

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Vliv oxidativního stresu na životaschopnost *Drosophila  
melanogaster***

**Bakalářská práce**

**Marie Kellerová**

Školitel: doc. RNDr. Michal Žurovec CSc.  
Školitel specialista: RNDr. Anna Žaloudíková

České Budějovice 2023

## **Bakalářská práce**

Kellerová, M., 2023: Vliv oxidativního stresu na životaschopnost *Drosophila melanogaster*. [The effect of oxidative stress on the viability of *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Oxidative stress is an expression of the imbalance between free radicals and antioxidants in the body. It is involved in the development of many diseases, contributes to aging, and plays an important role in the immune system. A number of signaling pathways are involved in the regulation of oxidative stress, it is influenced by the level of metabolism and the function of a number of enzymes. Among the most important enzymes involved in the regulation of oxidative stress is glutathione peroxidase (GPX). In this study, we investigated the silencing of the gene for *GPX* in *D. melanogaster* and observed the effects of the adenosine pathway on the level of oxidative stress. We monitored stress levels by tracking fly viability and measuring protein carbonylation. Our results showed that knocking out the gene for *GPX* led to a sharp increase in oxidative stress. At the same time, the adenosine signaling pathway was shown to have no effect on this increase.

## **Prohlášení**

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

**V Českých Budějovicích**

**Dne 10. dubna 2023**

.....

**Marie Kellerová**

## **Poděkování**

Nejdříve bych chtěla vyjádřit vděčnost svému školiteli prof. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSc. za možnost pracovat na své bakalářské práci v laboratoři molekulární genetiky na Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR. Chtěla bych mu také poděkovat za obrovskou podporu, zejména při dokončování mé práce. Další dík patří mé konzultantce paní RNDr. Anně Žaloudíkové za trpělivost, kterou se mnou měla při seznamování jednotlivých metod a spolu vedení mé práce. Chtěla bych také poděkovat svým spolupracovníkům, Mgr. Václavu Brožovi, Ph.D., Růženě Kuklové, Ing. Peteru Kmeťovi a Mgr. Lence Rouhové, kteří byli více než ochotni pomoci pokaždé, když jsem potřebovala. Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu při studiu.

## Seznam použitých zkratk

AdoR	adenosinový receptor
<i>AdoR<sup>l</sup></i>	mutace v adenosinovém receptoru
ATP	adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
bp	pár bazí
CAT	kataláza
cDNA	complementary DNA, DNA syntetizovaná z jednovláknové
CGD	chronické granulomatózní onemocnění
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
$-C - O - O$	peroxylový radikál
<i>CyO GFP</i>	Curly O – balancer; GFP – zelený fluorescenční protein
dd $H_2O$	dvojitě destilovaná voda, ultračistá
DEPC $H_2O$	voda bez nukleáz, sterilně filtrovaná s přídavkem diethylpyrokarbonát (DEPC) a autoklávovaná
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNáza	hydrolytický enzym schopen štěpit DNA
<i>DNPH</i>	2,4-dinitrofenylhydrazin
<i>dNTP</i>	deoxynukleotid trifosfát
dsRNA	dvouvláknová RNA
<i>EDTA</i>	kyselina ethylendiamintetraoctová
ENT	ekvilibrační nukleosidový transportér
GPX	gluthathion peroxidáza
GSH	gluthathion
<i>GS - SG</i>	gluthathion disulfid
<i>GdmCl</i>	guanidin hydrochlorid
$H_2O_2$	peroxid vodíku
<i>HCl</i>	kyselina chlorovodíková
$K - PO_4$	potassium phosphate
<i>MDB</i>	membrane desalting buffer
mRNA	messengerová RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
<i>NaCl</i>	chlorid sodný
NADH	redukovaná forma nikotinamidadeninukleotid (NAD)

NADPH oxidáza	enzym katalyzující produkci superoxidového aniontu redukcí kyslíku
např.	například
nM	nanomol, jednotka molární koncentrace
NTC	no template control, kontrola neobsahující templát
$O_2^-$	peroxidový radikál
$\cdot OH$	hydroxylový radikál
°C	stupně Celsia
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR (RT-PCR)	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time PCR)
rDNáza	deoxyribonukleáza bez příměsi ribonukleáz
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
RNáza	ribonukleáza
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
siRNA	small interfering RNA
SOD2	superoxiddismutáza 2
TCA	kyselina trichloroctová
TRIS	trisaminomethan
tzv.	tak zvaných
UAS	upstream activating sequence
UV	ultrafialové světlo
VDRC	Vienna Drosophila Stock Center
$\mu l$	mikrolitr

## Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Octomilka obecná ( <i>Drosophila melanogaster</i> ).....	1
1.2. Oxidativní stres.....	4
1.2.1. Vznik volných radikálů v dýchacím řetězci .....	4
1.2.2. Účinky reaktivních forem kyslíku na organismus.....	5
1.3. Anti-oxidativní obrana.....	6
1.3.1. Mechanismus anti-oxidativních enzymů .....	7
1.3.2. Gluthathion peroxidáza.....	9
1.4. Adenosin .....	10
1.4.1. Adenosinový receptor.....	11
1.5. Souvislost adenosinu s oxidativním stresem .....	11
2. Cíl práce .....	13
3. Materiály a metody.....	14
3.1. Materiály .....	14
3.2. Metody .....	14
3.2.1. Viabilita, poměr genotypů a test délky života dospělců.....	14
3.2.2. Křížení much .....	17
3.2.3. Izolace DNA .....	17
3.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	18
3.2.5. Gelová elektroforéza.....	19
3.2.6. Stanovení karbonylů a bílkovin.....	19
3.2.7. Real-time RT PCR (neboli gPCR) .....	20
4. Výsledky.....	24
4.1. Poměr genotypů narozeného potomstva.....	24
4.2. Srovnání délky života .....	25
4.3. Ověření přítomnosti <i>AdoR<sup>1</sup></i> mutace .....	28

4.4.	Hodnota karbonylů v jednotlivých genotypch .....	29
4.5.	Expresse genu GPX v genotypch <i>w</i> ; <i>UAS – GPXRNAi</i> ; + a <i>w</i> ; <i>UAS – GPXRNAi</i> ; <i>AdoR1</i> .....	30
5.	Diskuse .....	32
5.1.	Oxidativní stres zkracuje délku života <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
5.2.	<i>AdoR<sup>1</sup></i> mutace nezachraňuje drozofilu s nefunkční <i>GPX</i> .....	32
5.3.	Samotná <i>AdoR<sup>1</sup></i> mutace negativně ovlivňuje životaschopnost <i>Drosophila melanogaster</i> .....	33
6.	Závěr.....	35
7.	Literatura .....	36
8.	Přílohy .....	41

## 1. Úvod

Na vnitřní mitochondriální membráně dochází k jednomu z nejdůležitějších procesů probíhajících v buňce, který má za úkol zajistit tvorbu nových molekul ATP sledem reakcí známých jako respirační řetězec (Nelson & Cox, 2005). V tomto sledu reakcí oxidačně – redukčních dějů přechází přes membránu elektrony pomocí elektronových přenašečů až na konečný akceptor – kyslík, přičemž vzniká protonový gradient. Protonový gradient pohání vodík zpět přes membránu prostřednictvím ATP syntázy produkující ATP. Molekula ATP je využívána jako zdroj energie, která je potřebná pro správnou funkci buněk. Během tohoto děje se uvolňují meziprodukty nazývané volné radikály. Volné radikály jsou atomy s nepárovým počtem elektronů, což z nich činí velmi reaktivní a nestabilní látky (Burton & Jauniaux, 2011). Vzniklý reaktivní volný radikál může reagovat se stabilními molekulami za vzniku nových volných radikálů.

V malých koncentracích jsou volné radikály buňkou využívány k buněčné signalizaci (Brieger et al., 2012). Jejich množství je však nutné přísně regulovat pomocí anti-oxidativních enzymů a malých anti-oxidativních molekul. Pokud totiž dojde k jejich nadprodukcí vlivem stresu na organismus, spustí se řetězové reakce poškozující proteiny, lipidy, nukleové kyseliny i polysacharidy. Tento děj se nazývá oxidativní stres.

V laboratoři prof. Michala Žurovce při práci s *Drosophila melanogaster*, která měla mutaci v adenosinovém receptoru (*AdoR<sup>1</sup>*), byla vyslovena hypotéza, že adenosin a její receptor mohou být důležité pro buňku bránící se oxidativnímu stresu. Drozofila s tímto typem mutace totiž po vystavení se pesticidům dokázala přežít déle než drozofila, která mutaci v adenosinovém receptoru neměla.

Tato bakalářská práce navazuje na práci RNDr. Anny Žaloudíkové, která byla zaměřena na testování výše zmíněné hypotézy navozením oxidativního stresu zablokováním detoxifikačního enzymu superoxid dismutázy 2 (SOD2). Tato práce se bude zabývat testováním hypotézy zablokováním enzymu glutathion peroxidázy (GPX).

### 1.1. Octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*)

Modelovým organismem pro tento výzkum byla zvolena octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*). Jedná se o dvoukřídlý hmyz o rozměrech 2 – 3 mm vyskytující se po celém světě. Taxonomicky je zařazována do kmene členovci (*Antropoda*), třídy hmyz (*Insecta*), řádu dvoukřídlí (*Diptera*) a čeledi octomilkovití (*Drosophilidae*) (Schoch et al., 2020).

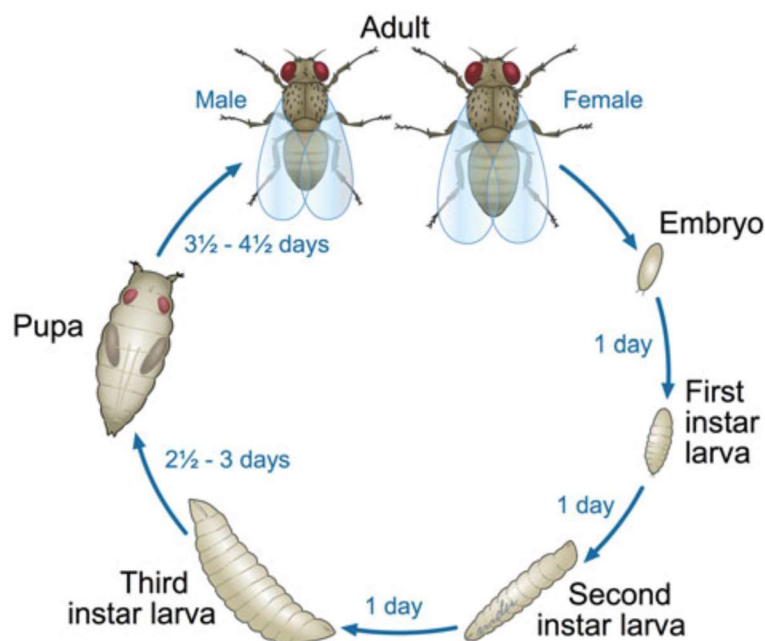


Délka života se pohybuje mezi 40 až 120 dny (Abolaji et al., 2013; Hirth, 2010), přičemž je ovlivňována několika faktory. Prvním jsou stresové podmínky prostředí, jakými jsou například teplota, vlhkost okolí a velikost populace (Joshi & Mueller, 1997; Hirth, 2010). Druhým velmi důležitým faktorem je strava (Hirth, 2010). Kupříkladu jídelníček, který zahrnuje kukuřičnou mouku, octomilce přispívá k délce života, ale pokud bude krmena potravou s vysokým obsahem sacharidů a cholesterolu, tato délka se zkrátí (Hirth, 2010). Při chovu v laboratořích je tedy nejčastěji krmena médiem obsahujícím kukuřičnou mouku, glukózu, agar a fungicid (Rand, 2010). Dalším v řadě ovlivňujících faktorů je pohlavní aktivita. Plodnost je totiž součástí zdravého životního stylu, a tudíž úzce souvisí s délkou života (Staats et al., 2018).

Octomilka se vyznačuje rychlým životním cyklem, kdy jeden pářící se pár je schopen během 10-12 dní při teplotě 25 °C vyprodukovat obrovské množství potomstva (Pandey & Nichols, 2011). Od jedné samice je možné očekávat až 300 potomků, přičemž vajíčka jsou kladena na potravu (Žurovec, 1999). Po naklazení je možné sledovat čtyři vývojová stadia a těmi jsou embryo, larva, kukla a dospělec (Ong et al., 2015). Díky vnějšímu vývoji octomilky jej můžeme pozorovat pod mikroskopem.

Do 24 hodin od naklazení se vylíhne larva prvního instaru. Po dobu čtyř dní se krmí a roste (3 larvální instary), přičemž její hmotnost se dokáže zvýšit až 200krát, což je způsobeno především endoreplikací larvální tkáně (Ong et al., 2015). Larva obsahuje tzv. imaginální disky, ze kterých později vznikají vnější struktury dospělé octomilky. Těmi jsou tykadlo, křídla, končetiny a složené oko (Yamaguchi & Yoshida, 2018). V té samé fázi (přibližně čtyři dny od naklazení) se larva přestává živit a opouští potravu za účelem hledání si vhodného místa pro zakuklení (Ong et al., 2015). Stádium kukly přetrvává další čtyři dny a octomilka během něho prochází metamorfózou. Imaginální disky podstupují procesy zakončené organogenezí, při které vzniknou dospělé formy orgánů. V té samé době zároveň většina larválních tkání zaniká (Yamaguchi & Yoshida, 2018).

