

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Vliv cytosolické nukleotidázy cN-IIIB na imunitní  
odpověď u *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Tereza Dolejšková

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

Školitel - specialista: Mgr. Lenka Chodáková, Ph.D.

České Budějovice 2021

Dolejšková, T., 2021: Vliv cytosolické nukleotidázy cN-IIIB na imunitní odpověď u *Drosophila melanogaster*. [Impact of cytosolic nucleotidase cN-IIIB on immune response in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Adenosine is a key signal molecule of the metabolic switch, a crucial process of metabolic changes in *Drosophila melanogaster* upon parasitoid wasp infection. However, some components of the adenosine creation pathway have yet to be discovered. We studied a potential convertor of AMP to adenosine in immune response, cN-IIIB, a cytosolic nucleotidase known to accept the methylated RNA cap nucleotide 7-methylguanosine as a substrate and to protect cells against undesired incorporation of this nucleotide into nucleic acids. We suggest this trait can be potentially important in the metabolic switch.

Prohlašuji, že jsem autorem bakalářské práce Vliv cytosolické nukleotidázy cN-IIIB na imunitní odpověď u *Drosophila melanogaster* a vypracovala jsem ji samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích, 12. 4. 2021

.....

Tereza Dolejšková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D. za skvělé vedení mé bakalářské práce po teoretické stránce a spoluškolitelce Mgr. Lence Chodákové, Ph.D. za výborné vedení mé práce po praktické stránce a veškerý čas strávený v laboratoři.

Dále bych chtěla poděkovat všem členům laboratoře za přátelskost a vstřícnost, zejména pak Mgr. Pavle Nedbalové, Michalině Kazek, Ph.D a Lucii Hrádkové za jejich ochotu kdykoli a s čímkoli pomoc.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

## Seznam použitých zkratek

**(d)** = deoxy

**Ado** = adenosin

**AdoR** = adenosinový receptor

**adoR** = mutace v genu AdoR

**ADP** = adenosindifosfát

**AMP** = adenosinmonofosfát

**ATP** = adenosintrifosfát

**Cas9** = s CRISPR asociovaný protein 9

**cdN** = cytosolická 5'(3') deoxyribonukleotidáza

**CMP** = cytidinmonofosfát

**cN** = cytosolická 5'-nukleotidáza

**cN-IIIb** = cytosolická 5'-nukleotidáza IIIb

**CRISPR** = z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

**crRNA** = CRISPR RNA

**DIC** = diferenciálním interferenčním kontrastem

**dNTPs** = deoxyribonukleotid trifosfát

**e-Ado** = extracelulární adenosin

**EDTA** = kyselina ethylendiamintetraoctová

**eN** = ekto- 5'-nukleotidáza

**ENT** = ekvilibrativní nukleosidový transportér

**Gal4** = transkripční aktivátor vázající se na „upstream“ aktivační sekvenci

**Gal80** = teplotně senzitivní represor Gal4

**gRNA** = „guide“ RNA

**hpi** = hodiny po infekci

**m<sup>7</sup>GMP** = 7-methylguanosen

**mdN** = mitochondriální 5'(3')-deoxyribonukleotidáza,

**NT5E** = ekto-5'-nukleotidáza

**PAGE** = polyakrylamidový gel

**PAM** = sekvence rozpoznávaná Cas9 3-4 nukleotidy „downstream“ od místa stříhu

**PBS** = fosfátový pufr

**PCR** = polymerázová řetězová reakce

**RNAi** = RNA interference

**RP49** = Ribosomální protein 49

**RT-qPCR** = kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí

**siRNA** = dvouvláknová RNA o délce 20–25 nukleotidů

**Srp** = Serpent

**TBE** = Tris-borát-kyselina ethylendiamintetraoctová

**TMP** = thymidinmonofosfát

**UAS** = „upstream“ aktivační sekvence

**UMP** = uridinmonofosfát

**w** = white

## Obsah

1. Úvod .....	1
1.1 Octomilka jako modelový organismus .....	2
1.2 Imunitní systém octomilky .....	2
1.3 Infekce parazitoidní vosičkou .....	3
1.4 Distribuce energie při imunitní odpovědi .....	4
1.5 Extracelulární adenosin.....	5
1.6 Adenosin a metabolický přesmyk.....	5
1.7 5' - nukleotidázy .....	6
1.7.1 cN-IIIB .....	6
1.8 Nástroje molekulární biologie využitelné u octomilky.....	8
1.8.1 Balancerové chromozomy .....	8
1.8.2 UAS-Gal4.....	8
1.8.3 RNA interference .....	8
1.8.4 CRISPR-Cas9.....	9
2. Cíle práce.....	10
3. Materiály a metody .....	11
3.1 Chov octomilek.....	11
3.2 Křížení .....	11
3.2.1 Výchozí linie octomilek .....	11
3.2.2 Křížení A (RNAi).....	12
3.2.3 Křížení B (CRISPR-Cas9) .....	12
3.3 Infekce a počítání lamelocytů .....	14
3.4 Navržení a test primerů.....	15
3.4.1 PCR .....	15
3.4.2 Gelová elektroforéza .....	16
3.5 Kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR) .....	16
3.5.1 Sběr hemolymfy .....	17
3.5.2 Izolace RNA.....	17
3.5.3 Reverzní transkripce.....	17
3.5.4 qPCR .....	18
3.6 Ověření somatické mutageneze pomocí tkáňově-specifické CRISPR-Cas9.....	19
3.6.1 Heteroduplex Mobility Assay .....	19
3.6.2 Izolace genomové DNA .....	20
3.7 Statistické zpracování dat .....	20

4. Výsledky .....	22
4.1 RNA interference cN-IIIB má vliv na tvorbu lamelocytů .....	22
4.1.1 Zavedení primerů pro RT-qPCR .....	22
4.1.2 Konstrukt RNAi snižuje expresi cN-IIIB v hematopoetické linii .....	23
4.1.3 Počty lamelocytů se při cN-IIIB RNAi zmenšují.....	24
4.2 cN-IIIB CRISPR-Cas9 má vliv na tvorbu lamelocytů.....	26
4.2.1 Optimalizace primerů pro Heteroduplex Mobility Assay .....	26
4.2.2 CRISPR-Cas9 pro cN-IIIB v hemocytech vytváří mutace.....	27
4.2.3 Počty lamelocytů se při inaktivaci cN-IIIB pomocí CRISPR-Cas9 zmenšují .....	28
5. Diskuze .....	33
6. Závěr .....	36
7. Literatura .....	37

## 1. Úvod

Veškeré biologické procesy jsou složitou souhrou mnoha kroků, které ultimátně vedou k tvorbě efektorových molekul, nejčastěji proteinů. Zároveň, veškeré informace potřebné k fungování těchto kroků a informace o stavbě efektorových molekul jsou zakódované v DNA. Díky moderním genetickým nástrojům, které jsou schopné manipulovat s přenosem informací z DNA i s DNA samotnou, vznikl reverzní přístup ke genetice. Experimentální biolog zná sekvenci genu o neznámé nebo ne zcela známe funkci a pomocí výsledků genové manipulace tuto funkci zjišťuje. K tomu je ale taktéž zapotřebí znalost genomu. A zde přicházejí do hry tzv. modelové organismy se známým genomem, které jsou intenzivně využívány pro studium a popsání obecných procesů aplikovatelných i na jiné organismy.

Jedním z nejznámějších modelových organismů je *Drosophila melanogaster*, v posledních letech hojně využívaná pro studium buněčné imunity. Jako stimulant imunitní reakce se často využívá infekce parazitoidní vosičkou, převážně *Leptopilina boulardi*. Účinná imunitní odpověď vyžaduje velké množství rychle dostupné energie, a tedy i přesnou regulaci. Stěžejní roli v regulaci metabolismu při metabolickém stresu hraje adenosinová signalizace (Bajgar *et al.*, 2015). V buňce převyšuje spotřeba ATP jeho produkci, hromadí se AMP, které je za pomoci 5' nukleotidáz přeměňováno na adenosin (Fencková *et al.*, 2011). Role konkrétních 5' nukleotidáz v produkci adenosinu není doposud zcela objasněna. Kandidátem byly ekto-5' nukleotidázy, ale jejich zvýšená produkce během infekce parazitoidní vosičkou nebyla prokázána. Transkriptomická data však ukázala zvýšenou produkci cytosolické nukleotidázy cN-IIIB (Doležal, nepublikováno). Cílem této práce je ověřit, zda se 5' nukleotidáza cN-IIIB, identifikována u člověka i octomilky, podílí na přeměně AMP na adenosin a tím na regulaci buněčné imunitní odpovědi.



## 1.1 Octomilka jako modelový organismus

*Drosophila melanogaster* (nověji *Sophophora melanogaster*), česky octomilka obecná, je běžným hmyzem řádu *Diptera* (dvoukřídli). Díky řadě svých vlastností je octomilka již od počátku 20. století, kdy byla poprvé použita T. H. Morganem, jedním z nejlepších modelů komplexních biologických procesů. K těmto vlastnostem patří rychlá generační doba, velké množství potomků, poměrně malý genom, snadné křížení nebo nenáročný chov. Další výhodou je jejich teplotní citlivost, kdy nižší teplota než optimálních 25°C zpomalí jejich vývoj.

Životní cyklus octomilky trvá za standardních podmínek přibližně 9-10 dní. Začíná naklazením vajíčka, ze kterého se za 24 hodin líhne první larvální stádium (první instar). Za dalších 24 hodin se larva svlékne a mění se v druhé larvální stádium (druhý instar). Stejně tak po dalších 24 hodinách vzniká třetí larvální stádium (třetí instar), ve kterém larva přetrvá 48 hodin do doby zakuklení. K zakuklení většinou dochází na suchém, bezpečném místě. Po čtyřech dnech, během kterých dochází k drastické přestavbě těla a rozvoje imaginálních disků, se líhnou plně dospělé mušky. Samečci jsou schopni se pářit již po několika hodinách, zatímco samičky až po 12 hodinách. Čerstvě vylíhlí jedinci jsou snadno identifikovatelní díky nápadně větší velikosti, světlé barvě a často ještě nerozvinutým křídům. To umožňuje získat neoplozené samičky a snadné vybrání partnera.

Octomilky mají 4 páry chromozomů, z toho první pár gonozomů s variantou X a Y stejně jako u člověka a 3 páry autozomů označované 2., 3. a 4. chromozom.

## 1.2 Imunitní systém octomilky

Hmyz je často voleným modelem pro studium obranných mechanismů nespecifické imunity. Jedním z důvodů je absence protilátkami zprostředkované adaptivní (specifické) imunity. Imunitní systém octomilky se skládá z dvou hlavních komponentů, buněčné imunity a humorální imunity (Sackton *et al.*, 2007).

Buněčnou imunitu zprostředkovávají hemocyty, buňky hemolymfy, které mají receptory rozpoznávání vzorů na buněčném povrchu patogenů (Schlenke & Begun, 2003). Samotná likvidace patogenu pak probíhá fagocytózou nebo enkapsulací a melanizací větších parazitů, jako jsou například vajíčka parazitoidní vosičky (Sackton *et al.*, 2007). Velké ploché buňky schopné enkapsulace se nazývají lamelocyty. Jsou jedním ze tří typů zralých hemocytů. Zralé hemocyty můžeme rozdělit na plazmatocyty (>95%), krystalové buňky (<5%) a lamelocyty (<1%) (Paddibhatla *et al.*, 2019). Lamelocyty vznikají přeměnou plazmatocytů až při rozpoznání napadení parazitem, ve zdravém jedinci přítomné nebývají. Nacházejí se pouze

v larválním stádiu (Vanha-aho *et al.*, 2015). Enzymatické reakce, které produkují melanin, jsou katalyzovány profenol oxidázou (Crozatier & Meister, 2007). Krystalové buňky obsahují parakrystalické inkluze. Hrají roli při hojení ran a imunitní reakci (Rizki & Rizki, 1959). Iniciují melanizaci uvolněním profenol oxidázy degranulací buňky (Vlisidou & Wood, 2015). Plazmatocyty jsou makrofágům podobné buňky, schopné fagocytózy. Slouží k eliminaci bakterií, cizorodých částic a apoptických buněk (Crozatier & Meister, 2007; Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Humorální odpověď zahajuje rozpoznání patogenně specifických molekul, jako jsou lipopolysacharidy, peptidoglykany nebo  $\beta$ -1,3-glukany. Centrum humorální imunity je tukové těleso (Schlenke & Begun, 2003). Rozpoznání patogenu vede k spuštění řady signalizací (především Toll a IMD), které stimulují tukové těleso k tvorbě antimikrobiálních peptidů uvolňovaných do hemolymfy (Sackton *et al.*, 2007).

Mnoho z těchto různorodých imunitních odpovědí je analogických vrozeným imunitním reakcím savců, především co se týče stejných komponentů a signalizačních cest. Výzkum z posledních let ukázal, že určitá míra specifické imunity existuje i u hmyzu a jiných bezobratlých (Pham *et al.*, 2007). Nicméně nespecifická imunita hraje u hmyzu hlavní roli.

### 1.3 Infekce parazitoidní vosičkou

Infekce parazitoidní vosičkou je často používaný model ke studiu buněčné imunity v larvě octomilky. Tyto vosičky jsou přirozeným nepřítelem octomilky. Vosička naklade do larvy jedno či více vajíček. Pokud larva včas vajíčko nezničí, parazitoid ji postupně bude konzumovat, dokud se nevylíhne dospělá vosička, což pro larvu znamená smrt (Keebaugh & Schlenke, 2014). Nejčastěji používanou vosičkou je *Leptopilina boulardi* (Small *et al.*, 2012).

