

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Tkáňově specifická mutageneze modelového organismu *Drosophila melanogaster* pomocí TAL nukleáz

Diplomová práce

Bc. Tomáš Gregor

Školitel: Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

České Budějovice 2015

Gregor, T., 2015: Tkářově specifická mutagenese modelového organismu *Drosophila melanogaster* pomocí TAL nukleáz. (Tissue specific mutagenesis with TAL nucleases using *Drosophila melanogaster* as a model, Mgr. Thesis, in Czech) 76p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

TAL nucleases are frequently used for mutagenesis in germline to create transgenic organism with mutation in every cell. I created TAL nucleases against *eGFP* and *Drosophila AdoR* receptor and combined them with UAS-Gal4 system to test if it is possible to use this genetic tool also for tissue specific mutagenesis.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích 24. 4. 2015

.....

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především svému školiteli Tomáši Doležalovi za jeho skvělé vedení, nakažlivé nadšení, cenné rady a jeho důvěru, kterou neztratil i přes mé počáteční neúspěchy. Dále chci poděkovat svým kolegům Adamovi Bajgarovi, Lucii Jonátové a Kateřině Kučerové za veškerou jejich pomoc, podporu a skvělé pracovní prostředí. Obrovský dík patří mojí rodině a přátelům za veškerou jejich podporu a trpělivost.

Zkratky

AD	activator domain
AK	aminokyselina
CDK	cyclin dependent kinase
DSB	double strand break
DSBR	double strand break repair
EBD	estrogen binding domain
eGFP	enhanced green fluorescent protein
GMR	glass multiple reporter
HR	homologous recombination
LR	last repeat
NHEJ	non-homologous end joining
NLS	nuclear localization signal
RPA	replication protein A
RVD	repeat variable di-residue
SDSA	synthesis dependent strand annealing
SSA	single strand annealing
TAL	transcription activator like
TALEN	transcription activator like effector nuclease
UAS	upstream activator sequence
ZF	zinc-finger
ZFN	zinc-finger nuclease

Obsah

1. Úvod	1
1.1 TAL efekторы.....	1
1.2 TAL nukleázy	3
1.3 Off-targetový efekt a toxicita TAL nukleáz	4
1.4 Opravy dvouvláknových zlomů DNA.....	6
1.4.1 Homologní rekombinace	6
1.4.2 Single strand annealing	7
1.4.3 Non-homologous end joining.....	7
1.4.4 Výběr způsobu opravy DNA	8
1.5 UAS-Gal4 systém	9
1.5.1 Engrailed-Gal4	10
1.5.3 Escargot Gal4.....	10
1.5.4 Patched Gal4	10
1.5.2 GMR-Gal4	11
1.6 Tkáňově specifická mutageneze	11
2. Cíle práce	13
3. Materiál a metody	14
3.1 Linie octomilek.....	14
3.2 Příprava a ověření TAL nukleáz.....	14
3.2.1 GoldenGate reakce #1.....	14
3.2.2 PCR ověření GoldenGate reakce #1	15
3.2.3 GoldenGate reakce #2.....	16
3.2.4 PCR ověření GoldenGate reakce #2	17
3.2.5 Klonování do integrazového vektoru pattb-NE3.....	17
3.2.6 pattb-NE3 ověření #1	18
3.3 Příprava transgenních linií octomilek	19
3.3.1 Příprava DNA pro mikroinjikace	19
3.3.2 Příprava jehel pro mikroinjikace	19
3.3.3 Příprava džusových misek a sklíčků.....	19
3.3.4 Mikroinjikace	20
3.4 Křížení.....	20
3.4.1 Křížení vytvořených transgenů.....	21

3.4.2 Křížení pro rekombinaci GMR a ptc Gal4 s UAS-GFP	23
3.4.3 Křížení pro indukci eGFP TALENů Gal4 drivery	23
3.4.4 Křížení AdoR1 TALENu	24
3.5 Ověření transgenních octomilek.....	26
3.5.1. Izolace genomové DNA	26
3.5.2 PCR ověření transgenů	26
3.6 Mikroskopie	26
3.6.1 Příprava vzorků ke konfokální mikroskopii	27
4. Výsledky	28
4.1 Design TAL nukleáz	28
4.2 Příprava TAL nukleáz.....	30
4.2.1 GoldenGate reakce #1.....	32
4.2.2 PCR ověření GoldenGate reakce #1	34
4.2.3 GoldenGate reakce #2.....	35
4.2.4 PCR ověření GoldenGate reakce #2	36
4.2.5 Klonování do vektoru pattb-NE3.....	36
4.2.6 pattb-NE3 ověření #1	38
4.2.7 pattb-NE3 ověření #2	39
4.2.8 Restrikce NcoI.....	40
4.2.9 Restrikce EcoT22I	42
4.2.10 Ověření transgeneze octomilek	43
4.3 Charakterizace fenotypů indukce eGFP TALENu	45
4.3.1 Engrailed Gal4	46
4.3.2 Escargot Gal4.....	50
4.3.3 Patched Gal4	54
4.3.4 GMR Gal4	59
4.4 Charakterizace fenotypů indukce AdoR1 TALENu	62
4.4.1 Engrailed Gal4	62
4.4.1 Escargot Gal4.....	64
5. Diskuse.....	66
6. Závěr	70
7. Literatura	71

1. Úvod

Zjišťování funkce určitého genu v organismu se neobejde bez kvalitních genetických nástrojů, kterými je možné expresi genu efektivně manipulovat, nebo úplně zrušit. U modelového organismu *Drosophila melanogaster* probíhal v tomto ohledu bouřlivý vývoj – počínaje inserční mutagenézí prostřednictvím P-elementů, přes mutagenézi homologní rekombinací, RNA interferenci, až k mutagenézi programovatelnými nukleázami. Každý z těchto přístupů s sebou ale přináší specifická úskalí a může mít na organismus větší vliv, než pouze ovlivnění exprese zkoumaného genu, což může komplikovat interpretaci výsledků. Například u RNA interference je známý tzv. off-targetový efekt, při kterém anti-sense RNA cílená proti mRNA určitého genu může na základě neúplné komplementarity potlačovat expresi i jiných mRNA. Tak, jako je dobrou praxí v tomto případě použít více RNAi konstruktů proti jednomu genu, jsme chtěli zajít ještě dál a vyzkoušet nový přístup - zkusit, jestli by bylo možné geny tkáňově specificky vypnout pomocí TAL nukleáz. V případě, že by se tento způsob ukázal jako funkční, šlo by o nové využití genetického nástroje, které by mohlo pomoci rozklíčovat problémy, ve kterých například RNAi není vhodným nástrojem, nebo by je mohl uvést do širšího kontextu.

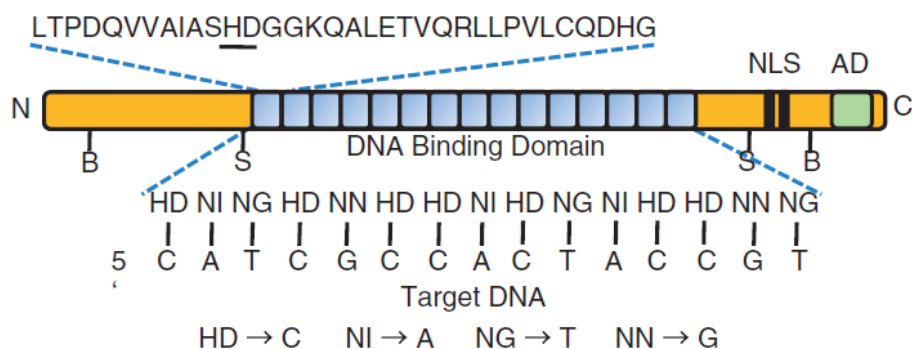
TAL nukleázy se dnes u *Drosophily* běžně používají k mutagenézi v zárodečné linii – do embryí je injikována mRNA kódující TALEN, která je v embryu translatována a provádí štěpení v určitém genu. Poté následuje screening na přítomnost mutace v genomu, nakonec se získá linie, kde každá buňka nese konkrétní mutaci. Náš přístup se liší tím, že je TAL nukleáza kódována v genomu *Drosophily* pod UAS promotorem, což umožňuje její tkáňově specifickou aktivaci pomocí různých Gal4 driverů. Vlastní mutagenéze by tedy měla probíhat přímo během vývoje a teoreticky tvořit mozaiku buněk s různými mutacemi v konkrétním genu, spolu s buňkami, kde mutagenéze nebyla úspěšná.

1.1 TAL efekторы

Transcription activator-like effectors, neboli TALE, jsou nově popsaná skupina DNA vazebných proteinů, které byly objeveny u patogenních bakterií rostlin rodu *Xanthomonas*. Tyto proteiny jsou bakteriemi vstříknuty do buněk pomocí sekrečního systému typu III a jsou translokovány do jádra, kde se váží na promotorové sekvence cílových genů. Tím přímo

modulují genovou expresi hostitelské rostliny, což vede k jejímu onemocnění, případně k aktivaci resistance vůči bakterií (Bogdanove, Schornack, and Lahaye 2010).

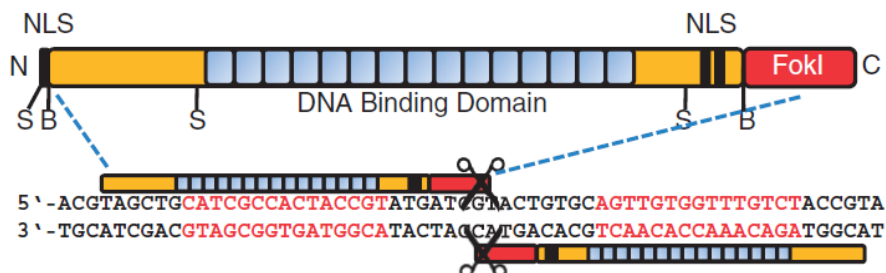
TAL efekторы se vážou na DNA pomocí centrální domény, která se skládá z tandemových opakování 33-35 AK dlouhých peptidů uzavřených jedním zkráceným opakováním o délce 20 AK, struktura TAL efektoru je na obrázku 1.1 (Cermak et al. 2011). Každé opakování se váže na jeden nukleotid cílové sekvence, přičemž specifita k určité bazi je určena dvojicí aminokyselin na pozicích 12 a 13 v každém opakování, nazývanou repeat-variable di-residue (RVD) (Boch et al. 2009). Bylo objeveno mnoho různých RVD, nejčastější 4 jsou HD, NG, NI a NN, nejsilněji asociované s bazemi C, T, A a G nebo A. Vazba však není absolutní, RVD mají potenciál rozpoznávat i jiné baze, což je nejvíce patrné u NN, které se váže téměř stejně často s G i A (Moscou and Bogdanove 2009). Okolní N-terminální a C-terminální domény TAL efektoru slouží k jeho cílení do jádra. U přírodních TAL efektorů obsahuje N-terminální doména sekreční signál pro systém III, C-terminální doména obsahuje DNA vazebné motivy leucinového zipu, dvě NLS sekvence v tandemu a acidickou transkripčně aktivační doménu (AD), zodpovědnou za změnu genové exprese a virulenci (Szurek et al. 2001; Scholze and Boch 2011). V přírodě se vyskytující TAL efekторы mají nejčastěji mezi 12 a 27 opakováními (Boch and Bonas 2010).



Obr. 1.1: Struktura TAL efektoru a specifita RVD pro jednotlivé baze (Cermak et al. 2011). Opakování RVD modulů je znázorněno modře, nahoře je sekvence aminokyselin jednoho modulu s podtrženým RVD. Dole je znázorněná sekvence RVD v opakováních a sekvence DNA, na kterou se budou vázat. B – BamHI, S – SphI restriční místa, NLS – nuclear localization signal, AD – transkripčně aktivační doména.

1.2 TAL nukleázy

TALENy použité v následujících experimentech byly vytvořeny z *PthXo1* TAL efektoru restrikční enzymem BamHI, který vyštěpil část N-terminálního konce a aktivační doménu na C-konci. Ta byla nahrazena nukleázou FokI, která provádí vlastní štěpení DNA (Christian et al. 2010). Protože dvouvláknovou DNA štěpí pouze jako dimer, design vyžaduje dva proti sobě orientované TALENy tak, aby se k sobě dostaly FokI nukleázy a provedly štěpení DNA, jak je znázorněno na obrázku 1.2.



Obr. 1.2: Struktura TAL nukleázy. Po vazbě Forward a Reverse TALENu na opačná vlákna DNA ve správné vzdálenosti od sebe, FokI nukleázy na jejich C-koncích dimerizují a provádí štěpení sekvence spaceru uprostřed (Cermak et al. 2011).

TALENy dosahují největší efektivity štěpení, pokud je vzdálenost mezi nimi 15bp, druhé optimum je ve vzdálenosti 24bp. Určitá aktivita TALENů je však přítomná i v širším rozmezí délek spaceru - od 13 do 30bp (Christian et al. 2010). Pro správnou funkci TALENů je také důležité, aby baze před 5' začátkem rozpoznávací sekvence (nazývaná také „repeat 0“) byla T. Experimentálně bylo ověřeno, že TAL efekторы s jinými bazemi v tomto místě nedokázaly aktivovat transkripci (Boch et al. 2009).

Mutagenní potenciál TAL nukleáz spočívá v tom, že se vzniklý zlom DNA nejčastěji opravuje metodou nehomologního spojování konců (NHEJ), při němž často dochází k menším insercím nebo delecím, které poškozují požadovaný gen. Studie (Moore et al. 2012) zkoumala rozsah délek insercí a delecí v cílových sekvencích pro 6 párů TALENů, a zjistila jejich průměrnou délku 11,5bp +/- 1,4 bp, celkový rozsah změn sekvence byl od 2 do 78bp.

1.3 Off-targetový efekt a toxicita TAL nukleáz

TALENy jsou obecně považovány za relativně přesný nástroj na cílení genů s vysokou účinností štěpení v cílové sekvenci a zároveň vysokou specifitou. K off-targetovému efektu neboli nespecifickému štěpení jiné než cílové sekvence, by teoreticky bylo nutné, aby byla v genomu další sekvence, na kterou by nasedaly oba TALENy ve správné vzdálenosti od sebe tak, aby mohla FokI nukleáza provádět štěpení. Pravděpodobnost této události by měla být velmi malá vzhledem k tomu, že Forward i Reverse domény TALENů mají běžně velikosti kolem 20bp, na rozdíl například od domén Zinc-Finger nukleáz, které mají nejčastěji 9-12bp, podle toho, jestli jsou použity 3 nebo 4 ZF moduly. Například výsledky mutagenese lidských buněk ukazují, že cytotoxicita TALENů je do velké míry ovlivněna jejich délkou – kratší TALENy s 8,5-10,5 opakováními dosahovaly větší cytotoxicity než delší, přestože jejich efektivita byla srovnatelná (Reyon et al. 2012).

Studie (Mussolino et al. 2011) testovala efektivitu TALENů a jejich off-targetový potenciál a zjistila, že TALEN štěpil sekvenci, která se lišila od cílové sekvence pouze 1 bází v místě vazby jedné domény TALENu a v místě jejího nultého opakování „repeat 0“, s frekvencí jen asi 1% oproti normální cílové sekvenci (druhá doména se párovala přesně). Studie (Dahlem et al. 2012), která analyzovala off-targetový efekt na modelu zebřičky, zjistila pomocí high resolution melting analýzy, že jejich TALEN neštěpí homologní sekvenci, která se od cílové sekvence liší ve 3 bázích na každé straně, kde se vážou TALENy. 2 odlišné baze pouze na jedné straně však již ke specifičnosti nestačily a sekvence byla štěpena. Rozdíl mezi těmito studiemi je možné vysvětlit tím, že v první studii neměla potenciální off-targetová sekvence bazi T v místě „repeat 0“, která je důležitá pro správnou funkci TALENu (Boch et al. 2009).

