

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

Vliv AdoR a signální dráhy JNK na přežití nádorových  
klonů *wts Drosophila melanogaster*

Bakalářská práce

**Štěpánka Tomková**

Školitel: doc. RNDr. Michal Žurovec CSc.

České Budějovice 2015

Tomková, Š., 2015: Vliv AdoR a signální dráhy JNK na přežití nádorových klonů *wts* u *Drosophila melanogaster* [Effect of AdoR and JNK pathway on surviving *wts* tumor clones in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech] – 28, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## Annotation

The aim of my research was to design methods for labelling mosaic clones generated by mitotic crossing-over in *Drosophila* somatic tissues. I assembled *D. melanogaster* recombinant lines for induction of hyperplastic *wts* homozygous clones in *wts* heterozygous background. Negative GFP labelling was used to visualize the clones, and *puc-LacZ* reporter construct was utilized to enable detection of activated JNK/Bsk in them.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 22. Dubna 2015

.....  
Štěpánka Tomková

## **Poděkování**

Tímto bych velice ráda poděkovala mému školiteli Michalovi Žurovcovi za ochotu a předání odborných poznatků při psaní mé bakalářské práce. Děkuji i všem členům laboratoře, a to především Romanovi Sidorovovi, který mi vždy ochotně pomohl a poradil.

V neposlední řadě patří velké díky mé rodině, zvláště mamince, která mě podporovala po celou dobu studia. Díky i všem blízkým přátelům, kteří mě neváhali povzbudit.

# Obsah

1	Úvod	5
1.1	Tumor supresorové geny a jejich mutace	5
1.2	Drosophila jako model pro výzkum rakoviny	5
1.3	Vlastnosti tumor supresorového genu <i>warts</i>	6
1.4	Vlastnosti adenosinového receptoru (AdoR) u <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.5	Buněčná kompetice	9
1.6	Signální dráha c-jun- kinázy	10
1.7	Mechanismus indukce GFP negativních klonů a LacZ barvení	11
2	Cíle práce	12
3	Materiál a metody	13
3.1	Konstrukce heterozygotních drozofil	13
3.1.1	Heterozygotní drozofily nesoucí puc-LacZ wtsx1 na 3. chromozomu	13
3.1.2	Heterozygotní drozofily nesoucí puc-LacZ wtsx1 AdoR1 na 3. chromozomu	14
3.2	Schémata křížení	15
3.3	Izolace genomové DNA pro PCR reakci	16
3.4	PCR reakce	16
3.5	Agarózová elektroforéza	17
3.6	Indukce <i>wts</i> klonů mutagenem	17
3.7	Detekce $\beta$ -galaktozidázové aktivity X-gal barvením	17
3.7.1	Příprava barvicího roztoku	17
3.7.2	Příprava trvalých preparátů	18
3.7.3	Vizualizace preparátů	18
4	Výsledky	19
4.1	PCR ověření inzertu puc-lacZ	19
4.2	Výsledná křížení	20
4.3	Indukce <i>wts</i> klonů mutagenem	20
4.4	Barvení imaginálních terčů	20
4.5	Příprava trvalých preparátů	21
4.6	Vizualizace negativních GFP klonů	21
4.7	Porovnání negativních GFP klonů a lacZ barvení	22
5	Diskuze	23
6	Závěr	25
7	Použitá literatura	26

# 1 Úvod

## 1.1 Tumor supresorové geny a jejich mutace

Tumor supresorové geny (TSG) jsou zodpovědné za kontrolu proliferace, stabilitu genomu a zabraňují replikaci poškozené DNA. Chrání organismus před vznikem nádorového onemocnění. Jejich prvotní funkcí je inhibice buněčného dělení. Pokud dojde k mutaci obou alel TSG dochází k neomezenému buněčnému dělení. U člověka jsou dvě možnosti jejich účasti při vzniku nádorů. V roce 1971 navrhl Alfred Knudson hypotézu dvou zásahů u výskytu retinoblastomu, vzácného nádoru oka dětského věku (Snustad, Simmons 2009). U sporadických nádorů dochází k náhodné inaktivaci obou alel TSG během života jedince. Takovéto nádory jsou vzácné a mají většinou jedno ohnisko vzniku. Naproti tomu u dědičné formy rakoviny, kdy jedna poškozená alela pochází z rodiče a během života jedince dojde v některých buňkách ke ztrátě druhé alely. U těchto jedinců se nádory vyskytují ve vysoké frekvenci a často mívají několik ohnisek vzniku (Snustad, Simmons 2009).

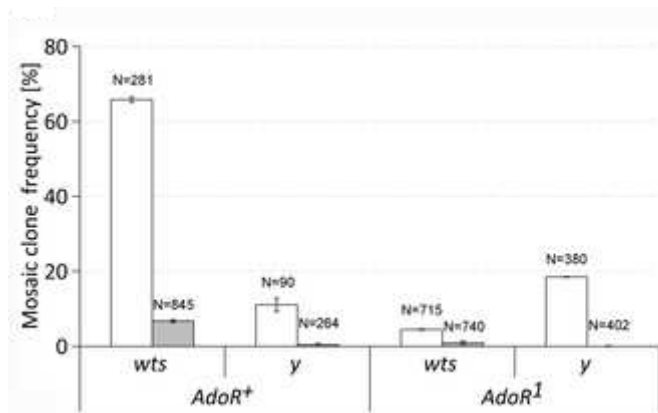
## 1.2 Drozofila jako model pro výzkum rakoviny

Drozofila je vhodným modelem pro studium řady vlastností lidských nádorů. Přestože existují některé důležité rozdíly (např. absence cévního oběhového systému), mnoho biologických procesů, které souvisejí s tumorogenezí a metastází, jsou dobře konzervovány. Drozofila se úspěšně používá například jako model pro studium genetické podstaty chování buněk při metastázi (Pagliarini *et al.* 2003).

Drozofila se rovněž stala velmi úspěšným modelem pro výzkum tumorových supresorových genů (DeLorenzo *et al.* 1999). Existuje-li u drozofily mutace v genu pro TSG, může docházet k podobnému jevu jako u dědičné formy lidské rakoviny, a to znamená ke vzniku somatických mozaikových nádorových klonů.

U drozofily je frekvence vzniku somatických klonů za stejných podmínek obvykle stejná a reprodučibilní. Můžeme měnit tedy podmínky a zjišťovat, zda mají vliv na frekvenci mozaikových klonů (Somatic mutation and recombination test – SMART). Je to výborný experimentální systém, který využíváme pro měření účinku mutagenů nebo mutagenních účinků prostředí, případně pro testování vlivu různých genů na frekvenci výskytu tumorů (Sidorov *et al.* 2001). V našem případě budeme sledovat vliv genů adenosinové signální dráhy na výskyt nádorových a kontrolních somatických mozaikových klonů  $wts^{xl}/wts^{xl}$ .

Protože je výskyt spontánních klonů relativně nízký, pro většinu experimentu jsme navíc použili indukci somatické rekombinace přidáním standardního množství cis-platiny (Sidorov *et al.* 2015).



**Obr. 1:** Účinek AdoR na frekvenci somatických mozaikových klonů (podle Sidorov *et al.* 2015).

Na grafu je znázorněn výskyt spontánní frekvence vzniku  $wts^{x1}$  a y somatických mozaikových klonů u AdoR<sup>+</sup> a AdoR<sup>-1</sup> much. Šedé a prázdné rámečky představují spontánní a cis-platinou indukovaný vznik mozaikových klonů. Frekvence  $wts^{x1}$  klonů v AdoR<sup>-1</sup> mouchách byla mnohem menší než u AdoR<sup>+</sup> much, pouze 4,5% porovnávaných s 65,9 %.