Genetický základ obrany proti vosičce je zatím jen částečně prozkoumán (Carton *et al.*, 2008). K úspěšné obraně je třeba spolupráce všech tří typů zralých hemocytů. Vápníková signalizace aktivuje plazmatocyty, které začnou migrovat k vajíčku (Mortimer *et al.*, 2013). Vajíčko obalí a vytvoří tak první vrstvu mnohvrstevné kapsule (Russo *et al.*, 1996). Řadou specifických signálů dojde k iniciaci diferenciaci plazmatocytů a/nebo prohemocytů v lymfatické žláze. Výzkum Márkus *et al.* (2009) identifikoval plazmatocyty z tzv. hematopoetické kapsy pod kutikulou jako hlavní zdroj lamelocytů při imunitní reakci. Plazmatocyty cirkulující v hemolymfě se také mění v lamelocyty, ale až na samotném vajíčku (Anderl *et al.*, 2016). Lamelocyty pak tvoří vnější vrstvu kapsule (Sorrentino *et al.*, 2004; Zettervall *et al.*, 2004).

Posledním krokem úspěšné obrany je melanizace způsobená degranulací krystalových buněk ve spolupráci s lamelocyty, která vajíčko usmrtí (Nam *et al.*, 2008).

Vajíčko je rozpoznáno do přibližně 2 hodin po infekci (zkr. hpi, z angl. *hours post infection*), to způsobí produkci lamelocytů do 24 hpi. Nakonec je do 48 hpi vajíčko enkapsulováno a zničeno (při úspěšné obraně) (Bajgar *et al.*, 2015).

#### **1.4 Distribuce energie při imunitní odpovědi**

Imunitní odpověď je energeticky velice náročný proces. Imunitní buňky po aktivaci preferují glykolýzu, i když je dostupné dostatečné množství kyslíku na průběh oxidativní fosforylace (Delmastro-Greenwood & Piganelli, 2013). Glykolýza je mnohem méně energeticky výhodný proces (2 moly ATP na jeden mol glukózy při glykolýze oproti 32 molům ATP na jeden mol glukózy při oxidativní fosforylaci). Tato změna preference je podobná tzv. Warburgovu efektu, metabolické adaptaci, která byla poprvé popsána u kvasinek a rakovinných buněk (Warburg, 1925), nedávno pak také u savčích imunitních buněk (Mills, 2015). Warburgův efekt je stav, kdy buňky preferují glykolýzu i přes dostatek kyslíku a potlačují mitochondriální oxidativní metabolismus. Slouží k rychlé proliferaci a je pozorován i u některých nádorových buněk (Penny *et al.*, 2016).

Výhoda glykolýzy spočívá v její vysoké rychlosti. Aby byla kompenzována malá výtěžnost tohoto procesu, je nutné přeměnit velké množství glukózy (Pfeiffer, 2001).

Ukládání glukózy je hormonálně kontrolovaný proces. Zajišťuje ho inzulin. Ukládáním glukózy se snižuje její množství v oběhu, což není vhodné při procesech vyžadujících velké množství glukózy. Studie DiAngelo *et al.* (2009) na *D. melanogaster* ukázala, že aktivace vrozené imunity s sebou přináší snížení inzulinové signalizace, lokálně vedoucí k potlačení růstu a ukládání glukózy. Redukce inzulinové signalizace má stěžejní význam v tukovém tělese, centru humorální imunity a zároveň poskytovateli energie pro imunitní buňky.

Aktivované imunitní buňky upraví svůj metabolismus (podobné Warburgovu efektu) a produkují signály, které zabrání využívání energie jinými procesy než imunitou. Tento metabolický přesmyk imunitních buněk je nutný k účinné imunitní odpovědi (Dolezal *et al.*, 2019). Jak ukázali Bajgar *et al.* (2015) nebo Bajgar & Dolezal (2018), aktivace imunitního systému vede k celkovému systémovému metabolickému přesmyku v organismu.

## 1.5 Extracelulární adenosin

Adenosin (Ado) je nukleosid skládající se z purinové báze, adeninu, navázané N-glykosidickou vazbou na pěti-uhlíkatý cukr, ribózu. Je jednou ze základních stavebních jednotek nukleových kyselin (DNA i RNA) a molekul energetického metabolismu (ATP, ADP atd.). Nachází se v buňce i mimo ni (extracelulární adenosin – e-Ado).

V organismu hraje řadu rolí. Jednou z nejvýznamnějších je role stresového signálu. Vzniká v buňce během metabolického stresu, kde hladina ATP rapidně klesne díky jeho velké spotřebě a v buňce se naopak hromadí AMP. Ado je přeměněn z AMP pomocí 5'-nukleotidáz a ekvilibrativními nukleosidovými transportéry (ENT) vypuštěn mimo buňku, kde slouží jako informační signál o stresu pro celý organismus (Antonioli *et al.*, 2008) (Fenckova *et al.*, 2011). Které konkrétní 5' nukleotidázy a jak velkou roli hrají v metabolickém přesmyku není doposud zcela objasněno.

Ado může vznikat v mezibuněčném prostoru z ATP vyteklého z poškozených buněk pomocí ektoenzymů, které přeměňují ATP na ADP, AMP až nakonec na Ado. Přeměnu z ATP na ADP a z ADP na AMP zprostředkovávají dva typy enzymů – CG42249 (z rodiny ekto-5'-nukleotidáz) a CG5276 (vápníkem aktivované nukleotidázy), z AMP na Ado pak dva příbuzné enzymy NT5E-1 a NT5E-2 (CG30104) (Fenckova *et al.*, 2011). Kandidátem pro vznik e-Ado během imunitní reakce proto byly ekto-5'-nukleotidázy, ale jejich zvýšená produkce v hemocytech během infekce parazitoidní vosičkou se nepotvrdila.

## 1.6 Adenosin a metabolický přesmyk

Běžnou reakcí organismu na zvýšené hladiny adenosinu je zpomalení metabolismu k překonání stresu. Během infekce jsou buňky ve velkém metabolickém stresu, a i mechanické poškození buněk je pravděpodobné. To naznačuje roli Ado v systémovém metabolickém přesmyku (Dolezal *et al.*, 2019).

Význam role Ado v metabolickém přesmyku demonstruje Dolezal *et al.* (2005) na *adoR* mutantních octomilkách, kterým chybí adenosinová signalizace díky mutaci v *AdoR* receptoru. *AdoR* je jediným receptorem spojeným s adenosinovou signalizací (Dolezelová *et al.*, 2007). Za normálních podmínek *adoR* mutace nijak octomilku neovlivňuje (Bajgar *et al.*, 2015) (Bajgar & Dolezal, 2018). Avšak blokováním e-Ado signálu při infekci parazitoidní vosičkou vedlo k drastickému snížení rezistence proti vosičce. Místo přesměrování energie do obrany, vývoj a růst pokračovali normální rychlostí jako by infekce neexistovala. To zapříčinilo nedostatečné zásobení imunitního systému energií a tím i nedostatek aktivovaných imunitních buněk. Aktivované lamelocyty byly plně schopné rozpoznat a enkapsulovat

vajíčko, ovšem nebylo jich dostatečné množství na úspěšné potlačení infekce (Bajgar *et al.*, 2015).

Hyperglykémie, která je také spojována s metabolickým přesmykem, se u *adoR* mutantů nevyskytovala (Bajgar & Dolezal, 2018). To nastínilo možnost, že hlavním problémem u *adoR* mutantů je nedostatek energie, protože nejsou schopni zvýšit hladinu cirkulující glukózy. Potvrdil to pokus na *adoR* larvách, které byly krmeny vysokocukernou stravou (12% glukózy místo 5%). U těchto larev bylo při infekci signifikantně více aktivovaných lamelocytů než u předchozích pokusů (Bajgar *et al.*, 2015).

Zároveň Bajgar *et al.* (2015) identifikovali imunitní buňky, které se diferencují, jako důležitý zdroj Ado signálu pro metabolický přesmyk. Výzkum provedli na octomilkách se zablokovaným transportérem adenosinu ENT2 v hematopoetické linii. Zabránili tak přenosu Ado ven ze stresovaných buněk. Toto zjištění potvrzuje koncept “sobeckého imunitního systému“ poprvé navržený Straubem v roce 2014. Imunitní buňky sami vytvářejí signál, který jim dává energetické privilegium nad zbytkem organismu (Dolezal *et al.*, 2019).

## 1.7 5'-nukleotidázy

Nukleosid monofosfát fosfhydrolázy, nazývané také 5'-nukleotidázy, jsou enzymy katalyzující defosforylaci nukleosid monofosfátů na nukleosid a anorganický fosfát (Bianchi & Spychala, 2003). U člověka bylo charakterizováno 7 různých 5'-nukleotidáz lišících se substrátovou specifitou, subcelulární lokalizací a tkáňově specifickou expresí. Substrátová specifita jednotlivých 5'-nukleotidáz se prolíná, ale jejich afinita k různým substrátům je rozdílná (Hunsucker *et al.*, 2005).

Podle subcelulární lokalizace je můžeme rozdělit na 5 cytosolických, jmenovitě cytosolická 5'-nukleotidáza IA (cN-IA), cytosolická 5'-nukleotidáza IB (cN-IB), cytosolická 5'-nukleotidáza II (cN-II), cytosolická 5'-nukleotidáza IIIA (cN-IIIA; dříve nazývaná cN-III) a cytosolická 5'(3')-deoxyribonukleotidáza (cdN), jednu mitochondriální (mitochondriální 5'(3')-deoxyribonukleotidáza, mdN) a jednu extracelulární (ekto-5'-nukleotidáza, eN) (Monecke *et al.*, 2014).

### 1.7.1 cN-IIIB

V roce 2012 byl identifikován nový člen cytosolických 5'-nukleotidáz pozorovaný jak u člověka, tak i u octomilky. Byl pojmenován cN-III like protein, později změněno na cN-IIIB. Lidský cN-IIIB vykazuje 59 % sekvenční podobnost s lidským cN-IIIA. I přes významnou sekvenční podobnost mají různé specifity substrátu. cN-IIIA defosforyluje

(d)CMP, (d)UMP a (d)TMP. V porovnání s cN-IIIA má cN-IIIB širší substrátovou specifitu. Velice dobře defosforyluje CMP a UMP, s výrazně nižší účinností pak i GMP a AMP (Buschmann *et al.*, 2013).

Pozoruhodná je vysoká schopnost cN-IIIB vázat modifikovaný purin 7-methylguanidin monofosfát ( $m^7$ GMP).  $m^7$ GMP je univerzálním meziproduktem degradace mRNA čepičky a je tedy produkován při všech degradacích eukaryotického mRNA (Monecke *et al.*, 2014). Enzymy odštěpující čepičku odstrihnou od mRNA  $m^7$ GDP z dlouhých oligonukleotidů (např. enzym Dcp2), které je dále přeměněné na  $m^7$ GMP nebo rovnou  $m^7$ GMP z krátkých oligonukleotidů, katalyzováno enzymy DpcS (Monecke *et al.*, 2014).

7-methylguanidin v DNA, který může být generován prostřednictvím neenzymatického methylového přenosu z toxinů nebo buněčných metabolitů, je předmětem vystřihávání. Ačkoli opravné mechanismy pro 7-methylguanidin v RNA nebyly doposud popsány, je pravděpodobné, že jeho začlenění do RNA bude narušovat její funkci. Proto se předpokládá existence evolučního tlaku na buňky, aby zabráňovaly začlenění 7-methylguanidinu do nukleových kyselin tím, že bude přímo likvidován. cN-IIIB může tedy být považována za  $m^7$ G-specifickou nukleotidázu, která chrání buňky před nežádoucím hromaděním  $m^7$ GMP a jeho potencionálního začlenění do nukleových kyselin (Buschmann *et al.*, 2013).

Jelikož konkrétní 5'- nukleotidázy hrající roli v metabolickém přesmyku přeměňování AMP na adenosin nejsou doposud známy a cN-IIIB se poměrně silně exprimuje v hemocytech, zdá se být možným kandidátem. Má afinitu k AMP, i když je slabší než k  $m^7$ GMP. Díky velké spotřebě ATP v buňce, která je v metabolickém stresu, by slabší afinita mohla být kompenzována velkým množstvím dostupného substrátu v podobě hromadícího se AMP. Cílem mé práce je pomocí infekce parazitoidní vosičkou a genetické manipulace ověřit, zda cytosolická nukleotidáza cN-IIIB hraje roli při imunitní odpovědi u octomilky. Kromě potencionální role v tvorbě adenosinu může alternativně i aktivita cN-IIIB v degradaci RNA čepičky zastávat významnou úlohu při aktivaci imunitních buněk, která je spojena s rozsáhlou změnou exprese mnoha genů, a tudíž i s tvorbou a degradací mRNA. Bez cN-IIIB může docházet k hromaděním 7-methylguanidinu, univerzálního meziprojektu degradace RNA čepičky, a jeho začleňování do nukleových kyselin, které může narušovat jejich funkci a tím negativně ovlivňovat buňky.

Za daných předpokladů by se zásah do produkce cN-IIIB měl projevit sníženou efektivitou imunitní odpovědi a snížením počtu aktivovaných lamelocytů.

## **1.8 Nástroje molekulární biologie využitelné u octomilky**

Následující část obsahuje vysvětlení některých molekulárních nástrojů potřebných k pochopení praktické části.

### **1.8.1 Balancerové chromozomy**

Balancerové chromozomy jsou chromozomy s mnohačetnými inverzemi, které znemožňují homologní rekombinaci. Jsou navíc opatřené fenotypově rozpoznatelnými markery a recesivně letální mutací. To umožňuje lehce rozpoznat jedince nesoucího balancer a zabraňuje vzniku homozygotů se dvěma balancery. Jde o velice nápomocný nástroj pro udržování recesivně letální mutace na homologním chromozomu, protože nedochází k rekombinaci při křížení.