Studie (Mussolino et al. 2011) také porovnávala eficienci a toxicitu ZFN a TALENů v savčích tkáňových kulturách a zjistila, že při zhruba stejné eficienci mutace genů dosahoval při zvyšující se koncentraci transformace buněk vektorem s nukleázou TALEN daleko nižší cytotoxicity než ZFN. To i přesto, že ZFN pár obsahoval heterodimer FokI nukleázy, u kterého bylo prokázáno, že snižuje toxicitu spojenou s činností nukleáz (Szczepek et al. 2007). Naopak, studie (Treen et al. 2014) se pokoušela o vypnutí genu *fgf11* pomocí TALENů u sumky *Ciona*, při jehož mutaci normálně není viditelný žádný defektní fenotyp. Při elektroporaci i relativně malého množství DNA s TALENy do gastrul se u raných

pulců objevovaly ve velké míře defekty. U pulců bez defektů a s přítomným markerem exprese TALENu však proběhl vývoj normálně u 90 % jedinců, tato studie spekuluje, že zřejmě nejde o off-targetový efekt, který by podle ní měl být přítomen stále, a abnormality by se měly během vývoje stupňovat.

U obdobné studie na modelovém organismu zebřičky, kde byla RNA s TALENy injikována do jednobuněčného embrya, byla míra jejich letality spolu s vývojovými defekty asi od 23% do 65% (Moore et al. 2012). Stejnou metodou prováděná transgeneze u studie (Dahlem et al. 2012) však k toxicitě nevedla, což by naznačovalo, že negativní efekt TALENů je závislý na jejich konkrétní rozpoznávací sekvenci.

Příčinou toxického efektu nukleáz při mutagenezi se zabývala studie (Beumer 2005), kde byly použity ZFN k mutaci genů u *Drosophily*. Po expresi páru ZFN proti genu *yellow* se projevila letalita, k otestování toho, jestli jde o efekt nadměrného štěpení DNA, upravili tento pár ZFN tak, aby obsahoval substituci ve štěpící doméně FokI bez toho aniž by byla ovlivněna DNA vazebná doména. Po expresi tohoto ZFN páru se letalita neprojevila, což naznačuje, že byla způsobena nadměrným štěpením DNA, zřejmě mimo cílovou sekvenci, a že nejspíše nejde o negativní efekt vazby ZFN na DNA, která by interferovala s normální funkcí chromosomů, jak spekulovala Bibikova a kol. (Bibikova et al. 2002).

Studie (Moore et al. 2012) spekuluje, že k off-targetovému efektu TALENů může přispívat používání homodimerické FokI nukleázy. Tímto problémem se zabýval Miller a kol. (Miller et al. 2007) u ZFN – jejich původní architektura umožňovala spojení nejen F a R domény, ale i spojení F/F a R/R domén přes FokI nukleázu, která normálně funguje jako homodimer. Možnost párování stejných podjednotek značně rozšiřuje off-targetový potenciál určitého páru ZFN. Změnili tedy podjednotky FokI tak, aby se mohly párovat pouze dvě odlišné (a tvořit heterodimer), a tím dosáhli velkého zvýšení specifiity ZFN při zachování stejné eficeince. Jak ale ukázala studie (Mussolino et al. 2011), cytotoxicita TALENů byla nižší než u ZFN i přes použití homodimerické FokI nukleázy.

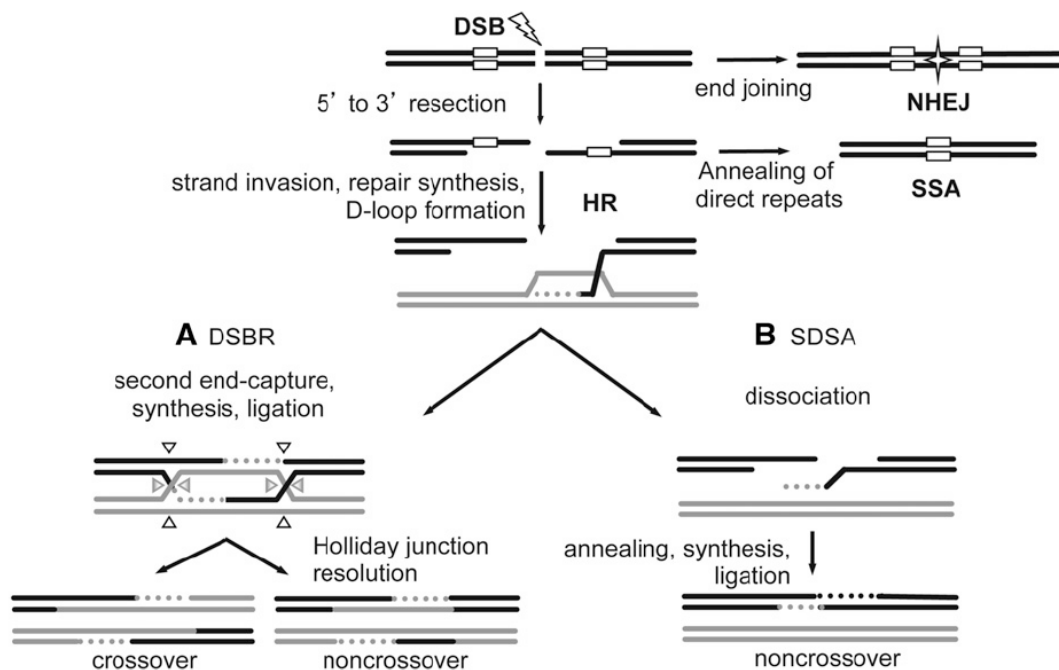
1.4 Opravy dvouvláknových zlomů DNA

Zachování integrity genomu je zásadní pro správnou funkci buňky a její přežití. Dvouvláknové zlomy DNA jsou obzvláště nebezpečné, a pokud jsou nechány neopravené, mohou vést k buněčné smrti a rozsáhlé reorganizaci genomu, která je často spojena s neoplastickou transformací buněk a vznikem nádorů (Ferguson and Alt 2001). U buněk tedy během evoluce vznikly skupiny proteinů fungující v signálních drahách, které detekují přítomnost DSB a jiných poškození DNA, zastaví buněčný cyklus a aktivují reparaci. Pokud je ale poškození DNA buňky rozsáhlé, překrývající se signální dráhy mohou vést až k apoptóze, aby zastavily šíření buněk s nestabilními genomy (Su 2006). Dvouvláknové zlomy DNA mohou být opraveny homologní rekombinací (HR), single-strand annealingem (SSA) a nehomologním spojováním konců (NHEJ) (Do et al. 2014).

1.4.1 Homologní rekombinace

Při homologní rekombinaci je templátem k opravě zlomu neporušená homologní sekvence. V případě, že ke zlomu dojde během mitózy, je tato sekvence na sesterské chromatidě, v případě meiózy se templát nachází na homologním chromosomu (Sung and Klein 2006). První fází je resekce DNA ve směru 5'-3' od místa zlomu, následována invazí vláknů k homologní sekvenci pomocí proteinu Rad51, jak je znázorněno na obr. 1.3 v části HR (Sugawara et al. 1995). Po nalezení homologie je zahájena reparační syntéza, při které vzniká formace D-loop a Hollidayův kříž. Po jeho formaci může HR pokračovat jedním ze dvou způsobů. V kanonickém DSBR modelu navrženém Szostakem a kol. (Szostak et al. 1983) se páruje druhý neinvadující 3' konec s druhým homologním vláknem a vzniká tak struktura se dvěma Hollidayovými kříži, která je na obrázku 1.3A. Z té se pak pomocí nicking endonukleáz stane buď produkt s crossoverem, nebo bez něj.

Druhý způsob HR, synthesis dependent strand annealing (SDSA), spočívá v tom, že po invazi vláknů a reparační syntéze je vlákno vytlačeno migrací Hollidayova kříže a připojí se k původnímu zlomu DNA, vzniká tak non-crossoverový produkt, jak je znázorněno na obrázku 1.3B (Helleday et al. 2007).



Obr. 1.3: Oprava dvouvláknových zlomů DNA (Do et al. 2014)

1.4.2 Single strand annealing

Oprava zlomu probíhá pomocí SSA, pokud se zlom DNA nachází mezi přímými repeticemi, jak je znázorněno bílými obdélníky na obrázku 1.3 v části SSA. Během 5'-3' resekce jsou tyto repetice odhaleny a párují se spolu, převislé konce jsou odštěpeny a zbytek DNA je dosyntetizován. Tento proces je zprostředkován proteiny RPA a Rad52 bez účasti Rad51 (Van Dyck et al. 2001).

1.4.3 Non-homologous end joining

NHEJ je nejjednodušší způsob opravy DNA, při kterém dochází ke spojování dvou konců DNA nezávisle na jejich sekvenci. Tento druh opravy je relativně přesný pro jednoduché zlomy s tupými konci (van Heemst et al. 2004), kde může být sekvence obnovena i bez její změny. Pokud konce nejsou kompatibilní, většinou při opravě dochází ke změně sekvence. Tyto změny mohou zahrnovat inserce, delece, substituce, a pokud jsou spojeny zlomy z jiných chromosomů, tak i translokace. Přestože se tato reparace označuje jako nehomologní, spojování konců je často zprostředkováno malými 1-6 bazovými mikrohomologiemi (Helleday et al. 2007). Vlastní oprava zahrnuje heterodimery Ku70/Ku80, které mají vysokou afinitu ke koncům zlomu a blokují 5'-3' resekci (Chapman, Taylor, and Boulton 2012). Na ty se váže DNA dependentní protein kináza DNA-PK, která je po přiblížení konců autofosforylována (Ding et al. 2003). Konce DNA mohou být zastřiženy

nukleázami (například Artemis), nebo vyplněny DNA polymerázami ($Pol\mu$ nebo $Pol\lambda$) k vytvoření kompatibilních konců (Lieber 2010). Nakonec komplex Ligase IV/XRCC4/XLF provede ligaci konců (Ahnesorg, Smith, and Jackson 2006).

1.4.4 Výběr způsobu opravy DNA

To jaký způsob opravy zlomu si buňka vybírá, je do velké míry ovlivněno tím, v jaké fázi buněčného cyklu se při vzniku zlomu nachází. Vzhledem k tomu, že většina homologních rekombinací probíhá mezi sesterskými chromatidami, odehrává se tedy v S a G2 fázích buněčného cyklu (Stark and Jasin 2003), stejně tak zlomy vzniklé během replikace DNA jsou opravovány homologní rekombinací. Studie (Aylon, Liefshitz, and Kupiec 2004) u kvasinek zjistila, že počáteční krok 5'-3' resekce je kontrolován aktivitou CDK, která tento krok omezuje na S a G2 fázi buněčného cyklu. Volné konce, u kterých nebyla provedena resekce, jsou vhodným substrátem pro NHEJ, kterými je také buňky zastavené ve fázi G1 opravovaly.

Studie (Rothkamm et al. 2003) zjišťovala relativní příspěvek oprav DNA pomocí NHEJ a HR v různých fázích buněčného cyklu na tkáňových kulturách buněk křečka, kde byly zlomy DNA indukovány ionizujícím zářením. Buňky defektní pro NHEJ měly silně omezenou opravu DNA ve všech fázích buněčného cyklu, zatímco buňky defektní pro HR měly největší defekty v pozdní S/G2 fázi, v jiných fázích byly k ozáření pouze mírně citlivé. Tato studie dále zjistila, že se HR používá k opravě zlomů asociovaných přímo s replikací, nemusí ale převažovat v celé S fázi. NHEJ je tedy i přes její mutagenní potenciál používána během všech fází buněčného cyklu.

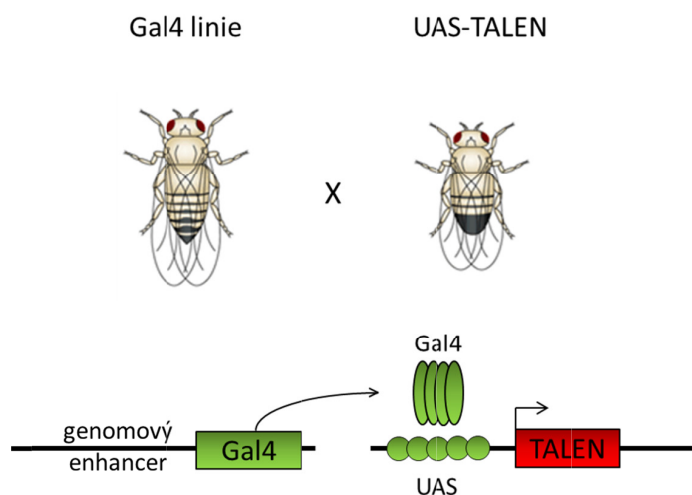
Mezi další faktory patří také stadium vývoje organismu – homologní rekombinace je preferovaná metoda opravy DNA během raných fází vývoje, NHEJ převažuje v dospělém organismu (Pastink, Eeken, and Lohman 2001). Roli hraje také druh organismu, typ tkáně a typ zlomu DNA (Gorski et al. 2003).

Komplexita místa zlomu DNA také hraje velkou roli ve volbě mezi NHEJ a HR, tento fenomén byl studován v G2 fázi buněčného cyklu, kdy přispívají k opravě oba způsoby. Přidání inhibitoru topoisomerázy II, etoposidu, v buňkách tvoří zlomy s 4-5 bazovými přesahy a s kovalentně navázaným proteinem (Spitzner et al. 1995). Tyto zlomy jsou opraveny z 90% pomocí NHEJ (Shibata et al. 2011). Ozáření buněk vysokoenergetickými uhlíkovými ionty oproti tomu vede k tvorbě komplexních zlomů DNA, u kterých je často

provedena resekce a oprava probíhá homologní rekombinací. Při použití ionizujícího záření s menší energií, které netvoří tak komplexní zlomy, probíhá oprava homologní rekombinací asi jen u 20% - 30% buněk (Shibata et al. 2011). Vzhledem k tomu, že nukleáza FokI používaná u TALENů a jiných programovatelných nukleáz, je upravený restriční enzym typu II, který tvoří zlomy na opačných vláčknech DNA ve vzdálenosti 9 a 13 bp od rozpoznávacího místa, v případě, že tvoří dimer (Wah et al. 1998; Bitinaite et al. 1998), je pravděpodobné, že se tento zlom opravuje jednodušší a rychlejší metodou NHEJ.

1.5 UAS-Gal4 systém

K dosažení tkáňově specifického vypnutí genů jsem využíval UAS-Gal4 systém (Brand and Perrimon 1993), který se skládá ze dvou částí – transkripční aktivátor kvasinek Gal4, který se specificky váže na sekvenci UAS a aktivuje expresi genů pod tímto promotorem. Do dnešního dne bylo vytvořeno mnoho Gal4 linií octomilek, kde je gen pro Gal4 pod kontrolou genomových enhancerů, které aktivují expresi Gal4 driveru určitým místně a časově specifickým způsobem. V následující části uvádím přehled exprese Gal4 driverů použitých při mých experimentech, případně exprese genů, do jejichž enhanceru byl Gal4 vložen.