### 1.3 Vlastnosti tumor supresorového genu *warts*

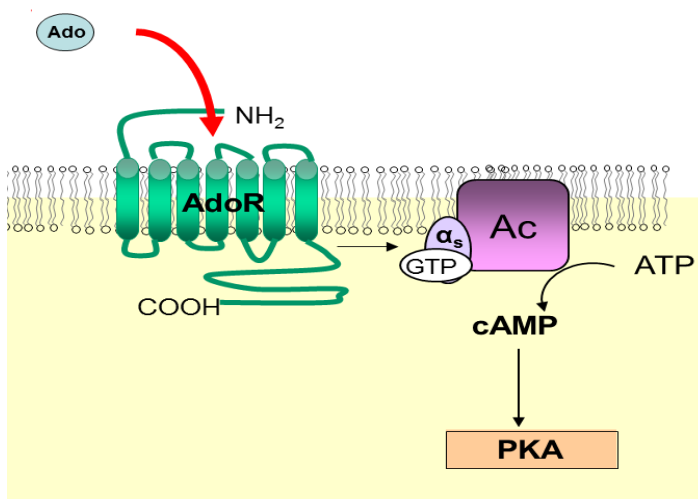
*Warts* (*wts*) je tumor supresorový gen patřící do WTS/LATS tumor supresorové rodiny. Z biochemického hlediska se jedná o serin/threonin protein kinázu (Halder *et al.* 2011). Gen byl nezávisle objeven ve dvou laboratořích, a to nejprve v laboratoři pod vedením Prof. Bryanta, kde byl popsán jako *warts* (Justice *et al.* 1995) a ve druhé laboratoři vedené Dr. Yu jej popsali jako *lats* (Tian Xu *et al.* 1995). Postupně se ukázalo, že tento gen je jeden z hlavních regulátorů buněčného dělení u *D. melanogaster* a uplatňuje se i při regeneračních opravách v organismu. Protein WTS je součástí signální dráhy Salvador-Warts-Hippo (SWH), která se podílí na regulaci růstu tkání u *Drosophila melanogaster*. Hlavním účinkem *wts* je regulace funkce transkripčního koaktivátoru Yorkie (YKI). (Halder *et al.* 2011). Mutace ve *wts* způsobuje zvýšení aktivity Yki, která může měnit WT (wild type – buňky divokého typu) buňky na rychle se rozrůstající superkompetitory mající tu schopnost eliminovat sousední WT buňky (Tyler *et al.* 2007).

Tato dráha je evolučně konzervovaná a hromadí se důkazy o její deregulaci v lidských nádorech.

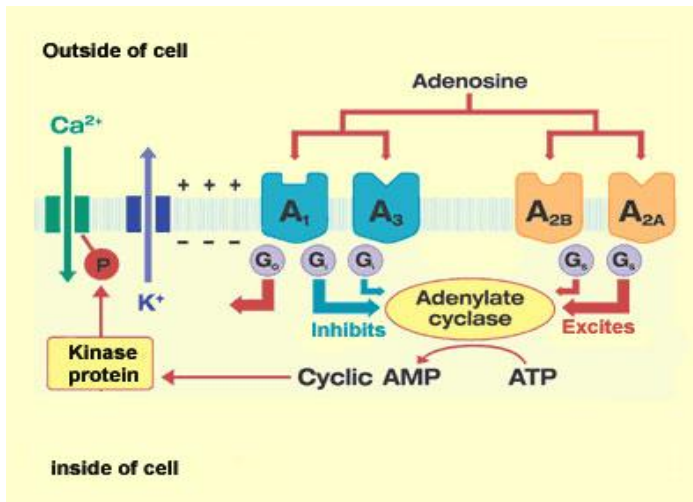
U drozofily je mutace  $wts^{xl}$  v homozygotním stavu letální. U heterozygotní drozofily pro  $wts^+/wts^{xl}$  může docházet ke vzniku nádorových somatických mozaikových klonů  $wts^{xl}/wts^{xl}$ . Tyto klony jsou viditelné jako malé hyperplastické útvary a zdá se, že buňky  $wts^{xl}/wts^{xl}$  mají růstovou výhodu oproti heterozygotním buňkám  $wts^+/wts^{xl}$  a lze říci, že se chovají také jako superkompetitoři (Sidorov *et al.* 2015).

#### 1.4 Vlastnosti adenosinového receptoru (AdoR) u *Drosophila melanogaster*

Adenosinové receptory je skupina receptorů spřažených s G-proteiny, které používají adenosin jako ligand (Dolezelova *et al.* 2007) Účastní se regulace reakcí na stres, nedostatek kyslíku, imunitních odpovědí i spánku. U drozofily byla objevena jediná forma AdoR (DmAdoR). DmAdoR je pozitivně spojen s adenylát cyklázou, jež katalyzuje cAMP. Nejbližší lidský homolog k drozofilímu AdoR je A2AR. Byla prokázána 38,3 % totožnost na 350 bází dlouhém N-terminálním konci. Drozofilí AdoR je zejména vyjádřen v optických lalocích mozku, slinných žlázách a imaginálních terčících u 3. larválního instaru drozofily (Dolezelova *et al.* 2007).

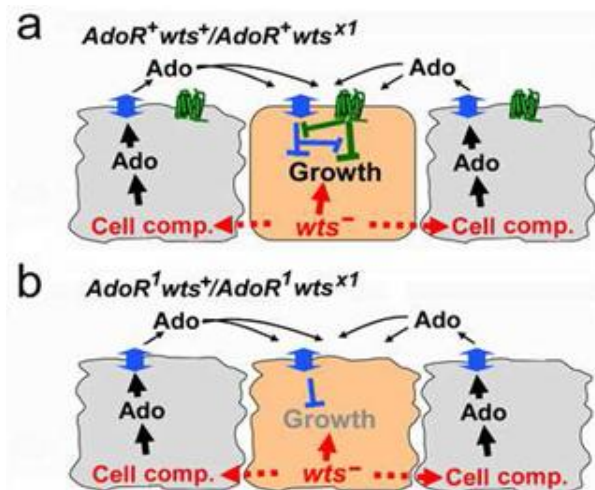


**Obr. 2:** Drozofilí AdoR (Dm AdoR) je transmembránový receptor spřažený s G-proteiny, který je aktivován extracelulárním adenosinem a jeho alfa podjednotka připojuje GTP a následně disociuje a aktivuje adenylát cyklázu. Adenylát cykláza převádí ATP na cAMP, který aktivuje protein kinázu A.



**Obr. 3:** Čtyři savčí isoformy AdoR. Receptory  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  jsou v pozitivním spojení s adenylát cyklázou a naopak  $A_1$  a  $A_3$  tento enzym negativně regulují (URL 1).

V naší laboratoři jsme zjistili, že AdoR a adenosinová signalizace ovlivňuje frekvenci výskytů somatických nádorových klonů  $wts^{x1}/wts^{x1}$ , avšak neovlivňuje frekvenci kontrolních klonů (Sidorov *et al.* 2015). Zdá se rovněž, že v přítomnosti homozygotní mutace  $AdoR^1$  jsou klony  $wts^{x1}/wts^{x1}$  eliminovány nebo alespoň ztrácejí svou růstovou výhodu v rámci mechanismu „buněčné kompetice“.

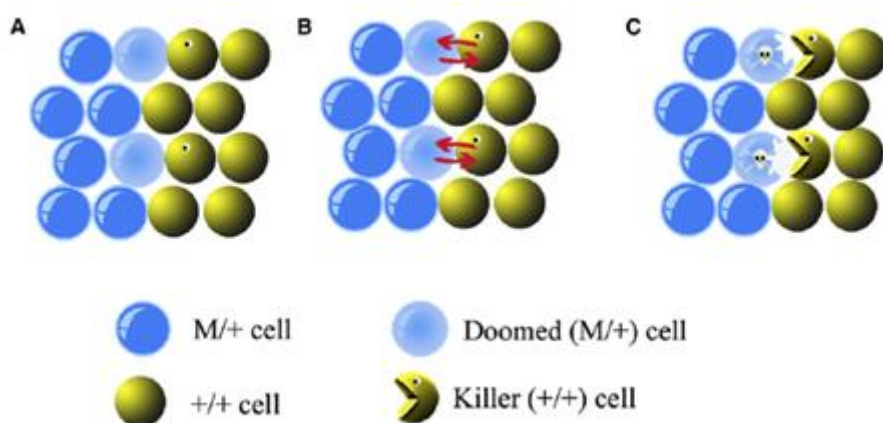


**Obr. 4:** Model adenosinového účinku na  $wts^{x1}$  hyperplastické buňky (Sidorov *et al.* 2015, upraveno). Buňky s hyperplastickými výrůstky jsou znázorněny oranžovou barvou, WT buňky světle šedě, zelený znak představuje AdoR a modrá obousměrná šipka naznačuje Ent2 (rovnovážný nukleosidový transportér 2). **a** u drozofil  $AdoR^+ wts^+/AdoR^+ wts^{x1}$  je frekvence  $wts^{x1}$  mozaikových hyperplastických výrůstků vysoká. **b** mutace v AdoR vede ke dramatickému snížení frekvence  $wts^{x1}$  klonů, protože příjem adenosinu není vyvážený adenosinovou signalizací.



