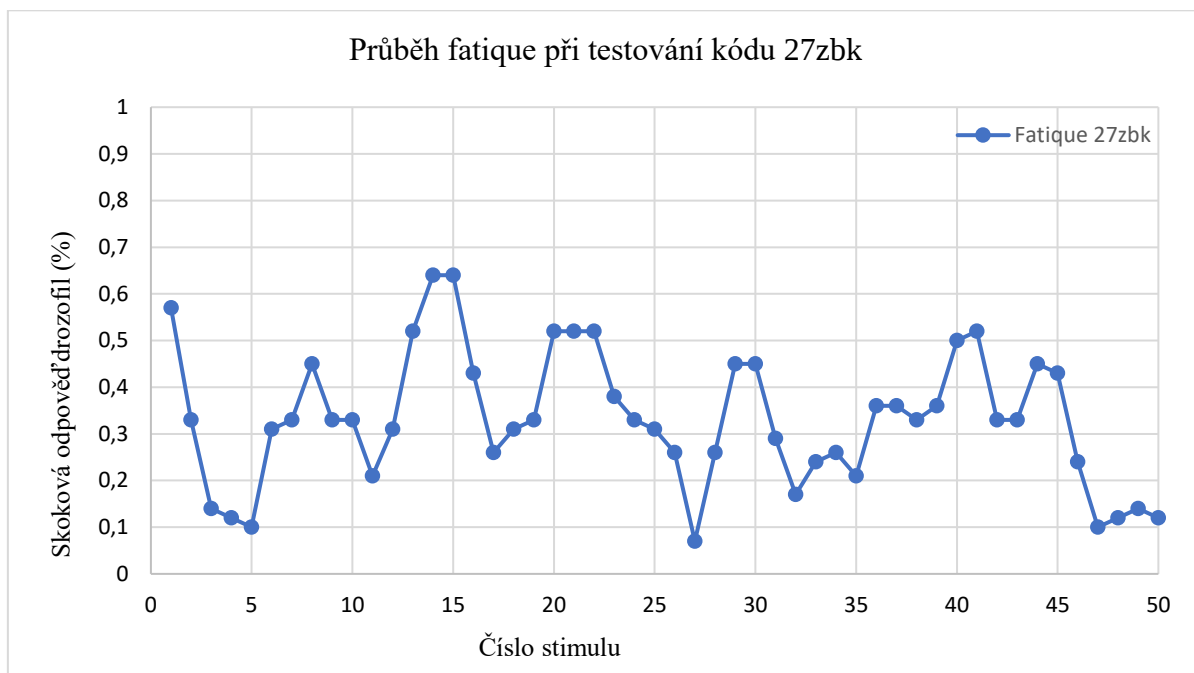
Obr. 11 - Průběh habituace kódu 14zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samic. Pro tento graf bylo 9 skokanů. Hodnota TTC je 15,32, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 6,82.



Obr. 12 - Průběh fatigue kódu 14zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samic. Pro tento graf bylo 9 skokanů. Hodnota TTC je 24,66, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 2.



Obr. 13- Průběh habituace kódu 27zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 11 skokanů. Hodnota TTC je 18,52, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 3,14.



Obr. 14- Průběh fatigue kódu 27zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 8 skokanů. Hodnota TTC je 9,07, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 8,07.

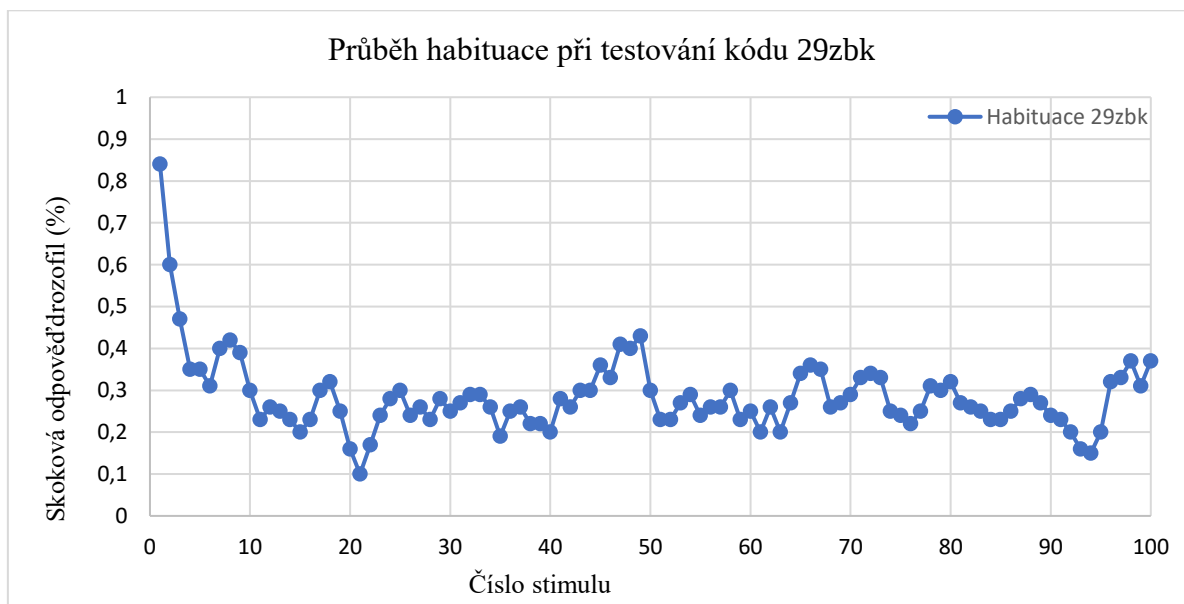
Procentuální hodnota skokových odpovědí jak u habituace tak u fatigue je ve všech kontrolních měřeních vždy menší než 50 % drozofil. To je nedostatečná skoková odpověď. Protože kontroly nesplňovaly základní podmínku, data experimentálních drozofil z tohoto dne se nevyhodnocovaly, protože k nim není porovnání.

4.2.5 Analýza habituace den 2

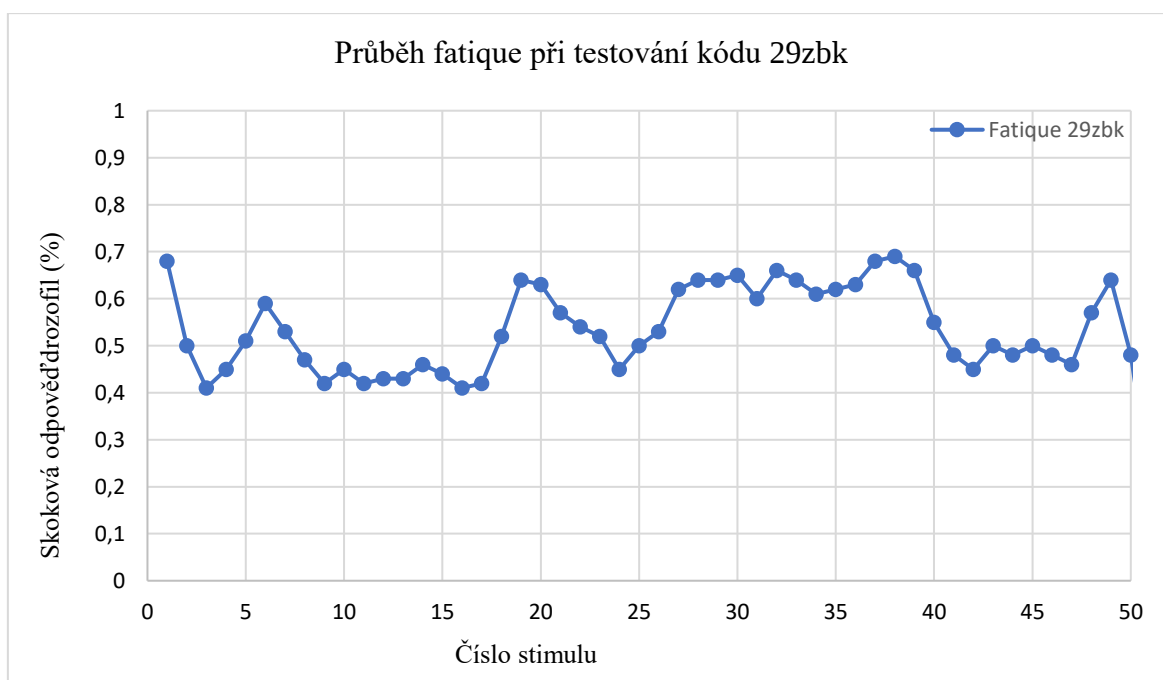
Druhý den testování probíhal ve středu 19.10.2022. Opět se nejdříve měřily kontrolní drozofily. Pro tyto dny šlo o kódy 29zbk, 30zbk a 42zbk. Jak drozofily reagovaly, je uvedeno v následující tabulce 13.

Habituace	Počet skokanů		Fatigue	Počet skokanů
29zbk	13		29zbk	17
30zbk	15		30zbk	14
42zbk	24		42zbk	24

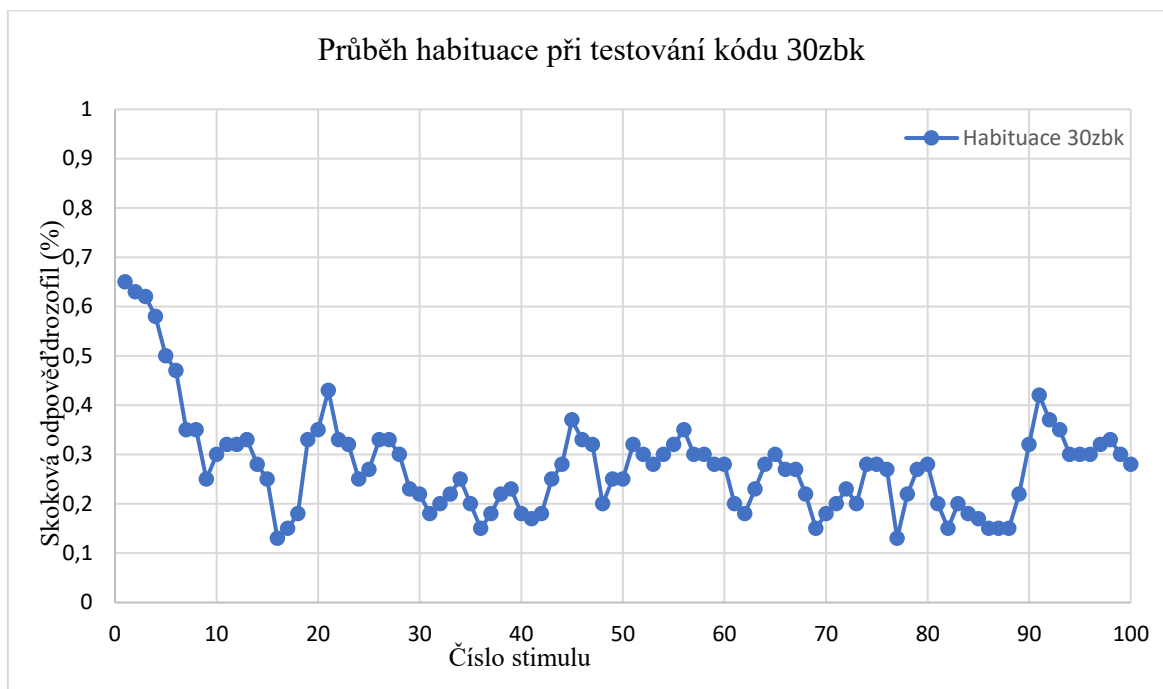
Tab. 13 - Počet skokanů pro jednotlivé kontroly.