Obr. 1.4: Schéma aktivace TALENu pomocí UAS-Gal4 systému. Po zkřížení linie nesoucí Gal4 driver s linií nesoucí TALEN za UAS sekvencí dojde k jeho aktivaci v těch tkáních, kde se exprimuje Gal4 driver.

1.5.1 Engrailed-Gal4

Engrailed je tzv. segment polarity gen, jehož funkcí je specifikovat tělní segmenty na přední a zadní část a zachovávat hranice parasegmentů v dospělých tkáních (Morata and Lawrence 1975). Engrailed se začíná exprimovat během rané gastrulace asi 2,5-3 h po kladení, ve fázi kdy začíná celularizace embrya (pozdní fáze syncytiálního blastodermu). Nejprve se začíná exprimovat v oblasti cephalické rýhy, poté v 13 dalších příčných pruzích, širokých pouze jednu buňku, které určují budoucí posteriorní oblasti segmentů. Tyto pruhy odpovídají budoucí maxile, mandibule a labiím, 3 hrudním a 8 abdominálním segmentům. Primordia imaginálních disků se zakládají pozdě v embryonálním vývoji, vždy na pomezí gradientu wingless a engrailed, exprese engrailed je tedy v discích přítomna od začátku vývoje.

1.5.3 Escargot Gal4

Escargot je transkripční faktor exprimovaný během embryogeneze s rozsáhlou expresí v ektodermu, napřed dorsálně v příčných pruzích, poté i ventrálně podél neurogenního ektodermu, a v hlavě, trachejích a CNS. V pozdějších stádiích se exprimuje v nožních, křídelních, halterních a genitálních discích. Také se rozsáhle exprimuje v abdominálních histoblastech a jiných imaginálních prekurzorech, ze kterých se poté tvoří epitel abdomenu. Také se exprimuje podél místa involuce hlavy, v oblastech dorsal ridge a frontal sac. (Whiteley et al. 1992; Hayashi et al. 1993).

1.5.4 Patched Gal4

Patched je jeden z několika tzv. segment polarity genů důležitých pro správné formování segmentů, jeho absence změní buňky v prostředních částech segmentů tak, že tvoří struktury normálně přítomné na hranicích středového segmentu (Hooper and Scott 1989). Exprese je přítomná v časných embryích v kortikálních oblastech, ve stadiu 8 se exprimuje v 15 příčných pruzích, v oblasti labra a v zadním střevě. Během tzv. „extended germ band“ fáze vývoje se tyto pruhy dělí na dva a mezi nimi se gen patched přestává exprimovat. Dále se patched exprimuje v různých oblastech hlavy, CNS, mesodermu a malpighických trubicích (Hooper and Scott 1989).

1.5.2 GMR-Gal4

Glass Multiple Reporter se využívá především jako reportér exprese v oku. Glass je ZF transkripční faktor, který se silně exprimuje v oblasti morfogenní rýhy očního disku a ve všech buňkách nacházejících se posteriorně za touto rýhou, dále v ocelli a v malé části mozku (Moses and Rubin 1991; Ellis, O'Neill, and Rubin 1993). GMR je pentamer 27bp glass response elementu z promotoru genu *Rh1* – část, která je aktivována transkripčním faktorem Glass, za ním se nachází minimální promotor *Hsp70* (Hay, Wolff, and Rubin 1994). GMR Gal4 byl vytvořen Freemanem (Freeman 1996) a také aktivuje expresi ve všech buňkách posteriorně za morfogenní rýhou. Studie (Li et al. 2012) porovnávající více GMR-Gal4 driverů zjistila také určitou míru exprese v křídelních a nožních imaginálních discích a trachejích.

1.6 Tkáňově specifická mutagenese

Přístupy popsané v předchozích částech – mutagenese pomocí TAL nukleáz, následná oprava DNA a možnost exprimovat u octomilky geny v různých tkáních pomocí UAS – Gal4 systému, jsou společně využívány v následující práci. U octomilky se běžně používají přístupy tkáňově specifické RNAi spojením s UAS - Gal4 systémem. Mutagenese pomocí programovatelných nukleáz (ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9) se ale zatím používá pouze k tvorbě mutantních linií, chtěli jsme tedy vyzkoušet potenciál těchto metod k více cílené mutagenesi do tkání. V porovnání například s RNAi by mělo být vypínání exprese genů efektivnější – pokud bude mutagenese v jedné buňce úspěšná, gen by se u ní, ani u jejích dceřiných buněk už dále exprimovat neměl, v případě, že by eficeience TALENů byla vysoká a k mutagenesi by došlo brzy ve vývoji určité tkáně, by tato metoda mohla tvořit klony – části organismu, kde budou všechny, nebo většina buněk obsahovat zmutovaný gen. Oproti tomu RNA interference expresi genu vždy pouze s určitou eficeincí potlačuje. To může být problém například tam, kde genu, který se snažíme vypnout, stačí pro jeho správnou funkci i malé množství proteinu – například buněčné receptory, u kterých je častá amplifikace signálu po jejich aktivaci, nebo enzymy, které dokáží přeměnit mnoho substrátových molekul na produkty.

Tento přístup tkáňově specifické mutagenese je zřejmě nejvíce podobný mitotické rekombinaci pomocí FLP-FRT systému a Cre-Lox rekombinaci. FLP-FRT systém pro místně specifickou rekombinaci, byl objeven u kvasinek a pro *Drosophila* ji zavedli Golic a Lindquist (Golic and Lindquist 1989). Spočívá v tom, že heterozygotní jedinec, nesoucí na jednom chromosomu recesivní mutaci, má za tímto místem FRT sekvenci (i na homologním chromosomu) a mezi těmito sekvencemi provádí flipáza (FLP) rekombinaci, homologní chromosomy tedy mají jednu chromatidu s mutací a jednu s normální kopií genu. Při následné mitóze tak mohou vznikat klony s homozygotní mutací a zároveň klony homozygotní pro normální kopii. Tkáňové specifity indukce se dosahuje aktivací flipázy pod UAS promotorem různými Gal4 drivery. Tato metoda je u *Drosophily* velmi rozšířená a používá se k analýze mozaik exprese pro určitý gen – tzv. „twin spot“ analýza. Nevýhodou této metody je, že tato rekombinace může zhomozygotnit další neznámé recesivní mutace na homologních chromosomech. Tato metoda také spoléhá na nízkou eficienci rekombinace, proto se nehodí například pro mutagenesi post-mitotických tkání, jako je mozek *Drosophily*, kde by byla k efektivní mutagenesi třeba rekombinace ve všech buňkách (Heidmann and Lehner 2001).

Cre-Lox systém byl také objeven u kvasinek (Sauer 1987) a mutagenese tímto systémem spočívá v tom, že je mutovaný gen ohraničený loxP sekvencemi, mezi kterými Cre rekombináza provádí rekombinaci, při jejich stejné orientaci dojde k vyštěpení, což vede k inaktivaci genu. Obdobně, regulací exprese Cre rekombinázy lze dosáhnout tkáňově specifické mutagenese. Tento systém je velmi rozšířený u výzkumu savčích buněk, výhodou je větší eficeince rekombinace než FLP/FRT (Nakano et al. 2001) a velké množství různých aplikací, objevují se ale nezanedbatelné zmínky o toxicitě u modelu myši i *Drosophily*, která je vysvětlována především přítomností kryptických pseudo-loxP míst v genomu, kde rekombináza štěpí, což vede k fragmentaci DNA a buněčné smrti (Heidmann and Lehner 2001; Lexow et al. 2013).

2. Cíle práce

Cílem mojí práce bylo připravit konstrukty nesoucí TAL nukleázy proti eGFP a adenosinovému receptoru octomilky *AdoR* a vytvořit transgenní linie nesoucí tyto konstrukty. Ty poté tkáňově specificky aktivovat pomocí UAS-Gal4 systému a zhodnotit jejich efekt.

3. Materiál a metody

3.1 Linie octomilek

Všechny octomilky byly chovány na standardní cornmeal dietě (120g kukuřičné mouky; 75g glukózy; 60g kvasnic; 15g agaru; vařeno 2 hodiny v 1,5l vody; poté bylo přidáno 25ml 10% methylparabenu v ethanolu) v 25°C. Linie použité při mých experimentech jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tab. 3.1: Seznam linií použitých v experimentech.

Název linie	Genotyp	Chromosom
TBX 0002	$\gamma^1 \ v^1 \ P\{\text{nos-}\phi\text{C31}\int\text{int.NLS}\}X; \text{attP40 (II)}$	II
TBX 0003	$\gamma^2 \ \text{cho}^2 \ v^1 \ P\{\text{nos-}\phi\text{C31}\int\text{int.NLS}\}X; \text{attP2 (III)}$	III
UAS-GFP	yw; P{w ^{+mW.hs} =UAS-GFP}	II
Escargot Gal4 UAS-GFP	yw; esg-Gal4 UAS-GFP UAS-lacZ/ Cyo	II
Engrailed Gal4 UAS-GFP	w; en Gal4	II
GMR Gal4	yw, GMR Gal4	II
Patched Gal4	Ptc-Gal4	II
w* Cyo	w*; Sco/Cyo; +*/+*	II
w* act-Gal4	w*; act-Gal4/TM6B	III
w	w [1118]	X

3.2 Příprava a ověření TAL nukleáz

V následující části uvádím složení GoldenGate a dalších restričních a ligačních reakcí provedených při přípravě TAL nukleáz, dále sekvence primerů a podmínky PCR pro ověření klonování. Samotný proces výroby TAL nukleáz je detailně popsán v první části výsledků.

3.2.1 GoldenGate reakce #1

Složení prvních GoldenGate reakcí bylo následující, použité plasmidy jsou součástí výsledků.

150 ng každého modulového plasmidu (pNN, pNI, pNG, pHD)

150 ng array plasmidu (pFusA, pFusB#)

1ul Bsal

1ul T4 DNA ligase

2ul 10x ligase buffer

H₂O do celkového objemu 20ul

Reakce probíhaly v termocykleru s následujícím programem:

37°C	5 min	}	10x
16°C	10 min		
50°C	5 min		
80°C	5 min		

Po skončení reakce jsem provedl Plasmid-Safe nuclease treatment k odstranění všech lineárních nezligovaných dsDNA fragmentů, které by mohly v bakteriích rekombinovat se správnými inserty. Do reakcí jsem přidal 1ul 10mM ATP, 1ul Plasmid-Safe nuclease a inkuboval 1 hodinu v 37°C.

5ul ligačních směsí jsem transformoval do DH5α kompetentních bakterií pomocí standardního heat-shock protokolu, vysel na LB misky se spectinomycinem a X-gal a inkuboval v 37°C přes noc. Poté jsem vybral několik bílých kolonií k ověření.

3.2.2 PCR ověření GoldenGate reakce #1

Primery

pCR8_F1 TTGATGCCTGGCAGTTCCT

pCR8_R1 CGAACCGAACAGGCTTATGT

PCR program

94°C	4min		
94°C	30s	}	30x
55°C	30		
72°C	105s		
72°C	10min		

Ze správných kolonií jsem nasadil miniprepy a nechal inkubovat přes noc v 37°C, plasmidovou DNA jsem vyizoloval pomocí QuiaPrep spin miniprep kitu.

3.2.3 GoldenGate reakce #2

V tabulce 3.2 jsou uvedeny názvy reakcí, plasmidy v jednotlivých reakcích a jejich objemy, množství každého plasmidu v reakci bylo asi 75 ng.

Tab. 3.2: Plasmidy použité pro GoldenGate reakce #2.

reakce	pFusA část	pFusB část	Last Repeat plasmid	backbone plasmid
eGFP F	eGFP FA	eGFP FB	pLR-NH	pTal3
μl	2	1.5	1	1
eGFP R	eGFP RA	eGFP RB	pLR-NG	pTal3
μl	1.5	1	1	1
AdoR1 F	AdoR1 FA	AdoR1 FB	pLR-NG	pTal3
μl	1	2	1	1
AdoR1 R	AdoR1 RA	AdoR1 RB	pLR-NH	pTal3
μl	1.5	1	1	1

Další součásti reakcí:

1ul Esp3I

1ul T4 DNA ligase

2ul 10x T4 ligase buffer

H₂O do celkového objemu 20ul

Reakce probíhaly v termocykleru s následujícím programem:

37°C 5 min }
16°C 10 min } 10x
37°C 15 min
80°C 5 min

5ul ligační směsi jsem transformoval do DH5α kompetentních bakterií, vysel na LB misky s ampicilinem a X-gal a inkuboval v 37°C přes noc. Poté jsem vybral několik bílých kolonií k ověření. Plasmid-Safe treatment zde nebyl nutný – opakování RVD modulů nemají homologii s vektorem pTal3.

3.2.4 PCR ověření GoldenGate reakce #2

Primery, podmínky reakce a správné velikosti fragmentů uvedené zde jsou shodné s pattb-NE3 ověřením #2

Primery

TAL_F1 TTGGCGTCGGCAAACAGTGG

TAL_R2 GGCGACGAGGTGGTCGTTGG

PCR program

94°C	4min	
94°C	30s	} 30x
55°C	30s	
72°C	180s	
72°C	10min	

3.2.5 Klonování do integrázového vektoru pattb-NE3

Složení restrikčních reakcí pTal3 vektorů s TALENy pomocí BbvCI bylo následující:

3,7ul každého pTal3 plasmidu s TALEN insertem (eGFP F, R; AdoR1 F, R)

pattbNE3 vektor (~1700 ng)

2ul NEB 4 10x buffer

2ul 10x BSA

1ul BbvCI

H₂O do celkového objemu 20ul.

Reakce jsem inkuboval 2 hodiny v 37°C, poté jsem pomocí QuiaQuick gel extraction kitu přečistil naštěpené plasmidy a provedl restrikci NotI, složení reakce je uvedeno v tabulce 3.3.

Tab. 3.3: Restrikce pTal3 plasmidů s TALENy enzymem NotI (2 hodiny v 37°C)

plasmid	DNA	NEB 3 10x	BSA 10x	NotI
eGFP F3	22ul (1852ng)	2,9ul	2,9ul	1,2ul
eGFP R11	27ul (1516ng)	3,5ul	3,5ul	1,1ul
AdoR1 F14	26ul(1566ng)	3,4ul	3,4ul	1,1ul
AdoR1 R20	24ul(1706ng)	3,15ul	3,15ul	1,2ul
pattbNE3 1-4	25ul(~1545ng)	3,25ul	3,25ul	1,1ul

Vyštěpené fragmenty s TALENy a otevřené vektory pattb-NE3 jsem z gelu extrahoval pomocí QuiaQuick gel extraction kitu. Fragmenty jsem ligoval v 3:1 molárním nadbytku insertu přes noc ve 4°C, složení ligačních reakcí je uvedeno v tabulce 3.4.

Tab. 3.4: Ligace TALEN fragmentů do integrazového vektoru pattbNE3.