V dospělém stádiu je již snadné opticky rozeznat pohlaví. Samice jsou obvykle větší než samci a do 24 hodin od vylíhnutí jsou připravené k páření. Samci mají na konci abdomenu na břišní straně tzv. „pohlavní věneček“; konec abdomenu je obvykle tmavě zbarven a na předním páru nožiček mají tmavý „pohlavní hřebínek“.



**Obr. 1:** Ukázka životního cyklu octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) (Ong et al., 2015).

Octomilka představuje složitý systém, který je ve spoustě ohledech velmi podobný savcům. Její mozek se skládá z více než 100 000 neuronů řídících cirkadiální děje, paměť, páření, krmení, navigaci při letu, a dokonce i agresivitu (Pandey & Nichols, 2011). Z tohoto důvodu je používána jako vhodný model ve velkém množství výzkumů. Toxikologické studie používají již raná stádia vývoje (embryo, larva), přičemž larva se využívá i při experimentech zkoumajících učení a paměť a studiích fyziologických a behaviorálních procesů (Yamaguchi & Yoshida, 2018). V dospělosti octomilka často reaguje na léky velmi podobným způsobem jako savci (Abolaji et al., 2013).

Jelikož je drozofila studována více než sto let, o její genetice je známo obrovské množství informací. Octomilka má čtyři páry chromozomů – pohlavní chromozomy X či Y, dva autozomy (nazývané 2 a 3) a jeden poměrně malý chromozom (4) (Yamaguchi & Yoshida, 2018). V nich bylo identifikováno přibližně 13 600 genů, z nichž 95 % se nachází na třech chromozomech (Rand, 2010). Z provedené analýzy bylo také zjištěno, že 77 % genů souvisejících s lidskými nemocemi vykazuje podobnost s geny octomilky (Reiter et al., 2001) stejně jako proteiny regulující genové exprese a metabolismus (Ong et al., 2015).

Dalším z důvodů, proč je octomilka často vybírána jako modelový organismus, jsou její nízká náročnost a snadný chov v laboratoři (Hirth, 2010). Bývá chována při teplotě 25 °C ve zkumavkách (tzv. vialkách) či větších lahvích, na jejichž dně je umístěna pevná potrava připravena z kukuřičné mouky, glukózy, agaru a fungicidu (Rand, 2010).

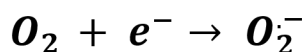
## 1.2. Oxidativní stres

Oxidativní stres lze definovat jako nerovnováhu mezi produkcí volných radikálů (reaktivních forem kyslíku, ROS) a anti-oxidativní obranou (Pisoschi & Pop, 2015). Výskyt tohoto jevu se zvyšuje se zvyšujícím se věkem, přičemž jsou ovlivňovány běžné funkce tkání (Cabello-Verrugio et al., 2017), a následkem toho způsobeny různé typy onemocnění. Bylo zjištěno, že tento děj vzájemně souvisí s více než sto chorobami, ať už jako jejich zdroj či následek (Pisoschi & Pop, 2015). Mezi takové se řadí například neurodegenerativní či kardiovaskulární onemocnění, diabetes a v neposlední řadě i proces stárnutí. Je ovšem nutné zmínit, že v nízkém množství produkce volných radikálů nemusí být pro organismus škodlivá, ba naopak je nezbytná pro spoustu fyziologických procesů (Brieger et al., 2012). Přírodním producentem jsou mitochondrie, kde ROS vznikají z molekuly kyslíku.

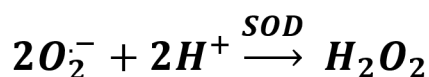
### 1.2.1. Vznik volných radikálů v dýchacím řetězci

Molekulární kyslík se označuje jako biradikál, což znamená, že ve svých valenčních vrstvách obsahuje dva nespárované elektrony (Turrens, 2003). Z této definice vyplývá, že se jedná o poměrně reaktivní látku se schopností vysokoenergetických přenosů elektronů, díky čemuž napomáhá tvorbě obrovského množství ATP při oxidativní fosforylaci (Burton & Jauniaux, 2011). V dýchacím řetězci slouží jako konečný akceptor elektronů a je posléze přeměňován na neškodnou vodu, což se nazývá tetravalentní redukce kyslíku (Davies, 1995). Ovšem zároveň probíhá i univalentní redukce kyslíku, při které v každém kroku dochází ke vzniku reaktivních meziproductů, tedy volných radikálů.

K jejich produkci dochází na komplexech I a III, kdy částečně redukovaný ubichinonový radikál daruje elektron molekule kyslíku, čímž vznikne superoxidový anion ( $O_2^-$ ).



Z tohoto typu volného radikálu poté mohou vznikat další druhy. Patří mezi ně kupříkladu peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) sice není již radikálem, jelikož má elektrony ve valenční vrstvě spárované, ale stále dokáže být velmi toxickou molekulou pro organismus. Pokud totiž zreaguje s kovy, vzniká hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ), který se řadí mezi nejreaktivnější typy ROS.





Rychlost formace volných radikálů závisí na počtu elektronů přítomných v řetězci, zvyšuje se tedy ve stavech hyperoxie či zvýšeného množství glukózy, ale paradoxně k tomu tak dochází i ve stavu hypoxie (Burton & Jauniaux, 2011). Obecně se předpokládá, že jejich produkce v mitochondriích připadá na 1–2 % celkové spotřeby kyslíku (Filomeni et al., 2015).

Nicméně existují i jiné zdroje volných radikálů. Ty se obecně dělí na vnější a vnitřní. Mezi vnější faktory zvyšující produkci se řadí například různé druhy chemikálií, UV či ionizující záření (Blokhina et al., 2003; Filomeni et al., 2015). Mezi vnitřní se kromě dýchacího řetězce řadí i fagocytující buňky, jakými jsou neutrofilů, monocytů a makrofágů (Davies, 1995).

### 1.2.2. Účinky reaktivních forem kyslíku na organismus

Jak bylo již zmíněno výše, volné radikály dokážou být prospěšné organismu, ovšem jen za předpokladu, že jejich úroveň je udržována na nízkých hladinách. V takových případech jsou součástí signalizačních kaskád, které jsou schopné vyvolat odpověď na stimulaci růstovými faktory (Brieger et al., 2012). Zároveň se účastní regulací buněčných procesů, jakými jsou diferenciaci, proliferaci, růst, apoptóza či migraci (Brieger et al., 2012).

Jedním z příznivých a zásadních vlivů na organismus je důležitost reaktivních forem kyslíku v imunitní reakci, kde se uplatňují při zneškodňování mikroorganismů a omezování specifické imunitní odpovědi a zánětu. Existují o tom důkazy u pacientů s chronickým granulomatozním onemocněním (CGD), které je právě způsobeno nedostatkem fagocytární NADPH oxidázy zodpovědné za tvorbu reaktivních forem kyslíku (Brieger et al., 2012). Tito pacienti trpí imunodeficiencí spojenou s opakovanými infekcemi, jelikož fagocytující buňky nemohou bez ROS provést účinnou fagocytózu bakterií, hub a mikrobů (Brieger et al., 2012).

Dále je důležité zmínit funkci peroxidu vodíku jako nezbytného kofaktoru thyroperoxidázy, enzymu účastnícího se posledního kroku v produkci thyroidních hormonů (Brieger et al., 2012). Předpokládá se, že ROS také napomáhají ovlivňovat kognitivní funkce či stárnutí.

Negativní důsledky reaktivních forem kyslíku jsou naopak vyvolány v případě obrovské nadprodukce, kdy kontrolní mechanismy nejsou schopné ji vyvažovat. V takovém případě dochází k tvorbě řetězových reakcí, které zasahují proteiny, lipidy i nukleové kyseliny.

Oxidace lipidů má škodlivý účinek na buněčné membrány. Zejména hydroxylový radikál podněcuje k peroxidaci nenasycených mastných kyselin odebráním vodíku z postranního řetězce za vzniku peroxylového radikálu ( $-C - O - O$ ) (Burton & Jauniaux, 2011). Za přítomnosti molekuly kyslíku, reakce pokračuje dál velkou rychlostí, při které hrozí riziko, že může dojít ke zničení 200–400 lipidových molekul před zastavením reakce (Jones, 2008). Oxidace lipidů může též vést ke vzniku reaktivních aldehydů, jejich následnému navázání na proteiny a narušení funkce (Pisoschi & Pop, 2015).

ROS u proteinů způsobuje také poškození jejich integrity, ztrátu katalytické aktivity u některých enzymů a neschopnost regulovat metabolické dráhy způsobením jejich oxidace (Juan et al., 2021). Ta může nastat přímou oxidací postranního řetězce, fragmentací molekul a chybným složením aminokyselin (Pisoschi & Pop, 2015).

Co se týče molekuly DNA, několik studií charakterizovalo účinky ROS zahrnující jednovláknové či dvouvláknové zlomy a poškození bazí (Yakes & Van Houten, 1997). Zranitelnou je zvláště mitochondriální DNA (mtDNA), která i za normálních podmínek podléhá 5–10krát více mutacím než jaderná DNA (Burton & Jauniaux, 2011). Hlavním důvodem je její umístění, nachází se totiž velmi blízko místa vzniku superoxidového aniontu, jelikož její funkcí je kódování několika enzymů elektronového transportního řetězce (Burton & Jauniaux, 2011). V případě mutace mtDNA dochází tedy ke zhoršené produkci ATP, přičemž se zvyšuje riziko dalšího úniku elektronů, tudíž i vyšší hladiny oxidativního stresu. V takovém případě dochází k aktivaci specifické stresové odpovědi, adaptivnímu mechanismu, jehož cílem je chránit buňky před ROS (Schreibelt et al., 2007).

### **1.3. Anti-oxidativní obrana**

Za biologický antioxidant je považována jakákoli sloučenina se schopností zpomalení či úplného zabránění oxidace substrátu (Pisoschi & Pop, 2015). Existují dva typy antioxidantů – exogenní a endogenní.

Exogenní antioxidanty, za jaké lze označit vitaminy C a E či karotenoidy, lze získat z potravy, především z ovoce a zeleniny. Je možné je také získat z doplňků stravy při nedostatečném množství v organismu. V takovém případě však hrozí riziko ovlivnění antioxidantního potenciálu buněk, kdy v důsledku toho může dojít ke zpomalení vstřebávání endogenních antioxidantů (Pisoschi & Pop, 2015).

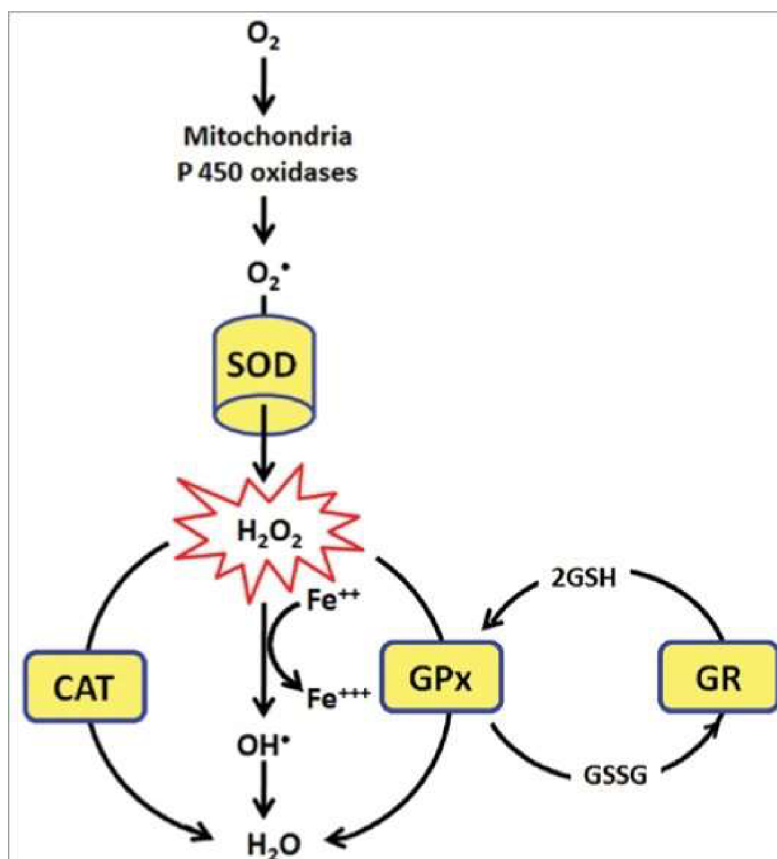
Endogenní antioxidanty vznikají v organismu a nachází se ve vodných a membránových kompartmentech buňky. Lze je dále rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Mezi nejdůležitější enzymatické antioxidanty se řadí enzymy superoxid dismutáza, kataláza či

gluthathion peroxidáza. Tyto enzymy jsou zodpovědné za intracelulární obranu (Shanker et al., 2005). Co se týče neenzymatických antioxidantů, mezi ty patří například gluthathion, proteiny (albumin, feritin či transferin), koenzym Q a kyselina močová (Pisoschi & Pop, 2015).

Každý z antioxidantů má svou specifickou funkci, přičemž současně kooperuje s ostatními. Dle jejich účinku je možné je rozdělit na antioxidanty blokuující řetězce, které brání šíření řetězových reakcí a na tzv. preventivní antioxidanty, které brzdí tvorbu nových řetězců (Somogyi et al., 2007). Společně tedy zabraňují šíření ROS či inhibují jejich reakce s molekulami.

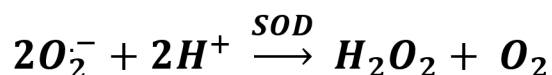
### 1.3.1. Mechanismus anti-oxidativních enzymů

Enzymatické antioxidanty jsou zodpovědné především za obranu intracelulárního prostředí proti superoxidovému aniontu (Somogyi et al., 2007). Mezi nejdůležitější, jak bylo již zmíněno výše, se řadí superoxid dismutáza, kataláza a gluthathion peroxidáza.