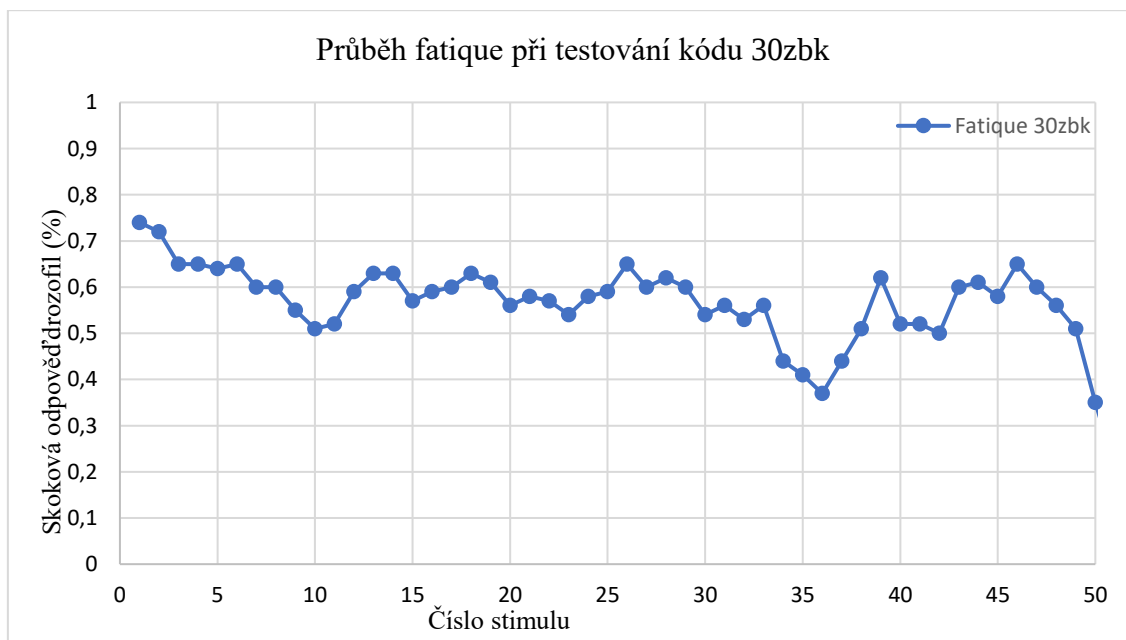
Obr. 15- Průběh habituace kódu 29zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 13 skokanů. Hodnota TTC je 11,65, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 3,15.



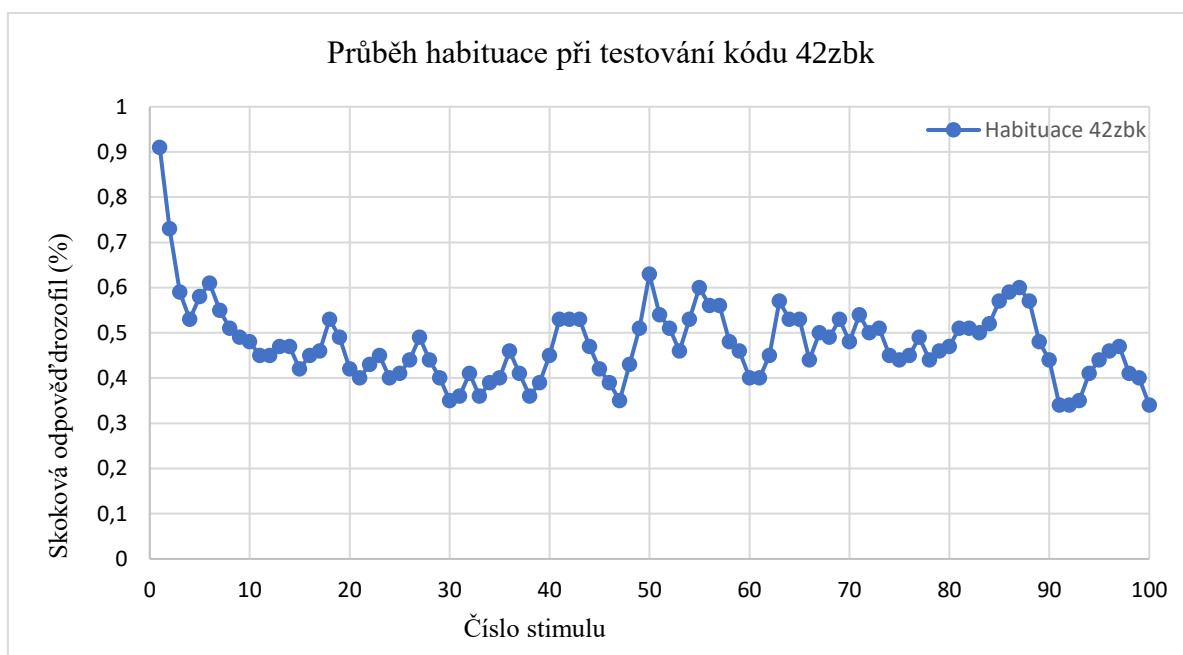
Obr. 16 - Průběh fatigue kódu 29zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 17 skokanů. Hodnota TTC je 24,65, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0,25.



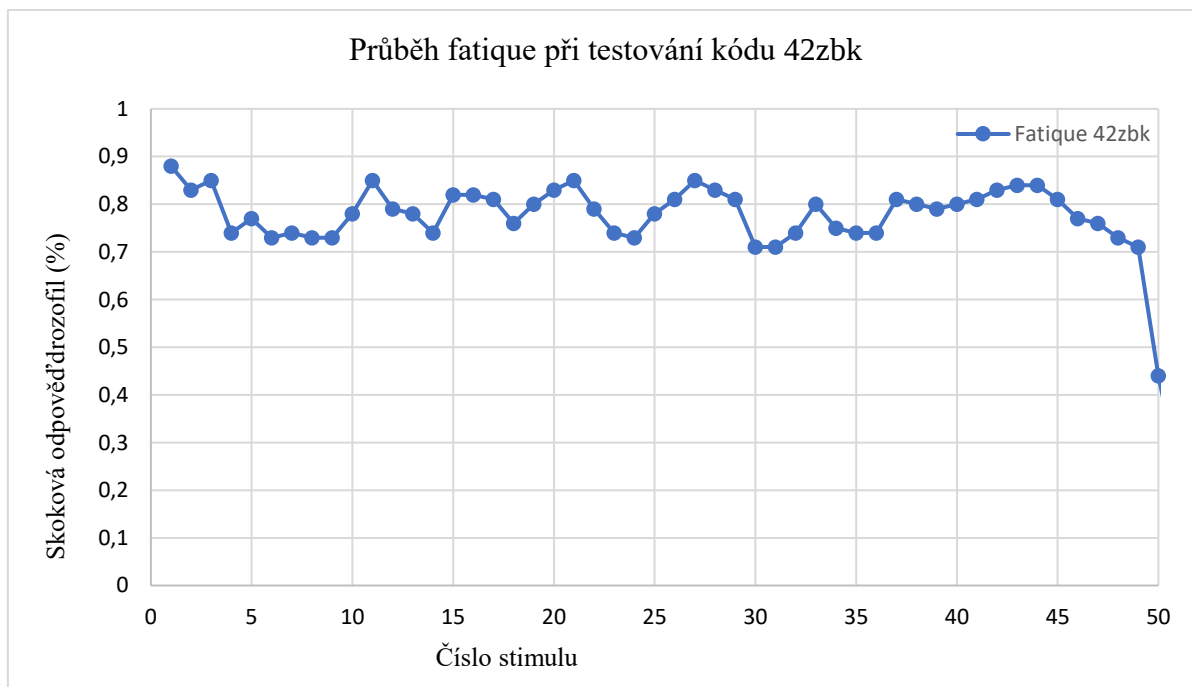
Obr. 17 - Průběh habituace kódu 30zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samic. Pro tento graf bylo 15 skokanů. Hodnota TTC je 18,75, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 8,95.



Obr. 18 - Průběh fatigue kódu 30zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samic. Pro tento graf bylo 14 skokanů. Hodnota TTC je 32,26, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0,06.



Obr. 19- Průběh habituace kódu 42zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 24 skokanů. Hodnota TTC je 42,53, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 6,28.



Obr. 20 - Průběh fatigue kódu 42zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 24 skokanů. Hodnota TTC je 50, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0.

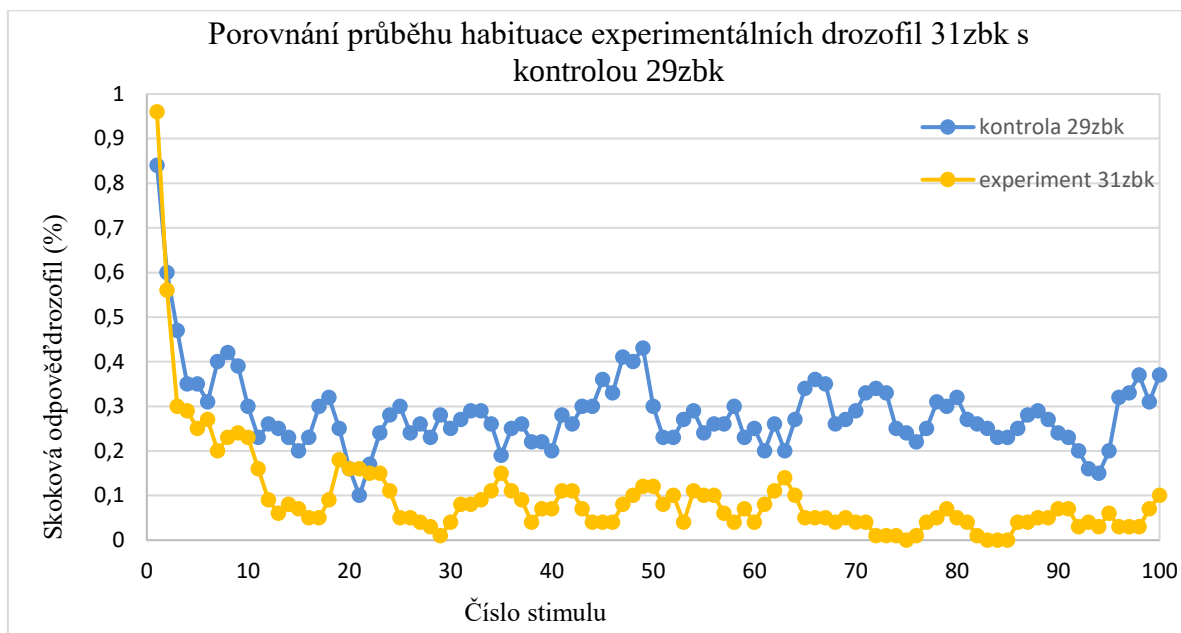
Pro kontrolní linie byla habituace nejlépe pozorovatelná u kódu 29zbk (TTC 11,65). Fatigue 29zbk (TTC 3,15) neprokázal předčasnou únavu, a tím potvrdil habituaci u kontroly 29zbk. U kontroly 30zbk (TTC 18,75) z grafu v habituační části je habituace o něco méně patrná než u kontroly 29zbk, ale k habituaci dochází, protože křivka grafu v průběhu měření klesla, a část fatigue (TTC 32,26) vyloučila únavu. U kódu 42zbk (TTC 42,53) se projevila habituace do menší míry. Jak pro fatigue (TTC 50), tak pro habituaci byly drozofily poměrně aktivní po celou dobu experimentu.