	TAL fragment	pattb-NE3vektor	10x T4 ligase buffer	T4 DNA ligase	H ₂ O
AdoR1 F14	6,2ul (42ng)	3ul (50ng)	1ul	1ul	0ul
AdoR1 R20	2,9ul (43ng)	3,5ul (50ng)	1ul	1ul	1,6ul
eGFP F3	5,6ul (40ng)	3ul (50ng)	1ul	1ul	0ul
eGFP R11	1,8ul (40ng)	3ul (50ng)	1ul	1ul	3,2ul

3.2.6 pattb-NE3 ověření #1

Primery

Seq TALEN 5-1 CATCGCGCAATGCACTGAC

TAL_R2 GGCGACGAGGTGGTCGTTGG

PCR program

```

94°C 4min
94°C 30s
59°C 30s
72°C 150s
72°C 10min
    
```

} 30x

3.3 Příprava transgenních linií octomilek

3.3.1 Příprava DNA pro mikroinjikace

Z klonů ověřených PCR a restrikcemi jsem nasadil midiprepy a DNA jsem vyzoloval pomocí Nucleobond Xtra Midi Plus kitu podle návodu výrobce. Koncentraci plasmidové DNA jsem změřil na Nanodropu a kvalitu ověřil pomocí agarové elektroforézy. Podle koncentrací plasmidu jsem určil množství DNA ke srážení tak, aby výsledná koncentrace v injikačním pufru byla v rozmezí 200-800 ng/ul. Plasmidovou DNA jsem vysrážel přidáním 1/10 objemu acetátu sodného a dvojnásobného objemu ledového 96% ethanolu. Po 30 minutové inkubaci v -20°C jsem vzorky centrifugoval 20 minut ve 4°C, odstranil supernatant a pelet promyl 70% ethanolem, krátce stočil a odstranil supernatant. Suchý pelet jsem resuspendoval v 25 ul čerstvě připraveného injikačního pufru (5 mM KCl; 0,1 mM NaH₂PO₄ pH 6,8; 1ul přefiltrovaného potravinového barviva; miliQ H₂O do 25 ul) a inkuboval 5 minut v 50°C. Poté jsem vzorky odstředil 5 minut na maximum, abych se zbavil nečistot, které by mohly ucpávat jehlu, a rozdělil jsem vzorky do alikvotů po 4 ul. Kvalitu a formu plasmidů v injikačním roztoku jsem ověřil pomocí agarové elektroforézy.

3.3.2 Příprava jehel pro mikroinjikace

Jehly pro mikroinjikace jsem vytahoval na přístroji Narishige PC-10, používal jsem borosilikátové kapiláry s vnějším a vnitřním průměrem 1mm a 0,5mm. Vytahování jehel probíhalo ve dvou krocích s maximálním závažím, hodnoty heateru byly následující (hodnoty v závorce byly používány méně):

Heater 1: 55,8 (54,2)

Heater 2: 54,5 (55)

3.3.3 Příprava džusových misek a sklíčků

4 gramy bakteriologického agaru jsem rozpustil ve 100 ml tmavého rybízového džusu, povařil 1 minutu a nalil do malých petriho misek. Sklíčka jsem připravil opakovaným namáčením do této směsi, dokud nebyla na sklíčku rovnoměrná vrstva o tloušťce asi 3mm.

3.3.4 Mikroinjikace

Pro mikroinjikace jsem používal integrázové linie octomilek TBX 0002 a TBX 0003. Tyto linie obsahují gen pro serinovou integrázu phiC31 pod kontrolou *nanos* promotoru, je tedy exprimována v kaudální části embrya, kde se oddělují budoucí buňky zárodečné linie dospělé. Dále obsahují buď sekvenci *attP40* na druhém chromosomu (TBX 0002), nebo *attP2* na třetím chromosomu (TBX 0003). Po injikaci konstruktů s odpovídajícím *attB* místem, integráza provede rekombinaci mezi *attB* a genomovým *attP* a dojde k inserci konstruktů do genomu (Bischof et al. 2007).

Integrázové linie octomilek (TBX 0002 a TBX 0003) byly chovány ve vialkách na standardní cornmeal dietě, několik dní před injikacemi byly přeneseny do válce na misky se stejnou dietou a kvasnicovou pastou. Před injikací jsem je nechal 2-3 hodiny rozklást na džusových miskách bez pasty a s kapkou ethanolu. Po rozkladění jsem tyto misky měnil každou půlhodinu – stáří embryí pro injikace nesmí přesáhnout 1 hodinu, kdy už začíná celularizace. Embrya jsem promyl 96% ethanolem, štětečkem přenesl na džusové sklíčko a seřadil za sebe. Do jehly jsem nabral pomocí Eppendorf Microloader malé množství injikačního roztoku, upevnil do mikromanipulátoru, opatrně zlomil hrot jehly o sklíčko a pomocí stříkačky injikoval roztok do kaudálního konce embryí. Po skončení jsem gel kolem embryí seřízl, přenesl na agarové misky s ampicilinem a nechal inkubovat v 25°C. Po 24 hodinách jsem pomocí jehly vybral vylíhlé první instary larev a opatrně je přenesl po 20 do standardních cornmealových vialek.

3.4 Křížení

Konstrukty eGFP F a AdoR1 F jsem injikoval do linie TBX 0002, nacházejí se tedy na druhém chromosomu (insert označen jako *attP40*^{*}) eGFP R a AdoR1 R jsem injikoval do linie TBX 0003 a leží tedy na třetím chromosomu (*attP2*^{*}). Protože integrázové linie obsahují marker *vermillion*, který jim dává červenou barvu oka, musel jsem samce vzešlé z injikací zkřížit se samicemi *white* a vybírat samce, u kterých jsem pozoroval změnu barvy oka expresí markeru *miniwhite*, což značilo přítomnost transgenu. Zároveň jsem tímto krokem odsegregoval phiC31 integrázu, která by dále mohla způsobovat nestabilitu genomu.

3.4.1 Křížení vytvořených transgenů

$$\text{♂ } \frac{y \ v \ \text{phiC31}}{Y}; \frac{\text{attP40}^*}{+} \otimes \text{♀ } W; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$\text{♂ } \frac{y \ v \ \text{phiC31}}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{\text{attP2}^*}{+} \otimes \text{♀ } W; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$\text{♂ } \frac{w}{Y}; \frac{\text{attP40}^*}{+}$$

$$\text{♂ } \frac{w}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{\text{attP2}^*}{+}$$

eGFP F, AdoR1 F

eGFP R, AdoR1 R

Obr. 3.1: Křížení pro ověření transgeneze a odsegregování phiC31 integrázy. Samci vzeší z injikovaných embryí byli kříženi s *white* samicemi a vzniklé samce jsem pozoroval na změnu barvy oka, která byla v případě úspěšné transgeneze světle žlutá.

V následujícím kroku jsem vytvořil homozygotní linie pro inserty TALENů křížením s balancerovými chromosomy *CyO* a *TM6B*.

$$\text{♂ } \frac{w}{Y}; \frac{\text{attP40}^*}{+} \otimes \text{♀ } W; \frac{+}{\text{CyO}}$$

$$\text{♂ } \frac{w}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{\text{attP2}^*}{+} \otimes \text{♀ } W; \frac{+}{+}; \frac{+}{\text{TM6B}}$$

$$W; \frac{\text{attP40}^*}{\text{CyO}} \otimes W; \frac{\text{attP40}^*}{\text{CyO}}$$

$$W; \frac{+}{+}; \frac{\text{attP2}^*}{\text{TM6B}} \otimes W; \frac{+}{+}; \frac{\text{attP2}^*}{\text{TM6B}}$$

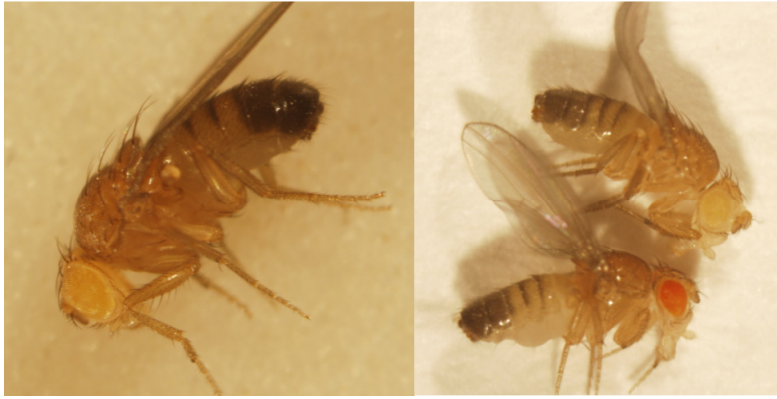
$$W; \frac{\text{attP40}^*}{\text{attP40}^*}$$

$$W; \frac{+}{+}; \frac{\text{attP2}^*}{\text{attP2}^*}$$

eGFP F, AdoR1 F

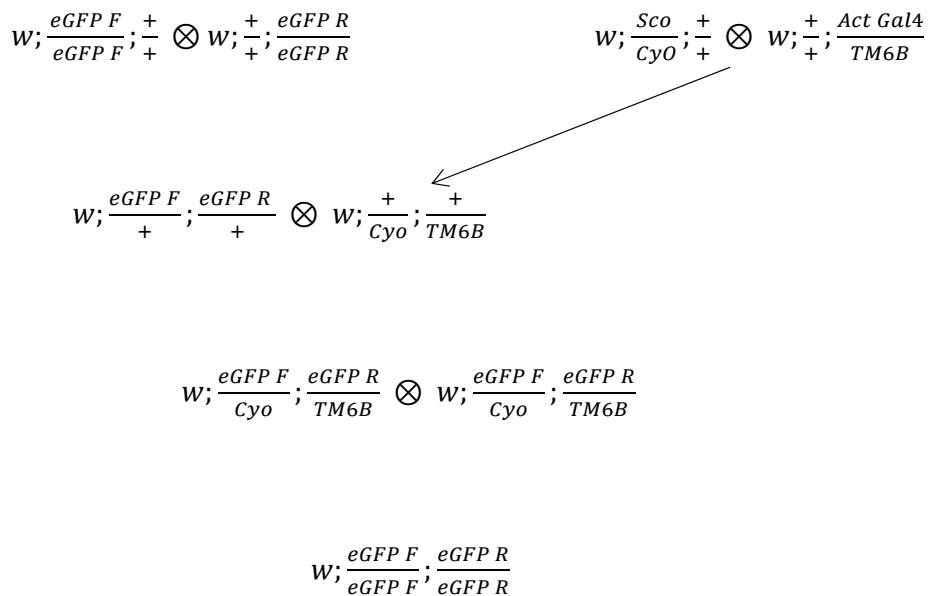
eGFP R, AdoR1 R

Obr. 3.2: Křížení pro vytvoření homozygotů s TALEN inserty, vlevo pro eGFP F a AdoR1 F, vpravo pro eGFP R a AdoR1 R.



Obr. 3.3: Samec s integrovaným TALEN konstruktem (heterozygot, vlevo) a rozdíl mezi heterozygotem a červenookým homozygotem, vpravo.

V následujícím kroku křížení na obrázku 3.4 jsem vytvořil dvojitého homozygota pro eGFP F a eGFP R TALEN, tuto linii jsem poté používal k indukci různými Gal4 drivery.



Obr. 3.4: Křížení pro vytvoření homozygota pro eGFP F a eGFP R TALEN. Samce a samice pro třetí krok jsem vybíral na základě rozdílu barvy oka – 2 kopie TALENu (a miniwhite markeru) dávaly červenou barvu oka oproti žluté u jedné kopie.

3.4.2 Křížení pro rekombinaci GMR a ptc Gal4 s UAS-GFP

$$\frac{GMR\ Gal4}{GMR\ Gal4}; \frac{+}{+} \otimes \frac{UAS-GFP}{UAS-GFP}; \frac{+}{+}$$

$$\text{♀ } \frac{GMR\ Gal4}{UAS-GFP}; \frac{+}{+} \otimes \frac{+}{CyO}; \frac{+}{+} \text{ ♂}$$

$$\frac{GMR\ Gal4-UAS-GFP}{CyO}; \frac{+}{+} \otimes \frac{GMR\ Gal4-UAS-GFP}{CyO}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{GMR\ Gal4\ UAS-GFP}{GMR\ Gal4\ UAS-GFP}; \frac{+}{+}$$

Obr. 3.5: Rekombinace GMR Gal4 driveru s UAS-GFP. Rekombinanti byli vybráni ve třetím kroku podle GFP fluorescence oka. Stejným způsobem jsem provedl rekombinaci ptc Gal4 driveru s UAS-GFP, rekombinanti měli po vylíhnutí viditelnou fluorescenci na křídlech a v oblasti pleury.

3.4.3 Křížení pro indukci eGFP TALENů Gal4 driveru

$$\frac{eGFP\ F}{eGFP\ F}; \frac{eGFP\ R}{eGFP\ R} \otimes \frac{en\ Gal4\ UAS-GFP}{en\ Gal4\ UAS-GFP}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{en\ Gal4\ UAS-GFP}{en\ Gal4\ UAS-GFP}; \frac{+}{+} \otimes W; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{eGFP\ F}{en\ Gal4\ UAS-GFP}; \frac{eGFP\ R}{+}$$

$$\frac{+}{en\ Gal4\ UAS-GFP}; \frac{+}{+}$$

Obr. 3.6: Křížení pro indukci eGFP TALENu pomocí engrailed Gal4 driveru a kontrolní křížení.

$$\frac{eGFP\ F}{eGFP\ F}; \frac{eGFP\ R}{eGFP\ R} \otimes \frac{esg\ Gal4\ UAS-GFP}{CyO}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{esg\ Gal4\ UAS-GFP}{CyO}; \frac{+}{+} \otimes W; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{eGFP\ F}{esg\ Gal4\ UAS-GFP}; \frac{eGFP\ R}{+}$$

$$\frac{esg\ Gal4\ UAS-GFP}{+}; \frac{+}{+}$$

Obr. 3.7: Křížení pro indukci eGFP TALENu pomocí escargot Gal4 driveru, byly vybírány larvy s GFP fluorescencí. Kontrolní křížení vpravo.

$$\frac{eGFP F}{eGFP F}; \frac{eGFP R}{eGFP R} \otimes \frac{GMR Gal4 UAS-GFP}{GMR Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+} \quad \frac{GMR Gal4 UAS-GFP}{GMR Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+} \otimes W; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{eGFP F}{GMR Gal4 UAS-GFP}; \frac{eGFP R}{+} \quad \frac{+}{GMR Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+}$$

Obr. 3.8: Křížení pro indukci eGFP TALENu pomocí GMR Gal4 driveru a křížení pro kontrolu.

$$\frac{eGFP F}{eGFP F}; \frac{eGFP R}{eGFP R} \otimes \frac{ptc Gal4 UAS-GFP}{ptc Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+} \quad \frac{ptc Gal4 UAS-GFP}{ptc Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+} \otimes W; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{eGFP F}{ptc Gal4 UAS-GFP}; \frac{eGFP R}{+} \quad \frac{+}{ptc Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+}$$

Obr. 3.9: Křížení pro indukci eGFP TALENu pomocí patched Gal4 driveru a křížení pro kontrolu.