## 1.5 Buněčná kompetice

Buněčná kompetice je nedávno objevený princip selekce buněk s vyšší fitness během nemoci i ve vývoji. Byla poprvé objevena v křídelních imaginálních terčících u drozofily před více než 30 lety (Morata and Ripoll, 1975). Buněčná kompetice byla prvně zjištěna při mitotické rekombinaci, kdy v heterozygotní drozofile vznikly normální buňky bez mutace „Minute“ a ty pak přerůstaly ostatní heterozygotní sousední buňky a eliminovaly je. Jedná se tedy o případ, kdy pomalu se dělicí buňky jsou eliminovány populací rychle se dělicích buněk. Buňky divokého typu (wt) rychleji rostou než M/+ buňky. Pomalu se dělicí buňky byly heterozygoti pro delecí Minute genu, kódujícího ribozomální protein. Minute heterozygotní buňky na křídlech mají normální velikost ale kratší chloupky. (Právě díky tomuto fenotypovému projevu se nazývají minute = maličký).



**Obr. 5:** Teoretické schéma znázorňující buněčnou eliminaci přes buněčnou kompetici (upraveno, Morata et al. 2007).

Rychle se dělicí wt +/+ buňky jsou označeny žlutě. Modře jsou označeny M/+ buňky, které se dělí pomalu. A) světle modře znázorněné „odsouzené“ M/+ buňky a žluté s očima jako zabijácké (+/+) buňky B) oboustranná aktivace buněk C) apoptózou umírající M/+ buňky pohlcené +/+ zabijáckými buňkami.

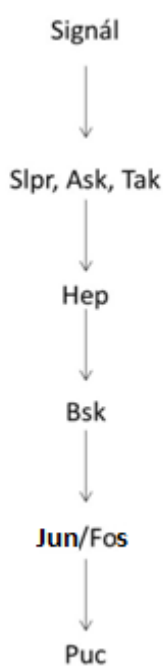
V případě genu *wts* zřejmě rovněž dochází k buněčné kompetici a homozygotní buňky  $wts^{x1}/wts^{x1}$  mají selekční výhodu oproti heterozygotním  $wts^{+}/wts^{x1}$ . Mechanismus kompetice ale může být podobný jako u buněk minute. Může také obsahovat signální dráhu Jun N-terminální kinázy (Tyler et al. 2007).

## 1.6 Signální dráha c-jun- kinázy

Kináza c-jun je důležitá signální molekula regulující řadu fyziologických procesů včetně nádorů a neurodegenerací. Je členem velké skupiny serin/threonin protein kináz a patří do rodiny mitogen aktivujících protein (MAP) kináz (Davis RJ 2000).

U drozofily je JNK dráha nazývaná „basket“ a je jednou ze stresových drah, která vyžaduje signál z další kinázy „hemipterous“ (Hep, JNKK), jež fosforyluje basket. Kaskáda Hep-Bsk může být aktivována několika intracelulárními signály (JNKKK) zahrnující dTAK1, DASK1, Slipper (Slpr) a dMekk1. JNKKK mohou být aktivovány v závislosti na stimulech intracelulárních proteinů jako je například GTPáza (Chen et al. 2002). Hep-Bsk kaskáda může být aktivována extracelulárním ligand/receptor systémem jako je Eiger/Wengen.

Overexprese Eiger v imaginálních terčících způsobuje buněčnou smrt aktivací JNK dráhy přes Misshapen (Msn, JNKKKK), dTAK1 (JNKKK), Hemipterous (Hep, JNKK) a Basket (Bsk, JNK) (Igaki T. et al. 2014). Bylo navrženo, že Eiger je produkován v apoptických buňkách a aktivuje JNK v sousedních buňkách striktně buněčně autonomním způsobem (Garijo et al. 2013).

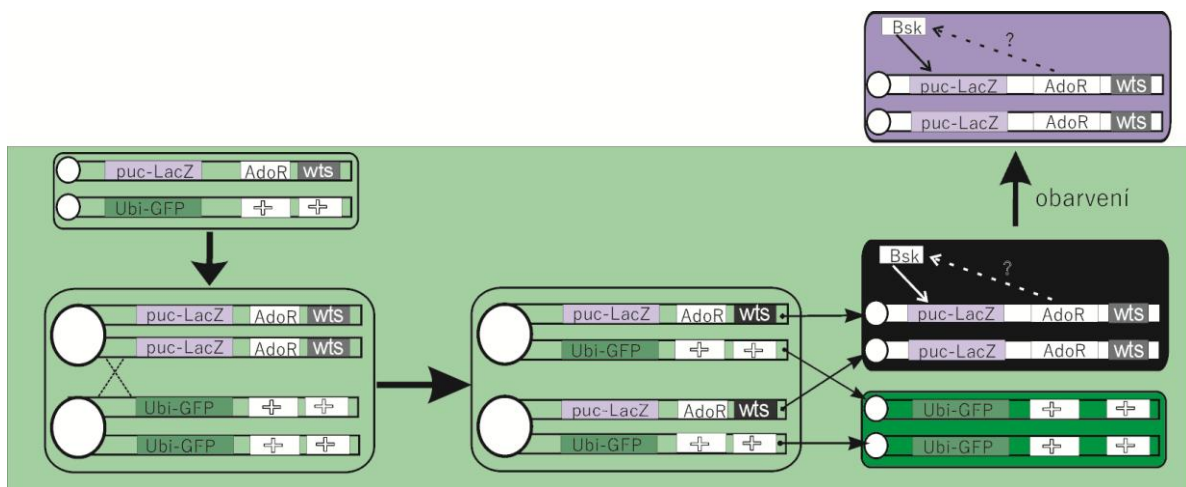


Basket spouští aktivitu transkripčního faktoru Jun a ten zase aktivuje promotor genu *puckered*. Aktivace Jun-N terminální kinázy zvyšuje proliferaci sousedních WT buněk, zatímco inaktivací JNK přes Puckered overexpresi se potlačí apoptóza v těch invadujících buňkách (Vidal et al. 2006). c-Jun protein, který je v lidském těle kódován *Jun* genem, je aktivován dvojí fosforylací JNK dráhy a také fosforylací-independentní funkce. My bychom chtěli zjistit, zda dráha JNK se aktivuje a může nám k tomu posloužit konstrukt obsahující promotor *puckered* spojený s genem pro bakteriální beta-galaktosidázu.

**Obr. 6:** Signální dráha c-Jun kinázy uplatňující se v buněčné kompetici. (zjednodušené schéma). Obsahuje několik proteinů – extracelulární Signál (Eiger), receptor (Wengen) přenáší na intracelulární signál Slpr/Ask/Tak pak na Hep a na vlastní bsk (neboli JNK), která spouští aktivitu transkripčního faktoru Jun a ten zase aktivuje promotor *puckered*.