**Obr. 2:** Přehled hlavních anti-oxidativních enzymů a jejich funkce (Pandey & Rizvi, 2010).

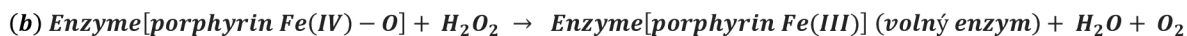
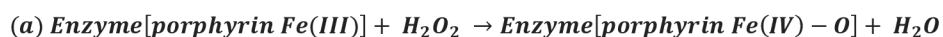
První v pořadí se po vzniku superoxidového aniontu uplatňuje superoxid dismutáza (SOD). Jedná se o skupinu enzymů (SOD1, SOD2, SOD3), které katalyzují reakci zvanou dismutace superoxidových radikálů. Při dismutaci dochází k oxidaci a zároveň redukci superoxidových aniontů, a konečným produktem je peroxid vodíku.



Ten je sice stabilnější, má dokonce důležitou funkci související s přenosem signálů, buněčným růstem, proliferací, diferenciací a apoptózou (Domínguez et al., 2010), ovšem má také schopnost difuze skrze membrány. Zvyšuje se tudíž riziko reakce s přechodnými kovy (tzv. Fentonova reakce), při které vzniká reaktivní hydroxylový radikál.

Je tedy nutné, aby docházelo k detoxifikaci této molekuly a tu zajišťují enzymy kataláza a glutathion peroxidáza. Tyto dva enzymy katalyzují sice stejnou reakci, ale každý z nich má jiný mechanismus provedení.

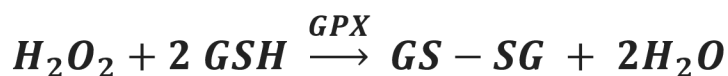
Kataláza (CAT), enzym u drozofily exprimovaný převážně v malphigických trubicích a tukovém tělese (Yang et al., 2007), katalyzuje dismutaci peroxidu vodíku ve dvou krocích. Nejdříve dochází k redukci jedné molekuly peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), přičemž vzniká kovalentní oxyferolová forma ( $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$ ) s porfyrinovým  $\pi$ -kationtovým radikálem (sloučenina I) a molekula vody (Nandi et al., 2019). V druhém kroku druhá molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  předá sloučenině I dva elektrony a výsledkem je její redukce a vznik druhé molekuly vody, molekulárního kyslíku a volného enzymu (Nandi et al., 2019).



**Obr. 3:** Jednotlivé kroky reakce peroxidu vodíku s katalázou: (a) první krok, (b) druhý krok (Nandi et al., 2019).

Na rozdíl od katalázy využívá glutathion peroxidáza (GPX) k detoxifikaci molekulu glutathion (GSH), což je všudypřítomný redoxní činitel většiny aerobních organismů (Fu et al., 2007). Tato molekula se skládá z cysteinu, glycinu a glutamátu (Mytilineou et al., 2002). Jeho význam vyplývá z několika studií, které uvedly, že u savců je GSH proti oxidačnímu stresu účinnější dokonce více než kataláza (Ehrhart & Zeevalk, 2001; Panday et al., 2020).

Společně s glutathion peroxidázou tvoří GSH/GPX systém, kde detoxifikují peroxid vodíku na vodu, přičemž se GSH oxiduje na glutathion disulfid ( $GS - SG$ ).



Kromě redukce peroxidu vodíku (GPX je zodpovědná až za 70 % detoxifikace v endoteliálních buňkách (Forgione et al., 2002)) je také zodpovědná za redukci lipidových hydroperoxidů na odpovídající alkoholy (Pisoschi & Pop, 2015).



Z mnoha studií vyplývá, že nedostatek GSH a GPX je schopen způsobit endoteliální dysfunkci a apoptózu (Panday et al., 2020).

### 1.3.2. Glutathion peroxidáza

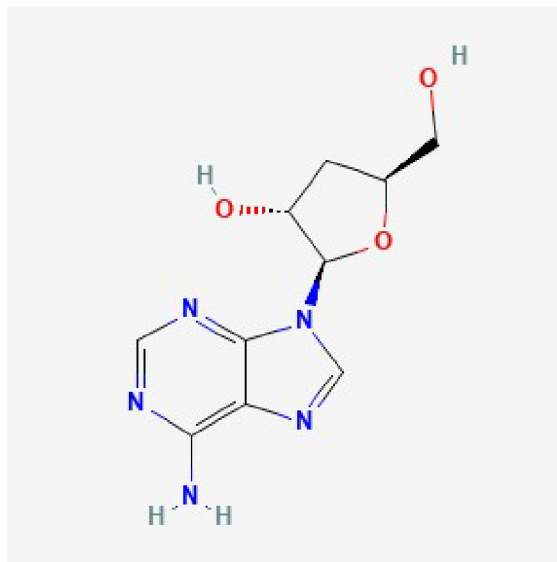
Glutathion peroxidáza představuje skupinu fylogeneticky příbuzných enzymů, z nichž 5 obsahují selenocystein. Předpokládá se, že přítomnost selenocysteinu je důležitá pro zaručení rychlé reakce s hydroperoxidem a zároveň rychlé redukovatelnosti pomocí GSH (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Do dnešní doby bylo u savců identifikováno celkem osm typů GPX (GPX1 – GPX8) (Smeyne & Smeynen, 2013), které jsou si navzájem velmi podobné.

U drozofily byly zjištěny zatím pouze dva typy genů pro tento enzym (*CG12013* a *CG15116* (Missirlis, 2003; The FlyBase Consortium, 2003)). *CG12013* (který byl použit v této práci) byl lokalizován v Golgiho komplexu a exprimuje se v několika strukturách (např. trávicí soustava či žloutkové jádro). Bylo zjištěno, že se podílí na několika procesech – odpovědi na oxidativní stres a také stres endoplazmatického retikula (Missirlis, 2003). Při porovnání s lidskými typy GPX byla zjištěna určitá podobnost s lidskou GPX4. Stejně tomu bylo i druhého identifikovaného genu (*CG15116*), který se nachází v extracelulárním prostoru a u kterého se předpokládá, že se podílí na peroxidázové aktivitě (vyvíjené proti oxidativnímu stresu) a pohlavním rozmnožování (Missirlis, 2003; The FlyBase Consortium, 2003).



#### 1.4. Adenosin

Adenosin je ubikvitární endogenní purinový nukleosid (Cunha R. A., 2008; Novotný J., 2015). Z chemického hlediska se jedná o 6-amino-9-beta-ribofuranosyl-9-H-purin (Neumannová, 2014; Novotný J., 2015).



**Obr. 4:** Strukturální vzorec adenosinu (zdroj:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/adenosine#section=2D-Structure>).

Za obvyklých podmínek se adenosin vně buněk udržuje v koncentracích v řádech desetin nM (Cunha R. A., 2008). Kromě toho je jednou z ústředních molekul účastnící se životně důležitých procesů buňky. Je totiž nezbytnou součástí její redoxní rovnováhy ("A" v NADH), genetiky (DNA a RNA), bioenergetiky ("A" v ATP) a epigenetiky (hlavním dárce metylu je S-adenosylmethionin) (Cunha, 2019).

Adenosin je důležitou složkou buněčné signalizace v eukaryotických buňkách, přičemž se řadí také mezi významné neuromodulátory a klíčové homeostatické regulátory (Novotný J., 2015). Je to hydrofilní molekula a z toho důvodu není schopna volně přecházet přes membrány. U savců i drozofily využívá tzv. nukleosidových transportérů – koncentračního (CNT) a ekvibrilačního (ENT), které jsou si vzájemně podobné (Lin et al., 2021). Tyto transportéry jsou evolučně staré proteiny, a kromě regulace hladin extracelulárního adenosinu zároveň vychytávají nukleosidy a nukleové báze pro re-syntézu nukleových kyselin (Novotný J., 2015; Young et al., 2013).

Pokud tedy dojde k narušení homeostázy, buňka se dostane do stresového stavu a začne uvolňovat ATP. Ten je v extracelulárním prostoru defosforylován na adenosin, který může být dále metabolizován adenosin deaminázou na inosin nebo aktivuje své adenosinové receptory

jako signální molekula (Liu & Xia, 2015). Protože je hladina ATP mnohonásobně vyšší, stačí, aby došlo k rozpadu jen malého množství ATP, aby se koncentrace adenosinu zvýšila až sto tisíc krát v důsledku vysoké koncentrace ATP v buňce (Cunha, 2008).

Tímto uvolněním buňka dává najevo okolním buňkám, aby se začaly adaptovat na nový metabolismus, tedy ten „stresový“. Musí se jednat o velmi rychlý proces, aby se zajistila celková homeostáza tkáně, ve které byl stres vyvolaný (Cunha, 2008). Aby však buňka byla schopna zaznamenat změnu v okolí, musí mít na svém povrchu receptory.

#### **1.4.1. Adenosinový receptor**

Adenosinové receptory (AdoR) se řadí ke skupině receptorů spřažených s G-proteiny (Novotný J., 2015). Dosud u savců byly popsány čtyři podtypy receptorů, tedy A1, A2A, A2B, A3 (Cunha R. A., 2008). U drozofily byl popsán pouze jediný receptor (Doleželová et al., 2007). Všechny se skládají z jednoho polypeptidového řetězce, který je strukturním motivem tvořícím sedm transmembránových šroubovic (Liu & Xia, 2015). Každý z receptorů se vyznačuje jiným buněčným a tkáňovým rozložením i rozdílnou afinitou k adenosinu (Novotný, 2015).

Nejrozšířenějším v savčím organismu je receptor A1, který se nachází v mozku, srdci, žaludku, tukové tkáni, genitáliích, ledvinách, játrech, očích a močovém měchýři (Doleželová et al., 2007; Novotný J., 2015). Receptor A2A se především nachází ve specifických částech mozku, ale například i v brzlíku, imunitních buňkách, srdci, plicích či cévách. Poslední dva receptory se vyskytují jen v nízkých hladinách, A2B téměř ve všech tkáních a A3 například jen v thyroideální žláze, mozku, játrech či srdci (Doleželová et al., 2007). Od jejich výskytu se odvíjí i jejich afinita. Receptory A1, A2A, A3 mají vysokou afinitu k extracelulárnímu adenosinu na rozdíl od A2B, který je obvykle aktivován až za patologických stavů (Liu & Xia, 2015).

#### **1.5. Souvislost adenosinu s oxidativním stresem**

Signální funkce adenosinu při oxidativním stresu není zcela jasná, ale předpokládá se, že adenosin přes své receptory působí na místo vzniku detoxifikačních enzymů a ovlivňuje jejich produkci. V organismu se mohou hromadit reaktivní formy kyslíku, které poškozují buňky a tkáně. V laboratoři prof. Žurovce se testovala hypotéza, že mutace v adenosinovém receptoru povede ke snížení signalizace adenosinu v buňce, a to bude mít pozitivní vliv na obranu proti

oxidativnímu stresu. V laboratoři byly již testovány dva důležité enzymy SOD2 a kataláza, a v této práci je testován další důležitý enzym glutathion peroxidáza (GPX).

V této bakalářské práci byly nakříženy drozofily, které měly mutaci v receptoru (*AdoR<sup>1</sup>*) a oxidativní stres byl u nich vyvolán RNA interferencí genu *gluthathion peroxidázy* (*GPX*). Tyto linie se srovnávaly s původní linií *GPX<sup>RNAi</sup>* bez *AdoR<sup>1</sup>* mutace, jako kontroly, abychom zjistili vliv *AdoR<sup>1</sup>* na míru oxidativního stresu.

## 2. Cíl práce

- 1) Popsat účinek RNA interference (RNAi) tzv. „silencing“ genu *gluthathion peroxidázy (GPX1)* u *Drosophila melanogaster*, vliv na viabilitu a délku života.
- 2) Vykřížit mouchu s genotypem:  $\mathbf{w}; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{UAS-GPX^{RNAi}}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ .
- 3) Sledovat vliv mutace *AdoR<sup>1</sup>* na projevy oxidativního stresu navozeného umlčením genu *GPX*.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1. Materiály

Vzorky použité v bakalářské práci byly drozofily objednané z Vienna Drosophila Resource Center (VDRC), Bloomington Drosophila Stock Center či byly vykřížené v laboratoři prof. Žurovce a udržovány v laboratorním „stocku“ při teplotě 18 °C. V tabulce (Tab. I) jsou popsány jednotlivé genotypy drozofil, které byly použity, a jejich původ.