3.4.4 Křížení AdoR1 TALENu

$$\frac{AdoR1 F}{AdoR1 F}; \frac{+}{+} \otimes \frac{+}{CyO}; \frac{+}{TM6B}$$

$$\frac{AdoR1 F}{CyO}; \frac{+}{TM6B} \otimes \frac{AdoR1 F}{CyO}; \frac{+}{TM6B}$$

$$\frac{AdoR1 F}{AdoR1 F}; \frac{+}{TM6B}$$

Obr. 3.10: Křížení pro vznik homozygota pro AdoR1 F balancovaného TM6B na třetím chromosomu.

$$\frac{+}{+}; \frac{AdoR1 R}{AdoR1 R} \otimes \frac{+}{CyO}; \frac{+}{TM6B}$$

$$\frac{+}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{TM6B} \otimes \frac{+}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{TM6B}$$

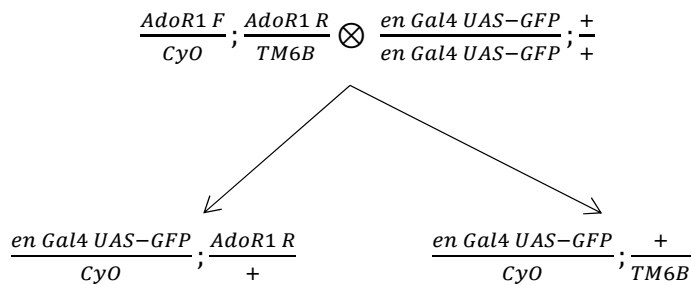
$$\frac{+}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{AdoR1 R}$$

Obr. 3.11: Křížení pro vznik homozygota pro AdoR1 R balancovaného CyO na druhém chromosomu.

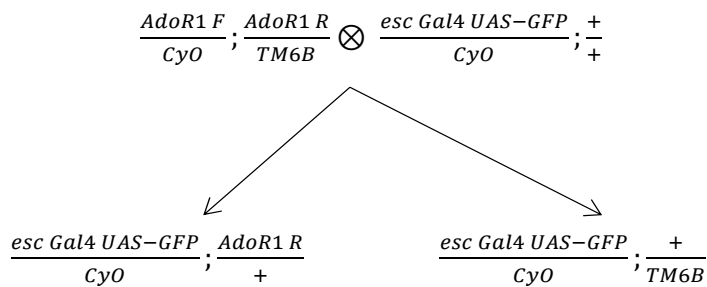
$$\frac{AdoR1 F}{AdoR1 F}; \frac{+}{TM6B} \otimes \frac{+}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{AdoR1 R}$$

$$\frac{AdoR1 F}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{TM6B}$$

Obr. 3.12: Křížení pro vznik balancovaného heterozygota pro AdoR1 F a AdoR1 R.



Obr. 3.13: Křížení pro indukci AdoR1 TALENu engrailed Gal4 driverem, jedinci s genotypem vpravo byli vybíráni jako kontrola.



Obr. 3.14: Křížení pro indukci AdoR1 TALENu escargot Gal4 driverem, jedinci s genotypem vpravo byli vybíráni jako kontrola.

3.5 Ověření transgenních octomilek

3.5.1. Izolace genomové DNA

K izolaci genomové DNA jsem rozdrtil 10 octomilek ve 400ul SNET pufru o složení:

20mM Tris-Cl pH 8,0

5mM EDTA pH 8.0

400mM NaCl, 1% SDS (w/v)

proteináza K (400ug/ml)

RNáza A (40ug/ml)

Inkuboval jsem 4 hodiny v 55°C za občasného míchání, poté jsem provedl standartní fenol-chloroformovou extrakci. DNA jsem vysrážel přidáním 1/10 objemu acetátu sodného a stejného objem isopropanolu, promyl 70% ethanolem a rozpustil v 200ul TE pufru (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0), kvalitu jsem ověřil pomocí agarové elektroforézy.

3.5.2 PCR ověření transgenů

Primery

TALEN_F2 ATGCACTGACGGGTGCCCC

TALEN_R2 TCCATGGCAGGACGTCCGC

Tuto PCR jsem prováděl třikrát s teplotami annealingu 59°C, 60°C a 61°C.

PCR program:

94°C	4min		
94°C	30s	}	35x
59-61°C	30s		
72°C	150s		
72°C	10min		

3.6 Mikroskopie

Larvy pozdních 3. instarů (96-120 hodin po naklazení) byly pitvány pomocí dvou mikropinzet velikosti 5 v PBS pufru. Pozorování fenotypů všech dospělců a tkání na obrázku 4.26 jsem prováděl pomocí stereo mikroskopu OLYMPUS SZX 12 s normálním osvětlením nebo fluorescencí. Fenotypy křídel jsem pozoroval u dospělců mladších 2 hodin invertovaným mikroskopem OLYMPUS IX71 pomocí DIC a fluorescenční mikroskopie.

3.6.1 Příprava vzorků ke konfokální mikroskopii

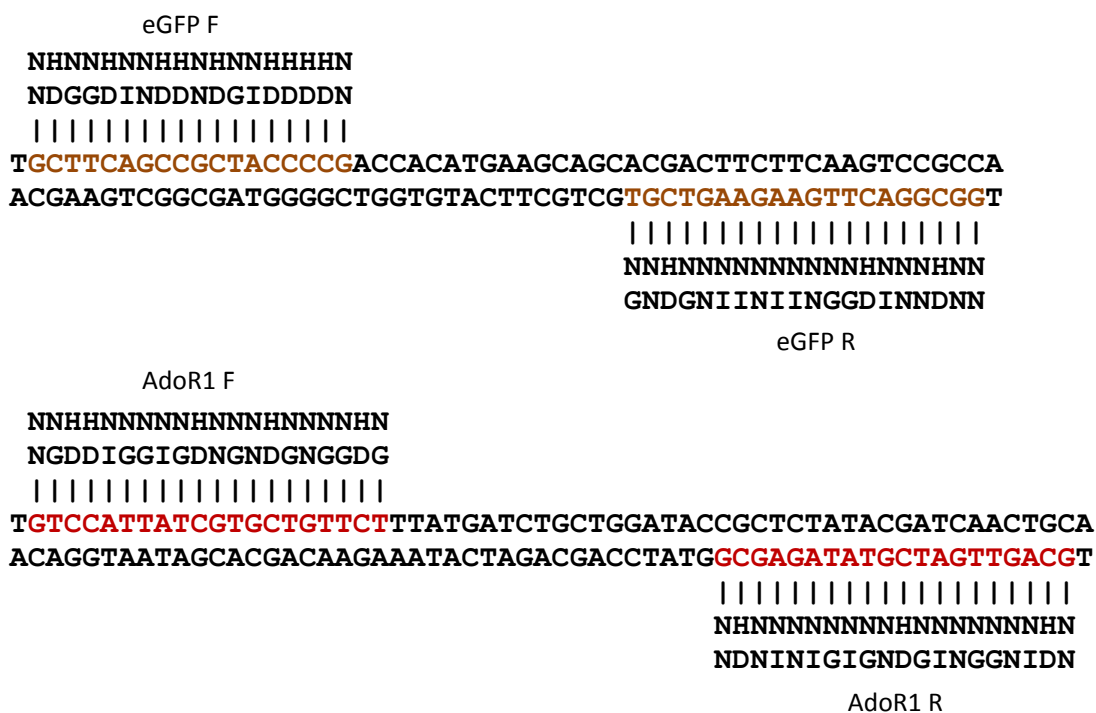
Larvy byly vypitvány v PBS pufru a přeneseny do zkumavek s PBS na led. Nejdéle po 20 minutách jsem PBS odsál a přidal fixační roztok (4% formaldehyd (v/v), 5 mM EGTA v 1x PBS) a inkuboval 20 minut v pokojové teplotě. Poté jsem fixační roztok odsál, třikrát vzorky promyl methanolem a nechal v něm inkubovat přes noc v -20°C. Rehydrataci jsem prováděl pomocí PBT pufru (PBS s 0,3% Triton-X), vzorky jsem promyl 2x s inkubací 20 minut v pokojové teplotě, při posledním promytí jsem k PBT přidal DAPI v poměru 1:10 000 a inkuboval 30 minut. Poté jsem PBT s DAPI opět nahradil PBT a tkáň přenesl do kapky mounting media na sklíčko, hotový preparát jsem zalakoval proti vyschnutí. Ke konfokální mikroskopii byl použit OLYMPUS FluoView FV1000 Laser scanning microscope (<http://www.olympus-global.com>). K analýze fotografií z konfokálního mikroskopu byl použit program ImageJ, složené fotografie na obrázku 4.21 byly vytvořeny pomocí ImageJ stitching pluginu (Preibisch, Saalfeld, and Tomancak 2009).

4. Výsledky

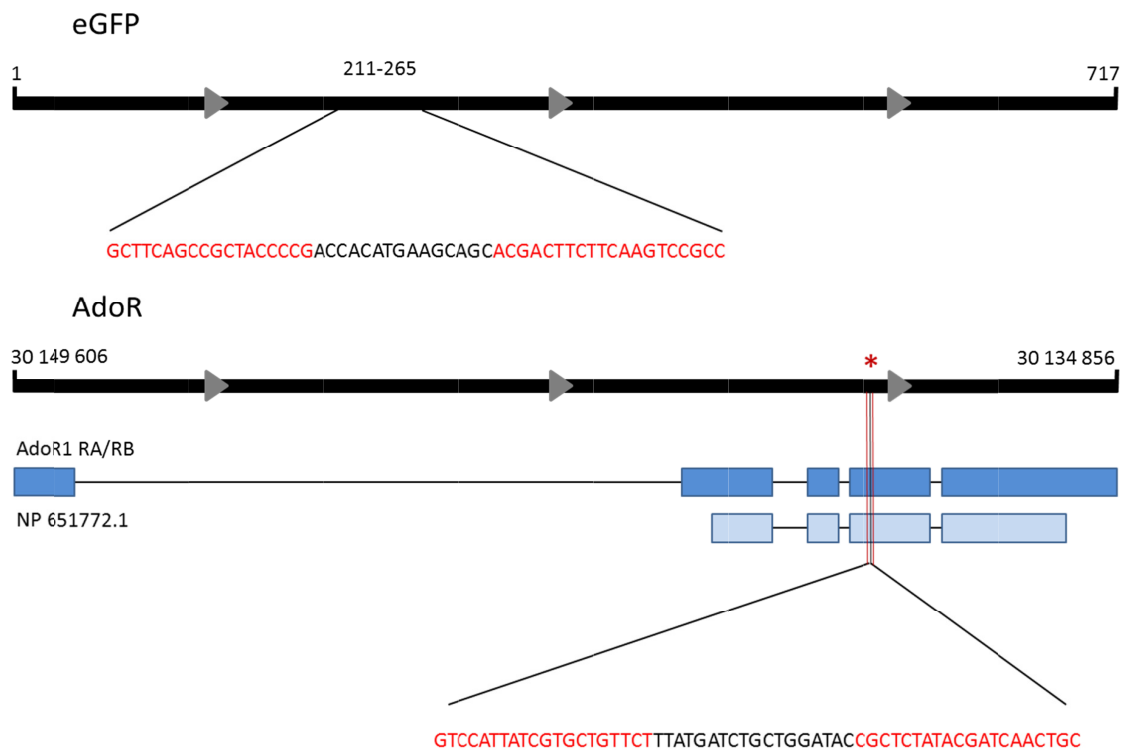
4.1 Design TAL nukleáz

TALENy byly navrženy pomocí online nástroje TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 (TALE-NT) (Doyle et al. 2012), který umožňuje návrh TALENu proti libovolné sekvenci DNA. Z navrhovaných TALENů byly vybrány takové, které se vážaly na počátky obou genů, což po opravě zlomu dává větší šanci pro posunové nebo nonsense mutace, které postihnou velkou část genu. AdoR1 TALEN byl navržen tak, aby cílil sekvenci na začátku 4. exonu *AdoR* receptoru, která se nenachází u linie *adoR* mutanta, kterého používáme při experimentech z důvodu delece. To by nám v případě kombinace AdoR1 TALENu s *adoR* mutací poskytovalo možnost zesílit efekt potlačení *AdoR*, v případě, že by efektivita TALENů nebyla dostatečně velká.

Na obrázku 4.1 je schématické znázornění TALENů pro eGFP a AdoR a sekvence, na kterou nasedají jednotlivé RVD moduly (NN, HD, NG, a NI). Každý se skládá z Forward a Reverse části, uprostřed se nachází 15 a 18 bazové spacery, ve kterých FokI nukleáza provádí štěpení. Obrázek 4.2 znázorňuje pozice štěpení v genech pro *eGFP* a *AdoR* receptor.



Obr. 4.1: Rozpoznávací sekvence pro oba TALENy spolu s RVD moduly vážajícími se na jednotlivé baze. Nahoře eGFP, dole AdoR1 TALEN.



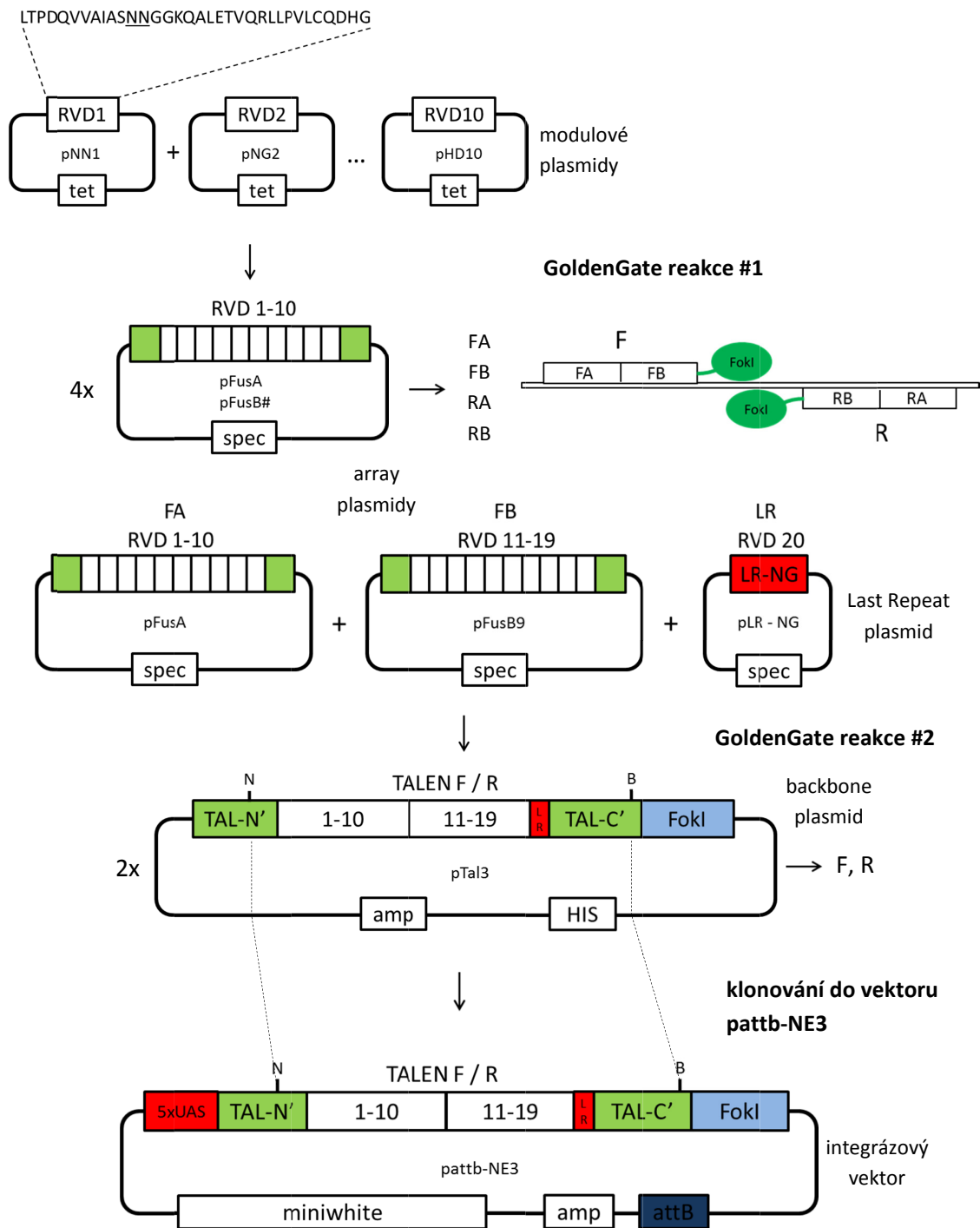
Obr. 4.2: Pozice štěpení TALENů v genech eGFP a AdoR. eGFP TALEN je navržen k vazbě na sekvenci od místa kódujícího 70. AK a dál, vzhledem k tomu, že se eGFP liší od GFP pouze úpravami F64L a S65T, by měl TALEN štěpit i GFP s jinak stejnou kódující sekvencí. AdoR1 TALEN je navržen, aby se vázal na sekvenci na začátku 4. exonu dvou nejčastějších variant adenosinového receptoru RA a RB. Svislé červené linie značí 77bp delecii *adoR* u mutantní linie, kterou využíváme při experimentech, linie uprostřed značí vazebné místo pro AdoR1 TALEN.