## 1.7 Mechanismus indukce GFP negativních klonů a LacZ barvení

Protože frekvence spontánního vzniku mozaikových klonů je velmi nízká, použili jsme pro jejich indukci cis-platinu (cisdiamino - dichlor platnatého komplexu). Použitím tohoto mutagenu docházelo ve vyšší frekvenci ke ztrátě heterozygotnosti (LOH) prostřednictvím somatické rekombinace a ke tvorbě somatických mozaikových klonů. Klony způsobené somatickou rekombinací na pravém rameni třetího chromozomu lze zviditelnit například pomocí markerového genu GFP umístěného v této oblasti genomu (Meyer *et al.* 2014). Promotor ubiquitin připojený ke genu GFP zajistí, že se bude exprimovat v jakékoliv části tkáně.



**Obr. 7:** Formování somatických mozaikových klonů s následným barvením s  $\beta$ -galaktozidázovou aktivitou. V heterozygotní buňce  $puc-LacZwts^{x1}AdoR^1/Ubi-GFP$  proběhne somatická rekombinace, která dá vzniknout tmavému klonu  $puc-LacZ wts^{x1}AdoR^1/puc-LacZ wts^{x1}AdoR^1$  a sesterskému klonu  $Ubi-GFP/Ubi-GFP$ .

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo zavedení potřebných metod výzkumu mozaikových somatických klonů u *Drosophila melanogaster*. Dílčí cíle zahrnují (1) konstrukce linií *D. melanogaster* vhodné pro tvorbu somatických mozaikových klonů, (2) indukce klonů v příslušných heterozygotech (3) detekce vytvořených klonů pomocí markerů.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Konstrukce heterozygotních drozofil

##### 3.1.1 Heterozygotní drozofily nesoucí *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>* na 3. chromozomu

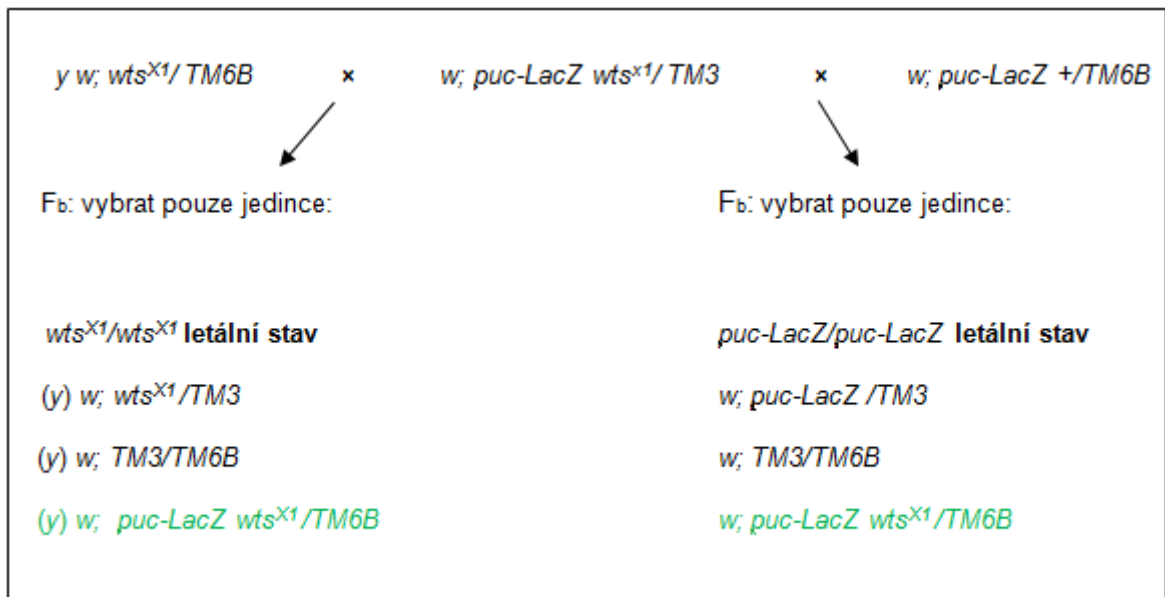
Pro křížení byly vybrány takové rodičovské drozofily, které nesly na 3. chromozomu *wts<sup>x1</sup>* a *puc-lacZ*. Z F<sub>1</sub> generace byla použita heterozygotní drozofila *y w/+ w; puc-LacZ +/+ wts<sup>x1</sup>* (u které mohlo dojít k rekombinaci). Ta byla dále zkřížena se samečkem *w; + + dco<sup>3</sup>/TM3, Sb Ser e* (na obrázku 6 je pro zjednodušení znázorněno pouze potomstvo obsahující TM3 balancer).

P:	<i>y w; wts<sup>x1</sup>/ TM6B</i>	×	<i>w; puc-LacZ +/TM6B</i>
F <sub>1</sub> :	<i>y w/+ w; puc-LacZ +/+ wts<sup>x1</sup></i>	×	<i>w; + + dco<sup>3</sup>/TM3</i>
F <sub>2</sub> :	<i>w; puc-LacZ +/TM3</i>		
	<i>w; wts<sup>x1</sup>/TM3</i>		
	<i>w; + +/ TM3</i>		
	<i>w; puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/ TM3</i>		

**Obr. 8:** Příprava heterozygotních drozofil nesoucích rekombinantní kombinaci *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>* na 3. chromozomu.

Ze získaného potomstva F<sub>2</sub> musíme získat ty správné drozofily a to na základě toho, že *wts<sup>x1</sup>/wts<sup>x1</sup>* je letální podobně jako *puc-LacZ/puc-LacZ*. Z F<sub>2</sub> generace byly vybráni samečci (ti správní jsou označeni zeleně), kteří byli individuálně zkříženi s oběma rodičovskými liniemi (viz Obr. 7).

Po zpětném křížení bylo zapotřebí vybrat správnou heterozygotní drozofilu s genotypem (*y*) *w; puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/TM6B, Hu Tb e* – poznáme ji tak, že se v příslušném potomstvu F<sub>2</sub> nebude vyskytovat ta část potomstva, která nenes balancerový chromozom.

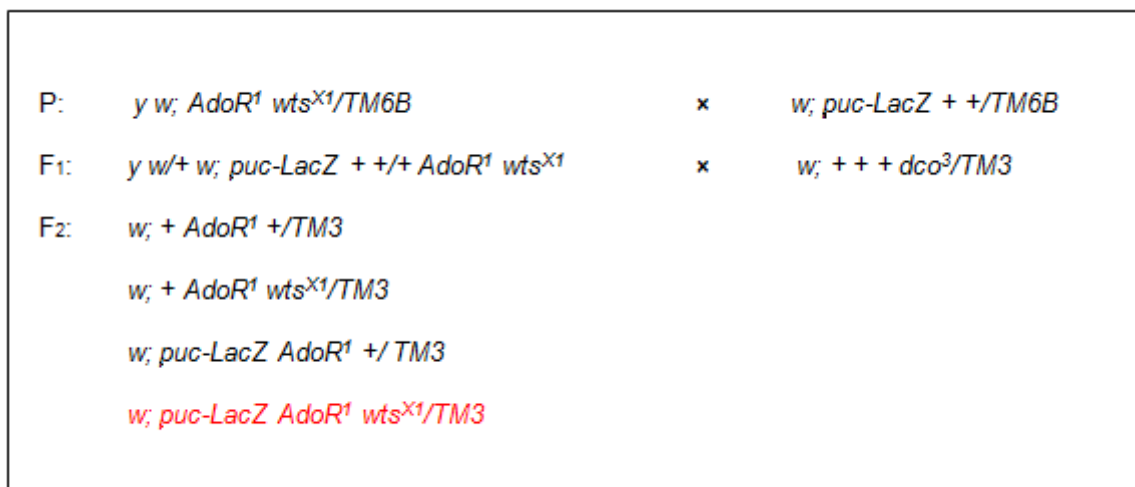


Obr. 9: Rozlišení drozofil nesoucích  $puc-LacZ wts^{X1}$  pomocí zpětného křížení.

Potvrzení správně vybrané heterozygotní drozofily (označeno zeleně) bylo ověřeno pomocí PCR reakce (viz kapitola 3.4.).