**Tab. I:** Seznam použitých genotypů drozofil a jejich původu.

Genotyp	Původ
$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{UAS - GPX^{RNAi}}; +$	VDRC (CG12013)
$w; \frac{act - Gal4}{CyO, GFP}; +$	Tomáš Doležal
$w; \frac{CyO}{IF}; \frac{MKRS}{TM6B HuTb}$	Erika Viragh
$w; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	Eva Doleželová
$w^{1118}$	Tomáš Doležal
$w; \frac{actGal4}{CyO GFP}; \frac{ADOR^1}{ADOR^1}$	Laboratorní stock prof. Žurovce
$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{UAS - GPX^{RNAi}}; \frac{ADOR^1}{ADOR^1}$	Vlastní křížení

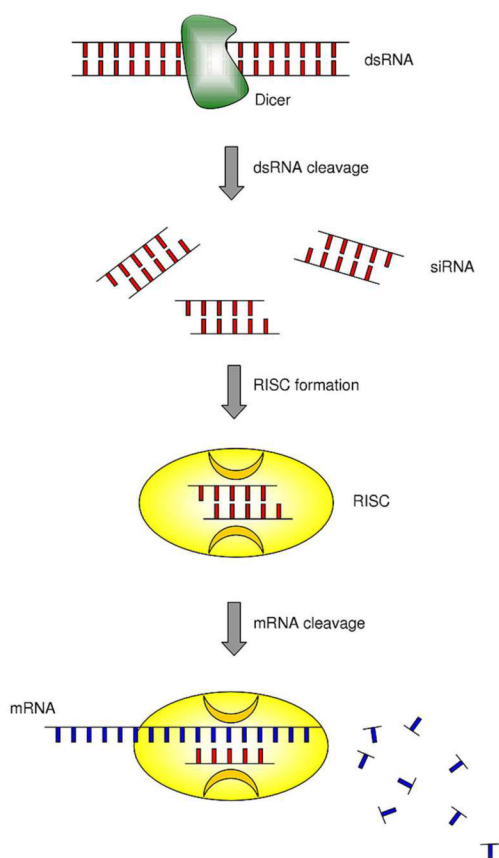
#### 3.2. Metody

##### 3.2.1. Viabilita, poměr genotypů a test délky života dospělců

Cílem této metody bylo zjistit, kolik jedinců se vylihně s daným genotypem, jak se předpokládaný poměr 1:1 bude lišit vlivem zvýšené mortality způsobené oxidativním stresem během vývoje od embrya po dospělé. Poté byly srovnávány dvě skupiny (genotyp bez *AdoR<sup>1</sup>* a genotyp s *AdoR<sup>1</sup>*), aby bylo zjištěno, zda mutace *AdoR<sup>1</sup>* ovlivňuje drozofilu, u které byl umlčen gen pro *GPX*.

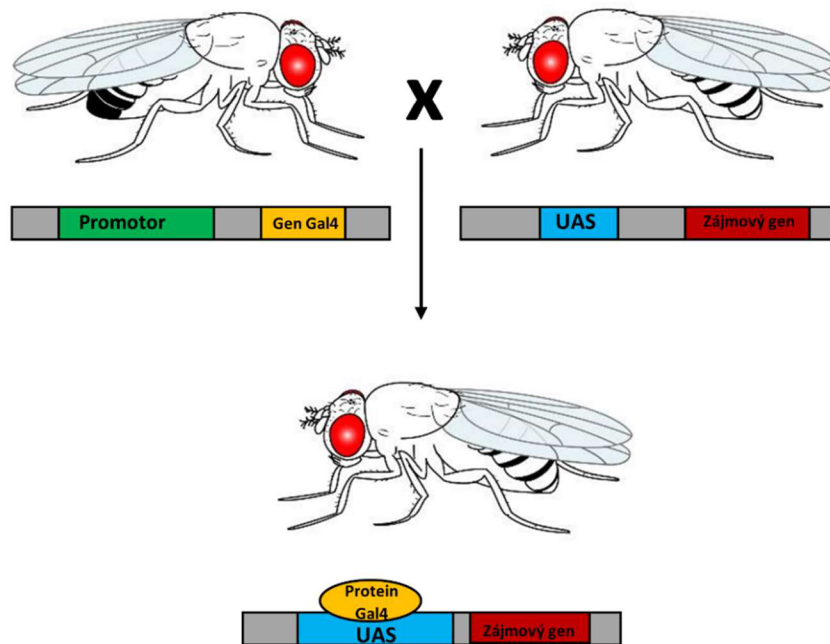
Pro umlčování genu se při křížení využilo mechanismu RNA interference (Fire et al., 1998). Jedná se o děj řídící genovou expresi v eukaryotických buňkách. Po vstupu dvouvláknové RNA (dsRNA) do buňky dochází k jejímu rozdělení enzymem Dicer na malé fragmenty o velikosti přibližně 21 nukleotidů, které se nazývají malé interferující RNA (siRNA).

Ty se naváží na protein Argonaut, čímž se vytvoří komplex zvaný RISC (RNAi silencing complex), který rozpozná komplementární mRNA, naváže se na ni a rozštěpí ji. Tímto je exprese genu inaktivována na post-transkripční úrovni (Mocellin & Provenzano, 2004).



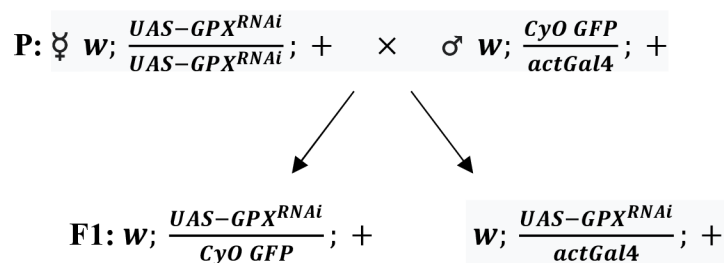
**Obr. 5:** Schéma mechanismu RNA interference (RNAi) (Mocellin & Provenzano, 2004).

UAS-GAL4 je poměrně jednoduchý systém skládající se ze dvou částí: transkripčního aktivátoru (protein Gal4) a aktivační sekvence (UAS) v DNA, která aktivuje transkripci navazujícího genu (Brand & Perrimon, 1993). Pokud se tyto dvě části na sebe napojí, systém je aktivován a je schopen řídit expresi konkrétního genu (overexprese či zabránění exprese).

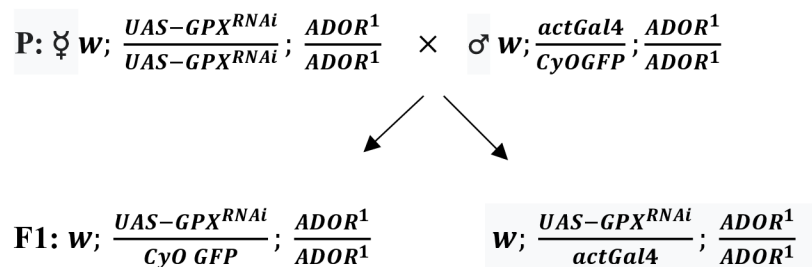


Obr. 6: Princip působení UAS-GAL4 systému.

RNAi v genu *GPXI* bylo zajištěno linií driveru  $w; \frac{CyO GFP}{act-Gal4}; +$ . Křížení je zobrazeno na následujícím schématu:



Stejným způsobem byla nakřížena linie *AdoR<sup>1</sup>*, viz kapitola 3.2.2., s driverem  $w; \frac{actGal4}{CyOGFP}; \frac{ADOR^1}{ADOR^1}$ . Schéma křížení je znázorněno níže:







### 3.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro provedení polymerázové řetězové reakce byla na ledu připravena směs obsahující: DreamTaq Green PCR Master mix (Thermo Scientific), ddH<sub>2</sub>O, primery „AdoRmutFw“ (se sekvencí 5'CCGCGAATTAATAGCTCCTG-3') a „AdoRmutRev“ (se sekvencí 5'GCACTCACACTCACCCACAT-3'). K této směsi byl přidán 1 µl templátové DNA. Tabulka (Tab. II) zobrazuje množství jednotlivých položek.

**Tab. II:** Množství jednotlivých komponent použitých na přípravu reakce PCR.

	Na 1 vzorek	Na 4 vzorky
Master mix	5 µl	20 µl
Primer Forward	0,4 µl	1,6 µl
Primer Reverse	0,4 µl	1,6 µl
ddH <sub>2</sub> O	3,2 µl	12,8 µl
Templátová DNA	1 µl	1 µl

Jako pozitivní kontrola byla použita samice  $w; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  a jako negativní kontrola byla použita samice  $w^{1118}$ . Primery byly navrženy a používány v laboratoři prof. Žurovce.

PCR byla prováděna v termocykleru Gene Pro (model: TC-E-48D). Tabulka (Tab. III) ukazuje používaný PCR profil.

**Tab. III:** Přehled PCR profilu.

	Teplota (°C)	Čas
1. Predenaturace	94,0	2 min
2. Denaturace	94,0	30 s
3. Annealing	60,0	30 s
4. Elongace	72,0	40 s
5. Postelongace	72,0	7 min
6. Chlazení	10,0	-
Počet cyklů (2-4)	35	

### 3.2.5. Gelová elektroforéza

Po PCR byla provedena gelová elektroforéza s cílem vizualizovat správnost křížení a detekovat mutaci *AdoR<sup>l</sup>* v daných liniích. Zároveň byla ověřena velikost produktu.

1 % agarózový gel se připravil smícháním 40 ml 1x TAE pufru, ve kterém bylo rozpuštěno 0,4 g agarózy (SeaKem LE Agarose) povařením v mikrovlnné troubě. Roztok byl poté chlazen pod tekoucí vodou a byly do něj přidány 3  $\mu$ l Ethidium Bromid (jedná se o interkalační činidlo, které slouží k detekci DNA pod ultrafialovým světlem).

Roztok byl nalit do formy elektroforetické vany s hřebínky, které definují jamky. Po zatuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty. Na připravený gel bylo nanášeno 10  $\mu$ l PCR produktu spolu s velikostním markerem (1 kb marker od společnosti New England BioLabs Inc.).

Elektroforéza probíhala 20–25 minut při napětí 80 V. Výsledek elektroforézy byl zobrazen pod UV světlem a posléze vyfotografován pomocí CCD kamery (VWR SMART5 Fluorescence Image Capture Quick).

### 3.2.6. Stanovení karbonylů a bílkovin

Karbonylace proteinů je ireverzibilní oxidativní modifikace, která je považována za hlavní znak poruch souvisejících s oxidativním stresem a slouží jako důležitý marker pro jeho měření (Song et al., 2020).

Tento experiment byl proveden ke stanovení koncentrace karbonylů jako spolehlivých biomarkerů oxidativního stresu. V experimentu bylo použito 25 drozofil na jeden vzorek. Celkem bylo testováno 12 vzorků, 3 vzorky od jednoho genotypu. Jako negativní kontrolní vzorky byly použity linie *CyO GFP* bez driveru.

K provedení experimentu byly použity následující reagenty:

- 50 mM K-PO<sub>4</sub> (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.0) pufr
- 7 mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) ve 2 M HCl, vždy čerstvě připraven
- 6 M guanidin hydrochlorid (GdmCl) ve vodě
- 28 % kyseliny trichloroctové (TCA)
- 5 % kyseliny trichloroctové (TCA)

Každý vzorek s 25 kusy drozofil byl homogenizován pomocí ručního homogenizátoru (Kimble Chase) ve 150  $\mu$ l pufru *K – PO<sub>4</sub>* a poté byla homogenizace provedena ještě důkladněji na ledu tzv. sonikací. Bylo přidáno 350  $\mu$ l pufru (pro doplnění objemu na 500  $\mu$ l)

a vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 15 minut. Následovala centrifugace, 10 minut při odstředivém zrychlení 6000 g a teplotě 4 °C.

Vzniklý supernatant byl následně rozdělen do dvou 1,5 ml zkumavek, 200 µl do zkumavky označené písmenem S (sample) a 200 µl do druhé s písmenem C (control). Do zkumavek značených S bylo přidáno 800 µl DNPH ve 2 M HCl a do vzorků značených C 800 µl samotného 2 M HCl. Ty se nechaly inkubovat v temnu po dobu jedné hodiny a každých 15 minut byly promíchány.

Po inkubaci bylo ke každému vzorku přidáno 0,5 µl 28 % TCA, vzorky byly promíchány, a nakonec inkubovány na ledě 5 minut. Po této inkubaci byly vzorky znovu centrifugovány na 10 minut při 15 000 g a teplotě 4 °C. Po odstranění supernatantu ve vzorcích se na dně nacházel sediment, který byl resuspendován v 0,5 ml 5 % TCA a následně byl nechán 5 minut na ledu. Opět proběhla centrifugace, při stejných podmínkách, a nakonec byl ze vzorků odstraněn supernatant.

Sediment se dále promýval ve 300 µl směsi ethanol/ethyl acetát (1:1) celkem dvakrát. Poté byl sediment znovu rozpuštěn v 500 µl GdmCl promícháním a centrifugován (6000 g, 10 minut) při teplotě 4 °C z důvodu odstranění zbytků a nečistot.

Z každé zkumavky bylo 220 µl supernatantu duplicitně napipetováno do dvou jamek mikrotitrační destičky (Cornig flag UV transparent (96)) a byla změřena absorbance (Tecan Infinite 200 PRO) při vlnových délkách 370 nm (karbonyly) a 280 nm (proteiny). Zároveň byla připravena kalibrační křivka pro proteiny, díky které se stanovil celkový objem proteinů ve vzorku a která byla nutná k dalším výpočtům.

Koncentrace karbonylů byla stanovena pomocí matematických výpočtů a transformací.

### **3.2.7. Real-time RT PCR (neboli gPCR)**

Real-time PCR byla provedena s cílem zjištění rozdílu exprese genu *GPX* v drozofile s genotypem obsahujícím *AdoR<sup>l</sup>* mutaci a genotypem neobsahující *AdoR<sup>l</sup>* mutaci.

Každý vzorek obsahoval 15 dospělých samic, které byly 3 dny staré a byly uchovávány do zpracování při teplotě -80 °C v 1,5 ml zkumavkách obsahujících 100 µl ribozolu (TRIzol Reagent; Thermo Fisher Scientific).

### 3.2.7.1. Izolace RNA

Po rozmražení byly vzorky důkladně zhomogenizovány pomocí ručního homogenizátoru (Kimble Chase). Následně bylo ke vzorkům přidáno 700 µl ribozolu (TRIzol Reagent; Thermo Fisher Scientific). Celkový objem byl 800 µl.