4.2 Příprava TAL nukleáz

Cílem této části práce bylo připravit integrazové vektory s TALENy proti sekvencím *eGFP* a receptoru *AdoR Drosophily*. Jejich příprava se skládala ze 3 částí, které jsou znázorněny na obrázku 4.3. V první části (GoldenGate reakce #1) bylo třeba složit dohromady sekvence jednotlivých RVD modulů z modulových plasmidů ve správném pořadí do array plasmidu. RVD modul kóduje jedno opakování DNA vazebné domény TALENu, jejich spojením za sebe jsem tedy získal poloviny Forward i Reverse TALENů, označené jako FA, FB a RA, RB. Ve druhé části (GoldenGate reakce #2) se tyto poloviny spojily k sobě a bylo připojeno poslední opakování – tzv. Last Repeat RVD modul, který je o několik AK kratší. Tyto části byly složeny do pTal3 backbone plasmidu, který už obsahuje okolní 5' a 3' sekvence, výsledkem je tedy hotový Forward nebo Reverse TALEN. Plasmid pTal3 je ale navržen jako kvasinkový expresní vektor, posledním krokem přípravy tedy bylo zaklonování TALENů do vektoru pattb-NE3, který obsahuje nezbytné sekvence pro integraci do genomu octomilky.

TALENy byly vytvořeny pomocí Golden Gate TALEN assembly kitu (Addgene), protokol je modifikovaná verze návodu publikovaného v (Cermak et al. 2011).

Při přípravě vektorů s TALENy byla využita GoldenGate technika, která využívá toho, že některé restrikční enzymy štěpí mimo jejich rozpoznávací sekvenci, která tedy může být libovolná. Jednotlivé převislé konce vyštěpovaných fragmentů i cílových plasmidů tedy byly navrženy tak, aby v jedné reakci zligovaly pouze jedním požadovaným způsobem, což výrazně zvyšuje efektivitu klonování. Po správné ligaci také dochází k zániku původních restrikčních míst, hotový produkt tedy není dále štěpen.



Obr. 4.3: Celkové schéma přípravy jednoho TALENU. 4 GoldenGate reakce #1 dají vzniknout polovinám TALENŮ (zde znázorněn TALEN s 20 RVD moduly, jejich počet se ale může lišit) FA, FB a RA, RB. Jejich orientace v hotovém TALENU spolu s FokI nukleázami je znázorněna v horní části obrázku. GoldenGate reakce #2 probíhá 2x – pro spojení FA s FB a RA s RB, přitom je připojen i Last Repeat. Následuje klonování do integrázového vektoru restrikční enzymy NotI (N) a BbvCI (B) v 5' a 3' oblastech, které jsou stejné pro všechny TALENY.

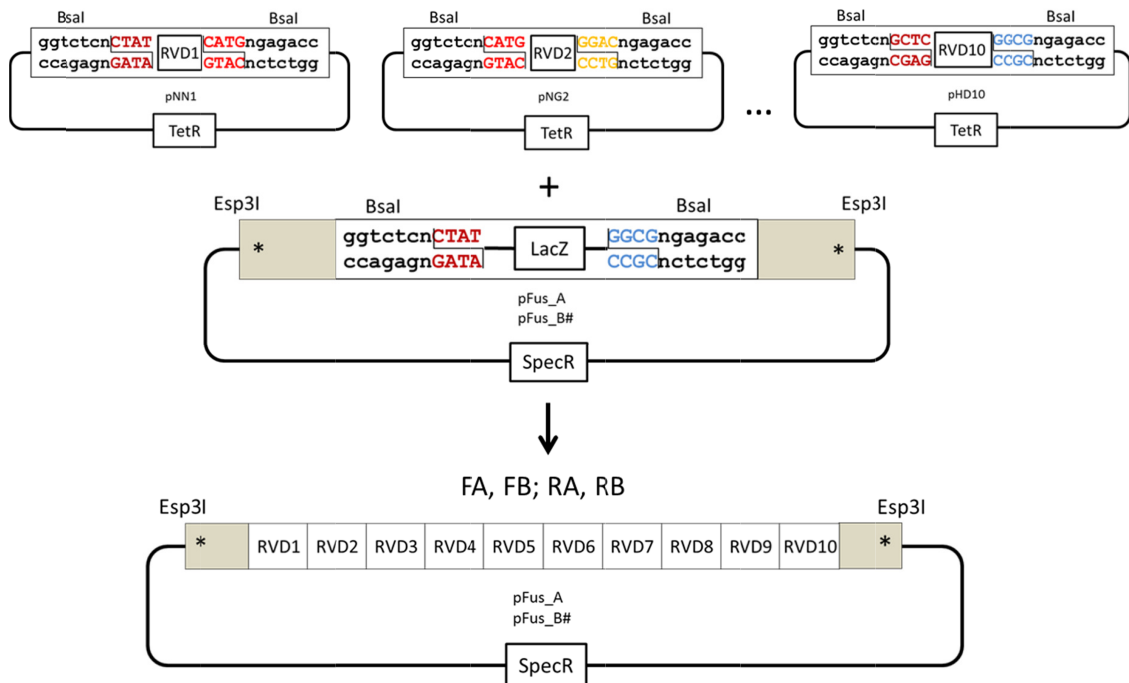
4.2.1 GoldenGate reakce #1

Prvním krokem v přípravě TALENů bylo složení modulů s jednotlivými RVD ve správném pořadí do array plasmidů pFUS_A a pFUS_B#. Sekvence těchto modulů se nachází na plasmidech pHD, pNG, pNN, pNI, v kitu je každý z těchto plasmidů 10x, označen číslem 1 až 10, které udává pořadí, jaké budou mít jednotlivé RVD moduly po složení v array plasmidu. Array plasmid je stejný pro FA a RA reakce – pFusA, pro FB a RB reakce se vybírá array plasmid pFusB#, číslo plasmidu odpovídá počtu opakování, které bude obsahovat (zde pFusB7 a pFusB9).

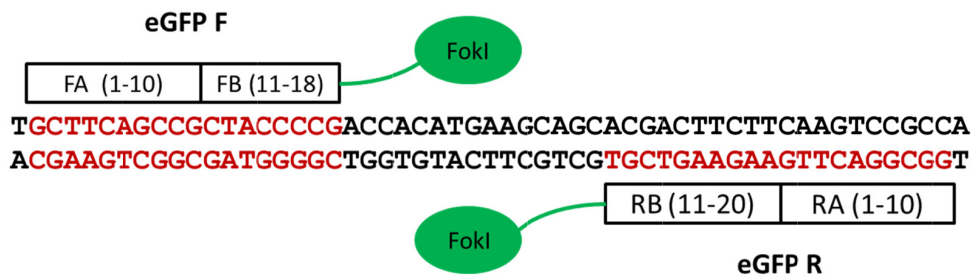
Plasmidy byly smíchány do reakcí podle tabulky 4.1, dále byl přidán enzym Bsal, který vyštěpil RVD moduly, které se díky komplementárním přesahům spojily a vložily do array plasmidů, ze kterých Bsal vyštěpila LacZ fragment. Výsledkem těchto reakcí tedy byly sekvence polovin DNA vazebných domén obou TALENů označovaných jako FA a FB (forward) a RA a RB (reverse), jak je znázorněno na příkladu eGFP TALENu na obrázku 4.5. Schéma vlastní reakce je na obrázku 4.4.

Tab. 4.1: Plasmidy použité pro GoldenGate reakce #1. Vlevo je uveden název reakce, číslo označuje pořadí daného RVD modulu v array plasmidu, který je uveden vpravo.

eGFP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	array plasmid
FA (1 - 10)	pNN1	pHD2	pNG3	pNG4	pHD5	pNI6	pNH7	pHD8	pHD9	pNN10	pFusA
FB (11 - 17)	pHD1	pNG2	pNI3	pHD4	pHD5	pHD6	pHD7				pFusB7
RA (1 - 10)	pNN1	pNN2	pHD3	pNN4	pNN5	pNI6	pHD7	pNG8	pNG9	pNN10	pFusA
RB (11-19)	pNI1	pNI2	pNN3	pNI4	pNI5	pNN6	pNG7	pHD8	pNN9		pFusB9
AdoR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	array plasmid
FA (1-10)	pNN1	pNG2	pHD3	pHD4	pNI5	pNG6	pNG7	pNI8	pNG9	pHD10	pFusA
FB (11-19)	pNN1	pNG2	pNN3	pHD4	pNG5	pNN6	pNG7	pNG8	pHD9		pFusB9
RA (1-10)	pNN1	pHD2	pNI3	pNN4	pNG5	pNG6	pNN7	pNI8	pNG9	pHD10	pFusA
RB (11-19)	pNN1	pNG2	pNI3	pNG4	pNI5	pNN6	pNI7	pNN8	pHD9		pFusB9



Obr. 4.4: Schéma GoldenGate reakce #1. RVD moduly jsou vyštěpeny enzymem Bsal a ligovány do array plasmidu pFusA a pFusB# místo LacZ. Okolní sekvence array plasmidů obsahují restriční místa pro Esp3I, kterými se moduly vyštěpí v GoldenGate reakci #2.

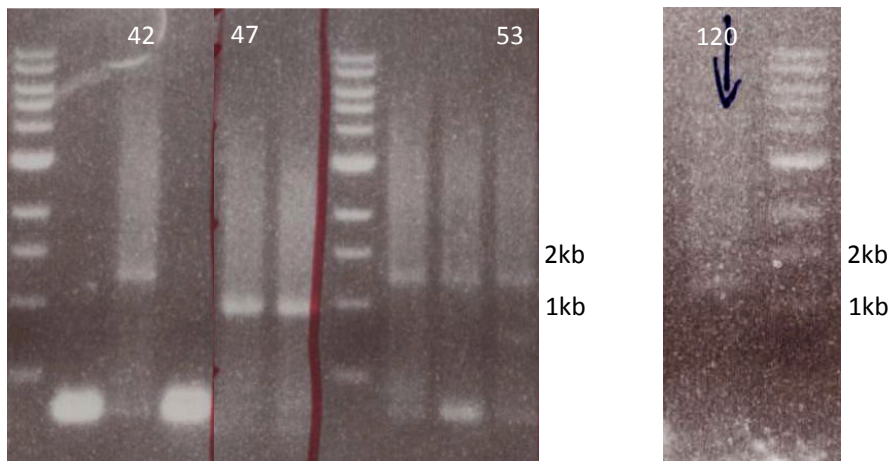


Obr. 4.5: Schéma rozdělení DNA vazebných domén TALENů na 2 části klonované zvlášť.

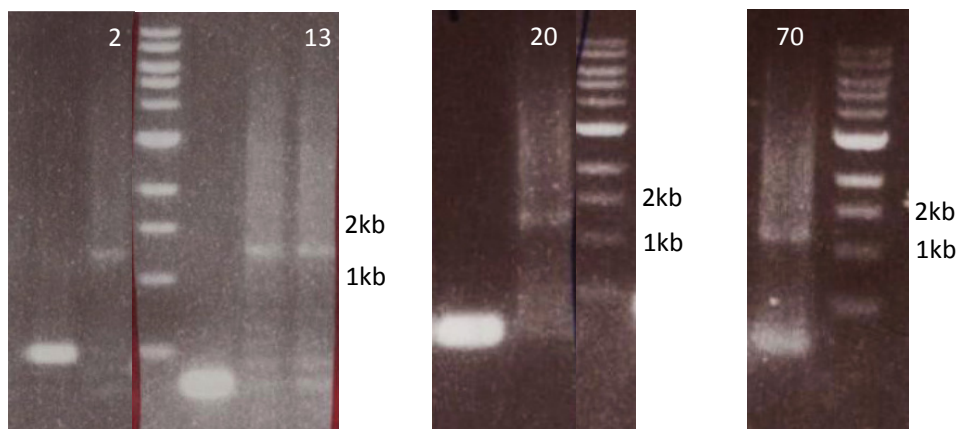
Po skončení restrikce a ligace v termocykleru jsem jednotlivé reakce transformoval do kompetentních bakterií, vysel na LB misky se spectinomycinem a X-Gal a inkuboval v 37°C přes noc, poté jsem vybral několik bílých kolonií k otestování PCR s primery pCR8_F1 a pCR8_R1. Protože jsou sekvence TALENů sérií repetit o 102 bazích, které se od sebe liší pouze v kódu pro 2 AK (RVD), při amplifikaci dochází ke sklouzávání polymerázy a následujícímu špatnému párování templátu a nově syntetizovaného vlákna. To při agarové

elektroforéze vytváří šmouhu a efekt žebříku viditelný ve spodní části gelu, což je také většinou znak správného klonu (pruh o správné velikosti nemusí být viditelný).

4.2.2 PCR ověření GoldenGate reakce #1



Obr. 4.6: Ověřovací PCR GoldenGate reakce #1 pro eGFP, správné klony, které jsou použity pro další reakce jsou označeny čísly: eGFP FA 42 (1247 bp) eGFP FB 47 (963 bp), eGFP RA 53 (1247 bp), eGFP RB 120 (1167 bp).



Obr. 4.7: Ověřovací PCR GoldenGate reakce #1 pro AdoR1. Dále použité správné kolonie jsou označeny čísly: AdoR1 FA 2 (1247 bp) AdoR1 RA 13 (1247 bp), AdoR1 RB 20 (1167 bp) AdoR1 FB 70 (1167 bp).