### **1.8.2 UAS-Gal4**

Brand a Perrimon v roce 1993 publikovali nástroj cílené exprese genu u octomilky, UAS-Gal4 systém. Gal4 je transkripční faktor původem z kvasinek, který se váže na UAS regulační sekvenci (z angl. *Upstream Activating Sequence*). To umožňuje téměř libovolnou regulaci exprese genu spojeného s UAS. K cílené expresi je potřeba mít jednu linii octomilek se zkoumaným genem za UAS sekvencí a druhou linii s tkáňově specifickým promotorem pro Gal4 transkripční aktivátor. Křížení těchto linií vede u potomků k tkáňově specifické expresi genu zájmu (Brand & Perrimon, 1993) (Fischer *et al.*, 1988).

### **1.8.3 RNA interference**

RNA interference (RNAi) je mechanismus post-transkripční genové regulace, který se nachází u mnoha organismů. Využívá nekódující úseky RNA, které jsou komplementární k cílové RNA. Prvním krokem je navázání dvouvláknové RNA (dsRNA) na enzym Dicer, který ji našťípá na 21-25 nukleotidů dlouhé úseky zvané siRNA (z angl. *short interfering RNA*). Antisense vlákno siRNA se pak stane součástí komplexu RNA a proteinů, zvaného RISC komplex, kde slouží jako vzor. Podle tohoto vzoru RISC komplex vyhledává mRNA a katalyzuje její štěpení a degradaci (Agrawal *et al.*, 2003). RNAi se ve vědě používá jako nástroj umlčení genu pomocí umělé tvorby nebo dopravení siRNA komplementární s cílovou mRNA do buňky.

#### 1.8.4 CRISPR-Cas9

CRISPR (z angl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas (CRISPR-associated) systém je adaptivní imunitní obrana bakterií a archeí proti virům a plazmidům. K nalezení a štěpení cílové DNA používá tento systém sekvenčně specifické krátké RNA tzv. CRISPR RNA (crRNA). Samotný CRISPR obsahuje spacer DNA, která odpovídá DNA viru nebo plazmidu. Každý spacer je unikátní. Cas geny jsou v operonu uspořádané helikázy a endonukleázy. Cas9 endonukleáza byla identifikována jako zodpovědná za dvouvláknový zlom iniciovaný tímto systémem. Při infekci novým virem nebo plazmidem, CRISPR-Cas zprostředkuje začlenění kusu DNA tohoto „vetřelce“ do vlastní DNA přibližně na konci CRISPR oblasti. Pak nastává fáze exprese a interference. Z CRISPRu transkripce vznikne pre-crRNA, která je enzymaticky rozštěpena na crRNA. Ta následně vytvoří komplex s Cas proteiny, které zajistí rozpoznání a umlčení cizích sekvencí (Jinek *et al.*, 2012) (Gratz *et al.*, 2015).

Tento systém byl upraven a adaptován v jednoduchý, ale vysoce účinný nástroj genové manipulace. Lze ho použít k narušení, odstranění, nahrazení, označení a úpravě jakéhokoli známého genu. Nejběžněji používaným je systém z bakterie *Streptococcus pyogenes*. Zahrnuje Cas9 protein a chimérickou RNA zvanou guide RNA (gRNA). Jediným známým požadavkem pro potencionální místo štěpení je přítomnost tří bázové sekvence zvané PAM, kterou Cas9 rozpoznává. PAM lze také modifikovat podle cílové DNA (Gratz *et al.*, 2015).



## **2. Cíle práce**

1. Pomocí RNA interference deaktivovat cN-IIIb v hematopoetické linii
2. Pomocí CRISPR-Cas9 somatické mutageneze deaktivovat cN-IIIb v hematopoetické linii
3. Infekcí parazitoidní vosičkou zjistit vliv absence cN-IIIb na buněčnou imunitní odpověď.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1 Chov octomilek

Veškeré octomilky, užitá na experimenty, byly chovány ve skleněných vialkách nebo plastových lahvičkách na standartní kukuřičné dietě (kukuřičná mouka 8%, agar 1%, instantní kvasnice 4%, sacharóza 5%) při pokojové teplotě (25°C).

#### 3.2 Křížení

K získání potřebných experimentálních jedinců bylo nejprve zapotřebí řady křížení linií, které již byly k dispozici.

##### 3.2.1 Výchozí linie octomilek

Tab. 1. Seznam výchozích linií octomilek

Číslo	Původ	Popis	Genotyp	Chromozom
1586	Tomáš Doležal	Srp Gal4	w*; Srp-Gal4	3
1499	BL-36304	TRIP background	y[1] v[1] ; P{y[+t7.7]=CaryP}attP40	3
1729	BL-64593	cN-IIIB RNAi	y1 sc* v1; P{TRiP.HMC05628}attP40	3
1661	Tomáš Doležal	double balancer	w*; Sco/CyO GFP; adgf- a[kar]/TM6B	2 + 3
1728	BL-77019	cN-IIIB CRISPR	y1 sc* v1; P{TKO.GS00793}attP40	3
1544	BL-54595	UAS-CAS9	w[1118]; P{y[+t7.7] w[+mC]=UAS- Cas9.C}attP2	3
1663	Tomáš Doležal	double/triple balancer	w*; Sco/CyO; adgf- a[kar]/TM6B/TM3 GFP Ser	2 + 3
1666	Tomáš Doležal	Srp Gal80	w*; Srp-Gal4 Gal80/TM6B	3

### 3.2.2 Křížení A (RNAi)

Toto křížení bylo provedeno k získání experimentálních jedinců aktivujících RNAi pro cN-IIIIB v hematopoetické linii (cN-IIIIB RNAi / Srp-Gal4). Driver Srp-Gal4 se exprimuje v hemocytech.

Křížily se linie 1586, obsahující Srp-Gal4, s linií 1729, obsahující konstrukt cN-IIIIB RNAi. Ke kontrole byly využity jedinci vzniklé křížením linie 1586 (Srp-Gal4) s linií 1499, která má genetické pozadí shodné s 1729, ale neobsahuje konstrukt cN-IIIIB RNAi.

### 3.2.3 Křížení B (CRISPR-Cas9)

Tímto křížením byli získáni experimentální jedinci indukující mutagenezi cN-IIIIB pomocí CRISPR-Cas9 v hematopoetické linii a kontrolní jedinci, kteří prošli stejným křížením a mají tedy stejné genetické pozadí. Křížení obsahovalo několik kroků. Použití samci a samice (panny) byli vždy na krátkou chvíli uspání pomocí CO<sub>2</sub>.

Krok č. 1: Křížení samců linie 1661 a samic linie 1728.

$$P: \text{♂ } w; \frac{Sco}{CyO \text{ GFP}}; \frac{adgf-a}{TM6B \text{ Hu}} \times \text{♀ } yV; \frac{TKO-cN-IIIIB}{TKO-cN-IIIIB}; \frac{+}{+}$$



$$F1: yV; \frac{CyO \text{ GFP}}{TKO-cN-IIIIB}; \frac{+}{TM6B \text{ Hu}}$$

Krok č. 2: Křížení samců linie 1544 a samic linie 1663.

$$P: \text{♂ } w; \frac{+}{+}; \frac{UAS-Cas9}{UAS-Cas9} \times \text{♀ } w; \frac{Sco}{CyO}; \frac{adgf-a}{TM3 \text{ GFP Ser}}$$



$$F1: w; \frac{+}{CyO}; \frac{UAS-Cas9}{TM3 \text{ GFP Ser}}$$

Krok č. 3: Pomocí markerů balancerů byli z kroku 1 vybráni jedinci heterozygotní pro TKO-cN-IIIIB na druhém chromozomu a balancer na třetím chromozomu. Podobně byli z kroku 2 vybráni výše schematicky popsání jedinci heterozygotní pro balancer na druhém chromozomu a pro UAS-Cas9 na třetím chromozomu. Tito jedinci byli zkříženi.

$$P: \text{♂ } y^v ; \frac{CyO \text{ GFP}}{TKO-cN-III B} ; \frac{+}{TM6B \text{ Hu}} \times \text{♀ } w ; \frac{+}{CyO} ; \frac{UAS-Cas9}{TM3 \text{ GFP Ser}}$$



$$F1: w ; \frac{CyO}{TKO-cN-III B} ; \frac{UAS-Cas9}{TM6B \text{ Hu}}$$

Z tohoto křížení byli vybráni jedinci heterozygotní pro TKO-cN-III B na druhém chromozomu a zároveň heterozygotní pro UAS-Cas9 na třetím chromozomu. Taktéž se vybrali potomci  $w ; \frac{CyO \text{ GFP}}{+} ; \frac{UAS-Cas9}{TM6B \text{ Hu}}$ , kteří sloužili jako kontrola.

Krok č. 4: Vybraní potomci z kroku 3 byli nadále kříženi mezi sebou tak, aby vznikli homozygoti.

$$P: \text{♂ } x \text{♀ } w ; \frac{CyO}{TKO-cN-III B} ; \frac{UAS-Cas9}{TM6B \text{ Hu}} \quad \text{kontrola: } \text{♂ } x \text{♀ } w ; \frac{CyO \text{ GFP}}{+} ; \frac{UAS-Cas9}{TM6B \text{ Hu}}$$



$$F1: w ; \frac{TKO-cN-III B}{TKO-cN-III B} ; \frac{UAS-Cas9}{UAS-Cas9}$$



$$w ; \frac{+}{+} ; \frac{UAS-Cas9}{UAS-Cas9}$$

Krok č. 5: Homozygoti hlavního křížení z kroku 4 byli kříženi zpočátku s linií 1586 (Gal4/UAS systém) a poté s 1666 (Gal4Gal80/UAS systém) pro zavedení CRISPR-Cas9 do hematopoetické linie. Teplotně senzitivní Gal80 umožňuje dočasnou represi Gal4 a tím pozdější produkci Cas9 v hemocytech. Důvodem je častá toxicita asociovaná s vysokými hladinami Cas9 spojené s Gal4/UAS (viz výsledky) (Port & Bullock, 2016).

S linií 1586

$$P: \text{♂ } w ; \frac{TKO-cN-III B}{TKO-cN-III B} ; \frac{UAS-Cas9}{UAS-Cas9} \times \text{♀ } w ; \frac{+}{+} ; \frac{Srp-Gal4}{Srp-Gal4}$$



$$F1: w ; \frac{TKO-cN-III B}{+} ; \frac{UAS-Cas9}{Srp-Gal4}$$

S linií 1666

P: ♂ w ;  $\frac{TKO-cN-III B}{TKO-cN-III B}$  ;  $\frac{UAS-Cas9}{UAS-Cas9}$  x ♀ w ;  $\frac{+}{+}$  ;  $\frac{Srp-Gal4 Gal80}{TM6B}$



F1: w ;  $\frac{TKO-cN-III B}{+}$  ;  $\frac{Srp-Gal4 Gal80}{UAS-Cas9}$

Kontrolní jedinci byli zkříženi stejným způsobem.

### 3.3 Infekce a počítání lamelocytů

K infekci za účelem vybuzení imunitního systému bylo vybráno vždy 120 larev brzkého třetího instaru (72 hodin staré). Výjimkou byly larvy vzniklé křížením s linií 1666, které byly 72 hodin ponechány v 18°C a poté přibližně 32 hodin v 25°C. Důvodem je teplotní senzitivita Gal4Gal80/UAS systému. Infekce probíhala v plastovém válci na Petriho misce se 110 samičkami (plus 30 samečky) parazitoidní vosičky *Leptopilina boulardi* po dobu 45 minut. Poté byly infikované larvy ponechány 18 h v inkubátoru (25°C).

Po 18-24h by měly být lamelocyty již vyvinuté, ale stále ne nalepené na vajíčku vosičky. V tomto intervalu probíhalo počítání lamelocytů. Nejprve byla larvička omyta a přemístěna na skleněnou destičku s jamkami obsahujícími 15 µl PBS. Následně byla pod binolupou (Olympus SZX12) pomocí dvou mikropinzet roztržena a vylita. Pro maximální výtěžek je potřeba vylít veškerou hemolymfu nejlépe převrácením kutikuly naruby a rozvinutím střev (střeva se ovšem nesmí poškodit). Směs hemolymfy s PBS byla několikrát promíchána mikropipetou. 10 µl směsi se přeneslo na hemocytometr (typ improved Neubauer), na kterém byly pod DIC (diferenciálním interferenčním kontrastem) mikroskopem (Olympus IX71) počítány lamelocyty larviček, jež obsahovaly 3 a více vajíček vosičky (považováno za dostatečnou infekci).

Počítací komora hemocytometru se skládá z 9 velkých čtverců o straně 1 mm. Prostřední velký čtverec je pak rozdělený na 25 středních čtverců, které se skládají z 16 malých čtverců. Pro počítání lamelocytů byl použit prostřední velký čtverec. Tekutina na hemocytometru pod sklíčkem dosahuje výšky 0,1 mm. Počítaný čtverec má tedy objem 1 x 1 x 0,1 = 0,1 mm<sup>3</sup> = 10<sup>-4</sup> ml. Hemolymfa larvičky byla rozpuštěna 15 µl PBS. Spočítány byly lamelocyty na objem 0,1 µl, proto je třeba číslo vynásobit 150, aby počet buněk odpovídal celé larvičce.

### 3.4 Navržení a test primerů

Sekvence genu byla získána z databáze FlyBase a pomocí programu Geneious 8.1.6. byly navrženy primery. Dvojice forward a reverse primerů pro cN-IIIB z cDNA (pozorování vlivu RNAi množstvím mRNA přepsané reverzní transkripcí do cDNA) a dvojice forward a reverse primerů pro cN-IIIB z genomové DNA (CRISPR-Cas9 působí v genomové DNA). Požadovaná délka produktu byla 100-150 bp s podobnou teplotou nasedání.

Primery pro RP49 (Ribosomální protein 49) již byly k dispozici.