Po zanalyzování kontrol, které lze použít, se vyhodnotily experimentální linie. Otestováno bylo 9 kódů. Ty jsou uvedeny v tabulce č. 14.

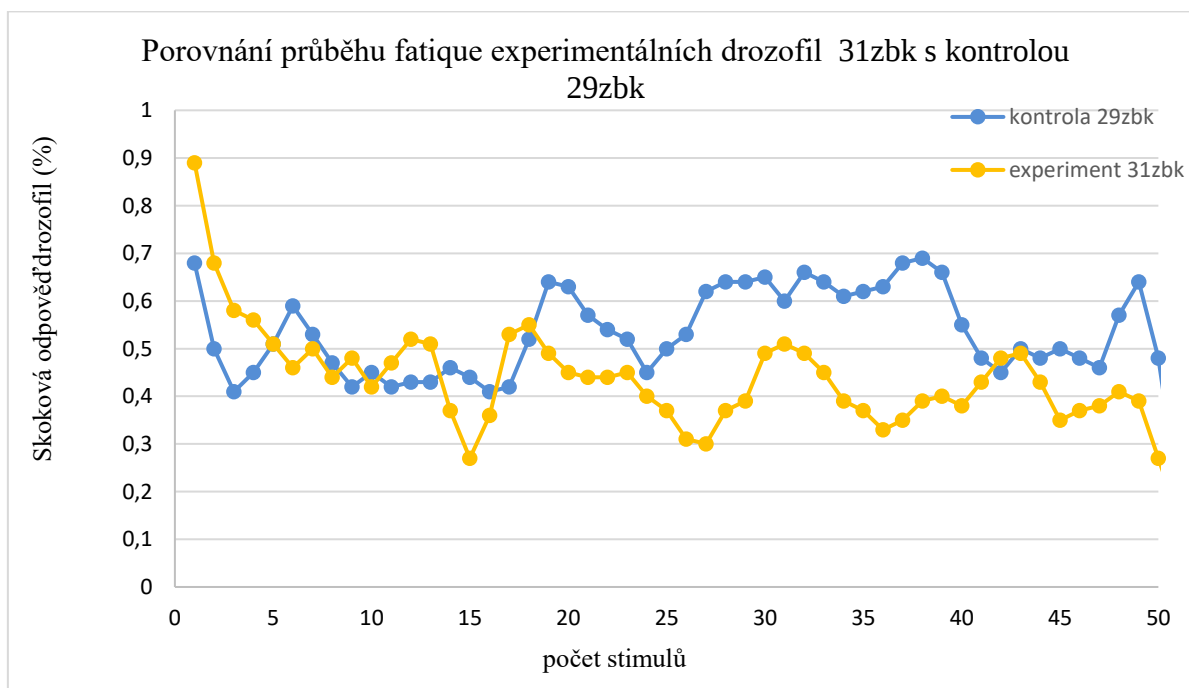
Kódy	Skokani/N	Počet skokanů při habituaci	Počet skokanů při fatigue
31zbk	0,791667	19	22
32zbk	0,583333	14	19
34zbk	0		
35zbk	0,083333		
36zbk	0,083333		
39zbk	0,041667		
40zbk	0		
41zbk	0,041667		
43zbk	0,75	18	19

Tab. 14 - Počet skokanů pro jednotlivé experimentální drozofily. U kódu, kde ve sloupci Skokani/N je číslo menší než 0,05 není počet skokanů v následujících sloupcích uveden.

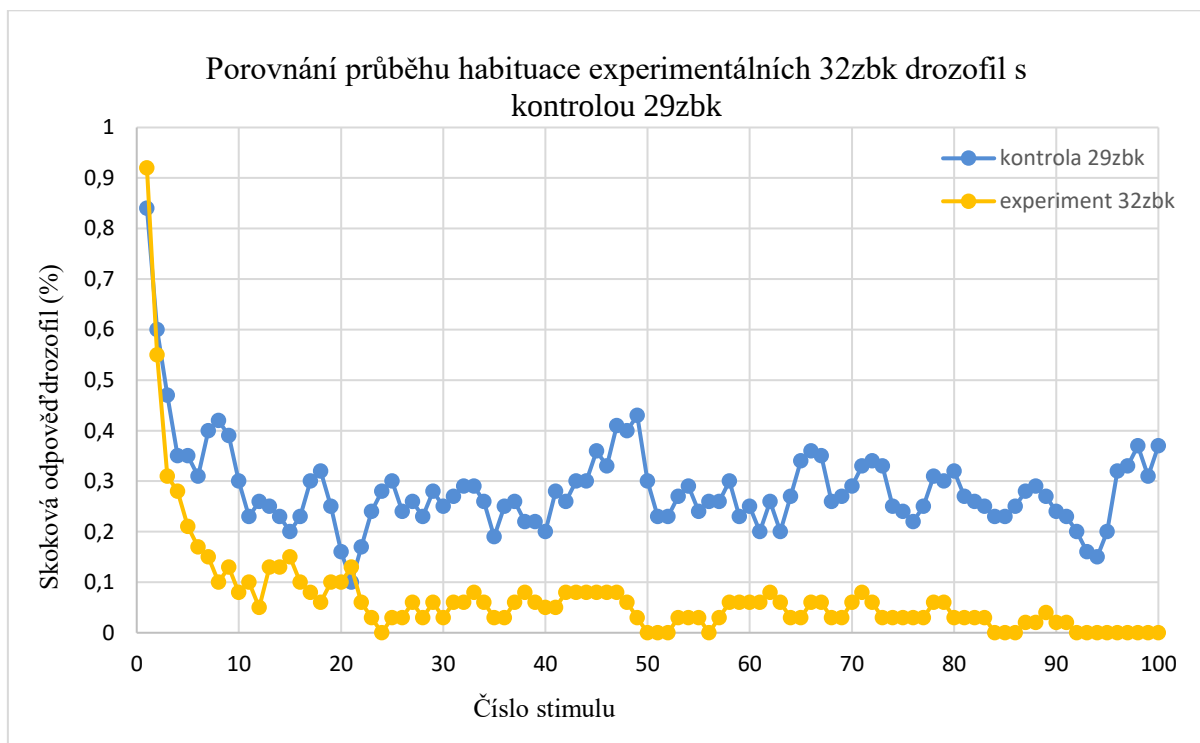
6 kódů z tabulky 14 vykazuje nedostatečnou skokovou odpověď. Nevytvořily se pro ně grafy, které by se porovnávaly s kontrolou. Následující grafy (obrázky 21- 26) jsou pouze pro 3 experimentální kódy 31zbk, 32zbk a 43zbk. Pro tyto kódy jsou v tabulce 14 uvedeny i počty skokanů v jednotlivých částech.



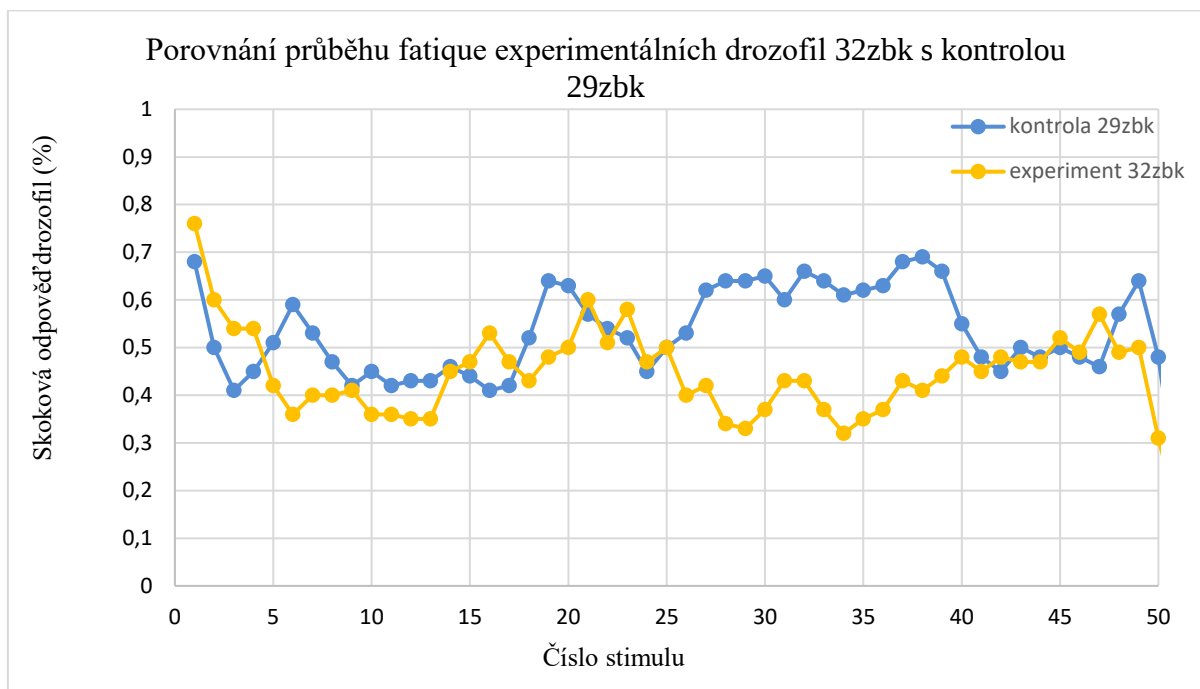
Obr. 21 - Průběh habituace kódu 31zbc. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Modrá křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Žlutá křivka zobrazuje jak se chovaly experimentální drozofily FB-G9a^{RNAi}. Pro tento graf bylo 19 skokanů. Hodnota TTC je 7,16, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0,83. P value 0,54.