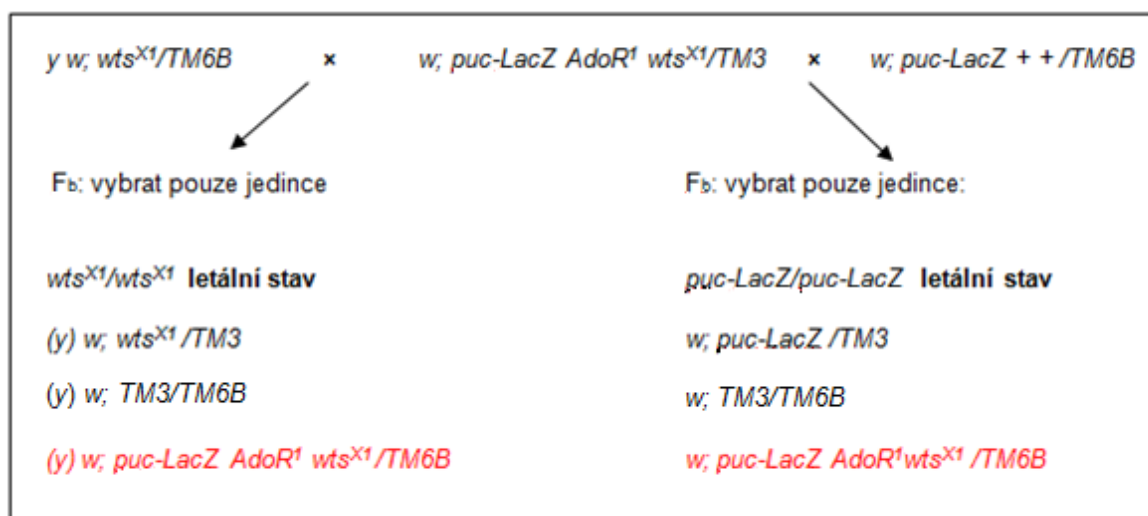
### 3.1.2 Heterozygotní drozofily nesoucí $puc-LacZ wts^{X1} AdoR^1$ na 3. chromozomu

Pro křížení byly vybrány takové rodičovské drozofily, které nesly na 3. chromozomu  $AdoR^1 wts^{X1}$  a  $puc-lacZ$ . Z F<sub>1</sub> generace byla použita drozofila  $y w/+ w; puc-LacZ + +/+ AdoR^1 (w^+) wts^{X1}$  a zkrížena se ♂  $w; + + + dco^3/TM3, Sb Ser e$ .



Obr. 10: Příprava heterozygotních drozofil nesoucích rekombinantní kombinaci  $puc-LacZ wts^{X1} AdoR^1$  na 3. chromozomu.

Z F<sub>2</sub> generace byly vybráni samečci (označeno červeně), kteří byli individuálně zkříženi s oběma rodičovskými liniemi. Po zpětném křížení bylo zapotřebí vybrat správnou heterozygotní drozofilu s genotypem (y) w; *puc-LacZ AdoR<sup>1</sup> wts<sup>X1</sup> /TM6B*, *Hu Tb e*

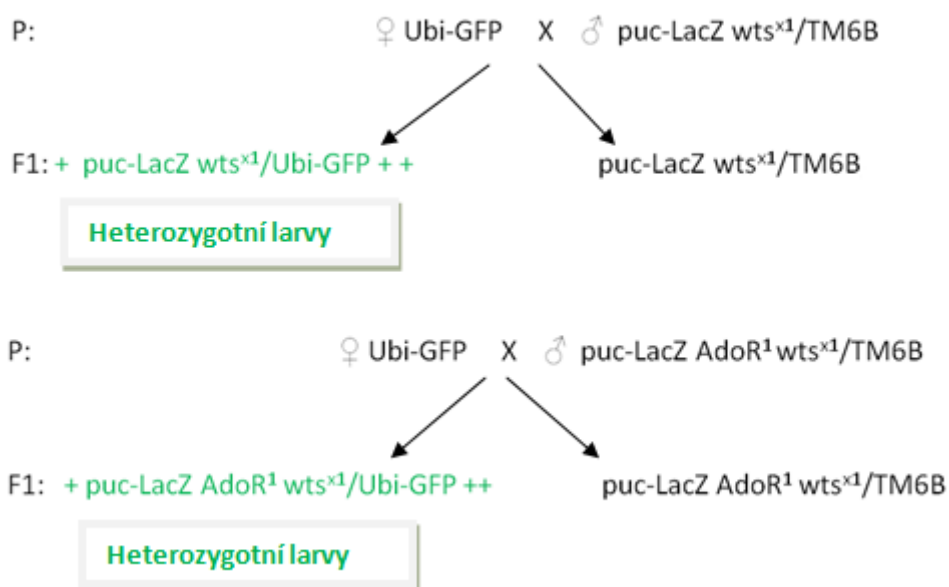


**Obr. 11:** Rozlišení drozofil nesoucích *puc-LacZ wts<sup>X1</sup> AdoR<sup>1</sup>* pomocí zpětného křížení.

Potvrzení správně vybrané heterozygotní drozofily (označeno červeně) bylo ověřeno pomocí PCR reakce (viz kapitola 3.4.).

### 3.2 Schémata křížení

Nezávisle byly provedeny dva typy křížení. Získání samečkové ze zpětného křížení s genotypem (y) w; *puc-LacZ wts<sup>X1</sup> /TM6B*, *Hu Tb e* byli zkříženi se samičkami nesoucí na 3. chromozomu *Ubi-GFP*. V F<sub>1</sub> byly vybrány heterozygotní larvy 3. instaru, které nenesly TM6B balancer. U druhého křížení byli vybráni samečci s genotypem (y) w; *puc-LacZ AdoR<sup>1</sup> wts<sup>X1</sup> /TM6B*, *Hu Tb e* a opět zkříženi se samičkami nesoucí na 3. chromozomu *Ubi-GFP*. V F<sub>1</sub> byly vybrány heterozygotní larvy 3. instaru, které nenesly *TM6B* balancer.



**Obr. 12:** Schémata křížení

### 3.3 Izolace genomové DNA pro PCR reakci

Pro přípravu DNA izolátů z dospělých drozofil byl použit “squishing” pufr (SP) (10mM Tris-HCl (pH 8,2), 1mM EDTA, 25 mM NaCl). Do 1 ml SP bylo přidáno 20  $\mu$ l 200  $\mu$ g/ml proteinázy K. Pro jednotlivé izolace byla použita jedna moucha, která byla rozmačkaná špičkou obsahující 50  $\mu$ l SP. Připravené izoláty byly inkubovány v 37°C na 30 minut. Pro inaktivaci proteinázy K byly vzorky zahřáty v 95°C na 2 minuty. Pro PCR reakci byly použity 2  $\mu$ l templátu (40 ng/ $\mu$ l).

### 3.4 PCR reakce

Celkový objem jedné PCR reakce činil 20  $\mu$ l. Reakce obsahovala tyto složky: 6  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l Master Mixu ( 2x konc. + Mg<sup>2+</sup> od Top - Bio), 1+1  $\mu$ l forward a reverse primerů (5  $\mu$ M) a 2  $\mu$ l templátu (40 ng/ $\mu$ l). Amplifikace proběhla v 35 cyklech, při teplotách: 95°C 40 s, 69°C 30 s a 72°C 1 min 30 s. Úvodní denaturace při 95°C 5 min a závěrečná elongace při 72°C 3 min (Gene Pro cycler).



Tab.I: Sekvence primerů použité na ověření inzertu puc-LacZ

Typ primeru	Sekvence ( od 5' k 3' konci)
Forward	GGTGATGGTGCTGCGTTGGAGTGAC
Reverse	GCTCCACAGTTTTCGGGTTTTTCGACG

### 3.5 Agarózová elektroforéza

Agarózový gel byl připraven jako 1% (0,6 g agarózy do 60-ti ml 1× TAE pufru - 40 mM Tris-CH<sub>3</sub>COOH; pH 8,2; 20 mM NaOAc; 1 mM EDTA; pH 8,0). Agaróza byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě a zchlazena na 50°C. Následně byl gel nechán ztuhnout v připravené elektroforetické vaně s příslušným hřebenem na jamky. Před nanášením vzorků na gel byly vzorky smíchány s 6× koncentrovaným nanášecím pufrům (s bromfenolovou modří). Vzorky byly porovnány se standardem (1 kb plus ladder, Thermo Scientific). DNA byla rozdělena na základě svého negativního náboje při napětí 90 V po dobu 45 minut. Následně by gel obarven v ethidium bromidu a vizualizován pod UV lampou.