**Tab. 2. Primery**

Název	Oligonukleotidová sekvence	Teplota nasedání
qCN-IIIB_r1	5' - GAA CTC CCT GCG GGA ATT ATA - 3'	55°C
qCN-IIIB_f1	5' - GAC CAC GTA GAA GCC AAC AT - 3'	54.9°C
CNIIbCRISPRfw1	5' - GCT GGA CGA GAC TGC TC - 3'	57.7°C
CNIIbCRISPRr1	5' - CGA ACT TGA TGA TGC GC - 3'	56.9°C
CNIIbCRISPRfw2	5' - CTC AGC TGC TGG ACG AGA AG - 3'	57.7°C
CNIIbCRISPRr2	5' - GTT GAT GAT GCG CTC CAC CT - 3'	57.9°C
qRP49 fw	5' - AAGCTGTCGCACAAATGGCG - 3'	61.4°C
qRP49 rev	5' - GCACGTTGTGCACCAGGAAC - 3'	59.3°C

#### 3.4.1 PCR

Funkčnost primerů byla testována pomocí PCR a následné elektroforézy. K uspané mušce (*w*) v mikrozkuhavce bylo přidáno 50  $\mu$ l squishing pufru [10mM Tris-Cl (pH 8.2), 1mM EDTA, 25 mM NaCl] a 0,5  $\mu$ l proteinkinázy K (200  $\mu$ g/ml). Následně se muška rozdrtila pomocí sterilní pipetovací špičky. Směs byla dále inkubována ve 37°C po dobu 30 minut a poté v 95°C 3 minuty (Biometra TB1 Thermoblock).

Na jednu PCR reakci o objemu 20  $\mu$ l bylo za potřeby 10  $\mu$ l 2x PPP Master Mix (dNTPs, PCR pufr, DNA polymeráza, loading dye) (Top-Bio), 1  $\mu$ l forward primeru (20  $\mu$ M), 1  $\mu$ l reverse primeru (20  $\mu$ M), 7  $\mu$ l Ultra PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio) a 1  $\mu$ l templátové DNA. Reakce proběhly v termocykleru (Biometra T3000 Thermocycler) dle následujících protokolů.

#### Protokol gradientové PCR pro primery qCN-IIIIB (produkt 169 bp)

95°C	3 min		denaturace, aktivace polymerázy
95°C	30 s	} 30 x	denaturace
52.8°C, 55.7°C, 57.1°C,	30 s		nasedání primerů
58.6°C, 61.0°C			
72°C	30 s		elongace
72°C	10 min		finální elongace

#### Protokol PCR pro primery CNIIIbCRISPR (produkt 150 bp)

95°C	3 min		denaturace, aktivace polymerázy
95°C	30 s	} 30 x	denaturace
57°C	30 s		nasedání primerů
72°C	30 s		elongace
72°C	10 min		finální elongace

### 3.4.2 Gelová elektroforéza

Velikost produktu byla ověřena na gelové elektroforéze. Na 1% gel o objemu 50 ml bylo zapotřebí 50 ml 1 x TBE pufru [výroba 5 x TBE na 11 – 54g Tris báze, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)] a 0,5 g agarózy (Roth). Směs se zahřívala v mikrovlnné troubě, dokud se vločky agarózy nerozpustily. Poté se schladila proudem studené vody z kohoutku na cca 60°C a přidalo se 5 µl ethidium bromidu. Směs byla následně nalita do elektroforetické aparatury s hřebínkem a ponechána polymerizovat při pokojové teplotě cca 30 minut. Po zatuhnutí se gel zalil 1 x TBE. Do první jamky bylo napipetováno 4,5 µl DNA ladderu (marker molekulové hmotnosti, 100bp nebo 1kb+; NEB) a do zbylých 7 µl jednotlivých PCR produktů. Poslední jamka obsahovala negativní kontrolu, kde byl templát nahrazen dH<sub>2</sub>O. Gel běžel po dobu cca 45 min při konstantním napětí 75 V (5-8 V na 1 cm vzdálenosti od anody ke katodě).

### 3.5 Kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR)

Pomocí RT-qPCR je možné kvantifikovat množství sledované RNA (respektive cDNA) v každém cyklu PCR porovnáním s amplifikací genu, u kterého je předpokládána stejná koncentrace (je stejně exprimován) v kontrolním i experimentálním vzorku (nejlépe “house keeping“ genu) a z toho tedy i zjistit účinnost RNA interference. Mutanti cN-IIIIB RNAi / Srp Gal4 (1586x1729) aktivují RNAi v hematopoetické linii, proto bylo potřeba

izolovat RNA z hemocytů. Ke kontrole byly využity jedinci vzniklí křížením linie 1586 (Srp Gal4) s kontrolní linií 1499.

### 3.5.1 Sběr hemolymfy

Hemolymfa byla sbírána ve dvou různých významných časových bodech: 0 hodin (brzký třetí instar, 72 h staré), 18 hodin bez infekce a 18 hodin s infekcí. Pro každý čas bylo provedeno 5 biologických replikátů (pro RNAi mutanty i kontrolu).

60 mutantních larev bylo vypitváno pod binolupou na parafilmem opatřeném sklíčku na ledu. Hemolymfa se přenesla mikropipetou do mikrozkušavky (Neptune) s 200  $\mu$ l trisolu (TRIzol, Ambion). Směs byla vortexována, scentrifugována a homogenizovaná mechanickým homogenizátorem. Vzorky se skladovaly v - 80°C do doby použití (izolace RNA).

### 3.5.2 Izolace RNA

RNA byla izolovaná pomocí izolačního kitu Direct-zol RNA kit (ZYMO Research) dle instrukcí výrobce. Výsledná RNA byla rozpuštěna v 15  $\mu$ l „RNase free“ H<sub>2</sub>O. Na spektrofotometru se změřila koncentrace vyextrahované RNA v ng/ml.

### 3.5.3 Reverzní transkripce

Práce probíhala na ledě v prostředí bez RNas s RNase free chemikáliemi. Bylo třeba připravit dvě směsi na jeden vzorek (Tab. 1 a Tab. 2).

**Tab. 3. Směs 1 (10  $\mu$ l)**

Oligo dT primer (50 $\mu$ M, 5' - d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)-3')	1 $\mu$ l
dNTPs (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Templátová RNA	1 $\mu$ g
DEPC H <sub>2</sub> O	Doplnit do 10 $\mu$ l

Po smíchání byla zahřáta 5 minut na 65°C a následně okamžitě schlazena na ledu.

**Tab. 4. Směs 2 (10  $\mu$ l)**

5x PrimeScript Buffer (Takara)	4 $\mu$ l
PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara)	0,5 $\mu$ l
DEPC H <sub>2</sub> O	5,5 $\mu$ l



Obě směsi byly smíchány a inkubovány v termocykleru 10 minut v 30°C, 60 min v 42°C (optimum pro aktivitu reverzní transkriptázy) a nakonec 15 minut v 70°C. Poté se výsledná cDNA dala chladit na led a byla Ultra PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio) naředěna 10 krát.

### 3.5.4 qPCR

Nejprve byla ověřena účinnost primerů (efektivita amplifikace) křivkou ředící řady kontrolního templátu larvální cDNA. Kontrolním genem pro porovnání křivek amplifikace byl RP49. Templátová DNA byla zředěna 2x, 10x, 100x, 1000x a 10 000x. PCR směs byla připravena z 0,48 µl forward primeru (20 µM), 0,48 µl reverse primeru (20 µM), 7,5 µl SYBR Green (Top-Bio) a 4,02 µl Ultra PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio). Ke všem jednotlivým ředěním byly provedeny 3 technické replikáty pro cN-IIIB RNAi primery i pro RP49 primery. Byly použity 96 jamkové PCR destičky (BioRad). Do každé jamky se napipetovaly 3 µl vzorku a 12 µl PCR směsi. Reakce probíhala v Real-Time PCR termocykleru (BioRad).

Samotná qPCR probíhala na dvou 96 jamkových destičkách, kdy na jedné byly použity cN-IIIB RNAi primery a na druhé RP49 primery. Ke každému biologickému opakování byly provedeny 3 technické replikáty (viz Tab. 5, biologické replikáty jsou označeny 1-5, technické replikáty jsou označeny a-c). PCR směs byla totožná se směsí pro kontrolu účinnosti primerů. Do každé jamky bylo opět napipetováno 12 µl PCR směsi a 3 µl vzorku.

**Tab. 5. qPCR replikáty**

Biologické replikáty	Technické replikáty								
	0 h			18 h bez infekce			18 h s infekcí		
	1a	1b	1c	1a	1b	1c	1a	1b	1c
	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c
	3a	3b	3c	3a	3b	3c	3a	3b	3c
	4a	4b	4c	4a	4b	4c	4a	4b	4c
	5a	5b	5c	5a	5b	5c	5a	5b	5c

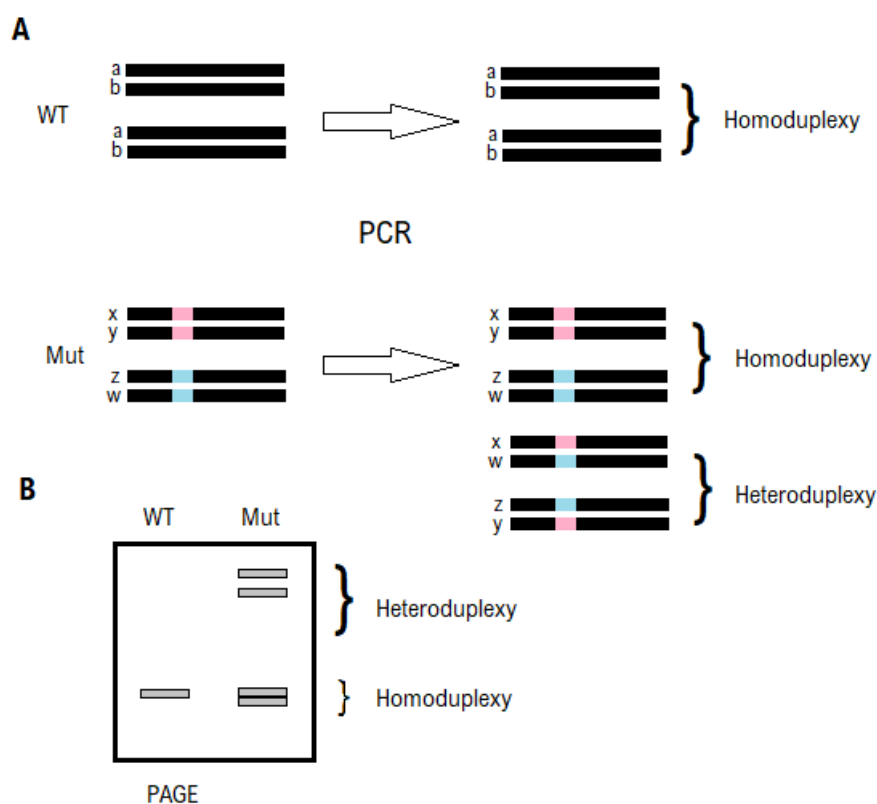
Vzor uvedený v tabulce byl použit pro RNAi mutanty a jejich kontrolu, a to pro cN-IIIB RNAi primery i pro RP49 primery.

### 3.6 Ověření somatické mutagenese pomocí tkáňově-specifické CRISPR-Cas9

Následující kroky byly provedeny k ověření funkce CRISPR-Cas9 v hematopoetické linii.

#### 3.6.1 Heteroduplex Mobility Assay

Tato metoda využívá heteroduplexu, který se tvoří během nasedání primerů (PCR annealing) na DNA s možnými mutacemi. Po mutagenезi pomocí Cas9 je ve vzorku směs DNA templátů s různými mutacemi v místě štěpení Cas9 (Obr. 1). Po PCR jsou tam tedy i různé produkty, které mezi sebou tvoří heteroduplexy. V místech, kde komplementární řetězce nejsou totožné, se tvoří bubliny. Tento heteroduplex je poté vizualizovatelný pomocí citlivého polyakrylamidového gelu (PAGE), protože se v gelu pohybuje pomaleji kvůli vzniklé bublině (Zhu *et al.*, 2014) (Foster *et al.*, 2019).



**Obr. 1: Identifikace insercí a delecí vzniklých mutagenézí CRISPR-Cas9 na polyakrylamidovém gelu.** WT značí nemutantní jedince (z angl. *wild type*). Mut značí mutanty pro CRISPR-Cas9.

A) Ilustrační obrázek tvorby heteroduplexů při PCR denaturaci a nasedání primerů. Černé proužky značí vlákna DNA, ab – nemutantní vlákna, xy a zw – různé mutace vzniklé opravou dvouvláknového zlomu způsobeného Cas9 (růžový obdélník jedna mutace, modrý obdélník jiná mutace). Po PCR

denaturaci a nasedání primerů vzniká více různých heteroduplexů, vzniklých párováním vláken s různými mutacemi. Vzniká i více různých homoduplexů. B) Heteroduplexy se díky vzniklé bublině pohybují v gelu pomaleji než homoduplexy. Na 15% polyakrylamidovém gelu (PAGE) jsou snadno rozpoznatelné, protože nestihnou doputovat tak daleko jako homoduplexy (upraveno dle Zhu *et al.*, 2014).

### 3.6.2 Izolace genomové DNA

DNA pro Heteroduplex Mobility Assay byla získána metodou fenolové extrakce. Kromě DNA mutantních jedinců (  $w ; \frac{TKO-cN-IIIb}{+} ; \frac{UAS-Cas9}{Srp-Gal4}$  ) byla izolována i DNA kontrolních jedinců v podobě linie 1586 (  $\text{♂} \times \text{♀} w ; \frac{+}{+} ; \frac{Srp-Gal4}{Srp-Gal4}$  ).