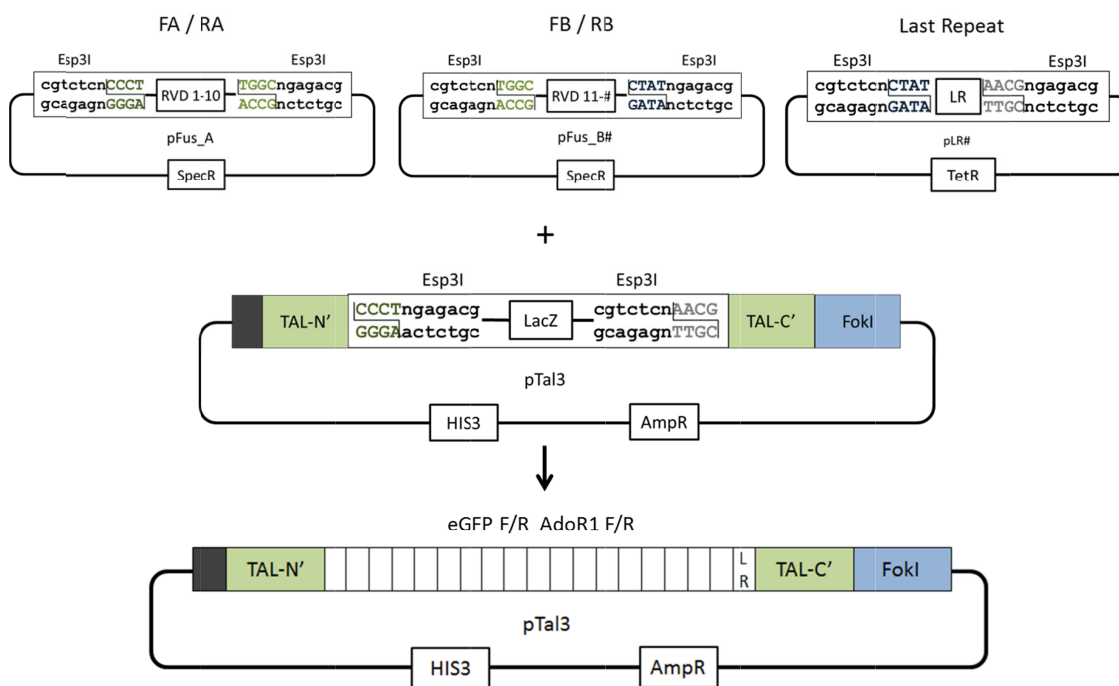
Ze správných kolonií jsem nasadil miniprepy, vyzoloval plasmidovou DNA a použil ji k následujícím reakcím.

4.2.3 GoldenGate reakce #2

Cílem této reakce bylo vyštěpení fragmentů FA; FB a RA; RB z array plasmidů, připojení posledního zkráceného Last Repeat RVD modulu a vložení do backbone plasmidu pTAL3, který obsahuje okolní 5' a 3' sekvence TALENu s NLS a FokI nukleázou. Výsledný produkt je tedy kompletní forward (F) nebo reverse (R) TALEN. Plasmidy byly smíchány do ligačních reakcí podle tabulky 4.2, schéma reakce je na obrázku 4.8.

Tab. 4.2: Plasmidy použité pro GoldenGate reakce #2. Vlevo je název reakce, dále jsou uvedeny použité části TALENů v pFusA a pFusB plasmidech, LR a backbone plasmid.

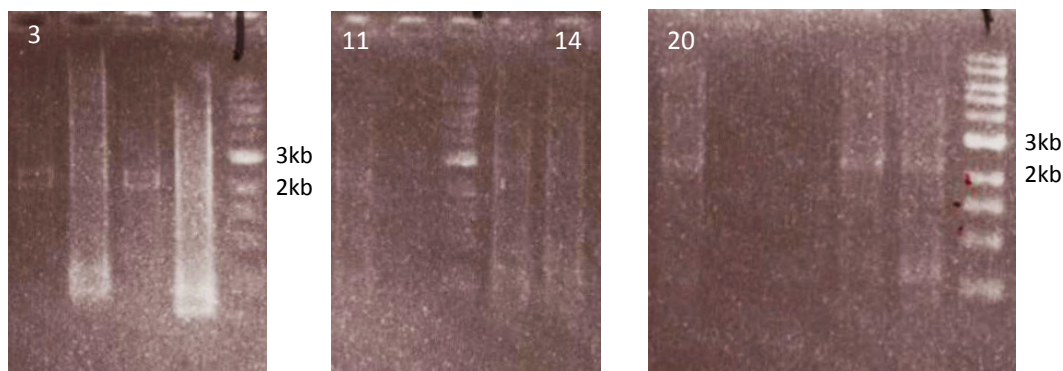
reakce	pFusA	pFusB	Last Repeat plasmid	backbone plasmid
eGFP F	eGFP FA	eGFP FB	pLR-NH	pTal3
eGFP R	eGFP RA	eGFP RB	pLR-NG	pTal3
AdoR1 F	AdoR1 FA	AdoR1 FB	pLR-NG	pTal3
AdoR1 R	AdoR1 RA	AdoR1 RB	pLR-NH	pTal3



Obr. 4.8: Schéma GoldenGate reakce #2. Domény jsou vyštěpeny enzymem Esp3I a spojeny FA s FB a RA s RB, je připojen Last Repeat modul a probíhá ligace do backbone plasmidu pTAL3 nahrazením fragmentu LacZ. Vznikají tak TALENy eGFP F, eGFP R, AdoR1 F a AdoR1 R.

Po skončení restriktivně ligační reakce v termocykleru jsem reakce transformoval do kompetentních bakterií, vysel na LB misky s ampicilinem a X-Gal a inkuboval v 37°C přes noc, poté jsem vybral několik bílých kolonií k následujícímu ověření.

4.2.4 PCR ověření GoldenGate reakce #2

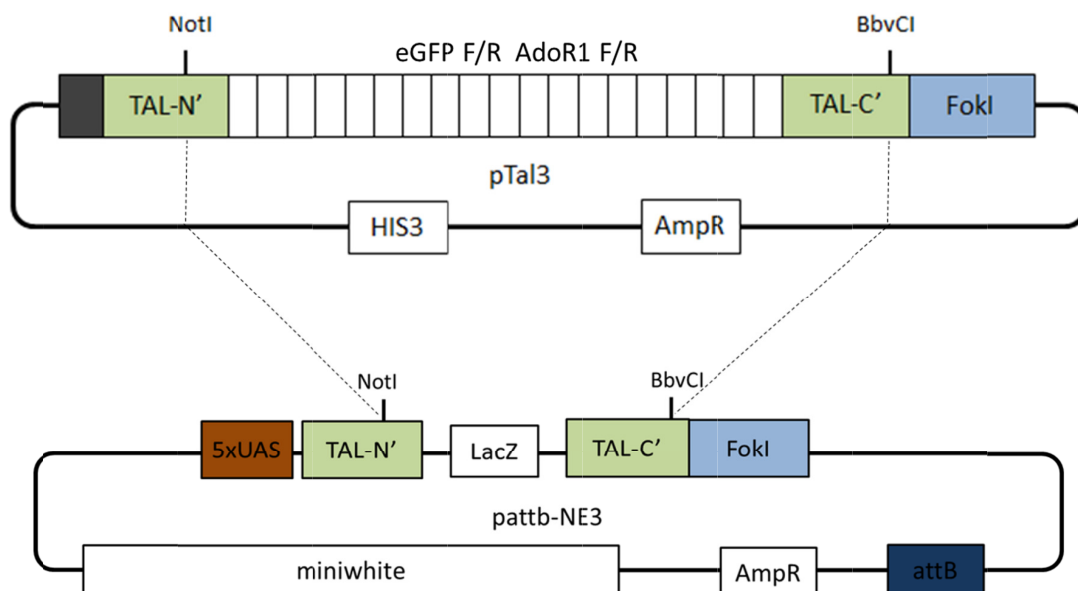


Obr. 4.9: Ověření insertu TALENů v pTal3 vektoru, dále použité správné kolonie jsou označeny čísly: eGFP F3 (2051 bp), eGFP R11 (2255 bp), AdoR1 F14 (2255 bp), AdoR1 R20 (2255 bp).

Ze správných kolonií jsem nasadil miniprepy, vyizoloval plasmidovou DNA a použil ji k následujícím reakcím.

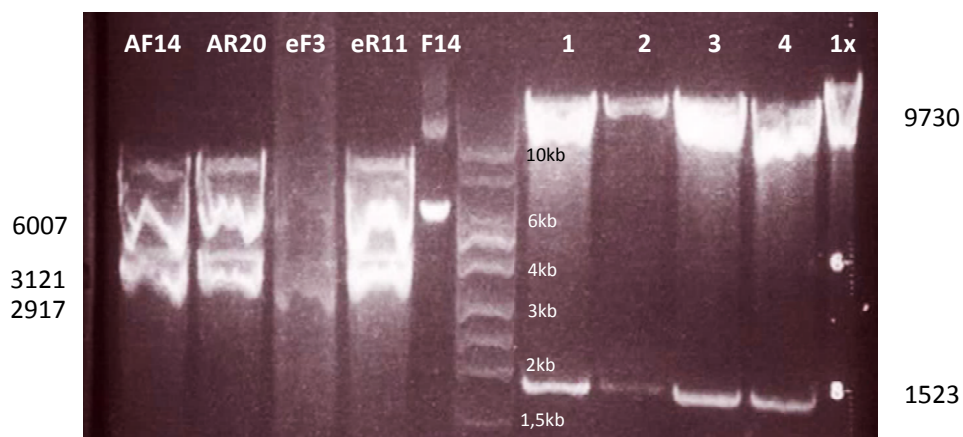
4.2.5 Klonování do vektoru pattb-NE3

Posledním krokem bylo zaklonování hotových TALENů do integrázového vektoru pattb-NE3. Ten obsahuje promotorovou sekvenci 5xUAS, marker exprese *miniwhite*, který po integraci do genomu navrácí *white* octomilkám barvu očí, sekvenci *attB* pro integraci do genomu pomocí integrázy phiC31 a ampicilinovou rezistenci. Do tohoto vektoru byly dále metodou In-Fusion klonování vloženy 5' a 3' sekvence obklopující TALEN – N a C terminální sekvence a sekvence pro FokI nukleázu. Tyto sekvence jsou stejné i v pTal3 vektoru s TALENy, restriktci jsem tedy provedl pomocí enzymů BbvCI a NotI, které štěpí pouze v těchto místech, jak je znázorněno na obrázku 4.10.



Obr. 4.10: Schéma klonování TALENů do integrázového vektoru pattb-NE3.

Nejdříve jsem provedl restrikci plasmidů pTal3 s částmi TALENů eGFP F, eGFP R, AdoR1 F a AdoR1 R a prázdného integrázového vektoru pattb-NE3 enzymy NotI a BbvCI. Jednotlivé restrikce jsem rozdělil pomocí agarové elektroforózy, která je na obrázku 4.11.

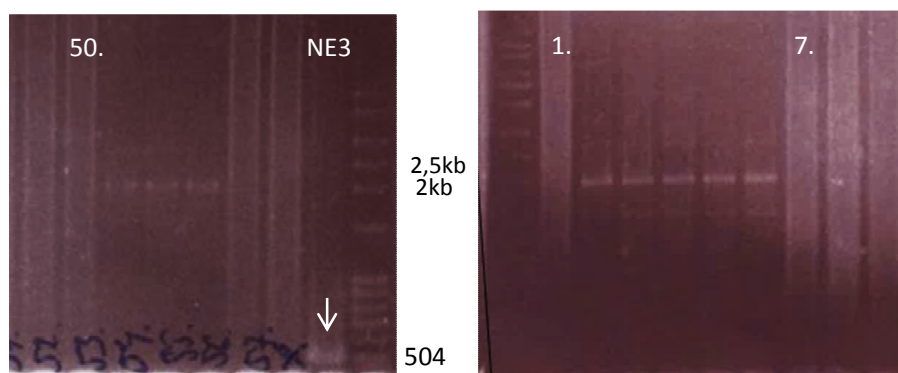


Obr. 4.11: Restrikce pTal3 vektorů s TALENy a prázdného integrázového vektoru pattbNE3 (1-4) enzymy NotI a BbvCI. Zleva: AdoR1 F14 (3121 bp), AdoR1 R20 (3121 bp), eGFP F3 (2917 bp), eGFP R11 (3121 bp). F14 je neštěpený pTal3 plasmid s AdoR1 F (9128 bp), 1x – linearizovaný integrázový vektor (11 253 bp).

Vyštěpené fragmenty z pTal3 vektorů s TALENy (vlevo, velikosti fragmentů 2917 bp a 3121 bp) a otevřené integrázové vektory (vpravo, fragmenty velikosti 9730 bp) jsem z gelu vyřízl a vyizoloval DNA, poté jsem připravil 4 ligační reakce, fragmenty s TALENy AdoR1 F, AdoR1 R, eGFP F, eGFP R jsem smíchal s otevřeným integrázovým vektorem a nechal přes noc ligovat v 4 °C.

Ligační reakce jsem poté transformoval do kompetentních bakterií, vysel na LB misky s ampicilinem a X-gal a nechal inkubovat přes noc v 37°C. Poté jsem vybral několik bílých kolonií a ověřil pomocí PCR s primery Seq TALEN 5-1 a TAL_R2, která je na obrázku 4.12.

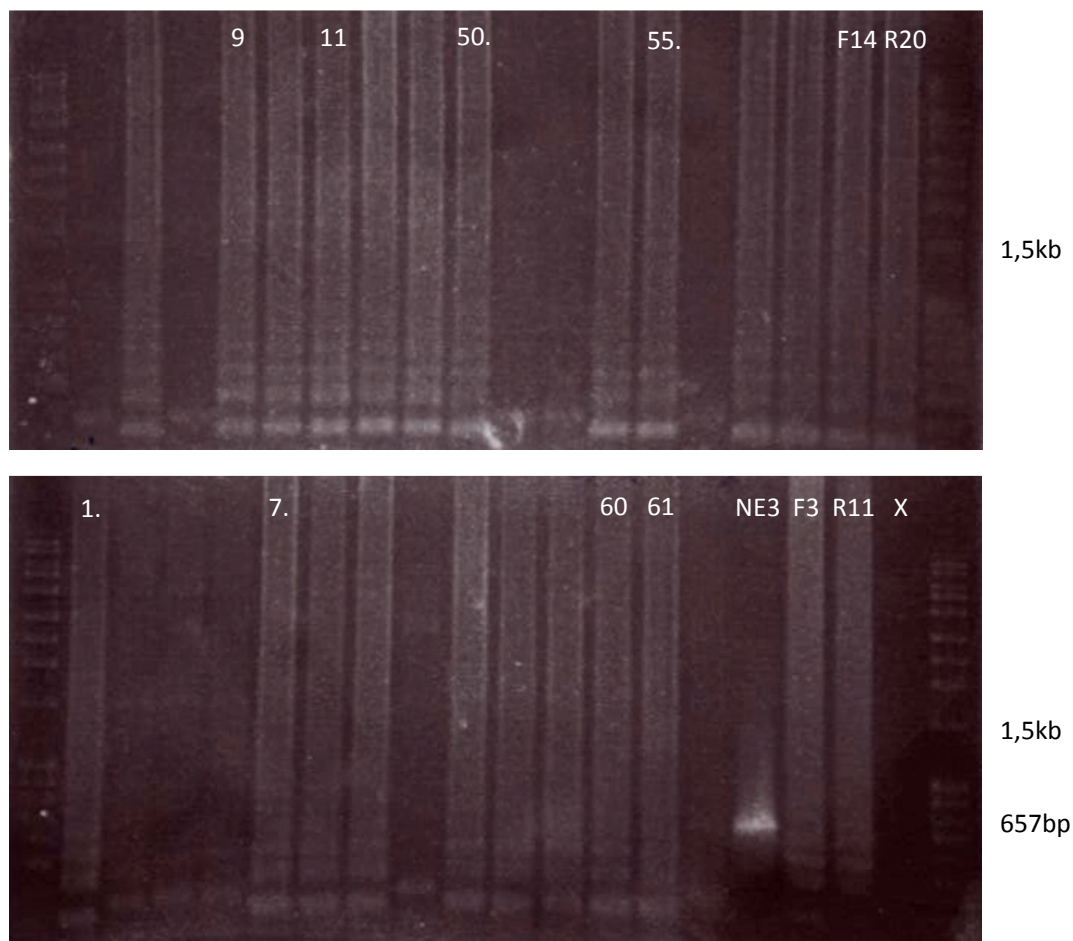
4.2.6 pattb-NE3 ověření #1



Obr. 4.12: PCR ověření klonů v integrázovém vektoru. Správné klony vybrané k dalšímu ověření jsou označeny čísly: eGFP F50. (1898 bp) AdoR1 F1. (2102 bp) a AdoR1 F7. (2102 bp) NE3 – amplifikace z prázdného pattb-NE3 vektoru (504 bp, označeno šipkou). Tyto klony byly (spolu s dalšími) ověřeny podruhé v následující PCR, kde jsou označeny stejnými čísly jako zde.