### 3.6 Indukce *wts* klonů mutagenem

Pro křížení a následné kladení vajíček bylo vybráno 10 fertálních samic a 7 samečků, kteří byli umístěni do standardní vialky s médiem (120 g kukuřičné mouky v 1,2 l vody; 15 g agaru; 75 g cukru; 60 g instantních kvasnic a 50 ml konzervantu – 10% methylparaben v denaturovaném ethanolu). Po 36 – 40 h byli rodiče přemístěni do nové vialky s čerstvým médiem. První larvální instar byl ošetřen přidáním 0,3 ml roztoku cis-platiny. Cis - platina (Sigma - Aldrich) byla připravena jako 0,2 mg/ml vodný roztok o koncentraci 0,67 mM.

### 3.7 Detekce β-galaktosidázové aktivity X-gal barvením

#### 3.7.1 Příprava barvicího roztoku

Barvicí roztok byl složen z 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,8 ml; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7 ml; 5 M NaCl – 1,5 ml; 1 M MgCl<sub>2</sub> – 50 μl; 50 mM K<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] (červená krevní sůl; Sigma – Aldrich) – 3 ml; 50 mM K<sub>4</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] (žlutá krevní sůl; Sigma – Aldrich) – 3 ml a 40 ml H<sub>2</sub>O. Připravený barvicí roztok je stabilní měsíce při pokojové teplotě přikrytý alobalem.

Pracovní roztok byl připraven předvařením barvicího roztoku v 37°C na 5 min. Následně bylo přidáno 8 µl 8% X-galu na 300 µl barvicího roztoku. Předvařením barvicího roztoku se sníží srážlivost X-gal krystalů.

### **3.7.2 Příprava trvalých preparátů**

Vhodné heterozygotní larvy (lezoucího 3. instaru) byly vloženy do Ringerova roztoku a následně byly vypreparovány imaginální terčíky. Dále byla tkáň zafixována 1% glutaraldehydem (Penta)/ PBS po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Zafixované tkáně bylo třeba dvakrát opláchnout v promývacím pufru (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) na 10 min. Tkáně byly inkubovány v X-gal barvicím roztoku v 37 °C na 1 hodinu. Po inkubaci byly tkáně promyty v 1 X PBS na 20 minut. Tkáně byly přeneseny do kapky 80% glycerolu/PBS na podložní sklíčko a překryty krycím sklíčkem. Pro zafixování preparátu byl použit bezbarvý lak na nehty.

### **3.7.3 Vizualizace preparátů**

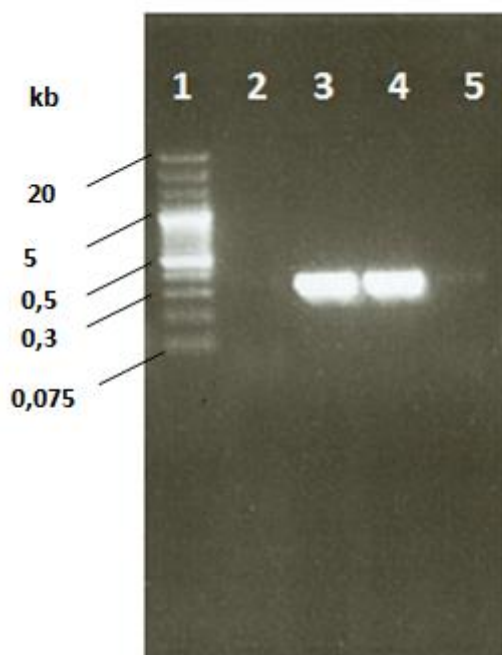
V průběhu přípravy trvalých preparátů byl použit stereo mikroskop, Discovery V8 od značky Zeiss s barevnou kamerou Canon, EOS 550 D; inverzní badatelský mikroskop IX73 od značky Olympus. Trvalé preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2 a nasnímány digitální barevnou kamerou DP73 značky Olympus.

## 4 Výsledky

### 4.1 PCR ověření inzertu *puc-lacZ*

Měla jsem nezávislé dva typy křížení, kdy mým úkolem bylo vytvořit takovou heterozygotní drozofilu, která v prvním případě nesla na 3. chromozomu *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/TM6B* a v druhém případě *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>AdoR<sup>1</sup>/TM6B*.

V F2 generaci jsem vybrala samečky *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/TM3*. TM3 balancer obsahuje dominantní markery *Stubble* (krátké a silné chloupky) a *Serrate* (křídla se zářezy). Následně jsem provedla sérii individuálních křížení s fertilními samičkami obou parentálních linií (*wts/TM6B* a *puc-LacZ/TM6B*). TM6B balancer obsahuje dominantní markery *Humeral* (extra chloupky na humeru) a *Tubby* (krátké silné tělo vzhledem k wt drozofilám). Pokud potomci individuálního křížení právě obsahovali TM6B balancer lze předpokládat i přítomnost *puc-LacZ* a mutace *wts<sup>x1</sup>*. Přítomnost inzertu *puc-lacZ* jsem ověřila přes PCR reakci (viz obrázek 11).



**Obr. 13:** PCR genu *lacZ*. 1: 1 kb plus ladder; 2: wt, 3: *wg-LacZ*, 4: *puc-LacZ*, 5 bez DNA

Očekávána velikost inzertu *puc-LacZ* byla 352 bp.

V F2 generaci jsem vybrala samečky *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>AdoR<sup>1</sup>/TM3*. TM3 balancer obsahuje dominantní markery *Stubble* (krátké a silné chloupky) a *Serrate* (křídla se zářezy). Následně jsem provedla sérii individuálních křížení s fertilními samičkami obou parentálních linií (*wts/TM6B* a *puc-LacZ/TM6B*). TM6B balancer obsahuje dominantní markery *Humeral* (extra chloupky na humeru) a *Tubby* (krátké silné tělo vzhledem k wt drozofilám). Pokud potomci individuálního křížení právě

obsahovali TM6B balancer lze předpokládat i přítomnost *puc-LacZ* a mutace *wts<sup>x1</sup>* a *AdoR<sup>1</sup>*. Přítomnost inzertu *puc-lacZ* jsem ověřila přes PCR reakci (viz obrázek 11).

## 4.2 Výsledná křížení

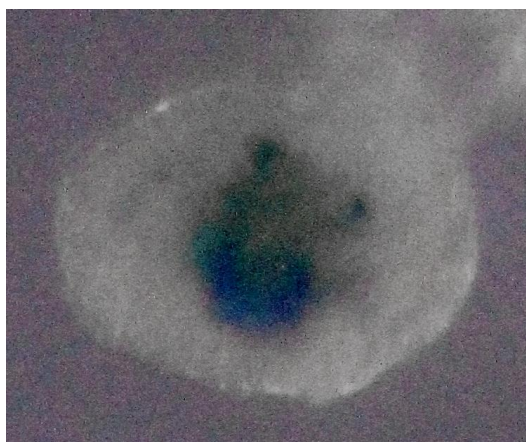
Pro výsledná křížení jsem vybrala fertlní samičky, které nesly na 3. chromozomu ubi-GFP. Vybrané samičky jsem použila na dvě nezávislá křížení, kdy jsem v prvním případě použila samečky s genotypem *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/TM6B* a v druhém případě samečky *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>AdoR<sup>1</sup>/TM6B*. Daná křížení probíhala ve standartních vialkách s čerstvým médiem. Po 36 – 40 hodinách jsem rodiče přemístila do nových vialek a předchozí vialky uchovala.