Aby bylo jisté, že došlo ke kompletní disociaci nukleoproteinů, vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5–10 minut. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno navíc 160 µl chloroformu, vzorky byly důkladně promíchány a poté znovu inkubovány při pokojové teplotě 2-3 minuty.

Následně byly centrifugovány po dobu 15 minut při 12 000 g a teplotě 4 °C. Po centrifugaci byly patrné tři fáze: spodní červená fáze obsahující fenol a chloroform, uprostřed bílá fáze a horní bezbarvá vodná fáze, která obsahovala RNA. Tato fáze byla opatrně odebrána do nové zkumavky a RNA byla precipitována přidáním 400 µl čistého isopropanolu.

Vzorky byly inkubovány 10 minut při pokojové teplotě a poté centrifugovány při 12 000 g a teplotě 4 °C 10 minut. Výsledkem byl bílý sediment precipitované RNA nacházející se na dně zkumavky (jeho velikost byla závislá na množství počátečního materiálu). V případě velmi čisté RNA byl sediment téměř průsvitný a těžko zaznamatelný.

Ze vzorků byl opatrně odebrán supernatant a sediment byl dvakrát promyt 75 % etanolem, který byl připraven s DEPC H<sub>2</sub>O. Při každém promývání bylo k sedimentu přidáno 800 µl etanolu a poté byly vzorky centrifugovány při odstředivém zrychlení 7500 g a teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Ze zkumavky byl pokaždé odebrán etanol opatrně, aby bylo zabráněno poškození sedimentu. Po promytí byl potřeba sediment RNA znovu rozpustit. Nejdříve byl 5-10 minut „sušen na vzduchu“ a poté byl rozpuštěn ve 100 µl DEPC H<sub>2</sub>O.

Posledním krokem izolace RNA bylo přečištění vzorků pomocí kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). Byl připraven lyzační pufr, kde k 100 µl vzorku byla přidána směs obsahující 300 µl RA1 pufru a 300 µl 100 % etanolu. Tato tekutina byla přemístěna do kolonky se silikonovou membránou (NucleoSpin RNA Column), centrifugována při 11 000 g po dobu 30 sekund a poté byla kolonka přesunuta do nové sběrné zkumavky (2 ml). Ke vzorkům bylo přidáno 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer), aby byla odstraněna sůl na silikonové membráně. Následně byly vzorky znovu centrifugovány při 11 000 g po dobu jedné minuty.

Poté byla připravena směs ve sterilní zkumavce: 10 µl rDNázy bylo přidáno k 90 µl reakčního pufru pro DNázu. Tato směs byla přímo napipetována na silikonovou membránu ke vzorku. Vzorek se nechal 15 minut inkubovat.

Ke vzorkům bylo přidáno 200 µl RAW2 pufru, aby se dosáhlo inaktivace rDNázy a po centrifugaci (30 sekund při 11 000 g) byly vzorky přesunuty do nové zkumavky (2 ml). Ve

fázi druhého promývání bylo ke vzorkům přidáno 600  $\mu$ l RA3 pufru. Vzorky byly znovu centrifugovány za stejných podmínek a poté byly přeneseny do nové sběrné zkumavky. K poslednímu promytí bylo přidáno ke každému vzorku 250  $\mu$ l RA3 pufru a centrifugace probíhala 2 minuty při 11 000 g, aby došlo k úplnému vysušení membrány. Poté byly vzorky umístěny do 1,5 ml zkumavek. Posledním krokem bylo napipetování 60  $\mu$ l vody očištěné od RNA a centrifugace při 11 000 g po dobu 1 minuty.

Konečný výtěžek RNA byl změřen spektrofotometricky při 260 nm na „NanoDrop 2000“ (ThermoScientific) a vzorky byly uchovány při teplotě -80 °C.

### **3.2.7.2. Reverzní transkripce**

Cílem této metody bylo přepsání genetické informace z RNA do cDNA (complementary DNA) a bylo k ní využito kitu „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Scientific).

Z vytěžené koncentrace RNA ve vzorcích bylo vypočteno množství  $\mu$ l potřebné templátové RNA tak, aby ve vzorku byla získána koncentrace 1000 ng/ $\mu$ l.

K tomuto množství byla doplněna DEPC H<sub>2</sub>O na objem 11  $\mu$ l a posléze byl ke vzorkům přidán 1  $\mu$ l oligo (dT) primeru a 2  $\mu$ l dNTP (10 mM). Konečný objem zkumavek, který činil 14  $\mu$ l, byl inkubován 5 minut při teplotě 65 °C v cykleru Gene Pro Thermal Cyclor (BIOER). Poté byly vzorky přesunuty na led a byly k nim přidány následující složky: 4  $\mu$ l 5  $\times$  pufru, 1  $\mu$ l inhibitoru RNáz (RiboLock RNase Inhibitor) a 1  $\mu$ l reverzní transkriptázy (Revert Aid H minus RT). Toto množství (20  $\mu$ l) bylo inkubováno při 42 °C po dobu 60 minut a posléze dalších 5 minut při teplotě 70 °C. Vzorky byly následně uchovány při teplotě -20 °C.

### **3.2.7.3. Kvantitativní RT-PCR**

Byly namíchaný dva „master mixy“ obsahující 1 $\times$  „Solis BioDyne“ mixu (5x HOT FIRE EvaGreen qPCR Mix Plus), 5' a 3' primery (po 1  $\mu$ l), 5  $\mu$ l templátu cDNA a ddH<sub>2</sub>O doplňující na objem 20  $\mu$ l. Do každého „master mixu“ se přidal jiný pár primerů. Byly použité dva typy primerů, primery LK-RT-Rack1Fw (se sekvencí 5'-CCCGTGACAAGACCCTGAT-3') a LK-RT-Rack1Rv (se sekvencí 5'-TAGTTGCCATCGGAGGAGAG-3') a primery „GPX FW“ (se sekvencí 5'-GCGGCCTGGTGATCCTCAAC-3') a „GPX Rev“ (se sekvencí 5'-AGTCGCGCAGGTGGCACA-3').

Vzorky byly stočeny na stolní centrifuze a rozpipetovány dle následující tabulky (Tab. IV).

**Tab. IV:** Schéma pipetování jednotlivých vzorků pro kvantitativní PCR reakci.

Primer LK-RT-Rack1			Primer GPX		
Č. vzorku	Typ vzorku	Koncentrace	Č. vzorku	Typ vzorku	Koncentrace
1-3	$w^{1118}$	25 x	29-31	$w^{1118}$	25 x
4-6	$w^{1118}$	5x	32-34	$w^{1118}$	5x
7-9	$w^{1118}$	1 x	35-37	$w^{1118}$	1 x
10-12	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	5 x	38-40	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	5 x
13-15	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	5 x	41-43	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	5 x
16-18	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	5 x	44-46	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	5 x
19-21	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	5 x	47-49	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	5 x
22-24	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	5 x	50-52	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	5 x
25-27	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	5 x	53-55	$w; \frac{UAS - GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	5 x
28	NTC	-	56	NTC	-

Bylo pipetováno elektronickou pipetou a sterilními pipetovacími špičkami, aby se zabránilo kontaminaci vzorku a dosáhlo se přesných výsledků.

Vzorky byly poté vloženy do termocyklieru Rotor Gene Q (QIAGEN), který byl nastaven na následující program (viz. Tab. VI.). Vyhodnocení probíhalo v programu Excel.

**Tab. V:** Program na RT-PCR.

	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Predenaturace	95	12 min	1
Denaturace	95	15 s	40
Annealing	60	20 s	
Elongace	72	20 s	

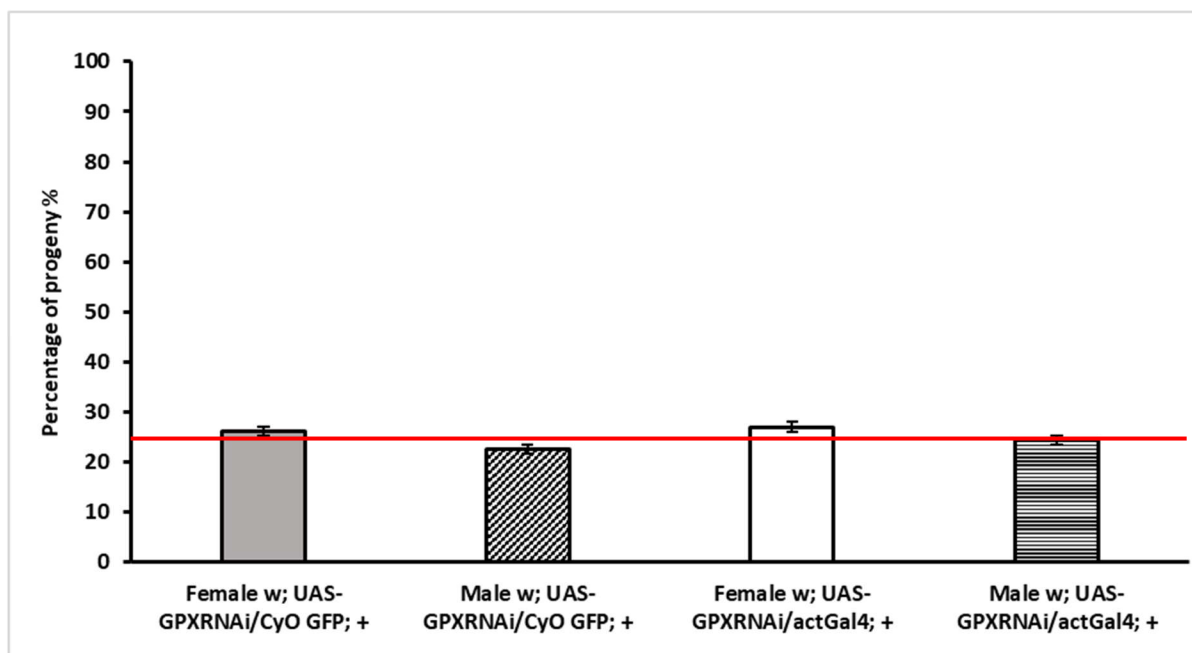
## 4. Výsledky

### 4.1. Poměr genotypů narozeného potomstva

Vliv oxidativního stresu během vývoje se může projevat jako vyšší úmrtnost již v larválním stádiu či kukle. Pokud by zde nebyl téměř žádný vliv, po křížení s driverem *actGal4* a aktivaci RNAi by se potomstvo rodilo v ideálním poměru 1:1 (25 %). Červené přímký v grafech vyznačují ideální poměr genotypů s *actGal4* nebo s *CyO GFP* u vylíhnutého potomstva.

Hodnota významnosti byla spočítána pomocí T testu, kde byly mezi sebou porovnávány vždy dvě skupiny – samci a samice zvlášť.

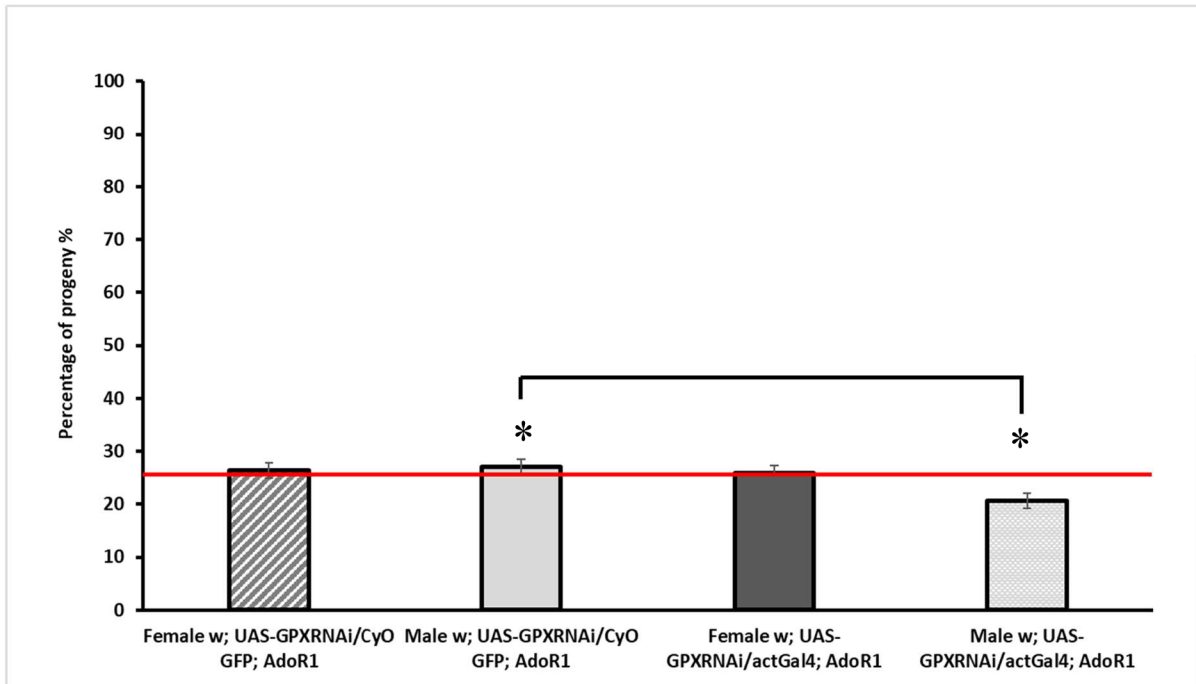
Na následujícím grafu (Obr. 7) poměr narozeného potomstva ukazuje, že se celkově ve větším poměru líhnou samice oproti samcům, avšak poměry jednotlivých genotypů se mezi sebou signifikantně neliší.