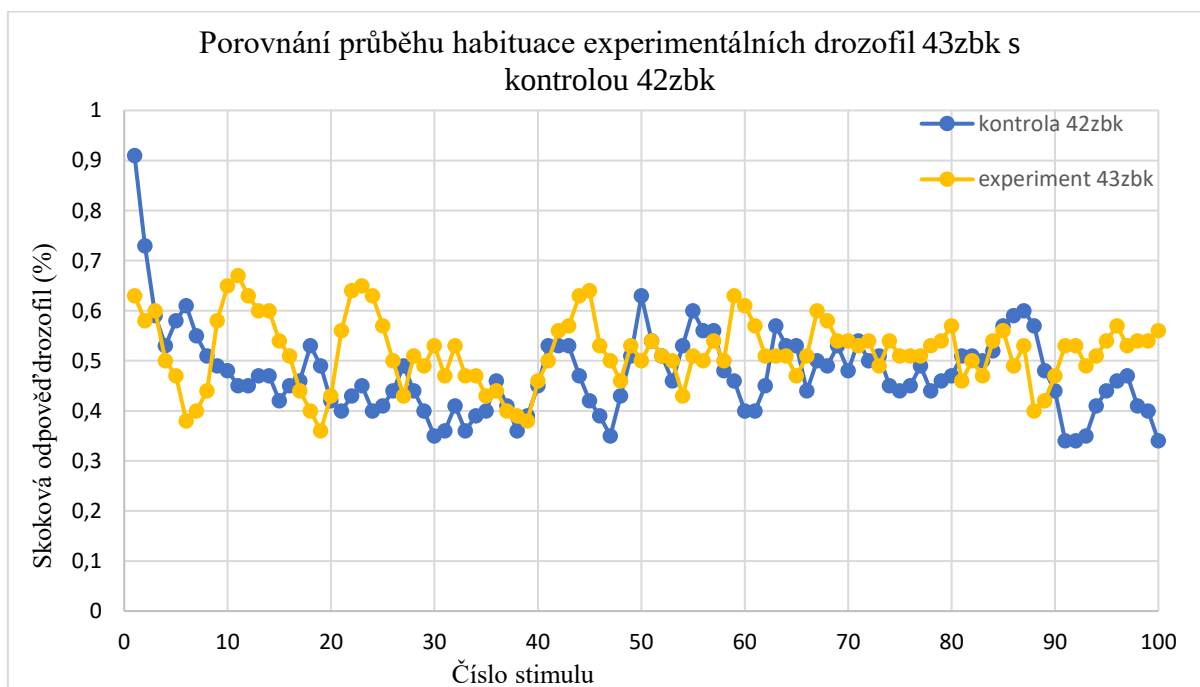
Obr. 22 - Průběh fatigue kódu 31zbc. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Modrá křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Žlutá křivka zobrazuje jak se chovaly experimentální drozofily FB-G9a^{RNAi}. Pro tento graf bylo 22 skokanů. Hodnota TTC je 27,51, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 1,26. P value 0,32.



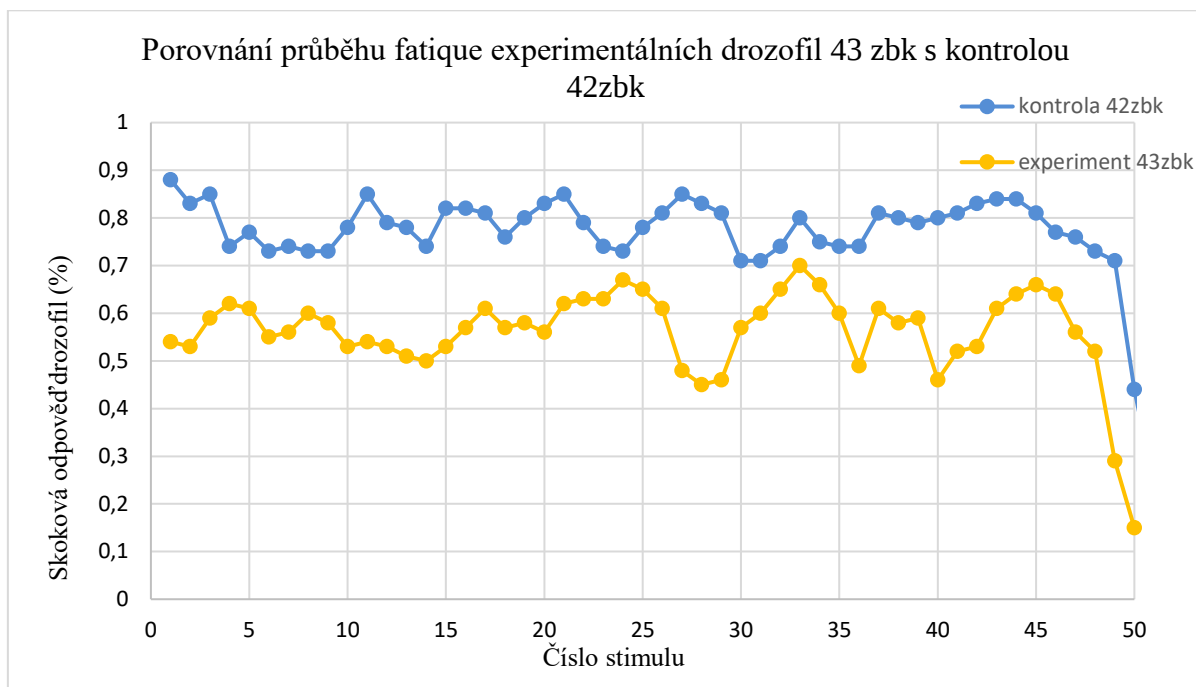
Obr. 23 - Průběh habituace kódu 32zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Modrá křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Žlutá křivka zobrazuje jak se chovaly experimentální drozofily FB-Nf1RNAi. Pro tento graf bylo 14 skokanů. Hodnota TTC je 4,87, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 1,12. P value 0,15.



Obr. 24 - Průběh fatigue kódu 32zbnk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Modrá křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samečů. Žlutá křivka zobrazuje jak se chovaly experimentální drozofily FB-Nf1RNAi. Pro tento graf bylo 19 skokanů. Hodnota TTC je 21,32, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 6,17. P value 0,91.



Obr. 25 - Průběh habituace kódu 43zbnk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Modrá křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samečů. Žlutá křivka zobrazuje jak se chovaly experimentální drozofily elav-Nf1^{RNAi}. Pro tento graf bylo 18 skokanů. Hodnota TTC je 57,12 s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 4,45. P value 0,8.



Obr. 26 - Průběh fatigue kódu 43zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Modrá křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních sameců. Žlutá křivka zobrazuje jak se chovaly experimentální drozofily *elav-Nf1^{RNAi}*. Pro tento graf bylo 19 skokanů. Hodnota TTC je 34,5, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 4,5. P value 0.

Ze druhého dne jsem měla kontroly, které měly skokovou odpověď vyšší než 50 % a šlo je porovnávat s experimentálními drozofilami. Kontroly 42zbk jak pro habituaci, tak pro fatigue vykazovaly skokovou odpověď 100 %. Kód 29zbk vykazoval skokovou odpověď pro habituaci 54 % a pro fatigue 70 %. Kód 30zbk vykazoval skokovou odpověď pro habituaci 62,5 %, pro fatigue 58 %. U experimentálních drozofil nebyla dostatečná skoková odpověď nad 50 % u 6 kódů (tabulka 14). Pro porovnání kontrol s experimentálními drozofilami jsem tedy měla 3 kódy. Skoková odpověď kódu 31zbk(*FB-G9a^{RNAi}*) byla pro habituaci 79 %, pro fatigue 91 %. Kód 32zbk (*FB-Nf1RNAi*) měl 58 % pro habituaci a 79 % pro fatigue. Kód 43zbk (*elav-Nf1^{RNAi}*) měl pro habituaci 75 %, pro fatigue 79 %. Pro habituaci kódu 31zbk vyšla TTC 7,16, TTC SEM 0,83, P value 0,54. Pro fatigue 31zbk vyšla TTC 27,51, TTC SEM 1,26, P value 0,32. Pro habituaci 32zbk vyšla TTC 4,87, TTC SEM 1,12, P value 0,15. Pro fatigue 32zbk vyšla TTC 21,32, TTC SEM 6,17, P value 0,91. Pro habituaci kódu 43zbk vyšla TTC je 57,12, TTC SEM 4,45, P value 0,8. Pro fatigue kódu 43zbk vyšla TTC 34,5, TTC SEM 4,5, P value 0.

U kódu 31zbk a 32zbk se experimentální drozofily habitovaly lépe než kontrola a také velmi rychle, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky průkazný. Fatigue experiment pro ně nepotvrdil

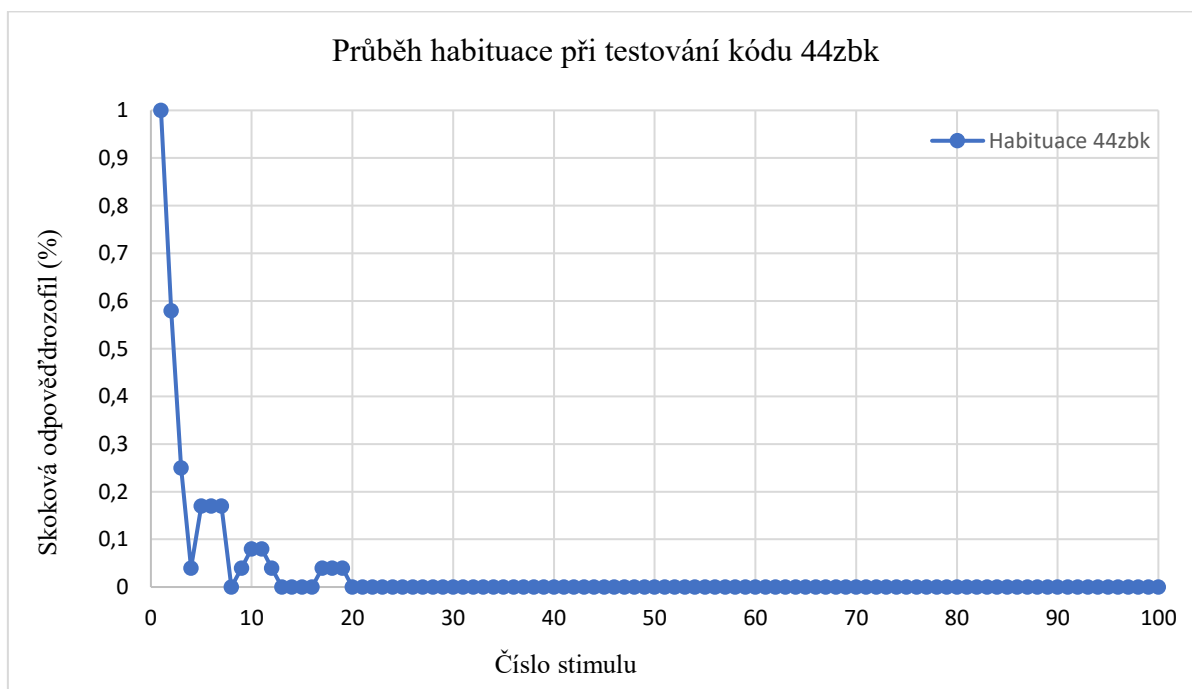
předčasnou únavu. Pro kód 43zbnk nedošlo k habituaci. Experimentální drozofily nelze moc dobře porovnat s kontrolou, protože v grafu vykazují podobné hodnoty a navzájem se překrývají.