K hemolymfě z 60 larev bylo přidáno 400  $\mu$ l SNET bufferu [na 10 ml - 1M Tris-Cl (pH 8.0) 200  $\mu$ l, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100  $\mu$ l, 5 M NaCl 800  $\mu$ l, 10 % SDS 1000  $\mu$ l + 7,9 ml H<sub>2</sub>O] a 8  $\mu$ l proteinázy K (20mg/ml). Směs byla inkubována v 55°C přes noc. Následovalo opakované přečištění DNA separací fenolové fáze (vždy v množství odpovídajícím množství vzorku – 1. Fenol:chloroform:isoamylalkohol v poměru 25:24:1, 2. chloroform:isoamylalkohol v poměru 24:1, 3. isopropanol) a alkoholová precipitace DNA (75% ethanol). Získaná DNA se rozpustila v 15  $\mu$ l Ultra PCR H<sub>2</sub>O. Koncentrace DNA byla následně změřena na spektrofotometru a kvalita ověřena pomocí jednoduché gelové elektroforézy.

Dále byla získaná DNA amplifikovaná pomocí PCR (protokol viz. 3.4.1; primery CNIIIbCRISPRfw1, CNIIIbCRISPRr1), při které došlo ke vzniku heteroduplexů. Jejich přítomnost se ověřila na PAGE gelu.

Polyakrylamidový PAGE gel [30% akrylamid-bisakrylamid (29:1, w/w) 3 ml, 1x Tris-borate-EDTA (TBE) 3ml, 10% ammonium persulfát 100  $\mu$ l, TEMED 5  $\mu$ l] s 5  $\mu$ l PCR produktu v každé jamce běžel 2 hodiny při konstantním napětí 150 V a následně byl 10 min barven pomocí GelRed (5 $\mu$ l na 50ml) (Biotium).

### 3.7 Statistické zpracování dat

Data byla statisticky a graficky zpracována v programu GrafPad Prism 8. Pro vyhodnocení počtů lamelocytů byl užít Mann-Whitney test. Pro analýzu qPCR dat byla nejprve užita metoda  $\Delta\Delta$ CT, která porovnává amplifikaci referenčního a zkoumaného genu. Vzniklá data byla vyhodnocena pomocí neparametrické ANOVY (Kruskal-Wallis test).

Výsledky qPCR byly zpracovány pomocí  $\Delta\Delta\text{Ct}$  testu. Z qPCR byly získány Ct (z angl. *cycle threshold*) hodnoty pro všechny vzorky (viz Tab. 5). Ct je číslo cyklu, kdy se objevila měřitelná fluorescence. Z Ct jednotlivých technických replikátů byl spočítán aritmetický průměr, takže každý biologický replikát reprezentuje jedna hodnota. Poté bylo spočítáno delta Ct ( $\Delta\text{Ct}$ ) z těchto hodnot reprezentujících biologické replikáty.  $\Delta\text{Ct}$  bylo počítáno u všech biologických replikátů pro mutanty cN-IIIIB i kontrolu.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (gen zájmu cN-IIIIB)} - \text{Ct (housekeeping gen RP49)}$$

Následně byl spočítán aritmetický průměr všech hodnot  $\Delta\text{Ct}$  kontroly. Tento průměr byl využit ke spočítání  $\Delta\Delta\text{Ct}$ .  $\Delta\Delta\text{Ct}$  bylo opět počítáno u všech biologických replikátů pro mutanty cN-IIIIB i kontrolu.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (vzorek)} - \Delta\text{Ct (průměr kontroly)}$$

K odstranění negativní hodnoty bylo číslo 2 umocněno na  $-(\Delta\Delta\text{Ct})$ .

$$\text{Fold change} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$$

$2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$  se anglicky nazývá fold change (fold gene exprese). Hodnota fold change rovná jedné znamená, že exprese sledovaného genu v experimentálním vzorku je rovná 100% exprese v kontrole. Takže mezi experimentální skupinou a kontrolní skupinou nedochází k žádné změně. Hodnoty nad 1 značí zvýšenou expresi oproti kontrole a pod 1 sníženou expresi.

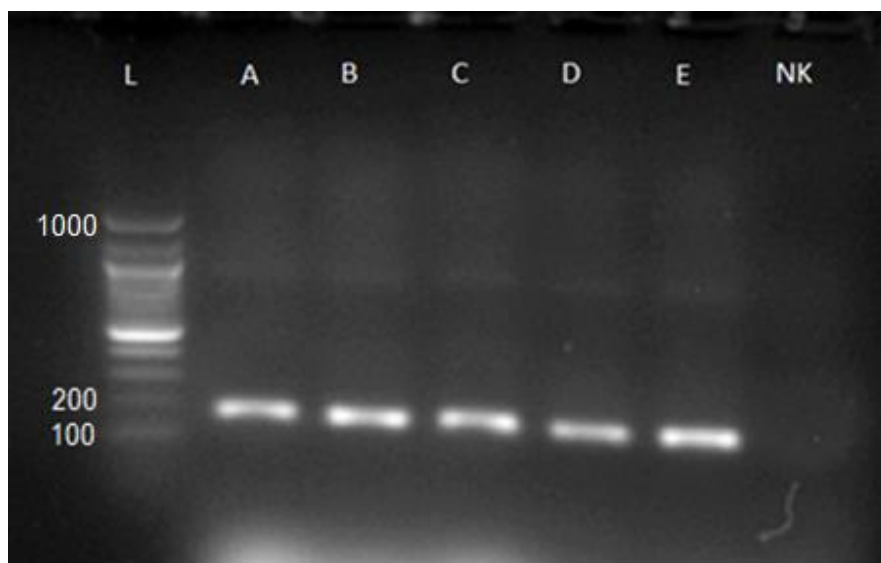
## 4. Výsledky

### 4.1 RNA interference cN-IIIB má vliv na tvorbu lamelocytů

Cílem tohoto pokusu bylo utlumení genu cN-IIIB v hematopoetické linii pomocí RNA interference. K zavedení RNAi konstruktů do hemocytů byl použit Gal4/UAS systém. Driver Srp-Gal4 se exprimuje v hemocytech. Křížily se linie 1586, obsahující Srp-Gal4, s linií 1729, obsahující konstrukt cN-IIIB RNAi. Ke kontrole byly využiti jedinci vzniklí křížením linie 1586 (Srp-Gal4) s linií 1499, která má genetické pozadí shodné s 1729, ale neobsahuje konstrukt cN-IIIB RNAi. Funkce konstruktů RNAi byla ověřena pomocí RT-qPCR.

#### 4.1.1 Zavedení primerů pro RT-qPCR

V programu Geneious 8.1.6. byly navrženy primery forward a reverse (qCN-IIIB\_r1, qCN-IIIB\_f1) pro cN-IIIB z cDNA. Jejich funkčnost byla ověřena na larvální cDNA pomocí gradientové PCR a následné elektroforézy. Tím byla determinována optimální teplota nasedání primerů.



**Obr. 2:** Agarózový gel ověřující funkci primerů pro cN-IIIB z cDNA tvorbou požadovaného PCR produktu. L značí 100 bp ladder, písmena A-E značí různé teploty nasedání primerů: A= 52.8°C, B= 55.7°C, C= 57.1°C, D= 58.6°C, E= 61.0°C, NK značí negativní kontrolu. Produkt je dlouhý 169 bp.

Jelikož primery fungovaly dobře při všech zvolených teplotách, jako optimální teplota bylo zvoleno 60°C. Tato teplota je nejbliž teplotě nasedání primerů pro qRP49, které byly použity při amplifikaci kontrolního genu (viz část Metody, 3.4. Tab. 2)

#### **4.1.2 Konstrukt RNAi snižuje expresi cN-IIIIB v hematopoetické linii**

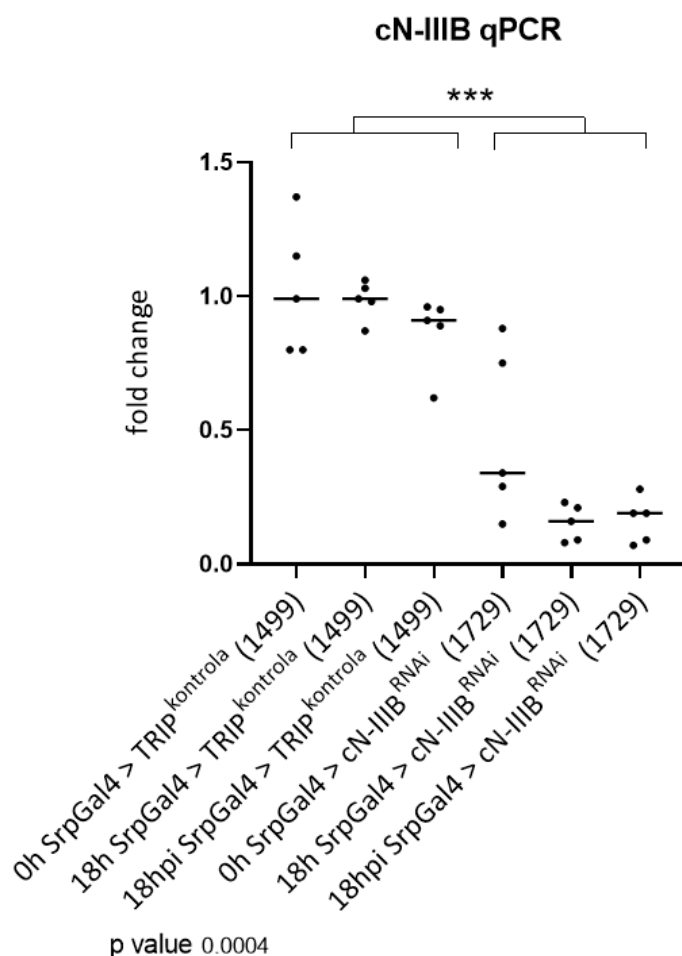
RT-qPCR byla provedena k ověření funkce RNAi konstruktů. RT-qPCR umožňuje kvantifikovat sledovanou RNA (respektive cDNA) v každém cyklu PCR porovnáním s amplifikací genu, u kterého je předpokládána stejná koncentrace (je stejně exprimován) v kontrolním i experimentálním vzorku. Kontrolním genem pro porovnání křivek amplifikace byl RP49.

Nejprve byla ověřena účinnost primerů (efektivita amplifikace) křivkou ředící řady kontrolního templátu larvální cDNA. Templátová DNA byla zředěna 2x, 10x, 100x, 1000x a 10 000x.

Účinnost primerů byla vyhodnocena jako 110,1%. Vyšší, než stoprocentní účinnost může být dána kontaminací vzorku inhibitory DNA polymerázy, chybou v pipetování, nespecifickými produkty nebo primerovými dimery. Z výsledku křivky tání se v tomto případě pravděpodobně jedná o vznik primer dimerů. Účinnost 90% až 110% je považována za optimální.

Výsledky qPCR byly zpracovány pomocí  $\Delta\Delta C_t$  testu. Porovnání  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  hemocytů z kontrolních jedinců a jedinců s indukovanou RNAi vypovídá o mnohem menší expresi cN-IIIIB po RNAi (Obr. 3). Potvrzuje tedy funkci RNAi konstruktů v hemocytech. Statisticky vyšel tento rozdíl průkazně (hodnota p (p value) = 0,0004; počítáno Kruskal-Wallis testem).

Nejvyšší hodnoty exprese byly naměřeny v 0 hodinách. Při porovnání hodnot RNAi a kontroly v 0 h pomocí Mann-Whitney testu vyšel rozdíl průkazně na hladině signifikance \* p < 0,05 (p = 0.0317).



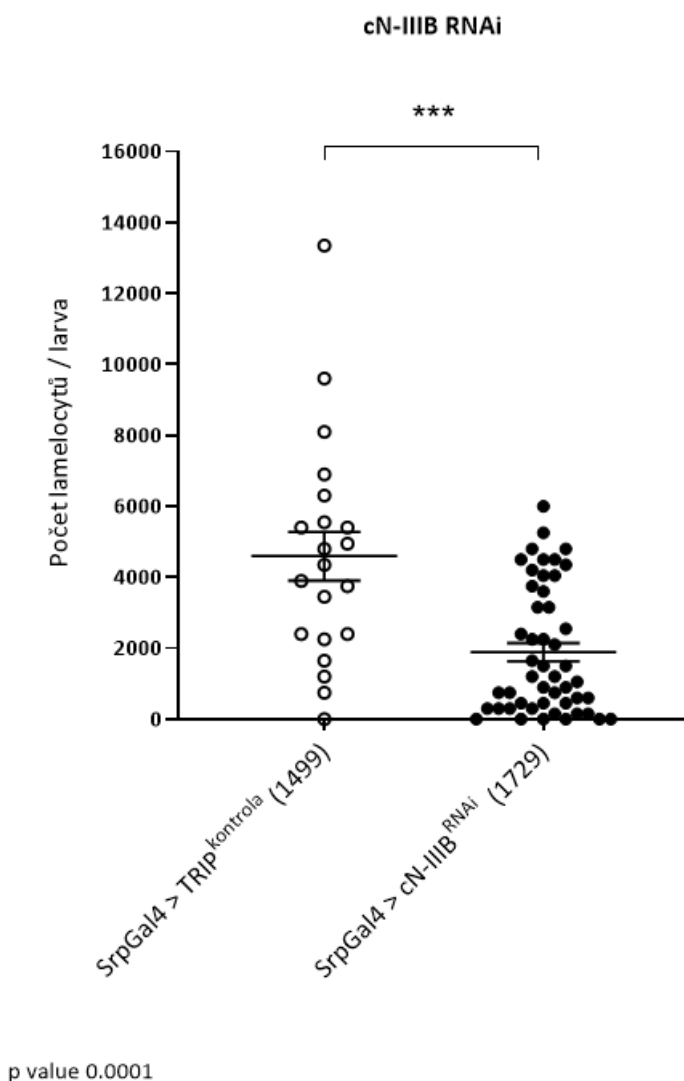
**Obr. 3: Graf porovnání exprese cN-IIIB v hematopoetické linii cN-IIIB RNAi mutantů a kontrolních jedinců.** Každý bod reprezentuje jednu  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  hodnotu. Zkratka RNAi značí jedince s konstruktem cN-IIIB RNAi aktivním v hematopoetické linii, “kontrola“ značí kontrolní jedince se stejným genetickým pozadím, ale bez cN-IIIB RNAi konstruktu. Horizontální čára reprezentuje medián. Vzorky byly odebírány v 0 hodinách (0 h), v 18 hodinách bez infekce (18 h) a v 18 hodinách s infekcí (18 hpi). Analýza (Kruskal-Wallis test) ukazuje rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci průkazný na hladině signifikance \*\*\*  $p < 0,0005$ .