## 4.3 Indukce *wts* klonů mutagenem

První larvální instar jsem ošetřila přidáním 0,67 mM roztoku cis-platiny. Po zhruba 3 dnech jsem očekávala třetí larvální instar. Vybrala jsem heterozygotní larvy *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/Ubi-GFP* a *puc-LacZ wts<sup>x1</sup> AdoR<sup>1</sup>/Ubi-GFP*, které se velikostně lišily od jinak fenotypově wt larev. Následně jsem je schromáždila do Ringer roztoku a vypreparovala imaginální terčičky u obou typů larev.

## 4.4 Barvení imaginálních terčičků

Vypreparované imaginální terčičky jsem zafixovala v roztoku glutaraldehydu/PBS a následně dvakrát propláchla v promývacím pufru. Současně jsem připravila X-gal barvicí roztok. Inkubovala jsem zafixované tkáně v X-gal barvicím roztoku 1 hodinu při 37°C . Po inkubaci jsem tkáně promyla v PBS pufru.

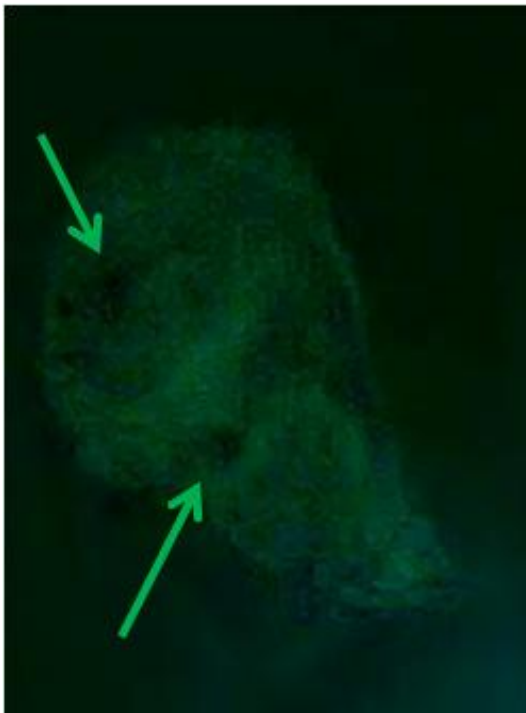


**Obr. 14:** Ukázka nožního terčičku vypreparovaného z *puc-LacZ/Ubi-GFP* larvy. Lze pozorovat modrý precipitát. Pozorováno pod stereo mikroskopem (Discovery V8, Zeiss; 8x zoom); foceno barevnou kamerou Canon (EOS 550 D) v PBS pufru.

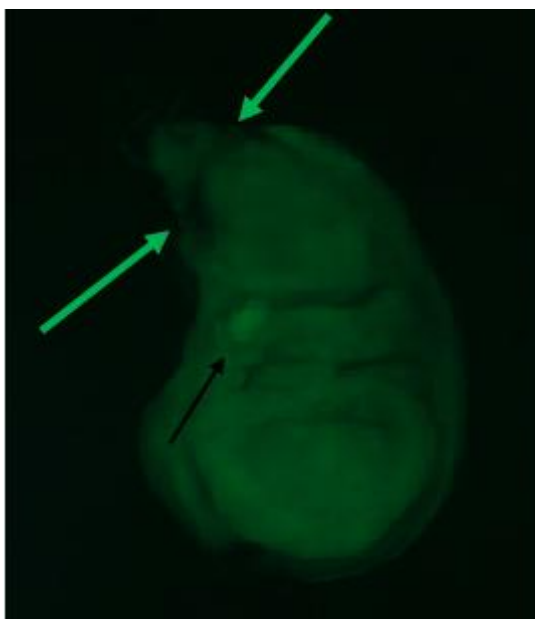
## 4.5 Příprava trvalých preparátů

Promyté tkáň jsem přenesla do kapky 80% glycerolu/PBS na podložní sklíčko a překryla krycím sklíčkem. Jemným tlakem jsem vytvořila klasický roztlakový preparát. Následně jsem okraje krycího sklíčka převrstvila bezbarvým lakem na nehty.

## 4.6 Vizualizace negativních GFP klonů



**Obr.15:** Ukázka negativních GFP klonů z křídelního terčíku vypreparovaného z *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/Ubi-GFP* larvy. Pozorováno pod stereo mikroskopem (Discovery V8, Zeiss; 8x zoom); foceno barevnou kamerou Canon (EOS 550 D) v PBS pufru.



**Obr. 16:** Ukázka negativních GFP klonů (označeno zelenými šipkami) a dvojnásobně zelený klon (označeno černou šipkou) z křídelního terčíku vypreparovaného z *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>AdoR<sup>1</sup>/Ubi-GFP* larvy. Pozorováno pod stereo mikroskopem (Discovery V8, Zeiss; 8x zoom); foceno barevnou kamerou Canon (EOS 550 D) v PBS pufru.

#### 4.7 Porovnání negativních GFP klonů a Lac-Z barvení

Ve stejných imaginálních terčících z *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>AdoR<sup>1</sup>/Ubi-GFP* larev jsem pod UV světlem zjistila GFP-negativní *wts* klony. Aktivace genu *puckered* jsem potvrdila ve stejných terčících a klonech za použití X-gal barvení.



**Obr. 17:** Ukázka křídelního terčíku z *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/Ubi-GFP* larvy, *x-gal* barvení (označeno modrou šipkou, negativní GFP klon (označeno černou šipkou). Pozorováno Zeiss Axioplan 2 mikroskopem při zvětšení 40x a foceno digitální barevnou kamerou DP73 značky Olympus.

## 5 Diskuze

V mé bakalářské práci jsem se snažila přispět k hypotéze, že adenosinový receptor je důležitým faktorem uplatňující se při buněčné kompetici. V přítomnosti funkčního *AdoR*<sup>+</sup> mají buňky *wts*<sup>x1</sup>/*wts*<sup>x1</sup> selekční výhodu nad WT buňkami. Naproti tomu v nepřítomnosti a tedy mutaci v *AdoR*<sup>1</sup> se selekční výhoda homozygotních *wts*<sup>x1</sup> buněk ztrácí (Sidorov *et al.* 2015). *AdoR* není potřebný pro vytváření *wts*<sup>x1</sup> klonů, ale spíše pro jejich růst a přežívání a ztráta funkčního *AdoR* možná nepatrně zvyšuje četnost ztráty heterozygotnosti klonů. Dříve bylo publikováno, že agonisti k adenosinovému receptoru snižují mutace u myši a lidských buněk, které byly ošetřeny alkylačními činidly nebo peroxidem vodíku (Wu *et al.* 2004). *AdoR* také interaguje s dalším tumor supresorovým genem *dco*, který je rovněž členem *wts* signální dráhy. Jak *wts*<sup>x1</sup>, tak *dco*<sup>3</sup> mozaikové klony vytváří rychle se rozrůstající hyperplastické výrůstky. Silné účinky adenosinového transportu a *AdoR* signalizace na životaschopnost buněk byl nedávno popsán u β- pankreatických buněk u zebřičky *in vivo* (Andersson *et al.* 2012).

Připravila jsem linie heterozygotních drozofil, které nesly rekombinantní kombinaci *puc-LacZ wts*<sup>x1</sup> a *puc-LacZ wts*<sup>x1</sup>*AdoR*<sup>1</sup> na 3. chromozomu. Pro výsledné křížení jsem vybrala linie drozofil, které byly vhodné pro indukci homozygotních klonů *wts*<sup>x1</sup>/*wts*<sup>x1</sup>.

GFP-negativní *wts* klony se ukázaly u obou typů testovaných larev *puc-LacZ wts*<sup>x1</sup>/*Ubi-GFP* a *puc-LacZ wts*<sup>x1</sup> *AdoR*<sup>1</sup>/*Ubi-GFP*, ale x-gal barvení jsem úspěšně potvrdila pouze u *puc-LacZ wts*<sup>x1</sup>/*Ubi-GFP*.