**Obr. 7:** Poměr narozeného potomstva u genotypů  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$ .

Z každého fenotypu se narodilo 700–800 jedinců. Hladiny významnosti mezi samičemi ( $p > 0,05$ ) a samci ( $p > 0,05$ ) se signifikantně nelišily.

Graf (Obr. 8) ukazuje poměr u linií drozofil mající *AdoR<sup>1</sup>* mutaci na III. chromozomu. Poměr samců  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  byl tentokrát signifikantně nižší, což může naznačovat, že *AdoR<sup>1</sup>* mutace nemá v tomto případě pozitivní efekt, jaký byl předpokládán.



**Obr. 8:** Poměr narozeného potomstva u genotypů  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  a

$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ . Z každého fenotypu se narodilo přibližně 600 jedinců. Hladiny významnosti mezi samicemi ( $p > 0,05$ ) neukazují signifikantní rozdíly v poměru, naopak tomu bylo u samců ( $p < 0,001$ ).

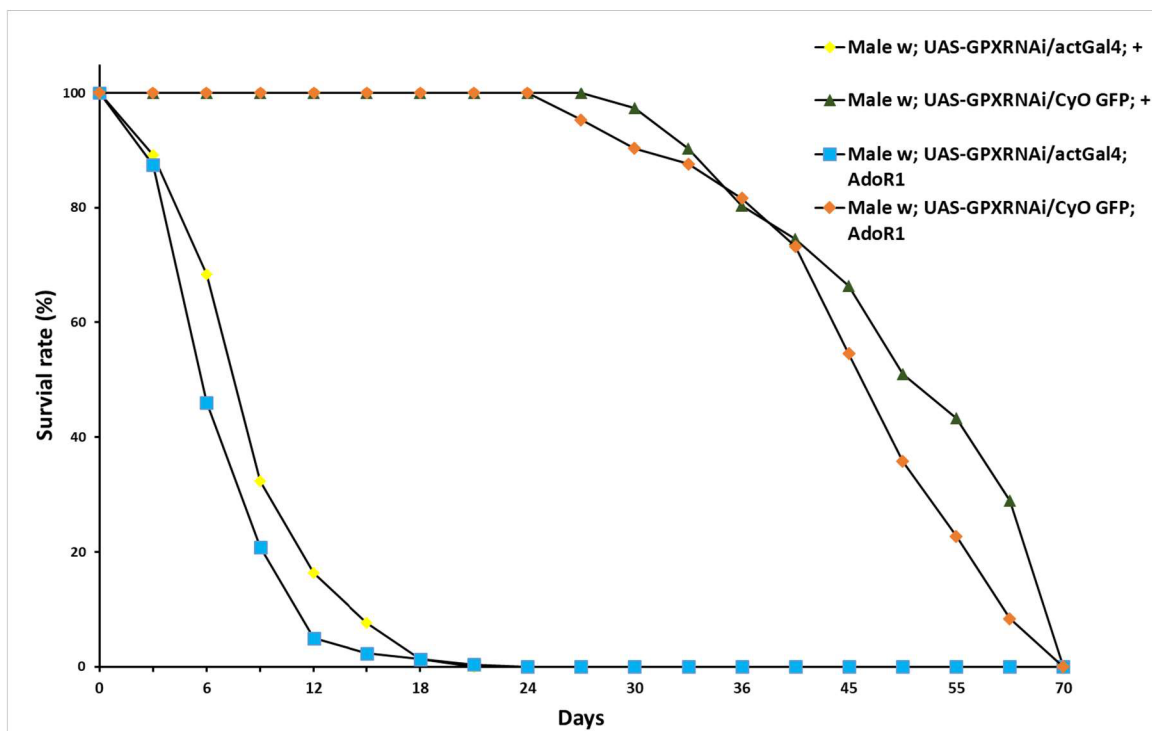
Přidáním  $AdoR^1$  mutace byla ovlivněna rychlost vylíhnutí, která se u genotypu  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  prodloužila na 11 dní, místo obvyklých 9 dní. Zde si také bylo možné všimnout sníženého počtu potomstva oproti genotypu  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ .

#### 4.2. Srovnání délky života

Oxidativní stres je schopen signifikantně snížit délku přežití. Uvažuje se tedy přímá úměra, že čím nižší životaschopnost drozofila vykazuje, tím vyššímu stresu podléhala. Pro vypočtení hladin významnosti byl použit vážený log-rank test, který se byl zpracován v programu R. Pro větší přehlednost jsou hodnoty signifikance zobrazené v tabulce (Tab. VI a Tab. VII).

Na následujícím grafu (Obr. 9) je srovnávána životaschopnost jednotlivých skupin samců mezi sebou. Standartní délka života u drozofily je přibližně 60 dní, avšak u genotypů s RNAi pro  $GPX$  bylo předpokládáno, že se výrazně zkrátí. U genotypu s  $AdoR^1$  mutací byl očekáván značný vliv na tyto výsledky.





**Obr. 9:** Srovnání viability genotypů  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$

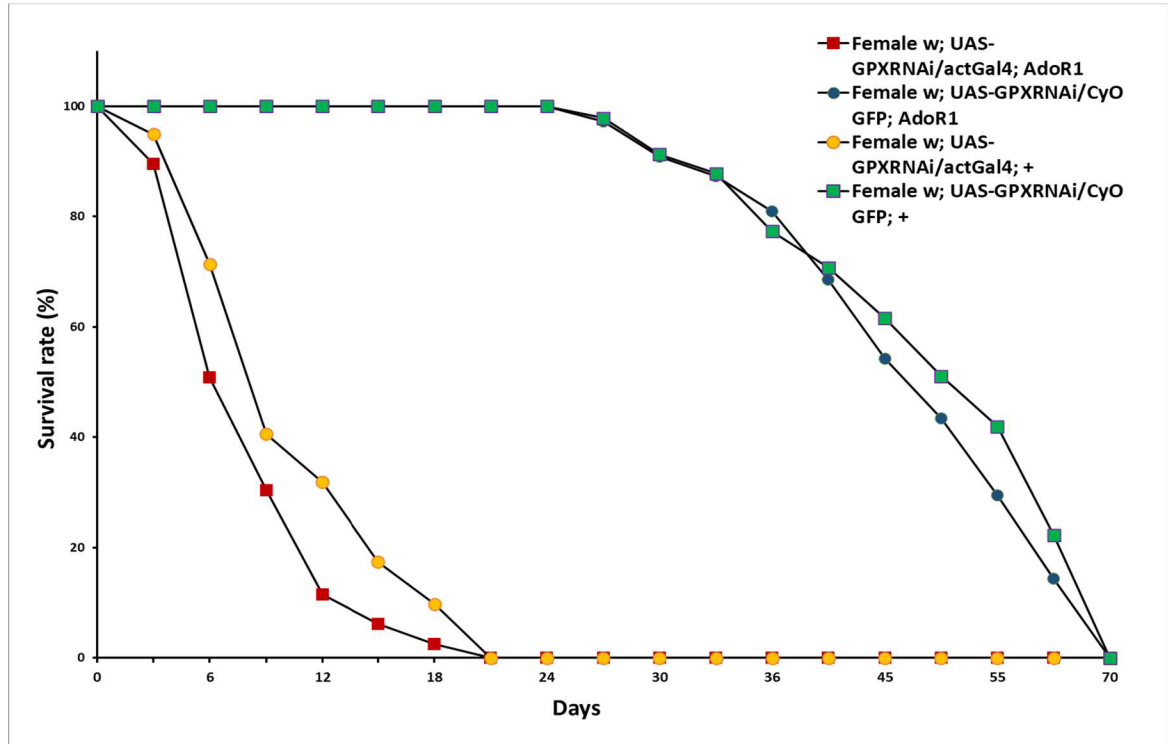
$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$  u samců. Průměrný den úmrtí  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  byl 7,9 a u  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  byl 9,5.

**Tab. VI:** Signifikance mezi porovnávanými genotypy u samců.

Porovnávané skupiny genotypů	Hladina významnosti $p$
$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ vs. $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$	$2 \times 10^{-16}$
$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ vs. $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	$7 \times 10^{-7}$
$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$ vs. $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	$4 \times 10^{-8}$
$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ vs. $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	$2 \times 10^{-16}$

Z výše uvedených dat vyplývá, že jednotlivé genotypy se v každém případě mezi sebou výrazně liší. Při porovnávání linií s driverem *actGal4* a linií *CyO GFP* se očekával výrazný rozdíl, což bylo statisticky potvrzeno. Při porovnávání jen linií  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$  a

$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  rozdíl očekávan původně nebyl, avšak se tyto skupiny zdají být odlišné. Genotyp s  $AdoR^1$  umíral dříve. Nakonec byly porovnané i skupiny  $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  a  $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ , u kterých byl rozdíl očekávan. Poněkud zajímavé bylo, že rozdíl byl v tomto případě obrácený, než bylo předpokládáno.



**Ob. 10:** Srovnání viability genotypů  $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  a  $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$

$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  a  $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; +$  u samic. Průměrný den úmrtí u

$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  byl 8,7 a u  $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  byl 11,1.

**Tab. VII:** Signifikance mezi porovnávanými genotypy u samic.

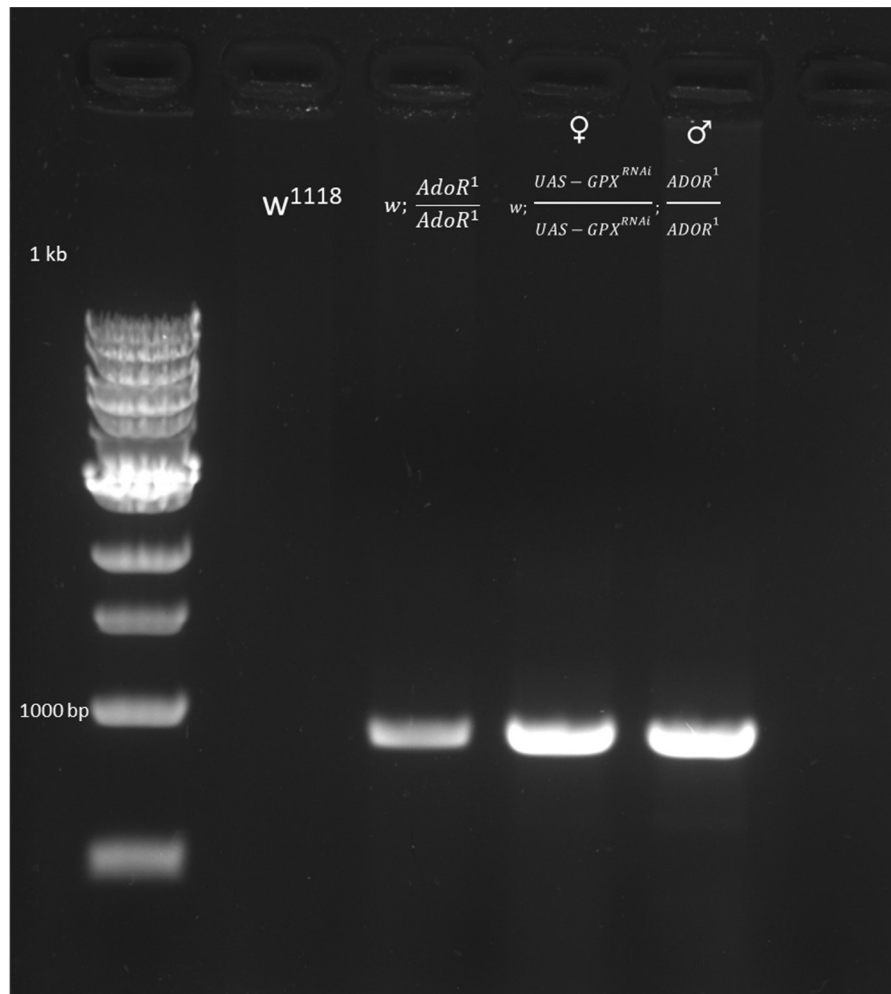
Porovnávané skupiny genotypů	Hladina významnosti $p$
$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ vs. $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; +$	$2 \times 10^{-16}$
$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ vs. $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	$3 \times 10^{-9}$
$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; +$ vs. $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	0,02
$W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ vs. $W; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{Cyo\ GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	$2 \times 10^{-16}$

U samic se linie *CyO GFP* mezi sebou také překvapivě lišily, avšak signifikance byla o poznání nižší než u samců. Linie s driverem *actGal4* a linie *CyO GFP* byl signifikantní výsledek naopak očekáván. Při porovnání skupin  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  vyšel také signifikantní rozdíl, stejně jako tomu bylo u samců.

Příznaky působení oxidativního stresu, které byly v obou případech stejné, se u každé skupiny dostavily v jinou dobu. Mezi symptomy se řadily: velmi pomalý pohyb, někdy téměř až neschopnost pohybu, a minimální reakce na vnější podněty. Genotyp  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  začal vykazovat známky onemocnění přibližně pátý až sedmý den od vylíhnutí, zatímco genotyp  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  tyto samé známky začal vykazovat mnohem dříve, často první či druhý den po vylíhnutí, nejpozději ovšem pátý den.

### 4.3. Ověření přítomnosti *AdoR<sup>1</sup>* mutace

Přítomnost *AdoR<sup>1</sup>* mutace byla ověřena pomocí metody PCR u samic i samců. Negativní kontrolou byla drozofila *w<sup>1118</sup>* a pozitivní kontrolou byla  $w; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ , která měla do genu *AdoR* vložen konstrukt „miniwhite“. Produkty měly mít velikost přibližně 945 bp, čímž bylo potvrzeno, že se jedná o požadovanou část genu.