#### 4.1.3 Počty lamelocytů se při cN-IIIB RNAi zmenšují

Jedinci s indukovanou RNAi pro cN-IIIB a kontrolní jedinci byli v brzkém třetím instaru infikováni parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*. Infekce vede k vybuzení imunitní odpovědi a iniciaci metabolického přesmyku organismu. Bez metabolického přesmyku nejsou hemocyty schopné se v dostatečném množství měnit na lamelocyty, buňky, které enkapsulují vajíčko parazitoidní vosičky a bojují tedy s infekcí. Má-li cN-IIIB vliv na adenosin, signální molekulu metabolického přesmyku, projeví se při infekci sníženým počtem

lamelocytů. Lamelocyty byly počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce. V tomto intervalu by se aktivované lamelocyty již měly nacházet v hemolymfě, ale neměly by plně enkapsulovat vajíčko.

U larev s aktivní cN-IIIB RNAi byly při infekci pozorovány výrazně menší počty lamelocytů než u kontrolních jedinců (Obr. 4). Statisticky vyšel tento rozdíl velice průkazně ( $p = 0,0001$ ).



**Obr. 4: Počty lamelocytů mutantů pro cN-IIIB RNAi v hematopoetické linii a kontrolu při infekci prazitoidní vosičkou.** Každý bod reprezentuje individuální larvu. Lamelocyty byly počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce. Horizontální čára uprostřed reprezentuje aritmetický průměr a zbylé dvě čáry směrodatnou odchylku průměru (SEM, z angl. *standard error of mean*). Pro otestování signifikance byl použit Mann-Whitney test. Analýza ukazuje rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci průkazný na hladině signifikance \*\*\*  $p < 0,0005$ .

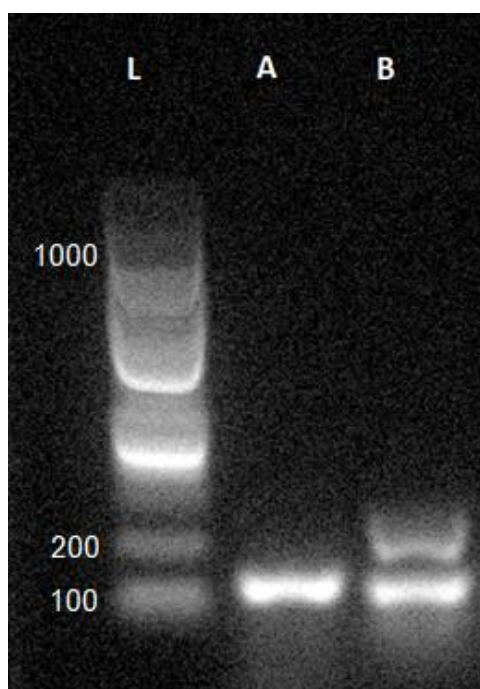


## 4.2 cN-IIIb CRISPR-Cas9 má vliv na tvorbu lamelocytů

Cílem tohoto pokusu bylo taktéž utlumení genu cN-IIIb v hematopoetické linii, ale tentokrát pomocí mutagenese indukované CRISPR-Cas9. K zavedení CRISPR-Cas9 do hemocytů byl zpočátku užitý Gal4/UAS systém a poté Gal4Gal80/UAS systém. Jak driver Srp-Gal4 tak Srp-Gal4Gal80 se exprimují v hemocytech. Homozygoti TKO-cN-IIIb; UAS-Cas9 vzniklí křížením několika linií byli dále kříženi nejprve s linií 1586 (Srp-Gal4) a později s 1666 (Srp-Gal4Gal80). Ke kontrole byli využiti jedinci bez TKO-cN-IIIb. Funkce konstruktů CRISPR-Cas9 byla ověřena pomocí Heteroduplex Mobility Assay.

### 4.2.1 Optimalizace primerů pro Heteroduplex Mobility Assay

V programu Geneious 8.1.6. byly navrženy dva forward a dva reverse primery (CNIIIbCRISPRfw1, CNIIIbCRISPRr1, CNIIIbCRISPRfw2, CNIIIbCRISPRr2) pro cN-IIIb z genomové DNA, kde CRISPR-Cas9 působí. Jejich funkce byla ověřena pomocí PCR a následné gelové elektroforézy. Podle výsledku elektroforézy byla vybrána účinnější dvojice pro následné používání.



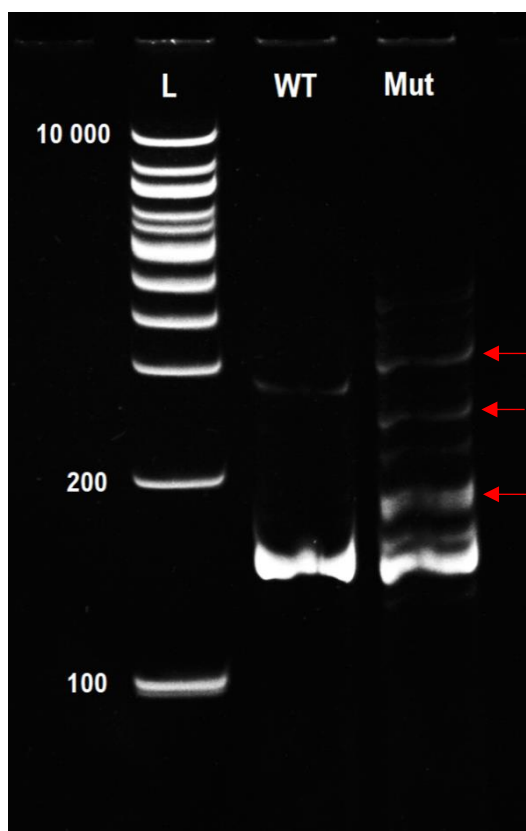
**Obr. 5:** Agarózový gel ověřující funkci primerů pro cN-IIIb z genomové DNA tvorbou požadovaného PCR produktu. L značí 100 bp ladder, „A“ značí použití primerů CNIIIbCRISPRfw1, CNIIIbCRISPRr1. „B“ značí použití primerů CNIIIbCRISPRfw2, CNIIIbCRISPRr2. Očekávaná délka produktu je 150 bp.

K dalšímu užívání byly vybrány primery CNIIIbCRISPRfw1, CNIIIbCRISPRr1 (A). Druhá dvojice primerů (B) tvořila více než jeden produkt.

#### 4.2.2 CRISPR-Cas9 pro cN-IIIb v hemocytech vytváří mutace

K ověření funkce konstruktů CRISPR-Cas9 byla užitá metoda Heteroduplex Mobility Assay. Metoda sleduje heteroduplexy vzniklé působením Cas9. Heteroduplexy se pohybují v PAGE pomaleji, kvůli bublině vzniklé nespárovanými bázemi (viz Obr. 1 z 3.6.1). Homozygoti TKO-cN-IIIb; UAS-Cas9 byli kříženi s linií 1586 (Srp-Gal4). Ke kontrole byla využita linie 1586 (Srp-Gal4).

Výsledek Heteroduplex Mobility Assay dokazuje tvorbu heteroduplexů u mutantů pro cN-IIIb CRISPR-Cas9 v hemocytech (Obr. 6, dráha „Mut“). Heteroduplexy se na PAGE projevují jako řada proužků nad hlavním proužkem pro cN-IIIb. Potvrzuje to tedy funkci konstruktů v hemocytech.



**Obr. 6:** Polyakrylamidový gel ověřující tvorbu heteroduplexů u mutantů pro cN-IIIb CRISPR-Cas9. L značí 1kb+ ladder. WT značí nemutantní (wild type) kontrolu v podobě linie 1586. Mut značí CRISPR-Cas9 mutanty. Slabší proužky nad hlavním proužkem pro cN-IIIb u Mut jsou heteroduplexy vzniklé jako důsledek mutagenese CRISPR-Cas9 (označené červenou šipkou).

#### 4.2.3 Počty lamelocytů se při inaktivaci cN-IIIB pomocí CRISPR-Cas9 zmenšují

Mutanti pro cN-IIIB CRISPR-Cas9 a kontrolní jedinci byli v brzkém třetím instaru infikováni parazitoidní vosičkou *L. boulardi* k vybuzení imunitní odpovědi, stejně jako cN-IIIB RNAi mutanti. Lamelocyty byly opět počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce.

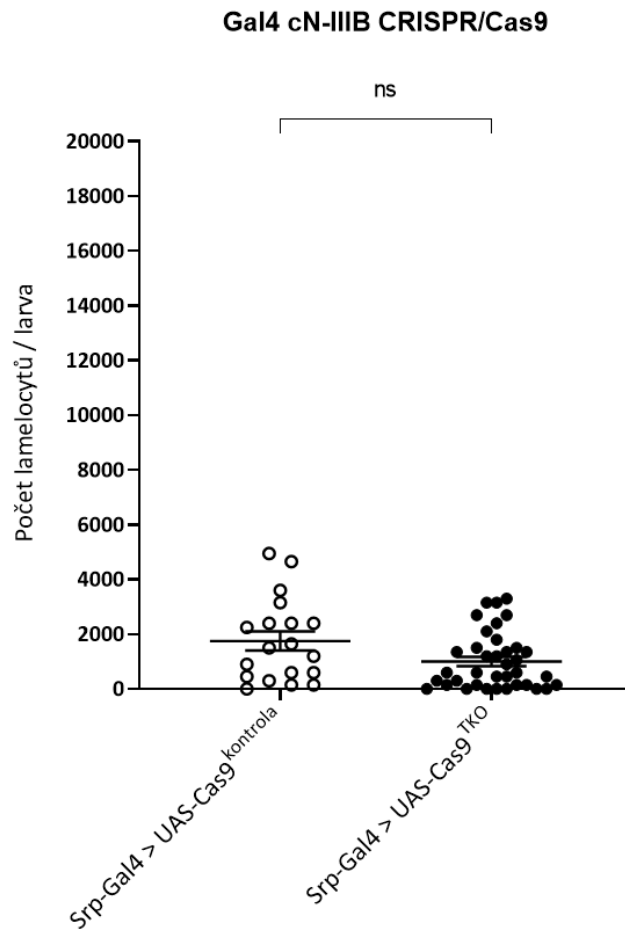
Mutanti i kontrolní jedinci byly zpočátku kříženi se Srp-Gal4 (linie 1586). U těchto CRISPR-Cas9 mutantů byly pozorovány velmi nízké počty lamelocytů, stejně jako u RNAi mutantů. Ovšem u kontroly, která v hemocytech exprimuje pouze Cas9 bez gRNA, byly také překvapivě malé počty těchto buněk. Velmi často se pohybovaly kolem nuly (Obr. 7). Při srovnání s mutanty nebyl na první pohled jasný průkazný rozdíl. Důvodem může být genetické pozadí s Cas9 nebo může jít o důsledek křížení. Nicméně ani jednu z těchto teorií nelze ověřit. Jediný možný částečně napravitelný důvod je negativní vliv samotné Cas9 na buňky.

Proto bylo rozhodnuto křížit mutanty i kontrolu namísto se Srp-Gal4 (linie 1586) s linií obsahující Srp-Gal4Gal80 (1666). Gal80 je represorem Gal4. Je také teplotně senzitivní, funguje pouze v nižších teplotách, než je standardní pro vývoj octomilky (25°C). To umožňuje dočasně blokovat Gal4 v embryu a larvě.

Nakladená vajíčka z tohoto křížení byla ponechána 3 dny v 18°C, aby Gal80 správně fungovalo. Poté byly vylíhnuté larvy 34 - 38 hodin inkubovány v 25°C k aktivaci Gal4 a následně infikovány běžným způsobem (viz 3.3).

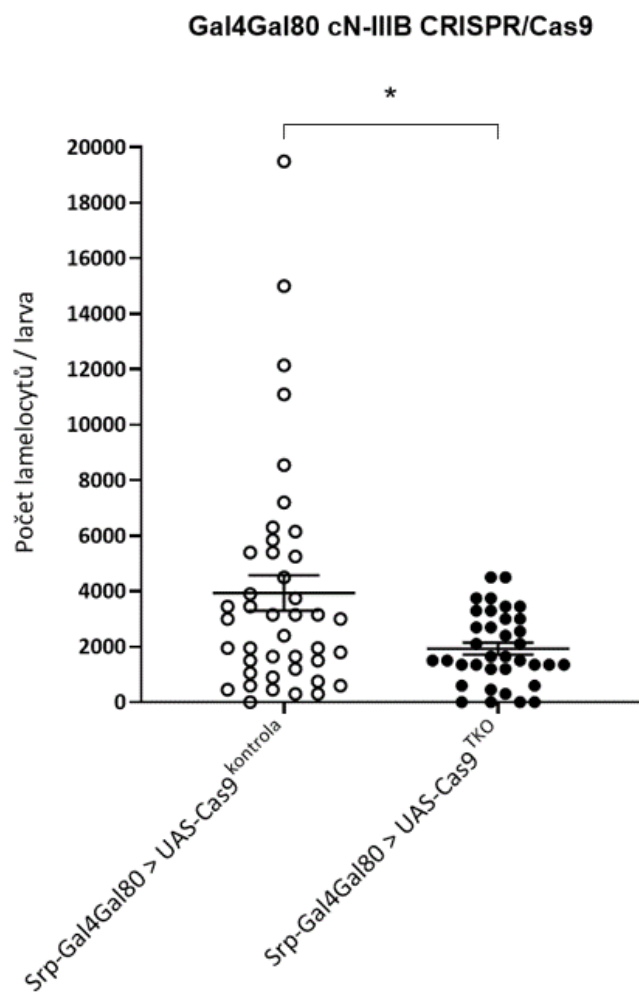
Výsledné počty lamelocytů byly u kontroly zřetelně více variabilní než u jedinců se Srp-Gal4 (Obr. 8). Také u mutantních jedinců se počty lamelocytů zvedly (pro srovnání Obr. 9). Statisticky vyšel rozdíl mezi kontrolou a mutanty průkazně s  $p = 0,0266$  na hladině signifikance \*  $p < 0,05$  (viz Obr. 8).