4.2.6 Analýza habituace den 3

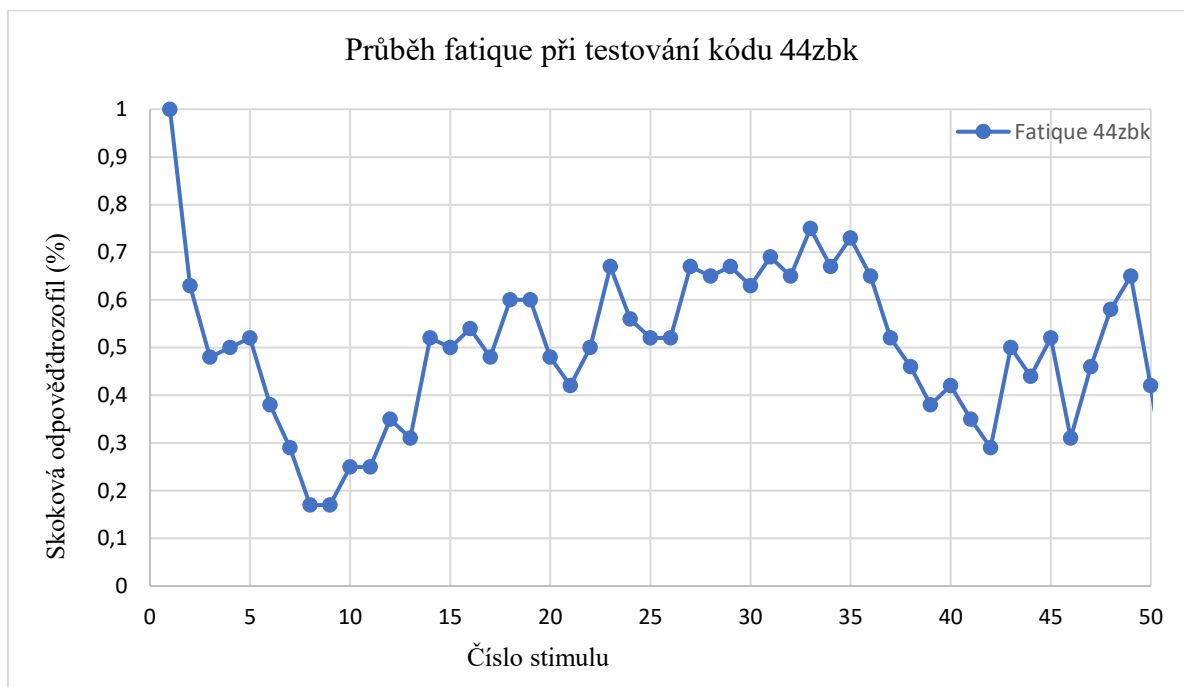
Třetí den testování proběhl 20.10.2022. Nejdříve proběhlo otestování kontrol a poté testování experimentálních drozofil. Při experimentech bylo vidět, že drozofily nereagují skokem na light-off stimuly. Zhodnocení kontrol je v následující tabulce 15. Kontrolní kódy jsou 44zbnk, 45zbnk, 57zbnk.

Habituace	Počet skoků		Fatigue	Počet skoků
44zbnk	5		44zbnk	10
45zbnk	3		45zbnk	3
57zbnk	6		57zbnk	10

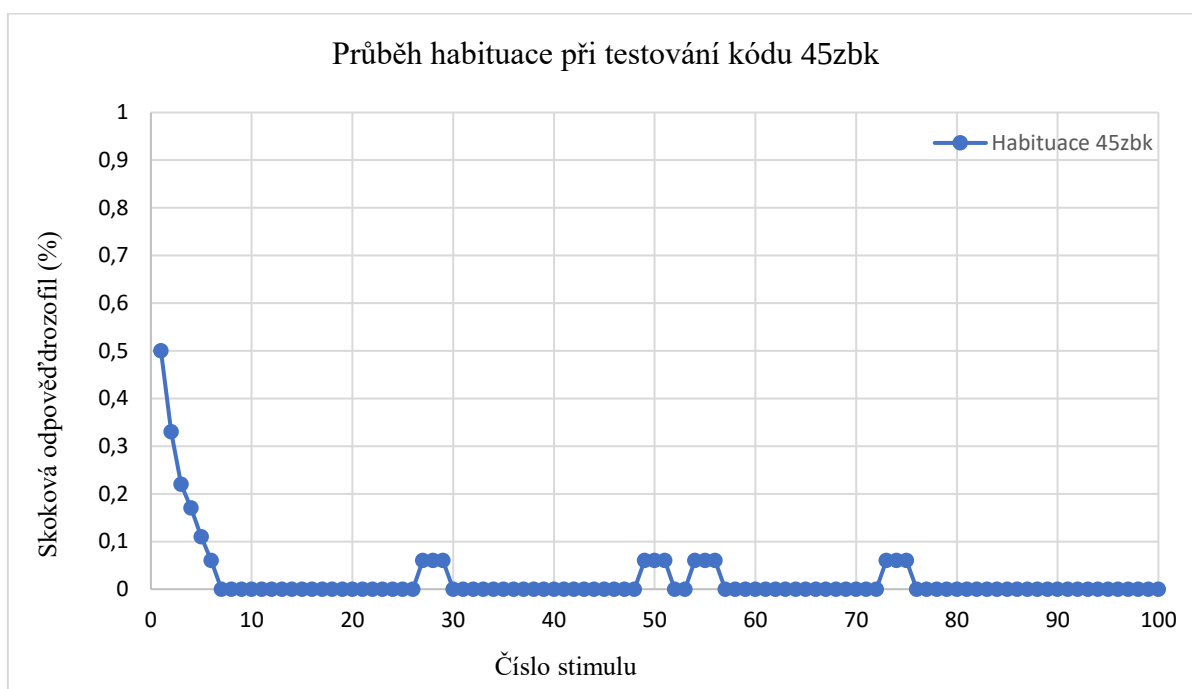
Tab. 15 - Počet skoků pro jednotlivé kontroly.



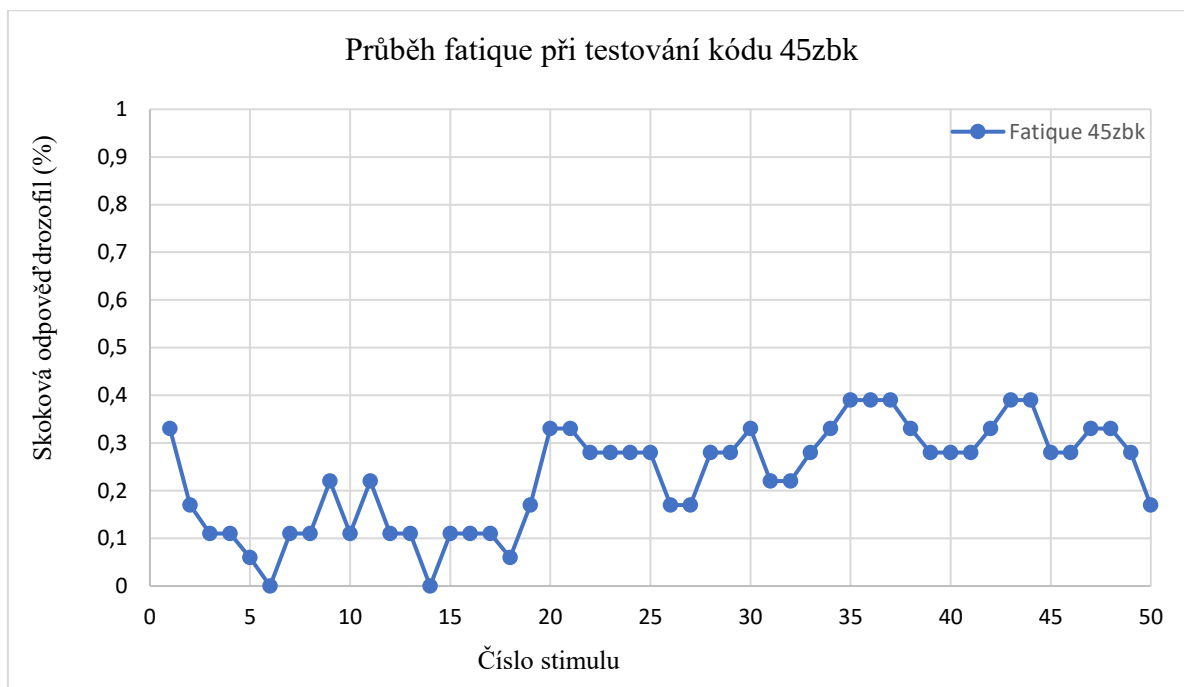
Obr. 27 - Průběh habituace kódu 44zbnk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 5 skoků. Hodnota TTC je 3,87, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 2,12.



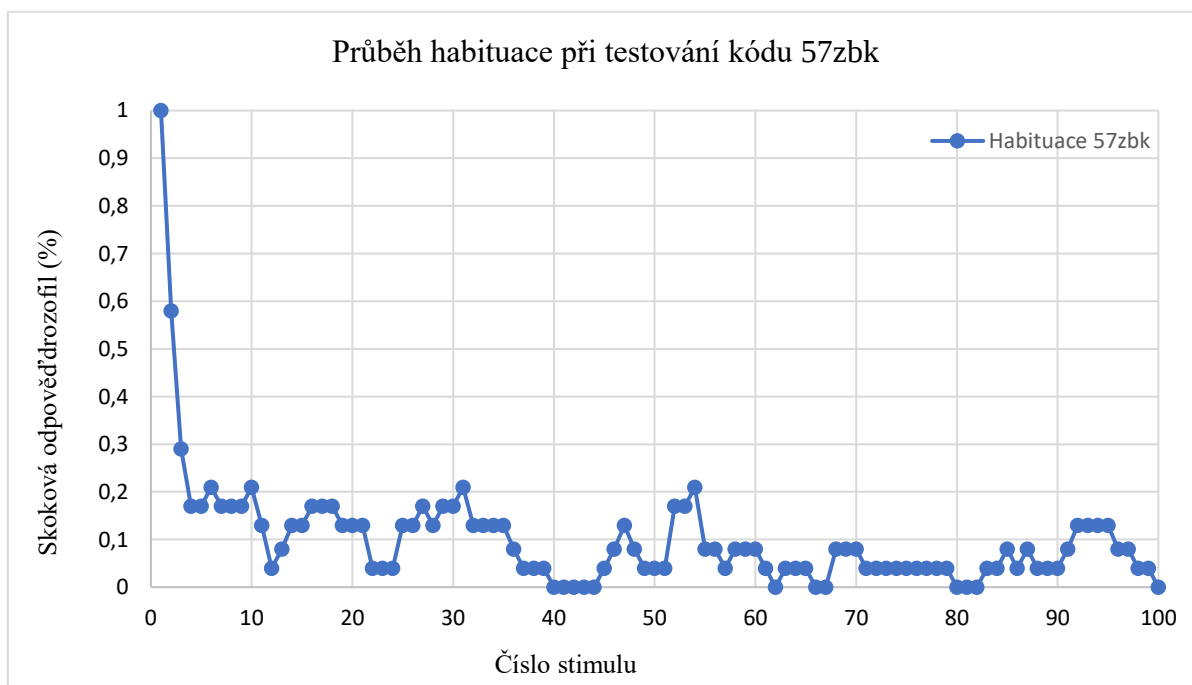
Obr. 28 - Průběh fatigue kódu 44zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 10 skokanů. Hodnota TTC je 23,56, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 3,93.