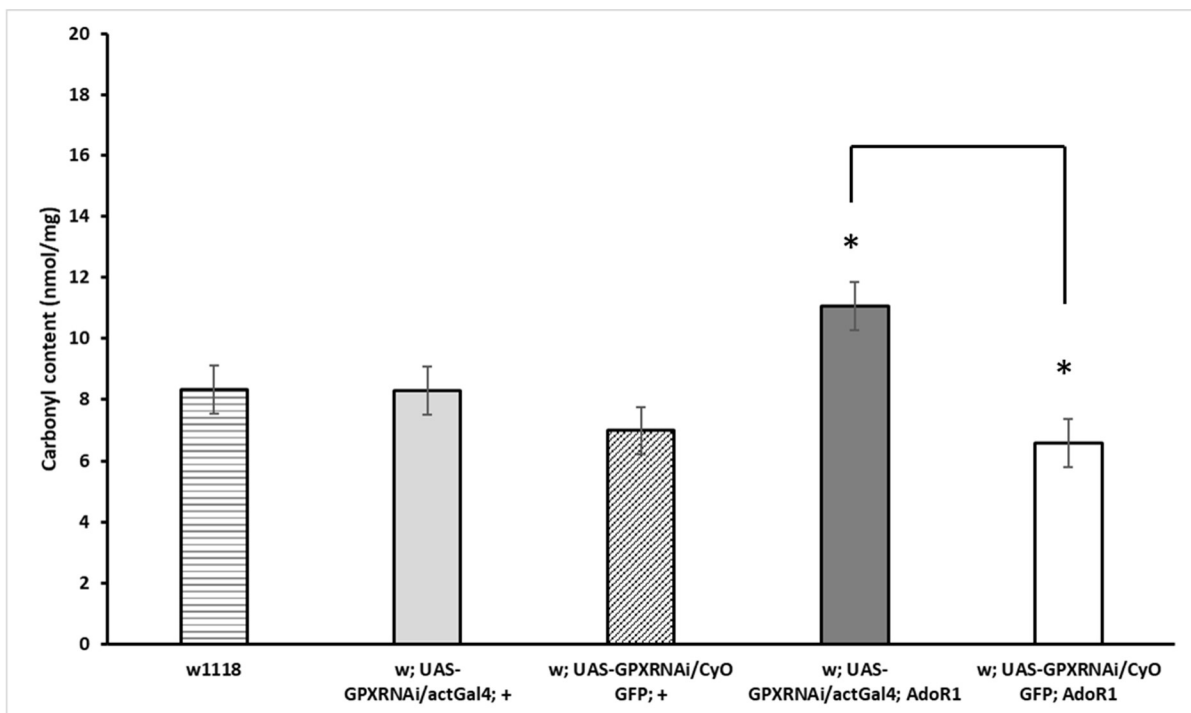


**Obr. 11:** Výsledek PCR reakce ověřující přítomnost mutace *AdoR<sup>1</sup>*.

#### 4.4. Hodnota karbonylů v jednotlivých genotypech

Množství karbonylů označuje úroveň oxidativního stresu, kterému drozofila podléhá. Čím vyšší hodnota vyjde, tím více konkrétní drozofila je stresovaná. Tento experiment byl prováděn ve třech opakováních, při každém experimentu bylo testováno 15 vzorků. Hodnota významnosti ( $p < 0,05$ ) byla posléze vypočtena T testem.

Na grafu (Obr. 12) jsou tyto hodnoty zobrazeny. Kontrolními skupinami byly  $w^{1118}$ ,  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}$ ; + a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ , u kterých byla předpokládána nižší úroveň karbonylů na rozdíl od zbylých skupin.



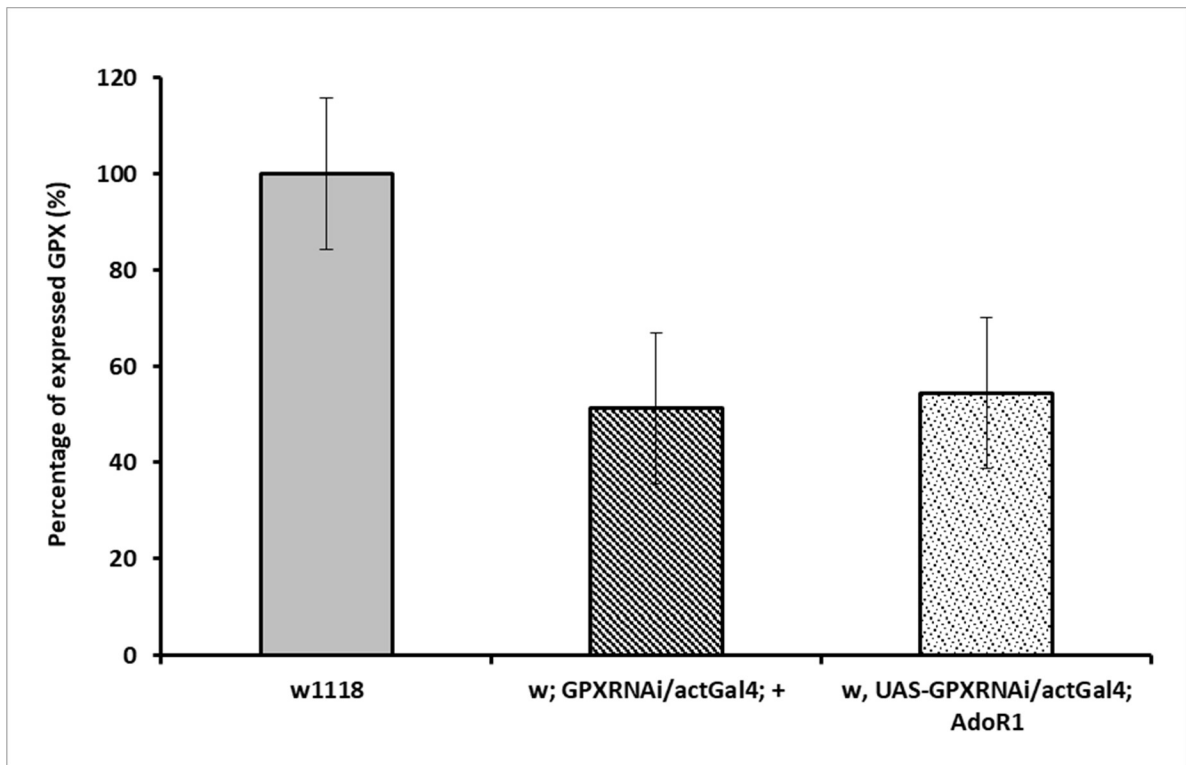
**Obr. 12:** Úroveň karbonylů v jednotlivých genotypech drozofil. Hladiny významnosti mezi jednotlivými skupinami ( $p < 0,05$ ) neukazují signifikantní rozdíly, kromě dvou porovnávaných skupin  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR1}{AdoR1}$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR1}{AdoR1}$  ( $p > 0,05$ ).

Úroveň karbonylů byla u genotypu  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR1}{AdoR1}$  mírně zvýšená, nejednalo se však o signifikantní rozdíl v porovnání se skupinou  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$ . Jediný rozdíl se ukázal mezi skupinami  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR1}{AdoR1}$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR1}{AdoR1}$ . Ostatní skupiny se mezi sebou významně nelišily.

#### 4.5. Exprese genu GPX v genotypch $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{UAS-GPX^{RNAi}}; +$ a $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{UAS-GPX^{RNAi}}; \frac{AdoR1}{AdoR1}$

Metodou RT-PCR byla zjištěna míra exprese genu *GPX* u jednotlivých genotypů, aby bylo možné zjistit, zda není příčinou rozdílů mezi genotypy. Celkem bylo testováno sedm vzorků ve dvou opakováních. Vzorek číslo 1 ( $w^{1118}$ ) byl negativní kontrolou. Signifikance byla vypočtena T testem.

Na následujícím grafu (Obr. 13) jsou vyznačené jednotlivé exprese genu *GPX*.



**Obr. 13:** Expres genů *GPX*. Hladina významnosti u skupin  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  a

$w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  nebyla signifikantní ( $p > 0,05$ ).

Oba genotypy měly oproti kontrolní skupině ( $w^{1118}$ ) výrazně nižší expresi genů *GPX*. Nicméně neukázal se signifikantní rozdíl mezi jednotlivými testovanými genotypy ( $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$  a  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$ ). Mutace v adenosinovém receptoru tedy zřejmě neovlivňuje hladinu exprese *GPX*.

## 5. Diskuse

### 5.1. Oxidativní stres zkracuje délku života *Drosophila melanogaster*

V této práci byly studovány účinky oxidativního stresu a jeho úzká spojitost se životaschopností drozofil. Podobně jako předchozí experimenty se stresem vyvolaným herbicidy nebo rotenonem u drozofil se účinky oxidativního stresu projeví především zkrácením délky života (Hosamani & Muralidhara, 2013). Abychom se vyhnuli používání nebezpečných chemikálií, oxidativní stres byl v této studii zaveden blokováním detoxifikačních enzymů pomocí RNA interference, kdy došlo k umlčení genu pro *GPX* (Mourão et al., 2009; Deepashree et al., 2022). To vedlo k chronickému působení oxidativního stresu, kdy se v organismu zvýšila úroveň  $H_2O_2$ , což mělo za následek snížení přežívání drozofil až o 85 % (Obr. 9 a Obr. 10). Příznaky onemocnění se začaly projevovat přibližně po prvním týdnu od vylíhnutí. Z výsledků je patrné, že dřívější úmrtí postihovalo více samce, což nebylo překvapivé. Z článku Niveditha et al., 2017 vyplývá, že samci jsou obecně citlivější na působení oxidativního stresu. Bylo též potvrzeno, že samice vykazují vyšší aktivitu anti-oxidativních enzymů (konkrétně SOD a CAT) oproti samcům (Niveditha et al., 2017), z čehož můžeme odvozovat důvod, proč i přes příznaky zvládaly svůj stav lépe než samci. V porovnání s prací RNDr. Žaloudíkové, 2023, nepublikovaná data, ve které byl vypnut gen pro *SOD2* (Kirby et al., 2002), kde byl čtvrtý den od vylíhnutí průměrným dnem úmrtí, ovšem nebyl nárůst úmrtí tak prudký. Vysvětlením pozorovaných rozdílů mezi jednotlivými enzymy by mohly být jejich odlišné funkce a možné odlišné míry toxicity molekul, jejichž přeměnu katalyzují (viz kapitola 1.3. a Obr. 2).

### 5.2. *AdoR<sup>1</sup>* mutace nezachraňuje drozofilu s nefunkční *GPX*

V předešlých studiích byl oxidativní stres navozen injikováním paraquatu a výsledkem byla vyšší rezistence mutantních linií *AdoR<sup>1</sup>* než v případě kontrol (Lin et al., 2021). Vliv mutace v adenosinovém receptoru na oxidativní stres byl testován paralelně oproti kontrolní skupině přidáním *AdoR<sup>1</sup>* mutace k drozofilám s blokováním genem *GPX*. Dle našich předpokladů, by drozofily nesoucí *AdoR<sup>1</sup>* měly přežívat mnohem déle, podobně jako tomu bylo v případě *SOD2* (Žaloudíková, 2023, nepublikovaná data). Ukázalo se však, že *AdoR<sup>1</sup>* zřejmě nemá vliv u genu *GPX* na zmírnění oxidativního stresu navozeného tímto způsobem. Mohlo by to být způsobeno odlišnými místy exprese jednotlivých detoxifikačních enzymů. Gen *GPX* je totiž exprimován u dospělých drozofil převážně v trávicí soustavě (Missirlis, 2003), zatímco gen *SOD2* je ve vyšší míře exprimován v nervové a kardiovaskulární soustavě (The FlyBase

Consortium, 2003). Lze tedy předpokládat, že gen *GPX* je soustředěn spíše na detoxifikaci potravy.

Další detoxifikační enzym, enzym kataláza (*CG6871*), který je zodpovědný za podobnou funkci jako *GPX* (viz kapitola 1.3.), je v těle drozofily exprimován především v malpighických trubicích a tukovém tělese (tyto orgány mají podobnou funkci jako játra u savců) (Yang et al., 2007). Jak vyplývá již z předešlých studií (Missirlis, 2003), *GPX* je sice u drozofily jedním z detoxifikačních enzymů, ale na rozdíl od katalázy se jeho účinek projevuje v geneticky rozdílných drahách a jiných buněčných kompartmentech. Zajímavé je, že v koronárních cévách u člověka byla zjištěna interakce mezi adenosinovým receptorem A2A a právě katalázou (Sharifi-Sanjani et al., 2013). Kromě toho docházelo v kardiomyoblastech ke zvýšení exprese enzymů katalázy a *GPX* v důsledku stimulace adenosinového receptoru A1R (Mangmool et al., 2022).

Naše výsledky jsou tedy v souladu s hypotézou (Missirlis, 2003), že hlavním enzymem zodpovědným za detoxifikaci  $H_2O_2$  v organismu je kataláza, kdežto *GPX* je spíše potřebná pro kontrolu  $H_2O_2$  přicházející do organismu. Je tedy možné uvažovat, že mutace *AdoR<sup>1</sup>* by mohla být prospěšná jen v určitých částech organismu (Fredholm, 2007). Ze studií prováděných v laboratořích prof. Žurovce (2023, nepublikovaná data) bylo totiž pozorováno, že mutanti s *AdoR<sup>1</sup>* oproti kontrolním skupinám jsou citlivější na metabolický stres v podobě hladovění. Naopak při vyvolání oxidativního stresu injekcí či krmením herbicidy (např. paraquatem) byla *AdoR<sup>1</sup>* mutace klíčem ke kompenzačním změnám (Lin et al., 2021).