Tyto výsledky naznačují negativní vliv Cas9 na tvorbu lamelocytů. Také potvrzují výsledky získané v předchozím kroku blokování cN-IIIB pomocí RNAi, že cN-IIIB má vliv na tvorbu lamelocytů (Obr. 10). Můžeme tedy říct, že blokování cN-IIIB v hemocytech při infekci parazitoidní vosičkou snižuje jejich schopnost se aktivovat a přeměnit na lamelocyty.



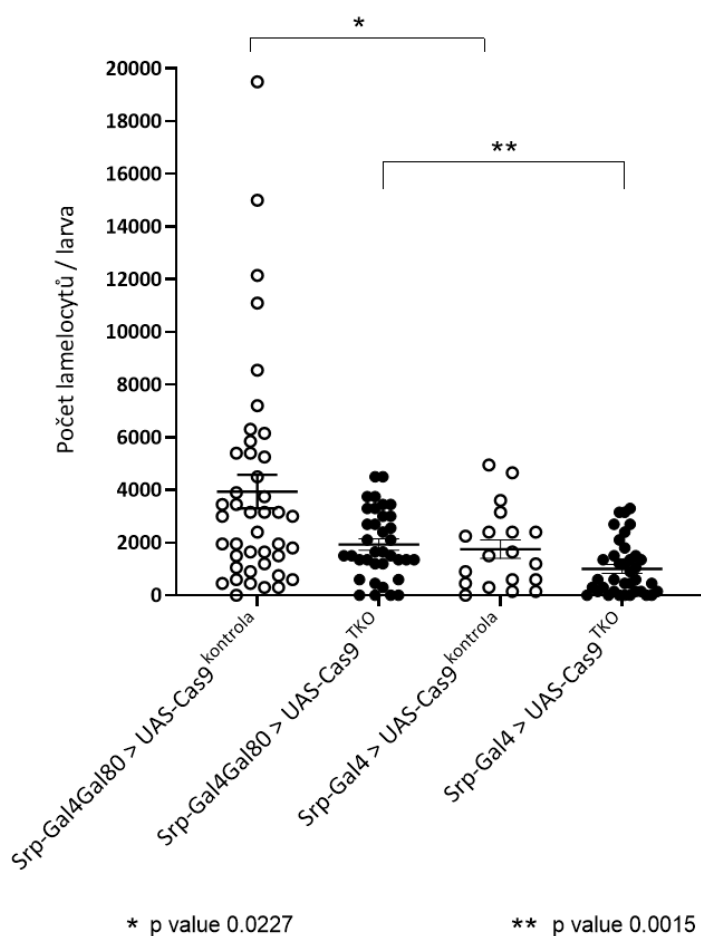
p value 0.0597

**Obr. 7: Počty lamelocytů mutantů pro Gal4 cN-IIIIB CRISPR-Cas9 v hematopoetické linii a kontrolu při infekci parazitoidní vosičkou.** Každý bod reprezentuje individuální larvu. Lamelocyty byly počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce. Horizontální čára uprostřed reprezentuje aritmetický průměr a zbylé dvě čáry směrodatnou odchylku průměru (SEM). Byl použit Mann-Whitney test. Analýza ukazuje rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci jako neprůkazný na hladině signifikance 0,05 (ns  $p > 0,05$ ).

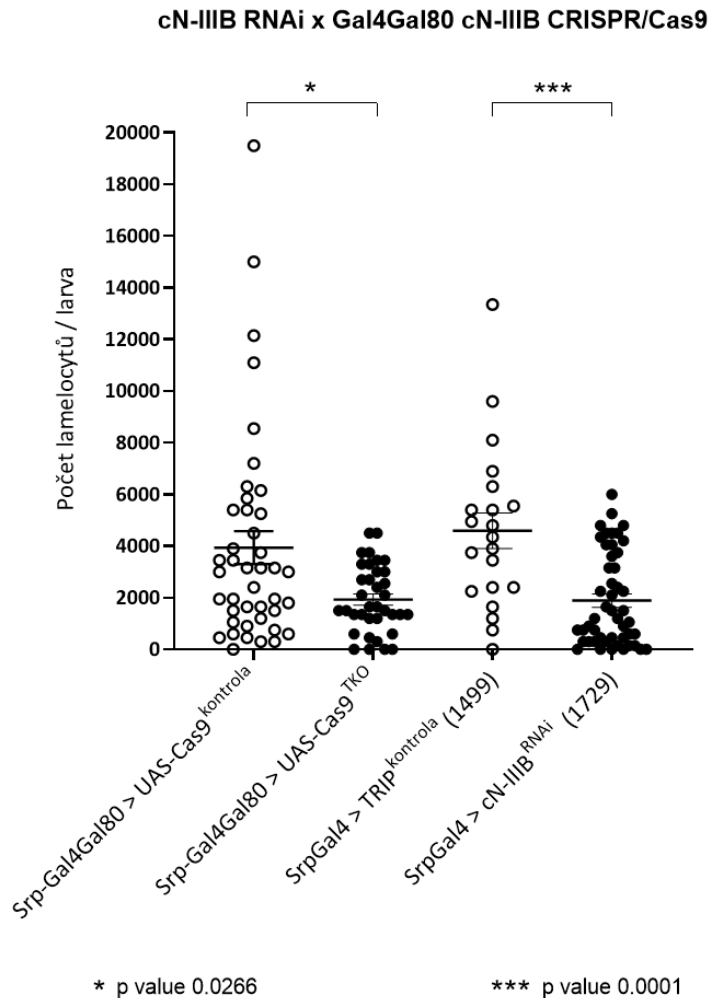


**Obr. 8: Počty lamelocytů mutantů pro Gal4Gal80 cN-IIIB CRISPR-Cas9 v hematopoetické linii a kontrolu při infekci parazitoidní vosičkou.** Každý bod reprezentuje individuální larvu. Lamelocyty byly počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce. Horizontální čára uprostřed reprezentuje aritmetický průměr a zbylé dvě čáry směrodatnou odchylku průměru (SEM). Byl použit Mann-Whitney test. Analýza ukazuje rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci na hladině signifikance \*  $p < 0,05$ .

### Gal4Gal80 x Gal4 cN-IIIB CRISPR/Cas9



**Obr. 9: Porovnání počtů lamelocytů mutantů pro Gal4Gal80 cN-IIIB CRISPR-Cas9 a Gal4 cN-IIIB CRISPR-Cas9 a jejich kontroly.** Každý bod reprezentuje individuální larvu. Prázdné kolečko značí kontrolu a plné mutanty. Lamelocyty byly počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce. Horizontální čára uprostřed reprezentuje aritmetický průměr a zbylé dvě čáry směrodatnou odchylku průměru (SEM). Rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci Gal4Gal80 je průkazný na hladině signifikance \*  $p < 0,05$ . Rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci Gal4 je neprůkazný na hladině signifikance 0,05 (ns  $p > 0,05$ ). Pro zhodnocení rozdílu mezi skupinami Gal4Gal80 a Gal4 byl použit Mann-Whitney test. Analýza ukazuje rozdíl mezi kontrolou Gal4Gal80 a Gal4 jako průkazný na hladině signifikance \*  $p < 0,05$ . Rozdíl mezi mutantními jedinci Gal4Gal80 a Gal4 je průkazný na hladině signifikance \*\*  $p < 0,005$ . To naznačuje, že Cas9 má sama efekt na buňky.



**Obr. 10: Počty lamelocytů mutantů pro Gal4Gal80 cN-IIIB CRISPR-Cas9 v hematopoetické linii s kontrolou a mutantů pro cN-IIIB RNAi v hematopoetické linii s kontrolou při infekci parazitoidní vosičkou.** Každý bod reprezentuje individuální larvu. Lamelocyty byly počítány mezi 18 a 24 hodinami od infekce. Horizontální čára uprostřed reprezentuje aritmetický průměr a zbylé dvě čáry směrodatnou odchylku průměru (SEM). Byl použit Mann-Whitney test. Analýza ukazuje rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci Gal4Gal80 cN-IIIB CRISPR-Cas9 průkazný na hladině signifikance \*  $p < 0,05$ . Rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci cN-IIIB RNAi je průkazný na hladině signifikance \*\*\*  $p < 0,0005$ . Rozdíl mezi CRISPR-Cas9 kontrolou a RNAi kontrolou vyšel neprůkazně na hladině signifikance 0,05 (ns  $p > 0,05$ ). Taktéž rozdíl mezi mutanty CRISPR-Cas9 a RNAi vyšel neprůkazně na hladině signifikance 0,05 (ns  $p > 0,05$ ).

## 5. Diskuze

Data získaná v této práci naznačují význam role cytosolické nukleotidázy cN-IIIIB v metabolickém přesmyku, stěžejním ději aktivace buněčné imunity proti nefagocytovatelným patogenům u *Drosophila melanogaster*. Bylo ukázáno, že inaktivací cN-IIIIB v hematopoetické linii při infekci parazotoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* dojde ke snížení počtu aktivovaných imunitních buněk bojujících s infekcí, lamelocytů.

K ověření úlohy byla cN-IIIIB v hemocytech inaktivována dvěma způsoby. Prvním způsobem byla RNA interference, která se řadí mezi posttranskripční mechanismy genové regulace. Gen je intaktní a mRNA tedy stále vzniká, ale je posttranskripčně degradována. Proto byla jako druhý způsob užitá regulace pomocí CRISPR-Cas9, která působí již v genomové DNA a gen zájmu je tedy inaktivován. Druhá metoda inaktivace také sloužila k ověření výsledků z první metody.

RNA interference byla indukovaná v hemocytech pomocí Srp-Gal4 driveru. Bez problému fungovala a způsobila znatelné snížení počtu lamelocytů při infekci, a tedy i pravděpodobně značné snížení odolnosti larvy proti vetřelci; odolnost je třeba ověřit. Mann-Whitney test ukázal rozdíl mezi kontrolou a mutantními jedinci průkazný na hladině signifikance 0,0005 ( $p < 0,0005$ ).

V hemolymfě se při infekci vyskytovalo poměrně velké množství hemocytů v různých fázích přeměny v lamelocyty, které se ještě za lamelocyty nedaly považovat. Při počítání lamelocytů v čase bližšímu 24 hodinám od infekce se průběžně zdálo být více lamelocytů, než v čase bližšímu 18 hodinám od infekce. To by mohlo naznačovat, že negativní dopad absence cN-IIIIB na hemocyty je zpomalení jejich schopnosti se měnit v lamelocyty. Nicméně tuto teorii by bylo nutné dále ověřit například porovnáním počtů lamelocytů mutantů pro cN-IIIIB v 18 hodinách od infekce s počty ve 24 hodinách od infekce a to celé srovnat s kontrolou v 18 a 24 hodinách od infekce.

Druhým způsobem inaktivace cN-IIIIB byla její mutace pomocí CRISPR-Cas9 opět zavedeného do hematopoetické linie pomocí driveru Srp-Gal4. Dle předpokladu byly při infekci počty lamelocytů u mutantních jedinců velice nízké. Ovšem problém nastal u kontroly, kde byly pozorovány počty lamelocytů podobně malé, jako u mutantů. Statisticky byl rozdíl mezi kontrolou a mutanty taktéž neprůkazný na hladině signifikance 0,05 (viz Obr. 7), proto byl učiněn pokus o nalezení důvodu těchto výsledků.



Potencionálním viníkem mohla být Cas9. Vysoké hladiny Cas9 spojené s Gal4/UAS byly často pozorované jako toxické pro buňky (Port & Bullock 2016). Gal4 se v hemocytech exprimuje již od embrya, a tudíž i Cas9. Zdá se tedy, že by v buňkách mohly být vysoké hladiny Cas9, která tak i bez gRNA může štěpit genomovou DNA na mnoha místech a tím způsobovat nestabilitu genomu. To může ovlivňovat diferenciaci lamelocytů nezávisle na cN-IIIIB. Proto jsme k dočasnému blokování Gal4 v hemocytech použili Gal4Gal80/UAS systém, kdy teplotně senzitivní Gal80 blokoval Gal4 při 18°C v embryu a larvě.

A skutečně se zdá, že tento zásah pomohl. Rozdíl mezi mutantními a kontrolními jedinci při použití Srp-Gal4Gal80 byl statisticky průkazný na hladině signifikance \*  $p < 0,05$ . Počty lamelocytů při infekci se zvedly jak u kontroly tak i u mutantní jedinců a to statisticky průkazně na základě Mann-Whitney testu, kdy rozdíl mezi kontrolními jedinci při použití Srp-Gal4Gal80 a kontrolními jedinci při užití Srp-Gal4 vyšel jako průkazný na hladině signifikance \*  $p < 0,05$ . Rozdíl mezi mutantními jedinci při použití Srp-Gal4Gal80 a mutantními jedinci při použití pouze Srp-Gal4 je průkazný na hladině signifikance \*\*  $p < 0,005$  (viz Obr.9). To naznačuje, že Cas9 opravdu sama o sobě má negativní vliv na tvorbu lamelocytů.