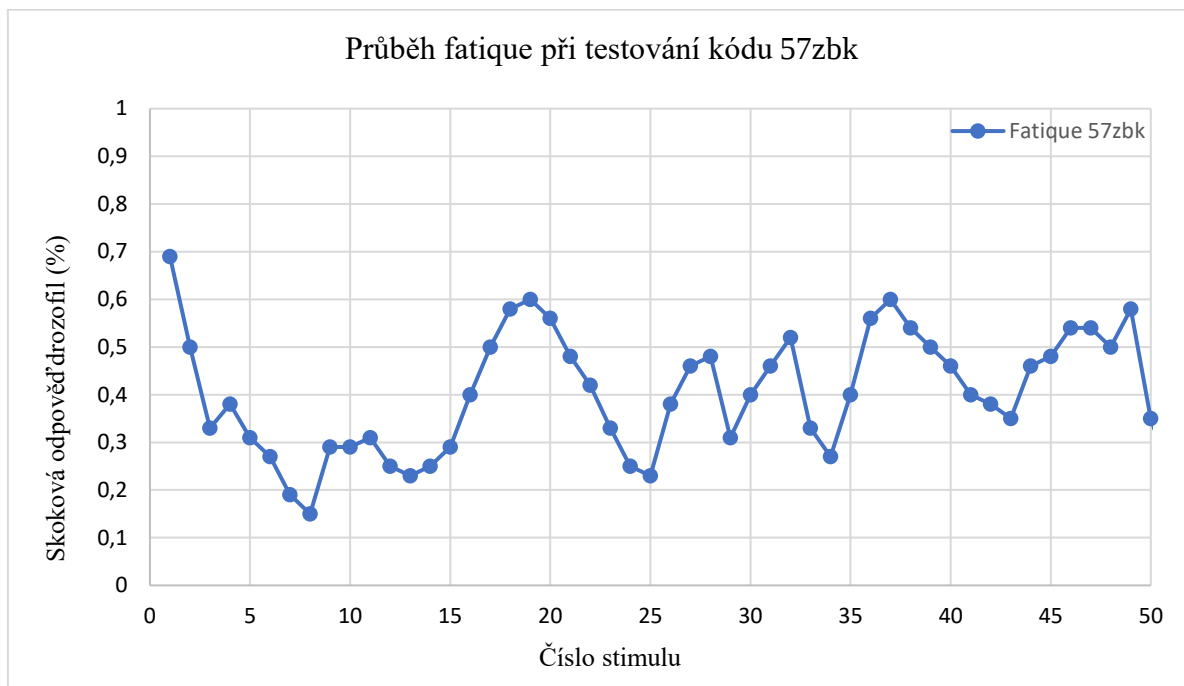
Obr. 29 - Průběh habituace kódu 45zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samic. Pro tento graf byli 3 skokani. Hodnota TTC je 3,33.



Obr. 30 - Průběh fatigue kódu 45zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samic. Pro tento graf byli 3 skokani. Hodnota TTC je 17,3.



Obr. 31 - Průběh habituace kódu 57zbn. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samic. Pro tento graf bylo 6 skokanů. Hodnota TTC je 3,37, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0,62.



Obr. 32 - Průběh fatigue kódu 57zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 10 skokanů. Hodnota TTC je 15,43, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 11,43.

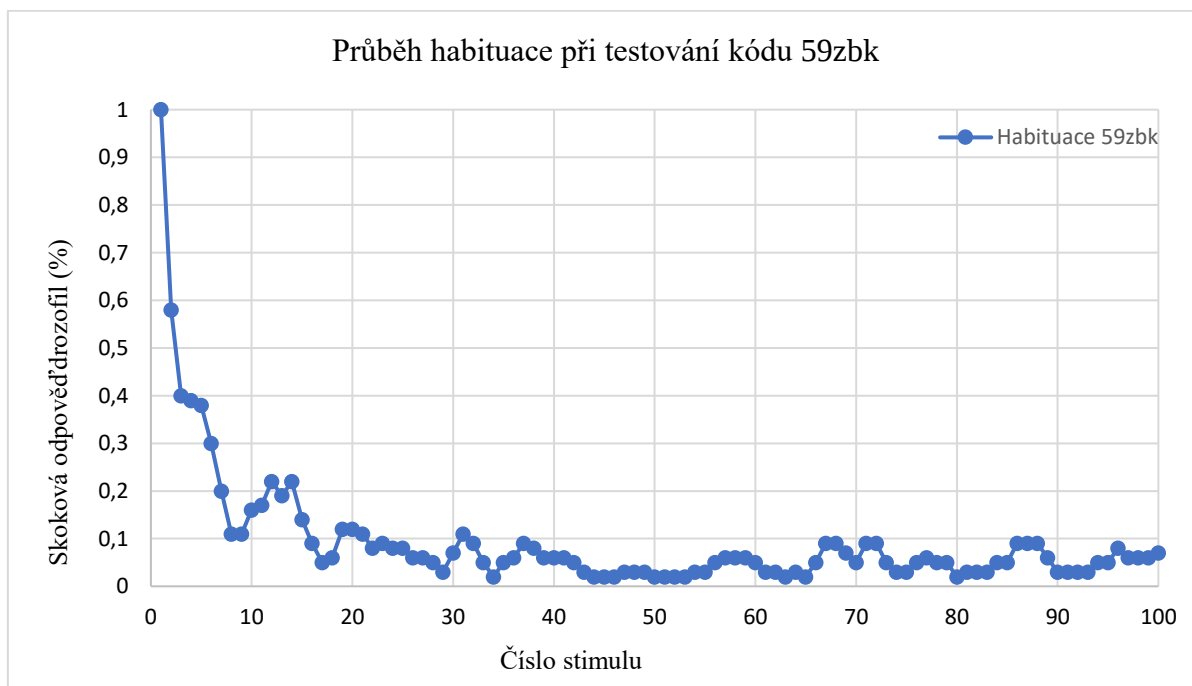
Uvedené hodnoty skokanů v tabulce 15 jsou nižší než 12. Kontroly nesplňovaly základní podmínku ani při jedné části experimentu. Vyhodnocení experimentálních drozofil nebylo provedeno.

4.2.7 Analýza habituace den 4

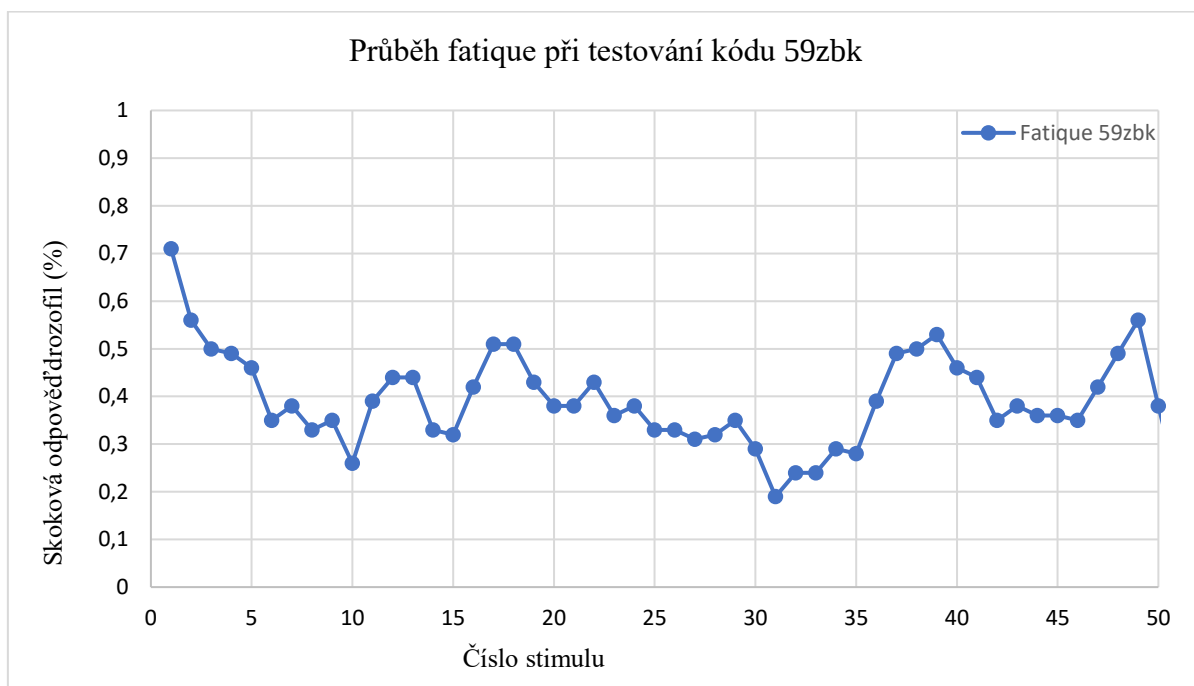
Poslední čtvrtý den 24.10.2022 se měřily experimenty 59zbk-73zb. Testování kvůli nedostatku much neproběhlo u kódů 60zbk, 63zbk a 68zbk. Pro kód 73zbk nebyl dostačující počet drozofil, proto byly použity už jednou testované drozofily z předchozího dne z kódu 58zbk. U kódů 72zbk, 66zbk a 67zbk nebyla destička plně obsazená všemi 24 drozofilami. První se vyhodnocovaly kontroly, výsledky jsou uvedeny v tabulce 16. Pro tyto dvě kontroly následují i grafy (obrázky 33-36).