### **5.3. Samotná *AdoR<sup>1</sup>* mutace negativně ovlivňuje životaschopnost *Drosophila melanogaster***

Výsledky z pozorování stárnutí nejenže ukázaly, že *AdoR<sup>1</sup>* mutace nebyla schopná drozofilu zachránit, ale taková drozofila podléhala zvýšenému oxidativnímu stresu průměrně o dva dny dříve (Obr. 9 a Obr. 10). Sníženou životaschopnost však měly i kontrolní skupiny drozofil s funkčním genem pro *GPX* a *AdoR<sup>1</sup>* mutací. Rozdíly mezi jednotlivými genotypy se ukázaly i při testování úrovně karbonylů v organismu (Obr. 12). U skupiny  $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$  byla tato úroveň karbonylů lehce zvýšená, což koresponduje s výsledky přežívání (viz Obr. 9 a Obr. 10). I když se v tomto případě nejednalo o signifikantní rozdíl, výsledek naznačuje, že drozofila s přidanou *AdoR<sup>1</sup>* mutací podléhala mírně vyššímu oxidativnímu stresu.



Při opětovném srovnání s výsledky s blokováním enzymem SOD2 (Žaloudíková, 2023, nepublikovaná data) docházelo k opačnému efektu, u SOD2 došlo k signifikantnímu prodloužení života. Rozdíl oproti blokování *SOD2* by zřejmě mohl spočívat v tom, že adenosin reguluje opravné mechanismy jiné než kontrolu  $H_2O_2$ , případně nemá vliv na expresi opravných mechanismů ve střevě. Jisté ovšem je, jak bylo dokázáno v předchozích studiích (Doleželová et al., 2007), že adenosin je molekulou, která se účastní obrany organismu. Vliv *AdoR<sup>1</sup>* na délku života však dosud pozorován nebyl, zřejmě proto, že se jedná pouze o relativně malý vliv (Doleželová et al., 2007; Lin et al., 2021). Pro odhalení přesného mechanismu tohoto jevu bude do budoucna potřeba podrobit zkoumané drozofily dalším experimentům.

## 6. Závěr

V této práci bylo dokázáno, že umlčení genu pro *GPX* má vážné následky na životaschopnost *Drosophila melanogaster* v důsledku zvýšeného oxidativního stresu. Při porovnávání našich výsledků s daty blokování *SOD2*, která představuje první linii obrany proti reaktivním formám kyslíku, je patrné, že rychlost úmrtí není tak náhlá. Z těchto pozorování vyplývá, že enzym gluthathion peroxidáza, zodpovědný za odstraňování  $H_2O_2$ , je rovněž podstatným detoxifikačním enzymem v tomto organismu.

V průběhu studie byly úspěšně nakříženy drozofily s genotypem, který kromě konstruktů pro umlčení *GPX* na svém III. chromozomu obsahovaly *AdoR<sup>l</sup>* mutaci. Přítomnost *AdoR<sup>l</sup>* mutace ovšem nebyla schopná zachránit drozofily, které měly blokováný gen *GPX*, naopak jejich životaschopnost spíše negativně ovlivňovala. Možným důvodem tohoto jevu je, že *GPX* je exprimována na rozdíl od ostatních enzymů převážně v trávicí soustavě.

Je tedy zřejmé, že mutace *AdoR<sup>l</sup>* není prospěšná v drozofilách ve všech částech organismu a že odstraňování  $H_2O_2$  v trávicím traktu je na receptoru pro adenosin nezávislá. V průběhu pokusů jsme rovněž pozorovali vliv *AdoR* na délku života. Tento účinek ovšem nebyl dosud pozorován, a proto by bylo do budoucna dobré se jím více zabývat i nadále a podrobit ho dalším experimentům.

## 7. Literatura

- Abolaji et al. (2013). *Drosophila melanogaster* as a Promising Model Organism in Toxicological Studies. *Arch. Bas. App. Med*, *1*, 396–403.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- Andrés Juan, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E., & Reinbothe, S. (2021). Molecular Sciences The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci*, *22*, 4642.  
<https://doi.org/10.3390/ijms>
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, *91*, 179–194.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Brand, H., & Perrimon, N. (1993). *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. In *Swiss Medical Weekly* (Vol. 142).  
<https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(5), 3289–3303.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, *25*(3), 287–299.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- Cabello-Verrugio, C., Simon, F., Trollet, C., & Santibañez, J. F. (2017). Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). Hindawi Limited.  
<https://doi.org/10.1155/2017/4310469>
- Cunha R. A. (2008). Adenosine Neuromodulation and Neuroprotection. In A. Lajtha & K. Mikoshiba (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (3rd Edition).
- Cunha, R. A. (2019). Signaling by adenosine receptors-Homeostatic or allostatic control? *PLoS Biology*, *17*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000213>
- Davies, K. J. A. (1995). Oxidative stress: the paradox aerobic life of aerobic life. *Biochem. SOC. Symp.* *61*, 1–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/bss0610001>
- Deepashree, S., Shivanandappa, T., & Ramesh, S. R. (2022). Genetic repression of the antioxidant enzymes reduces the lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology B*, *192*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01412-7>
- Doleželová, E., Nothacker, H. P., Civelli, O., Bryant, P. J., & Zurovec, M. (2007). A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *37*(4), 318–329.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.12.003>
- Domínguez, L., Sosa-Peinado, A., & Hansberg, W. (2010). Catalase evolved to concentrate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at its active site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *500*(1), 82–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.017>

- Ehrhart, J., & Zeevalk, G. D. (2001). Hydrogen peroxide removal and glutathione mixed disulfide formation during metabolic inhibition in mesencephalic cultures. *Journal of Neurochemistry*, 77, 1496–1507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00355.x>
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 22, Issue 3, pp. 377–388). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 806–811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35888>
- Forgione, M. A., Weiss, N., Heydrick, S., Cap, A., Klings, E. S., Bierl, C., Eberhardt, R. T., Farber, H. W., & Loscalzo, J. (2002). Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 282(4 51-4). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00598.2001>
- Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 14, Issue 7, pp. 1315–1323). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402132>
- Fu, R.-Y., Jian, C., & Yin, L. I. (2007). The Function of the Gluthathione/Gluthathione Peroxidase System in the Oxidative Stress Resistance Systems of Microbial Cells. *CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 23(5), 770–775. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s1872-2075\(07\)60048-x](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s1872-2075(07)60048-x)
- Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 9, 504–523. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/187152710791556104>
- Hosamani, R., & Muralidhara. (2013). Acute exposure of *drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 83(1), 25–40. <https://doi.org/10.1002/arch.21094>
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 295, Issue 4). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>
- Joshi, A., & Mueller, L. D. (1997). *Adult crowding effects on longevity in Drosophila melanogaster: Increase in age-independent mortality*. <https://escholarship.org/uc/item/9sd8b05p>
- Kirby, K., Hu, J., Hilliker, A. J., & Phillips, J. P. (2002). *RNA interference-mediated silencing of Sod2 in Drosophila leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.252342899](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.252342899)
- Lin, Y. H., Maaroufi, H. O., Kucerova, L., Rouhova, L., Filip, T., & Zurovec, M. (2021). Adenosine Receptor and Its Downstream Targets, Mod(mdg4) and Hsp70, Work as a Signaling Pathway Modulating Cytotoxic Damage in *Drosophila*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.651367>
- Liu, H., & Xia, Y. (2015). Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 119, 1173–1182. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00350.2015>
- Mangmool, S., Kyaw, E. T. H., Nuamnaichati, N., Pandey, S., & Parichatikanond, W. (2022). Stimulation of adenosine A1 receptor prevents oxidative injury in H9c2 cardiomyoblasts: Role of Gβγ-mediated Akt and ERK1/2 signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 451. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116175>

- Missirlis, F., Rahlfs, S., Dimopoulos, N., Bauer, H., Becker, K., Hilliker, A., Phillips, J. P., & Jackle, H., (2003). A putative Glutathione Peroxidase of *Drosophila* Encodes a Thioredoxin Peroxidase That Provides Resistance against Oxidative Stress But Fails to Complement a Lack of Catalase Activity. *Biological Chemistry*, 463–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/BC.2003.052>
- Mocellin, S., & Provenzano, M. (2004). RNA interference: Learning gene knock-down from cell physiology. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-39>
- Mourão, M. D. M., Dinguirard, N., Franco, G. R., & Yoshino, T. P. (2009). Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000550>
- Mytilineou, C., Kramer, B. C., & Yabut, J. A. (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism & Related Disorders*, 8(6), 385–387. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(02\)00018-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s1353-8020(02)00018-4)
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress-And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*.
- Neumannová, K. (2014). *Metabolismus adenosinu a jeho úloha v buněčné fyziologii Adenosine metabolism and its role in cell physiology*.
- Niveditha, S., Deepashree, S., Ramesh, S. R., & Shivanandappa, T. (2017). Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 187(7), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1061-1>
- Novotný J. (2015). Adenosin a jeho role ve fyziologii. *Československa Fysiologie*, 64(1), 35–44.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- Panday, S., Talreja, R., & Kavdia, M. (2020). The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Research*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104010>
- Pandey, K., & Rizvi, S. (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.4161/oxim.3.1.10476>
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, pp. 55–74). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Rand, M. D. (2010). *Drosophotoxicology: The growing potential for Drosophila in neurotoxicology*. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.06.004>

- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *11*(6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. In *Database* (Vol. 2020). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schreibelt, G., van Horssen, J., van Rossum, S., Dijkstra, C. D., Drukarch, B., & de Vries, H. E. (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Research Reviews*, *56*(2), 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.005>
- Shanker, G., Syversen, T., Aschner, J. L., & Aschner, M. (2005). Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Molecular Brain Research*, *137*(1–2), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.02.006>
- Sharifi-Sanjani, M., Zhou, X., Asano, S., Tilley, S., Ledent, C., Teng, B., Dick, G. M., & Mustafa, S. J. (2013). Interactions between A2A adenosine receptors, hydrogen peroxide, and KATP channels in coronary reactive hyperemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *304*(10). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00637.2012>
- Smeyne, M., & Smeynen, R. J. (2013). Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *62*, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.001>
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. In *Physiological Measurement* (Vol. 28, Issue 4). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/28/4/R01>
- Song, Y. R., Kim, J. K., Lee, H. S., Kim, S. G., & Choi, E. K. (2020). Serum levels of protein carbonyl, a marker of oxidative stress, are associated with overhydration, sarcopenia and mortality in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01937-z>
- Staats, S., Lüersen, K., Wagner, A. E., & Rimbach, G. (2018). *Drosophila melanogaster* as a Versatile Model Organism in Food and Nutrition Research. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 66, Issue 15, pp. 3737–3753). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05900>
- The FlyBase Consortium. (2003). *The FlyBase database of the Drosophila genome projects and community literature The FlyBase Consortium\**. <http://www.geneontology.org/>.
- Turens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. In *Journal of Physiology* (Vol. 552, Issue 2, pp. 335–344). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Yakes, F. M., & Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Cell Biology*, *94*, 514–519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.514>
- Yamaguchi, M., & Yoshida, H. (2018). *Drosophila* as a model organism. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1076, pp. 1–10). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1)

- Yang, J., McCart, C., Woods, D. J., Terhzaz, S., Greenwood, K. G., Ffrench-Constant, R. H., & Dow, J. A. T. (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological Genomics*, 30(3), 223–231.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00018.2007>
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 34, Issues 2–3, pp. 529–547).  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>
- Žurovec, M. (1999). *Molekulární biologie živočichů*.

## 8. Přílohy

**Tab. VIII:** Poměr narozeného potomstva linie drozofil bez *AdoR<sup>1</sup>*

Genotyp	Počet jedinců	%
Female $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$	782	26,12763
Male $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; +$	676	22,58603
Female $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	807	26,96291
Male $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; +$	728	24,32342

**Tab. IX:** Poměr narozeného potomstva linie drozofil s *AdoR<sup>1</sup>*

Genotyp	Počet jedinců	%
Female $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	660	26,305301
Male $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{CyO GFP}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	676	26,943005
Female $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	654	26,066162
Male $w; \frac{UAS-GPX^{RNAi}}{actGal4}; \frac{AdoR^1}{AdoR^1}$	519	20,685532

**Tab. X:** Sledování životaschopnosti linie drozofil bez *AdoR<sup>1</sup>*

Den úmrtí	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	40	45	50	55	60	70	celkem
Male $w; UAS-GPX^{RNAi}/actGal4;$	34	65	113	50	27	20	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	313
Female $w; UAS-GPX^{RNAi}/actGal4; +$	14	65	85	24	40	21	13	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	276
Male $w; UAS-GPX^{RNAi}/CyO GFP; +$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	18	26	15	21	40	20	37	75	259
Female $w; UAS-GPX^{RNAi}/CyO GFP; +$	0	0	0	0	0	0	0	0	5	15	8	24	15	21	24	21	45	51	229

**Tab. XI:** Sledování životaschopnosti linie drozofil s *AdoR<sup>1</sup>*

Den úmrtí	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	40	45	50	55	60	70	celkem
Male $w; UAS-GPX^{RNAi}/actGal4; AdoR1$	0	38	125	76	48	8	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	302
Female $w; UAS-GPX^{RNAi}/actGal4; AdoR1$	0	29	107	57	52	15	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	277
Male $w; UAS-GPX^{RNAi}/CyO GFP; AdoR1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	15	8	18	25	56	56	39	43	25	299
Female $w; UAS-GPX^{RNAi}/CyO GFP; AdoR1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	16	9	16	31	36	27	35	38	36	251