Nicméně i přes zlepšené výsledky v porovnání s výsledky lamelocytů u cN-IIIIB RNAi a její kontroly jsou i tyto počty v průměru poněkud menší. Statisticky vyšel rozdíl mezi kontrolou RNAi a kontrolou CRISPR-Cas9 neprůkazně ( $p > 0,05$ ). Vizuálně je ale rozdíl znatelný. Infikovaná TRIP kontrola pro RNAi má hodnoty více rozložené s největším množstvím dat uprostřed grafu, kolem průměrné hodnoty, jak je to u nemutantních jedinců běžné. U infikované CRISPR-Cas9 kontroly bez gRNA můžeme vidět nejvíce hodnot na bázi grafu, pod průměrnou hodnotou (viz Obr.10). Tato distribuce naznačuje, že buď genetické pozadí s Cas9 nebo exprese Cas9 ovlivňuje počet lamelocytů. Různé linie octomilek jsou také různou mírou schopné produkovat lamelocyty (Leitão *et al.*, 2019). Genetické pozadí octomilek s cN-IIIIB RNAi a s cN-IIIIB CRISPR-Cas9 a jejich kontrol není stejné, je tedy možné, že tyto nižší počty lamelocytů jsou ovlivněny genetickým pozadím linií. Ovšem nerovnoměrná distribuce počtu lamelocytů spíše naznačuje vliv Cas9, kdy u některých larev se Cas9 projevila více (nižší počty lamelocytů) a u jiných méně (dosahují vyšších hodnot, běžných pro dané genetické pozadí). Gal80 totiž ani v 18°C nezabrání expresi Gal4 v hemocytech na 100%, a tudíž se již od embrya stále trochu exprimuje Cas9. Tato exprese ovšem může být u každého jedince trochu jiná, a proto vzniká nerovnoměrná distribuce počtu lamelocytů.

Díky použití Gal80 se počet lamelocytů přiblížil běžným kontrolním hodnotám a tento výsledek tak demonstruje úspěšné použití regulovatelné somatické mutagenese pomocí CRISPR-Cas9 v hematopoetické linii octomilky, ale také upozorňuje na problém přílišné exprese Cas9, který je možné řešit právě kombinací s Gal80.

Stěžejním regulátorem metabolického přesmyku je extracelulární adenosin uvolněný z imunitních buněk. Signalizuje celému organismu, aby přeměroval energii ze zásob, růstu a vývoje do imunitního systému. Bez tohoto přesunu energie nejsou hemocyty schopné se v dostatečném množství přeměnit v lamelocyty (Bajgar *et al.*, 2015) (Dolezal *et al.*, 2019). Kromě jiného, adenosin také vzniká defosforylací AMP. Jelikož cN-IIIB je schopná vázat AMP a její deaktivace při infekci parazitoidní vosičkou snížila počty lamelocytů, mohla by se opravdu podílet na přeměně AMP v adenosin. Tím by mohla významně ovlivnit vyplavení adenosinu z aktivovaných imunitních buněk a celkový metabolický přesmyk.

Nicméně cN-IIIB má největší substrátovou preferenci 7-methylguanosu ( $m^7$  GMP), univerzálního meziprojektu degradace RNA čepičky (Buschmann *et al.*, 2012). Při aktivaci imunitního systému dochází ke změně exprese celé řady genů, a tedy i k velké produkci a degradaci mRNA. Je tedy možné, že bez cN-IIIB, která by  $m^7$  GMP degradovala, je hromadící se  $m^7$  GMP začleňován do RNA, potenciálně i do DNA, což je nežádoucí.  $m^7$  GMP může po začlenění narušovat funkci RNA i DNA a tím negativně působit na buňky. Tato úloha cN-IIIB by tedy mohla být zásadní pro efektivní diferenciaci lamelocytů bez těchto nežádoucích účinků.

Z výsledků této práce jsme schopni determinovat, že cN-IIIB hraje úlohu v hemocytech a má tak vliv na aktivaci imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce. V tuto chvíli ovšem ještě nejsme schopni rozlišit, která z výše uvedených potenciálních rolí je důležitější. Jako další výzkum této problematiky proto navrhuji například měření hladin AMP, adenosinu a  $m^7$  GMP v hemocytech nebo volné glukózy pomocí hmotnostní spektrometrie u jedinců s normálně fungující cN-IIIB a s její potlačenou funkcí po infekci vosičkou. To by mohlo pomoci rozlišit, zda se jedná o vliv nedostatečné tvorby adenosinu, a tedy hladiny adenosinu i volné glukózy by měly být nižší než u kontroly, nebo zda jde o vliv hromadícího se 7-methylguanosu.

## 6. Závěr

Konstrukt RNA interference i CRISPR-Cas9 somatická mutagenese pro cN-IIIIB byly pomocí driveru Srp-Gal4 nebo Srp-Gal4Gal80 úspěšně zavedeny do hematopoetické linie. Avšak výsledky naznačují, že přílišná exprese Cas9 i bez gRNA může mít negativní vliv na aktivaci lamelocytů, kterému se dá částečně vyhnout použitím systém Gal4Gal80/UAS.

Rozdíl mezi počty lamelocytů jedinců s blokovanou cN-IIIIB a jejich kontrolou vyšel statisticky průkazně u RNA interference i u CRISPR-Cas9. To znamená, že se tato cytosolická nukleotidáza podílí na aktivaci buněčné imunity proti parazitoidní vosičce a potencionálně i na metabolickém přesmyku. Nicméně z těchto výsledků nelze v tuto chvíli s jistotou určit, zda se nepřítomnost cN-IIIIB projevuje negativně na množství aktivovaných lamelocytů kvůli nedostatku adenosinu, a tedy nedostatečnému signálu pro metabolický přesmyk a aktivaci lamelocytů nebo zda se jedná o vliv hromadícího se 7-methylguanosinu, který může být začleňován do nukleových kyselin a narušovat jejich funkci. Pro oddělení těchto vlivů je potřeba provést další výzkum.

## 7. Literatura

1. Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 657-685. doi: 10.1371/journal.pbio.1002135
2. Anderl, I., Vesala, L., Ihalainen, T. O., Vanha-Aho, L. M., Andó, I., Rämetsä, M., & Hultmark, D. (2016). Transdifferentiation and proliferation in two distinct hemocyte lineages in *Drosophila melanogaster* larvae after wasp infection. *PLoS pathogens*, 12(7), e1005746. doi: 10.1371/journal.ppat.1005746
3. Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Del Tacca, M., & Blandizzi, C. (2008). Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 14(4), 566-574. doi: 10.1002/ibd.20316
4. Bajgar, A., Kucerova, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J., & Dolezal, T. (2015). Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic switch during immune response. *PLoS Biol*, 13(4), e1002135. doi: 10.1371/journal.pbio.1002135
5. Bajgar, A., & Dolezal, T. (2018). Extracellular adenosine modulates host-pathogen interactions through regulation of systemic metabolism during immune response in *Drosophila*. *PLoS pathogens*, 14(4), e1007022. doi: 10.1371/journal.ppat.1007022
6. Bianchi, V., & Spychala, J. (2003). Mammalian 5'-nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46195-46198. doi: 10.1074/jbc.R300032200
7. Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401-415.
8. Buschmann, J., Moritz, B., Jeske, M., Lilie, H., Schierhorn, A., & Wahle, E. (2013). Identification of *Drosophila* and human 7-methyl GMP-specific nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2441-2451. doi: 10.1074/jbc.M112.426700
9. Carton, Y., Poirié, M., & Nappi, A. J. (2008). Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science*, 15(1), 67-87.
10. Crozatier, M., & Meister, M. (2007). *Drosophila* haematopoiesis. *Cellular microbiology*, 9(5), 1117-1126. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00930.x

11. Delmastro-Greenwood, M. M., & Piganelli, J. D. (2013). Changing the energy of an immune response. *American journal of clinical and experimental immunology*, 2(1), 30.
12. DiAngelo, J. R., Bland, M. L., Bambina, S., Cherry, S., & Birnbaum, M. J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20853-20858. doi: 10.1073/pnas.0906749106
13. Dolezal, T., Krejcova, G., Bajgar, A., Nedbalova, P., & Strasser, P. (2019). Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect biochemistry and molecular biology*, 109, 31-42. doi:10.1016/j.ibmb.2019.04.005
14. Dolezal, T., Dolezelova, E., Zurovec, M., & Bryant, P. J. (2005). A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS Biol*, 3(7), e201. doi: 10.1371/journal.pbio.0030201
15. Dolezelova, 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. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.12.003
16. Fenckova, M., Hobizalova, R., Fric, Z. F., & Dolezal, T. (2011). Functional characterization of ecto-5'-nucleotidases and apyrases in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(12), 956-967. doi:10.1016/j.ibmb.2011.09.005
17. Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332(6167), 853-856. doi: 10.1038/332853a0
18. Foster, S. D., Glover, S. R., Turner, A. N., Chatti, K., & Challa, A. K. (2019). A mixing heteroduplex mobility assay (mHMA) to genotype homozygous mutants with small indels generated by CRISPR-Cas9 nucleases. *MethodsX*, 6, 1. doi: 10.1016/j.mex.2018.11.017
19. Gratz, S. J., Rubinstein, C. D., Harrison, M. M., Wildonger, J., & O'Connor-Giles, K. M. (2015). CRISPR-Cas9 genome editing in *Drosophila*. *Current protocols in molecular biology*, 111(1), 31-2. doi: 10.1002/0471142727.mb3102s111
20. Hunsucker, S. A., Mitchell, B. S., & Spychala, J. (2005). The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & therapeutics*, 107(1), 1-30. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.01.003

21. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821. doi: 10.1126/science.1225829
22. Keebaugh, E. S., & Schlenke, T. A. (2014). Insights from natural host-parasite interactions: The *Drosophila* model. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 111-123. doi: 10.1016/j.dci.2013.06.001
23. Leitão, A. B., Bian, X., Day, J. P., Pitton, S., Demir, E., & Jiggins, F. M. (2019). Independent effects on cellular and humoral immune responses underlie genotype-by-genotype interactions between *Drosophila* and parasitoids. *PLoS pathogens*, 15(10), e1008084. doi: 10.1371/journal.ppat.1008084
24. Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 697-743. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615
25. Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, É., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., ... & Andó, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4805-4809. doi: 10.1073/pnas.0801766106
26. Mills, C. D. (2015). Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology*, 6, 212. doi: 10.3389/fimmu.2015.00212
27. Monecke T, Buschmann J, Neumann P, Wahle E, Ficner R (2014) Crystal Structures of the Novel Cytosolic 59-Nucleotidase IIIB Explain Its Preference for m7 GMP. *PLoS ONE* 9(3): e90915. doi:10.1371/journal.pone.0090915
28. Mortimer, N. T., Goecks, J., Kacsoh, B. Z., Mobley, J. A., Bowersock, G. J., Taylor, J., & Schlenke, T. A. (2013). Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9427-9432. doi: 10.1073/pnas.1222351110
29. Nam, H. J., Jang, I. H., Asano, T., & Lee, W. J. (2008). Involvement of Pro-Phenoloxidase 3 in Lamellocyte-Mediated Spontaneous Melanization in *Drosophila*. *Molecules & Cells* (Springer Science & Business Media BV), 26(6).
30. Paddibhatla, I., Gautam, D. K., & Mishra, R. K. (2019). SETDB1 modulates the differentiation of both the crystal cells and the lamellocytes in *Drosophila*. *Developmental biology*, 456(1), 74-85. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.08.008

31. Penny, H. L., Sieow, J. L., Adriani, G., Yeap, W. H., See Chi Ee, P., San Luis, B., ... & Wong, S. C. (2016). Warburg metabolism in tumor-conditioned macrophages promotes metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*, 5(8), e1191731. doi: 10.1080/2162402X.2016.1191731
32. Pfeiffer, T.; Schuster, S.; Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science*, 292(5516), 504–507. doi:10.1126/science.1058079
33. Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog*, 3(3), e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0030026
34. Port, F., & Bullock, S. L. (2016). Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nature methods*, 13(10), 852. doi: 10.1038/nmeth.3972
35. Rizki, M. T. M., & Rizki, R. M. (1959). Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Cell Biology*, 5(2), 235-240. doi: 10.1083/jcb.5.2.235
36. Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., & Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology*, 112(1), 135-142. doi: 10.1017/s0031182000065173
37. Sackton, T. B., Lazzaro, B. P., Schlenke, T. A., Evans, J. D., Hultmark, D., & Clark, A. G. (2007). Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. *Nature genetics*, 39(12), 1461-1468. doi: 10.1038/ng.2007.60
38. Schlenke, T. A., & Begun, D. J. (2003). Natural selection drives *Drosophila* immune system evolution. *Genetics*, 164(4), 1471-1480.
39. Small, C., Paddibhatla, I., Rajwani, R., & Govind, S. (2012). An introduction to parasitic wasps of *Drosophila* and the antiparasite immune response. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63). doi: 10.3791/3347
40. Sorrentino, R. P., Melk, J. P., & Govind, S. (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics*, 166(3), 1343-1356. doi: 10.1534/genetics.166.3.1343
41. Straub, R. H. (2014). Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis research & therapy*, 16(2), 1-15. doi: 10.1186/ar4688

42. Vanha-Aho, L. M., Anderl, I., Vesala, L., Hultmark, D., Valanne, S., & Rämet, M. (2015). Edin expression in the fat body is required in the defense against parasitic wasps in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004895. doi: 10.1371/journal.ppat.1004895
43. Vlisidou, I., & Wood, W. (2015). *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *The FEBS journal*, 282(8), 1368-1382. doi: 10.1111/febs.13235
44. Warburg, O. (1925). über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klinische Wochenschrift*, 4(12), 534-536.
45. Zettervall, C. J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I., & Hultmark, D. (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14192-14197. doi: 10.1073/pnas.0403789101
46. Zhu, X., Xu, Y., Yu, S., Lu, L., Ding, M., Cheng, J., ... & Tian, Y. (2014). An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 4(1), 1-8. doi:10.1038/srep06420