Habituace	Počet skokanů		Fatigue	Počet skokanů
59zbk	18		59zbk	18
72zbk	10		72zbk	13

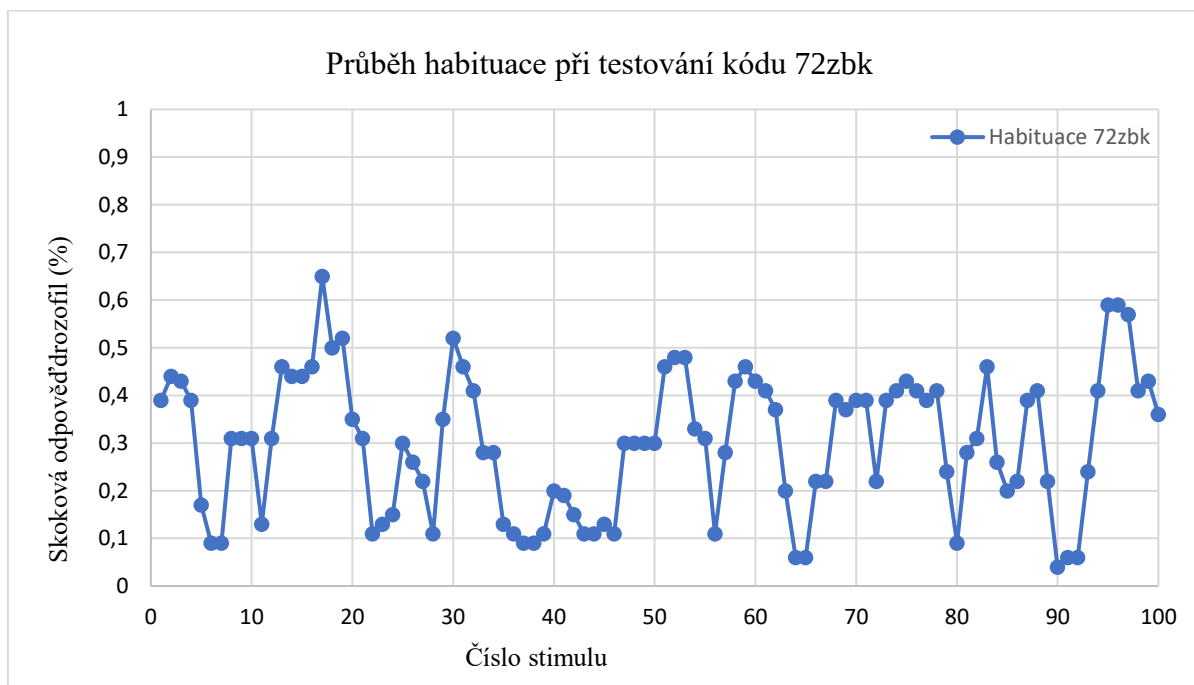
Tab. 16 - Počet skokanů pro jednotlivé kontroly.



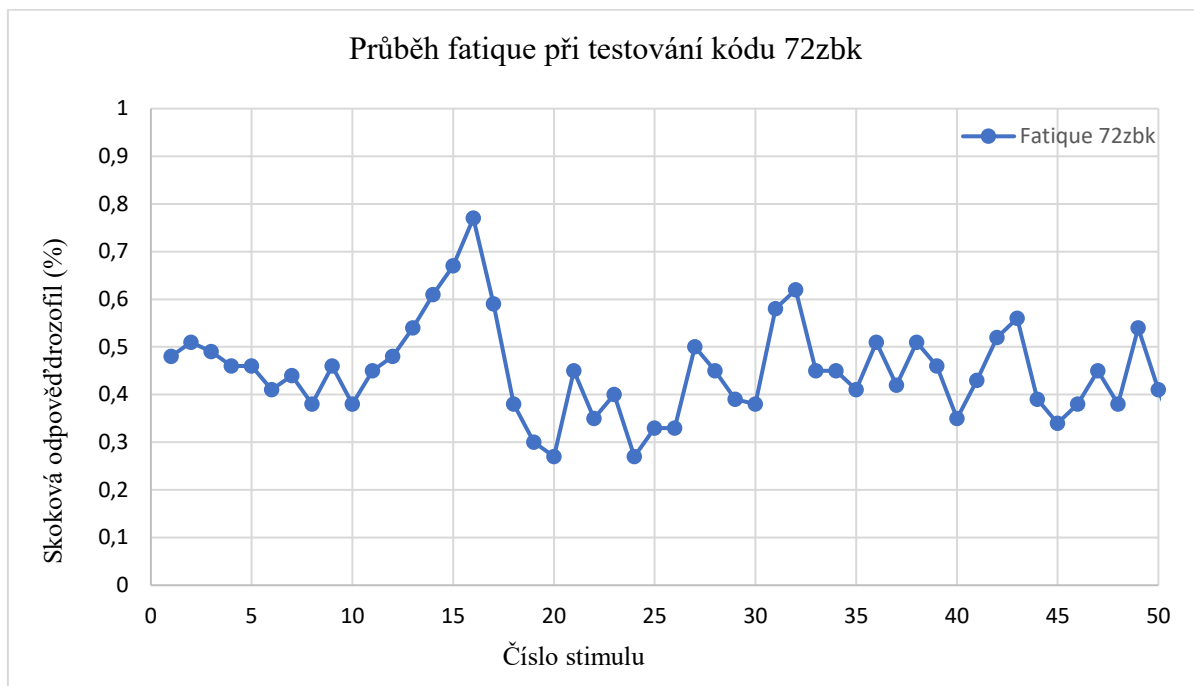
Obr. 33 - Průběh habituace kódu 59zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 18 skokanů. Hodnota TTC je 6,53, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 1,82.



Obr. 34 - Průběh fatigue kódu 59zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 18 skokanů. Hodnota TTC je 24,58, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 0,08.



Obr. 35 - Průběh habituace kódu 72zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh habituace kontrolních samců. Pro tento graf bylo 10 skokanů. Hodnota TTC je 10,72, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 7,72.



Obr. 36 - Průběh fatigue kódu 72zbk. Na ose X je uveden počet stimulů. Na ose Y kolik % drozofil reagovalo skokovou odpovědí. Křivka grafu zobrazuje průběh fatigue kontrolních samců. Pro tento graf bylo 13 skokanů. Hodnota TTC je 24,13, s odchylkou (střední chyba průměru, TTC SEM) 12,13.

Z tohoto dne máme pouze 1 použitelnou kontrolu, kód 59zbk. Ten má pro habituaci i fatigue skokovou odpověď 75 %. Druhá otestovaná kontrola 72zbk při habituaci nesplňovala podmínku, že musí reagovat minimálně 50 % drozofil. Pro habituaci kódu 59zbk vyšla TTC 6,53, TTC SEM 1,82. Pro fatigue kódu 59zbk vyšla TTC 24,58, TTC SEM 0,08. Pro habituaci kódu 72zbk vyšla TTC 10,72, TTC SEM 7,72. Pro fatigue kódu 72zbk vyšla TTC 24,13, TTC SEM 12,13.

V následující tabulce 17 jsou vypsány hodnoty experimentálních drozofil. Protože je jenom jedna kontrola, tak jsou uvedeny pouze experimenty s ní srovnatelné.

Kódy	Skokani/N
61zbk	0,125
62zbk	0,125
64zbk	0,125
65zbk	0,125
66zbk	0,041667
67zbk	0,208333
69zbk	0,083333
70zbk	0
71zbk	0,041667

Tab. 17 - Počet skokanů pro jednotlivé experimentální drozofily.

Žádný z kódů v tabulce 17 nesplňuje signifikantní hodnotu skokové odpovědi. Přestože v tento den reagovaly kontroly na light-off stimulus dobře, žádné z experimentálních drozofil dostatečnou skokovou odpověď neprokázaly.

4.2.8 Výsledek analýzy habituace

Ve všech dnech drozofily málo reagovaly na stimuly light-off. V prvním a třetím dni reagovaly špatně i kontroly, takže z těchto dnů nemám žádné výsledky. Z druhého dne jsem porovnála 3 experimentální kódy. Zbytek experimentálních kódů nesplňoval dostatečnou skokovou odpověď pro analýzu. Tyto 3 kódy 31zbk, 32zbk a 43zbk jsou jedinými vyhodnocenými experimentálními drozofilami. Ze čtvrtého dne byla použitelná pouze jedna kontrola, k ní ale nebyly použitelné experimentální drozofily. U kódů 31zbk a 32zbk vyplývalo z grafů, že dochází k velmi rychlé habituaci. Dokonce možná k lepší habituaci než u kontroly, i když rozdíl v TTC nebyl signifikantní. U fatigue experimentů byla pozorovatelná postupná únava. U kódu 43zbk k habituaci nedocházelo.

5. Diskuze

Tato práce vygenerovala data, která popisují nastavování kritérií pro změření habituace i samotné otestování habituace u manipulace exprese vybraných genů. Habituace je řízena mozkem, během ní dochází k postupnému snižování reakčních odezev na okolní podněty. U jedinců, u kterých se vyskytuje PAS nebo PI, je průběh habituace často abnormální. Deficit v habituaci je tedy relevantním ekvivalentem kognitivní funkce. Výskyt těchto poruch může být způsoben monogenně. Velmi časté potíže, kterými trpí jedinci s některou z těchto zmíněných poruch, jsou obezita a častější výskyt zánětů. Fenckova et al.,(2019) prokázali, že 50 % testovaných drozofilích ortologů pro PI/PAS, je důležitých pro habituaci v mozku. Navíc bylo zjištěno, že některé z nich jsou spojeny s imunometabolickými potížemi (SysNDD, database of gene disease relationships in neurodevelopmental disorders. Retrieved May 8, 2020, from <https://sysndd.dbmr.unibe.ch/>). Protože při léčbě zánětů dochází ke snížení projevů autistického chování (Gładysz et al., 2018), existuje možnost, že imunitní a metabolické potíže mohou přispívat ke kognitivní disfunkci u poruchy autistického spektra nebo u poruchy intelektu.

Studium vlivu některých takovýchto PI/PAS genů v imunometabolických tkáních na kognitivní funkci lze provést prostřednictvím ortologů ve zvířecích modelech. Pro tuto práci se habituace testovala na organismu *Drosophila melanogaster*. Pomocí posttranskripčního mechanismu regulace genové exprese, známého jako RNA interference, se snížila funkce určitého genu. To vše s využitím UAS-Gal4 systému (Brand & Perrimon, 1993). Testovaly se i 2 geny (*csw* a *Ras1*), u kterých se exprese cíleně zvyšovala, protože mutace v lidských ekvivalentech vedou ke zvýšení jejich funkce u PI/PAS. Tyto manipulace se prováděly v tukové tkáni, která má jak metabolickou (zásobárna energie), tak imunitní funkci. Testoval se jejich efekt na habituaci.

Před testováním samotných manipulací bylo potřeba nastavit systém Zantiks. Testovaly se nejlepší možné podmínky pro vyhodnocování habituace na základě light- off stimulů ve všech třech částech experimentu „Pulse“, „Habituation“, „Fatigue“. Ověření intervalů mezi light-off stimuly se ukázalo jako potřebné. Skript s hodnotami, které přesně odpovídaly požadovaným hodnotám pro průběh experimentu, vytvářel delší časové intervaly mezi light-off stimuly. K opoždění docházelo kvůli chvilkovému odpojení přístroje od programu. Přístroj se odpojuje, aby mohl sbírat a ukládat data, ze kterých vypočítává uraženou vzdálenost. Podle délky intervalu ví, jak dlouho může být odpojen, a také kdy se má vrátit. Jeho návrat do experimentu

nebyl přesný a to způsobovalo opožďování stimulu. Zkrácením intervalu, do kdy se mohl vrátit, o 0,05 sekundy, se docílilo přesnějšího intervalu mezi light-off stimuly.