Vyzkoušela jsem si metodu detekce somatických mozaikových klonů a detekovala jsem v nich aktivitu signální dráhy JNK. Pro praktické použití pro výzkum aktivace dráhy JNK je však potřeba metodu dále optimalizovat. Za největší úskalí v mé práci byl malý počet a malá velikost indukovaných klonů *wts*<sup>x1</sup>/*wts*<sup>x1</sup>. Zejména se tento problém objevil u tumorových klonů *wts*<sup>x1</sup>*AdoR*<sup>1</sup>/*wts*<sup>x1</sup>*AdoR*<sup>1</sup>, kterých je ještě mnohonásobně méně než klonů *wts*<sup>x1</sup>/*wts*<sup>x1</sup>. Nedostatečnými zkušenostmi s preparací imaginálních terčů jsem si do preparátů vnesla mnoho artefaktů, které významně ovlivnily lokalizaci obarvených klonů. Podstatnou měrou se taktéž podílel fakt, že vypreparované imaginální terčů setrvaly delší dobu ve fyziologickém roztoku, pro schromažďování tkání pocházejících z obou typů testovaných larev. Modifikovala jsem podmínky barvení LacZ tak, aby se zachoval fluorescenční signál proteinu GFP a detekovala jsem několik *wts* klonů na základě nepřítomnosti markeru GFP.

Statistické vyhodnocení nebylo možné provést z důvodů nedostatečného množství zpracovaných vzorků. Tudíž se nelze ani vyjádřit k účinku adenosinového receptoru na přežívání nádorových klonů *wts* u *Drosophila melanogaster*.

Pro další práci by bylo daleko vhodnější použít indukci klonů enzymem flipázou, což je mnohem účinnější a zároveň se tímto vyhneme práci s mutagenní cis-platinou. (Pagliarini *et al.* 2003).

X-gal barvení ničí GFP, a proto by metoda barvení X-gal mohla být zlepšena použitím anti-LacZ protilátek, které by byly kombinované s GFP (Yoshioka *et al.* 2012).

Druhou možností by bylo použití fluorescenčního značení s pomocí *puc-Gal4* driveru, který by se kombinoval s reportérovým genem UAS-RFP. Za použití binárního systému exprese (Q systém), který je obdobný jako GAL4/UAS systém, založeného na regulaci genů z *Neurospora crassa qa* genového klastru. Q systém se skládá ze dvou regulačních proteinů QF a QS. Připojovací místo pro QF se nazývá QUAS (QF upstream activating sequences) a je alternativou k UAS u *Saccharomyces*. QF je transkripční regulátor, který se připojuje ke QUAS sekvenci a transkripčně aktivuje „downstream“ genu, alternativou GAL4. QS je QF represor QUAC promotoru, který efektivně blokuje QF prostřednictvím transkripční aktivace. QS represor může potlačit QF kyselinou chinovou, alternativa ke GAL80. Na QF založený MARCM (Mosaic analysis with a repressible cell marker) může být použit nezávisle nebo v připojení s GAL4 (Potter *et al.* 2010).



## 6 Závěr

Zavedla jsem potřebné metody X-gal barvení, které vedly k detekci mozaikových somatických klonů vyskytujících se v imaginálních terčících u *Drosophila melanogaster*. Provedla jsem konstrukce linií *D. melanogaster puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/TM6B* a *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>AdoR<sup>1</sup>/TM6B*, které byly vhodné pro tvorbu klonů. Dále jsem úspěšně provedla indukci cis-platinou a sledovala *wts<sup>x1</sup>/ wts<sup>x1</sup>* klony, které jsem detekovala pomocí nepřítomnosti markeru GFP. Prostřednictvím X-gal barvení jsem detekovala u heterozygotních larev *puc-LacZ wts<sup>x1</sup>/Ubi-GFP* modré zbarvení, které úzce souvisí s aktivací JNK dráhy. Nicméně se statisticky nelze vyjádřit k roli adenosinového receptoru na přežívání *wts* somatických mozaikových klonů.

## 7 Použitá literatura

Andersson O, Adams BA, Yoo D, Ellis G, Gut P, Anderson RM, German MS, Stainier DY (2012) Adenosine signaling promotes regeneration of pancreatic beta cells in vivo. *Cell Metab* 15: 885-894.

Brody T and Cravchik A (2000) *Drosophila melanogaster* G protein- coupled receptors. *J. Cell Biol.* 150: 83 – 88.

Chen W, White MA, Cobb MH (2002) Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* 277: 49105 – 49110.

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 103: 239–52.

Dolezelova E, Nothacker HP, Civelli O, Bryant P J, Zurovec M (2007) A *Drosophila* adenosin receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem. Mol.* 37: 318 – 329.

De Lorenzo C, Mechler B M, Bryant P J (1999) What is *Drosophila* telling us about cancer? *Cancer and metastasis reviews* 18: 295 – 311.

Pérez-Garijo A, Yaron Fuchs and Steller H (2013) Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *e-Life* 2: 1- 18.

Halder G, Johnson R L (2011) Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138 (1): 9 – 22.

Igaki T, Miura M(2014) The *Drosophila* TNF ortholog Eiger: Emerging physiological roles and evolution of the TNF system. *Seminar in immunology* 26: 267 – 274.

Justice R W, Zilian O, Woods D F, Noll M, Bryant P J (1995) The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development* 9:534-546.

Meyer SN, Amoyel M, Bergantinos C, de la Cova C, Schertel C, Basler K, Johnston LA (2014) An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition. *Science* 346: no. 6214.

Morata G, Martín F A (2007) Cell Competition: The Embrace of death. *Developmental Cell* 13 (1): 1 -2.

Morata G and Ripoll P (1975) Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Developmental Biology* 42 (2): 211 – 221.

Pagliarini RA, Xu T (2003) A genetic screen in *Drosophila* for Metastatic behavior. *Science* 302: 1227 – 1321.

Potter Ch J, Tasic B, Russler EV, Liang L, Luo L (2010) The Q system: A repressible Binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* 141: 536 – 548.

Sidorov R A, Ugnivenko EG, Khovanova EM, Belitsky G A (2001) Induction of tumor clones in *D. melanogaster* *wts*/+ heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutation Research* 498: 181 – 191.

Sidorov R, Kucerova L, Kiss I, Zurovec M (2015) Mutation in the *Drosophila melanogaster* adenosine receptor gene selectively decreases the mosaic hyperplastic epithelial outgrowth rates in *wts* or *dco* heterozygous flies. *Purinergic Signalling* 11: 95 – 105.

Staley BK Irvine KD (2010) Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr Biol.* 20(17): 1580-1587.

Tyler DM, Li W, Zhuo N, Pellock B, Baker NE (2007) Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* 175: 643 – 657.

Tyler DM, Baker NE (2007) Expanded and fat regulate growth and differentiation in the *Drosophila* eye through multiple signaling pathways. *Dev Biol* 305 (1): 187 – 201.

Vidal M, Larson DE, Cagan RL (2006) Csk-deficient boundary cells are eliminated from normal *Drosophila* epithelia by exclusion, migration, and apoptosis. *Dev cell* 10: 33 – 44.

Yoshioka Y, Tue N T, Fujiwara S, Matsuda R, Valadez-Graham V, Zurita M, Yamaguchi M. (2012) *Drosophila* DREF acting via the JNK pathway is required for thorax development. *Genesis* 50 (8): 599 – 611.

Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W, (1995) Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 121: 1053 – 1063.

Wu Y, Zheng J, Linden J, Holoshitz J (2004) Genoprotective pathways. Part I. Extracellular signaling through G (s) protein-coupled adenosine receptors prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res* 546 (1 – 2): 93 – 102.

Internetové zdroje:

URL 1: The brain from top to bottom (online), citováno dne 14. 4. 2015.

Dostupné z: [http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a\\_11/a\\_11\\_m/a\\_11\\_m\\_cyc/a\\_11\\_m\\_cyc.html](http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_11/a_11_m/a_11_m_cyc/a_11_m_cyc.html)

Knižní zdroje:

Snustad DP, D, Simmons MJ, Relichová J *Genetika*. Vyd. 1. Přeložil Anna Matalová. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 665 - 689. ISBN 978-80-210-4852-2.