Vymezení kritérií pro rozeznávání skokové odpovědi a vytvoření zápisů výsledků v jednodušší formě pomocí 1 (skok) a 0 (bez reakce) se podařilo nastavit. Pro vytvořený dataset, který zaznamenával uraženou vzdálenost drozofily 0,5 sekund před stimulem i po stimulu, se vytvořilo kritérium threshold. Threshold porovnává svoji nastavenou hodnotu s rozdílem mezi uraženými vzdálenostmi při a před light-off stimulem. Vytvořený dataset se porovnal s mnou zapsanými výsledky, které jsem získávala zhlédnutím vytvořených videí pořízených během experimentu. Z rozdílů a typů skoků, promeškaný nebo falešný skok, se vyhodnotila kvalita hodnocení kritéria threshold. Rozdíl skoků vyžadoval přidání dalšího kritéria a to MSD. To sloužilo k upřesnění pohybu. Konkrétně, aby pouze pohyb křídla nebo jenom končetiny nebyl vyhodnocován jako skok. Kritérium MSD vedlo ke snížení chybovosti. Nastaveným kritériem pro nejpresnější měření se stala kombinace threshold 0 + MSD>1. Přidáním a nastavením tohoto kritéria se dosáhlo 98,42 % přesnosti při vyhodnocování skoků a neskoků. Tato kombinace vyšla jako nejpresnější nastavení, proto se používala pro testování experimentálních drozofil.

U většiny změřených dat pro experimentální drozofily nemohla být data zanalyzována. Skoková odpověď u většiny experimentů vycházela pod 50 %. Změny u některých vykřížených potomků byly pozorovatelné ještě před měřením habituace v přístroji Zantiks. Ve vialkách s experimentálními drozofilami se nacházelo méně kukel. K vylihnutí z kukel docházelo také později. Jedno křížení se nepodařilo ani namnožit, bylo zcela letální. Jednalo se o křížení s RNAi proti genu *CG6287*. Tento gen tvoří vazbu s NAD koenzymem, který figuruje v redoxních a biosyntetických reakcích jako přenašeč elektronů (Dengler et al., 1997). Funkce genu *CG6287* v tukovém tělese je pravděpodobně velmi důležitá, protože utlumení jeho funkce vedlo k letalitě. U potomků křížení s overexpresí *Ras85D-R68Q* docházelo k vytváření kukel, z nich se však dospělé drozofily nevylihly. U kontrolních linií nebyly pozorovatelné změny v průběhu vývoje.

Ve dvou měřených dnech při testování habituace experimentální drozofily ani kontroly nereagovaly na light-off stimuly dobře. Bez kontrol nemohlo být provedeno testování experimentů. Pouze z druhého a čtvrtého dne testování mohla být pořízena data experimentálních drozofil, která se měla s čím srovnávat, protože v kontrolních měřeních reagoval dostatek drozofil. U většiny experimentálních drozofil není vliv na habituaci

pozorovatelný, kvůli špatnému reagování na light-off stimuly během experimentu. To ale nemusí znamenat, že tato konkrétní úprava genotypu nemá žádný vliv na habituaci, jen by pravděpodobně musela být změřena jiným způsobem než pomocí light-off jump habituace.

Tím, že se testované geny exprimují v tukovém tělese, mohou být důležité pro ukládání energie. Výskyt letálních a subletálních fenotypů u manipulací s některými těmito geny naznačuje, že tyto geny by mohly mít zásadní vliv na fyziologii organismu. To by mohlo potvrzovat i to, že když drozofily byly umístěny na led, aby se mohly přendat na měřicí destičku, tak velmi rychle usínaly. Naopak probuzení v destičce jim trvalo déle.

Chování kontrol ve dvou dnech ze čtyř nebylo optimální. Bez kontrol se nedají vyhodnocovat data. Nevíme, proč kontrolní linie špatně reagovaly.

Pro testování habituace by mohly být použité jiné testovací metody. Existující modely vyhodnocují habituaci studováním návyku na vizuální, mechanické, chuťové a čichové podněty. Různorodost reakcí drozofil na stimulaci zápachem vedla k rozvoji různých čichových habitačních modelů. Jedním z nich je T-bludiště, které již bylo použito v laboratoři E. Skoulakise (Semelidou et al., 2019). V trénovací části jsou drozofily vystaveny určitému pachu, který se rozšíří po celé trubici. V momentě, kdy se tak stane jsou drozofily vytaveny elektrickému šoku. Ten je pro ně nepříjemný, a způsobí skokovou reakci. Následně se do trubice vpustí druhý pach. K tomuto pachu se nepřidávají elektrické šoky, takže nezpůsobuje skokovou reakci. Následně jsou drozofily spouštěny do testovací trubice. Do testovací trubice je z každé strany vpouštěn jeden ze dvou předchozích pachů. Když se drozofily dostanou do testovací trubice, tak z každé strany cítí jiný zápach. Mají na výběr, kam půjdou. Na základě předchozí zkušenosti by si měly vybrat zápach, který nemají spojený s elektrickým šokem. Pro měření v testovací trubici není potřeba skokové reakce. Jak habituace probíhá, se určí podle směru, kam drozofily polezou.

6. Závěr

Porovnáním automaticky vytvořených datasetů s manuálním vyhodnocením videí se podařilo dosáhnout minimální chybovosti v zapisování skoků. Tvorbu falešných skoků nebo nerozpoznaných skoků se následně podařilo snížit díky novým kritériím, threshold a MSD. Až jejich kombinace vedla k minimální chybovosti ve vytváření špatně vyhodnocených skoků. Úspěšnost vyhodnocování skokové reakce s kombinací kritérií byla vyšší než 98 %. Podařilo se zamezit i vznikajícím delším intervalům mezi jednotlivými stimuly light-off.

Z testování experimentálních drozofil nemáme mnoho výsledků. Vyhodnocení komplikuje chování kontrolních drozofil, které málo skákaly. Použitelné výsledky jsou jenom u dvou dnů měření. U experimentálních drozofil, pro které se mohla získaná data analyzovat, byla viditelná rychlá únava. Únava, vznik letálních a subletálních fenotypů, pomalejší vývoj, rychlé usínání na ledu a pomalé probouzení po odstranění z ledu naznačuje, že testované geny pravděpodobně mají v tukové tkáni důležitou funkci pro život drozofil. Jaký je jejich vliv na habituaci se z těchto výsledků nedá určit.

7. Literatura

1. Aspromonte, M. C., Bellini, M., Gasparini, A., Carraro, M., Bettella, E., Polli, R., Cesca, F., Bigoni, S., Boni, S., Carlet, O., Negrin, S., Mammi, I., Milani, D., Peron, A., Sartori, S., Toldo, I., Soli, F., Turolla, L., Stanzial, F., ... Leonardi, E. (2020). Characterization of intellectual disability and autism comorbidity through gene panel sequencing. *Human Mutation*, 41(6), 1183–1183. <https://doi.org/10.1002/humu.24012>
2. Barron, H. C., Vogels, T. P., Behrens, T. E., & Ramaswami, M. (2017). Inhibitory engrams in perception and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(26), 6666–6674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701812114>
3. Blok, L. E. R., Boon, M., van Reijmersdal, B., Höffler, K. D., Fenckova, M., & Schenck, A. (2022). Genetics, molecular control and clinical relevance of habituation learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 143, 104883. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104883>
4. Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
5. Coll-Tané, M., Krebbers, A., Castells-Nobau, A., Zweier, C., & Schenck, A. (2019). Intellectual disability and autism spectrum disorders ‘on the fly’: insights from *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms*, 12(5). <https://doi.org/10.1242/dmm.039180>
6. Dengler, U., Niefind, K., Kieß, M., & Schomburg, D. (1997). Crystal structure of a ternary complex of d -2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* , NAD + and 2-oxoisocaproate at 1.9 Å resolution 1 1Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 640–660. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0864>
7. Engel, J. E., & Wu, C.-F. (1996). Altered Habituation of an Identified Escape Circuit in *Drosophila* Memory Mutants. *The Journal of Neuroscience*, 16(10), 3486–3499. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-10-03486.1996>

9. Fenckova, M., Blok, L. E. R., Asztalos, L., Goodman, D. P., Cizek, P., Singgih, E. L., Glennon, J. C., Int'Hout, J., Zweier, C., Eichler, E. E., von Reyn, C. R., Bernier, R. A., Asztalos, Z., & Schenck, A. (2019). Habituation Learning Is a Widely Affected Mechanism in *Drosophila* Models of Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*, 86(4), 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.029>
10. Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., & Pillai, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.05.006>
11. Gładysz, D., Krzywdzińska, A., & Hozyasz, K. K. (2018). Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder—Could They Hold Promise for Causative Treatment? *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6387–6435. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0822-x>
12. Katz, G., & Lazcano-Ponce, E. (2008). Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Pública de México*, 50. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342008000800005>
13. Kochinke, K., Zweier, C., Nijhof, B., Fenckova, M., Cizek, P., Honti, F., Keerthikumar, S., Oortveld, M. A. W., Kleefstra, T., Kramer, J. M., Webber, C., Huynen, M. A., & Schenck, A. (2016). Systematic Phenomics Analysis Deconvolutes Genes Mutated in Intellectual Disability into Biologically Coherent Modules. *The American Journal of Human Genetics*, 98(1), 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.11.024>
14. Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., & Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*, 38(1), 81–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044318>
15. Maia, N., Nabais Sá, M. J., Melo-Pires, M., de Brouwer, A. P. M., & Jorge, P. (2021). Intellectual disability genomics: current state, pitfalls and future challenges. *BMC Genomics*, 22(1), 909. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08227-4>

16. McDiarmid, T. A., Bernardos, A. C., & Rankin, C. H. (2017). Habituation is altered in neuropsychiatric disorders—A comprehensive review with recommendations for experimental design and analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80, 286–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.028>
17. Meral, T., & Yalnizoğlu, D. (2013). *Developmental abnormalities and mental retardation* (pp. 211–217). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52891-9.00021-X>
18. Neumeier, William. H., Grosso, C., & Rimmer, J. H. (2017, September 26). *Obesity and Individuals with Intellectual and Developmental Disabilities A Research to Policy Brief*. https://www.aucd.org/template/news.cfm?news_id=13080&parent=295&parent_title=AUCD%20Publications&url=/template/page.cfm?id%3D295
19. Ramaswami, M. (2014). Network Plasticity in Adaptive Filtering and Behavioral Habituation. *Neuron*, 82(6), 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.035>
20. *RNAi handbook experiments*. Retrieved April 8, 2023, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/rnai-handbook-brochure.pdf>
21. Roote, J., & Prokop, A. (2013). How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for *Drosophila* Genetics. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 3(2), 353–358. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004820>
22. Rutkowski, E. M., & Brimer, D. (2014). Physical Education Issues for Students With Autism. *The Journal of School Nursing*, 30(4), 256–261. <https://doi.org/10.1177/1059840513503686>
23. Semelidou, O., Acevedo, S., & Skoulakis, E. (2019). Accessing Olfactory Habituation in *Drosophila melanogaster* with a T-maze Paradigm. *BIO-PROTOCOL*, 9(11). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3259>
24. *SysNDD, database of gene disease relationships in neurodevelopmental disorders*. Retrieved May 8, 2020, from <https://sysndd.dbmr.unibe.ch/>

25. Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, 15(5), 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>