4.2.7 pattb-NE3 ověření #2

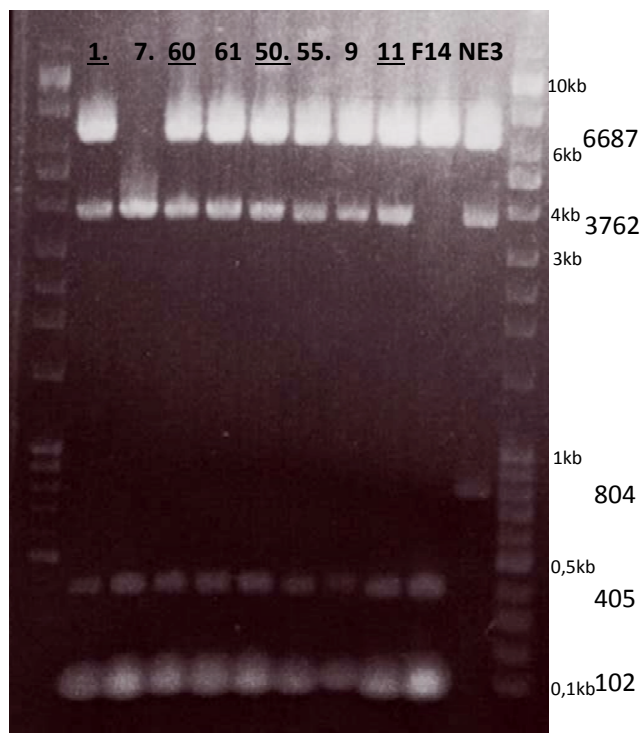
Na následující ověření jsem použil primery TAL_F1 a TAL_R2, které amplifikují TALENy z vektorů pTal3 i pattb-NE3 a dávají stejné velikosti fragmentů. Podmínky reakce jsou shodné s PCR ověřením GoldenGate reakce #2. Z klonů na obrázku 4.13 označených číslem jsem nasadil miniprepy, vyzoloval plasmidovou DNA, správnost insertů jsem dále ověřoval restrikčními reakcemi.



Obr. 4.13: PCR ověření klonů v integrázovém vektoru. Klony eGFP R9 a eGFP R11 (2255 bp), eGFP F50. a eGFP F55. (2051 bp), AdoR1 F1. a AdoR1 F7. (2255 bp), AdoR1 R60 a AdoR1 R61 (2255 bp) byly vybrány k ověření restrikcí. NE3 – amplifikace prázdného pattb-NE3 vektoru (657 bp). F14, R20, F3, R11 – kontrolní amplifikace TALENů z pTal3 vektoru (2051 pro F3, 2255 bp pro F14, R20 a R11), X – negativní kontrola.

4.2.8 Restrikce NcoI

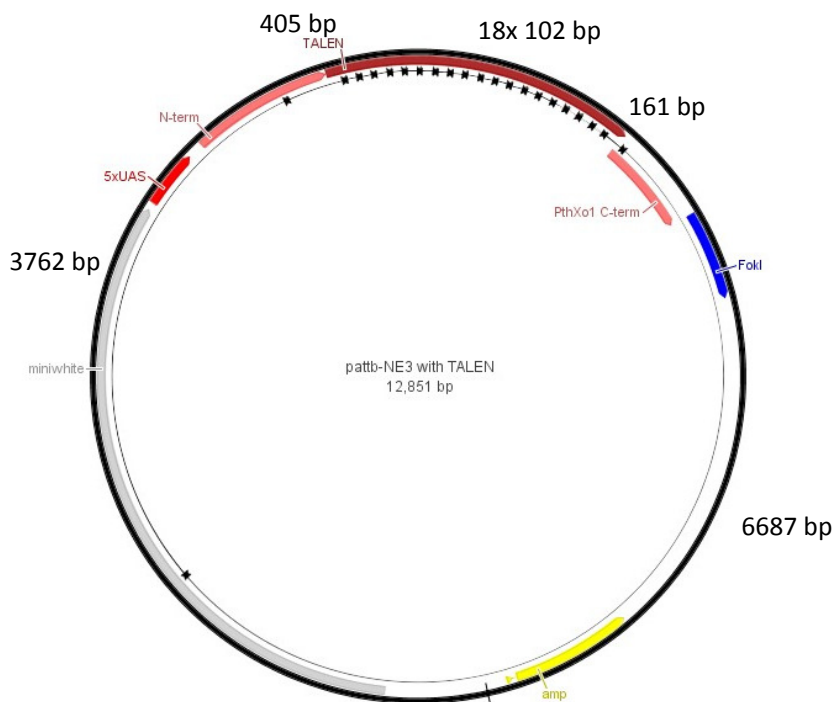
Pomocí této restrikce jsem ověřil správnost insertu TALENů v integrázovém vektoru. Touto restrikcí bylo možné odlišit správný insert v integrázovém vektoru od insertu v předchozím pTal3 vektoru a od prázdného integrázového vektoru. Velikosti fragmentů pro jednotlivé plasmidy jsou v tabulce 4.3., restrikční mapa pro pattb-NE3 s insertem je na obrázku 4.15.



Tab. 4.3: Velikosti fragmentů po restrikci NcoI

pattb-NE3 insert (1-61)	pTal3 insert (F14)	prázdný pattb-NE3 (NE3)
6687 bp	6726 bp	6687 bp
3762 bp	405 bp	3762 bp
405 bp	161 bp	804 bp
161 bp	102 bp	
102 bp		

Obr. 4.14: Restrikce integrázových vektorů s TALENy enzymem NcoI. Zleva AdoR1 F1.,F7.; AdoR1 R60, R61; eGFP F50., F55.; eGFP R9, R11. F14 – AdoR1 F v pTal3 vektoru, NE3 – prázdný pattb-NE3 vektor. NcoI štěpí i uvnitř repetitivních sekvencí TALENů, fragmentů o velikosti 108bp se tedy z jednoho plasmidu vyštěpí 18 (u eGFP F 16). Podtržené správné klony jsem použil pro transgenezi.



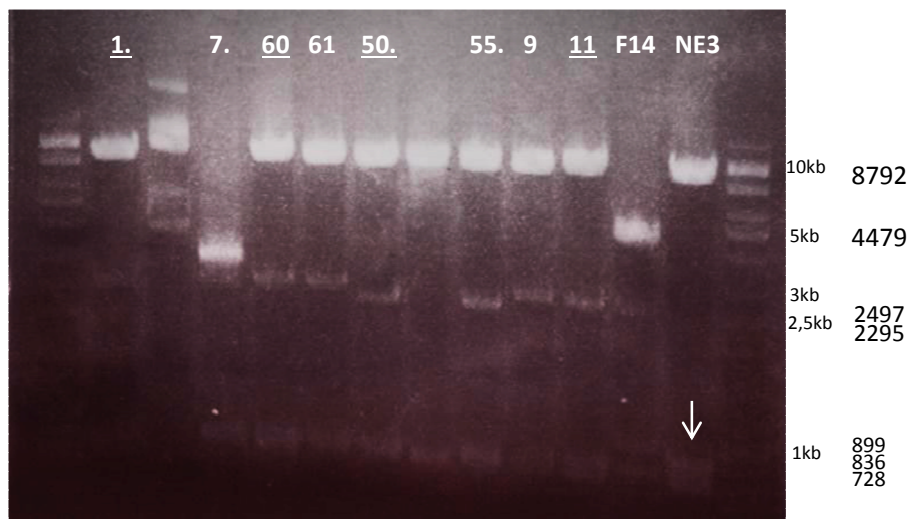
Obr. 4.15: Mapa restrikce integrázového vektoru pattbNE3 s insertem TALENu enzymem NcoI, restrikční místa jsou znázorněna černě na vnitřní straně, kolem jsou uvedeny vzdálenosti mezi nimi. Z prázdného integrázového vektoru se místo repetice vyštěpí pouze úsek s LacZ (804 bp), pTal3 vektor neobsahuje miniwhite, takže štěpí pouze v 5' a 3' oblastech TALENu a v repeticích. Obrázek byl vytvořen programem Geneious 7 (Kearse et al. 2012).

4.2.9 Restrikce EcoT22I

Tuto restrikci jsem použil jako dodatečné ověření správnosti insertů, tento enzym štěpí blíž sekvencím TALENů, lze tedy lépe poznat rozdíl mezi kratšími eGFP F fragmenty a delšími eGFP R, AdoR1 F a AdoR1 R fragmenty. Velikosti fragmentů pro tuto restrikci jsou v tabulce 4.4, fragmenty za lomítkem jsou pro plasmid s kratším konstruktem eGFP F.

Tab. 4.4: Velikosti fragmentů po restrikci EcoT22I.

pattbNE3 insert (1-61)	pTal3 insert (F14)	prázdný pattbNE3 (NE3)
8792 bp	4479 bp	8792 bp
2497/2295 bp	2497/2295 bp	899 bp
836 bp	980 bp	836 bp
726 bp	836 bp	726 bp
	336 bp	

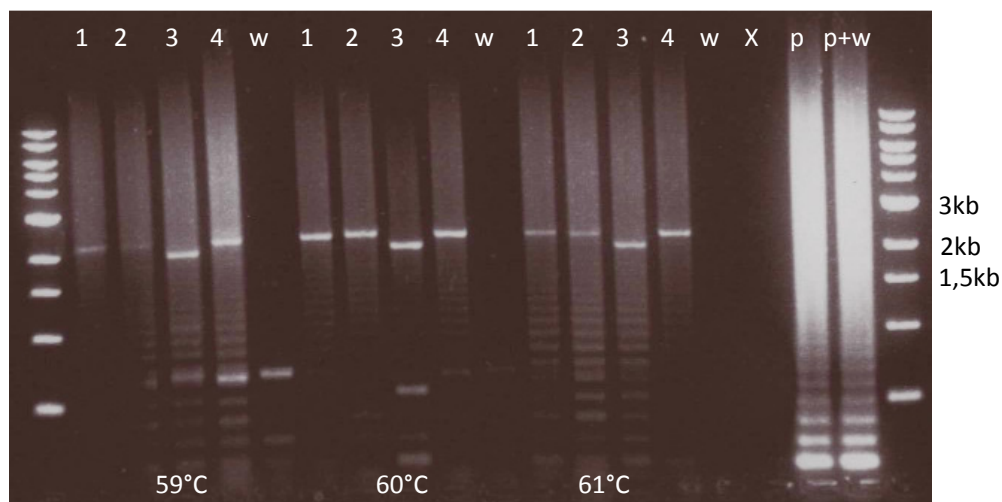


Obr. 4.16: Restrikce klonů enzymem EcoT22I. Zleva AdoR1 F1. a F7., AdoR1 R60 a R61, eGFP F50. a F55., eGFP R9 a R11. F14 – AdoR1 F v pTal3 vektoru, NE3 – prázdný pattb-NE3 vektor, šipkou jsou označeny jeho malé fragmenty (899-728 bp). Podtržené správné klony jsem použil pro transgenezi.

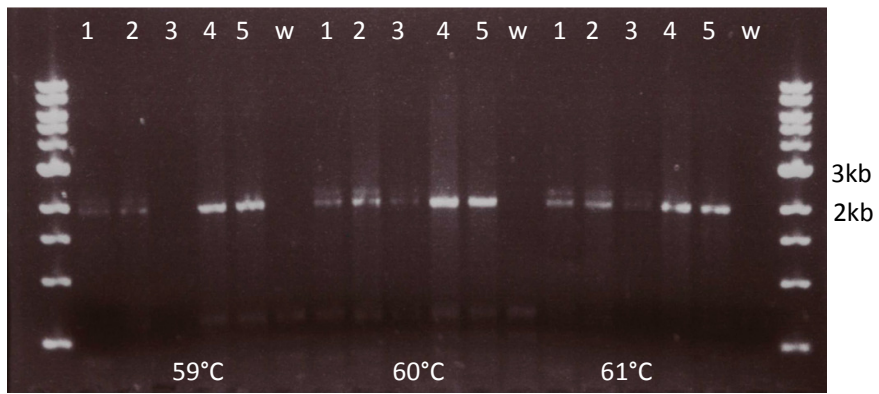
4.2.10 Ověření transgeneze octomilek

Klony eGFP F50., eGFP R11, AdoR1 F1. a AdoR1 R60 dávaly při všech ověřeních správné velikosti fragmentů, z těchto kolonií jsem tedy nasadil midiprepy, vyzoloval plasmidovou DNA, opět ověřil restrikcí a připravil k injikaci. Plasmidy s TALENy jsem injikoval do embryí integrázových linií octomilek TBX 0002 a TBX 0003 s *attP* místy na druhém a třetím chromosomu. Konstrukty eGFP F a AdoR1 F se nachází na druhém chromosomu, konstrukty eGFP R a AdoR1 R na třetím.

Všechny linie použité při mých experimentech jsem ověřil pomocí PCR na přítomnost TALENů v genomu, použil jsem gradient teplot annealingu 59°C-61°C. Na obrázku 4.17 je PCR z homozygotů pro jeden TALEN (forward nebo reverse), ověřil jsem několik samostatných linií insertů označených číslem. Na obrázku 4.18 byly otestovány linie dvojitých homozygotů eGFP F eGFP R (1-3), jsou zde tedy přítomné 2 produkty, z nichž kratší je pro eGFP F TALEN.



Obr. 4.17: Ověření správné transgeneze octomilek pomocí PCR. 1: AdoR1 F13 (2125 bp), 2: AdoR1 R5 (2125 bp), 3: eGFP F7 (1921 bp), 4: eGFP R5 (2125 bp), w: kontrolní linie *white* bez insertu, bez produktu (fragment při teplotě 59°C je nespecifický a mizí při vyšší teplotě) X: negativní kontrola, p: pozitivní kontrola – plasmid s eGFP R, p+w: stejný plasmid s přídanou genomovou DNA z *white*.



Obr. 4.18: Ověření správné transgeneze octomilek pomocí PCR. 1-3: eGFP F; eGFP R homozygoti (2125 bp a 1921 bp), 4: eGFP F21, 5: eGFP F23 (1921 bp), w: kontrolní linie *white*.

4.3 Charakterizace fenotypů indukce eGFP TALENu

K ověření efektu exprese eGFP TALENu na tkáňově specifickou mutagenizi genu pro eGFP jsem jej křížil spolu s několika liniemi Gal4 driverů, které měly zároveň sekvenci UAS-GFP na stejném chromosomu. Gal4 driver tedy aktivoval jak expresi TAL nukleázy, tak eGFP. Požadovaný efekt vypínání exprese GFP jsem porovnával s kontrolou, která se lišila absencí TAL nukleázy a zachytil pomocí konfokální, fluorescenční a světelné mikroskopie. Modře jsou obarvená jádra buněk pomocí DAPI, zelená je fluorescence GFP.

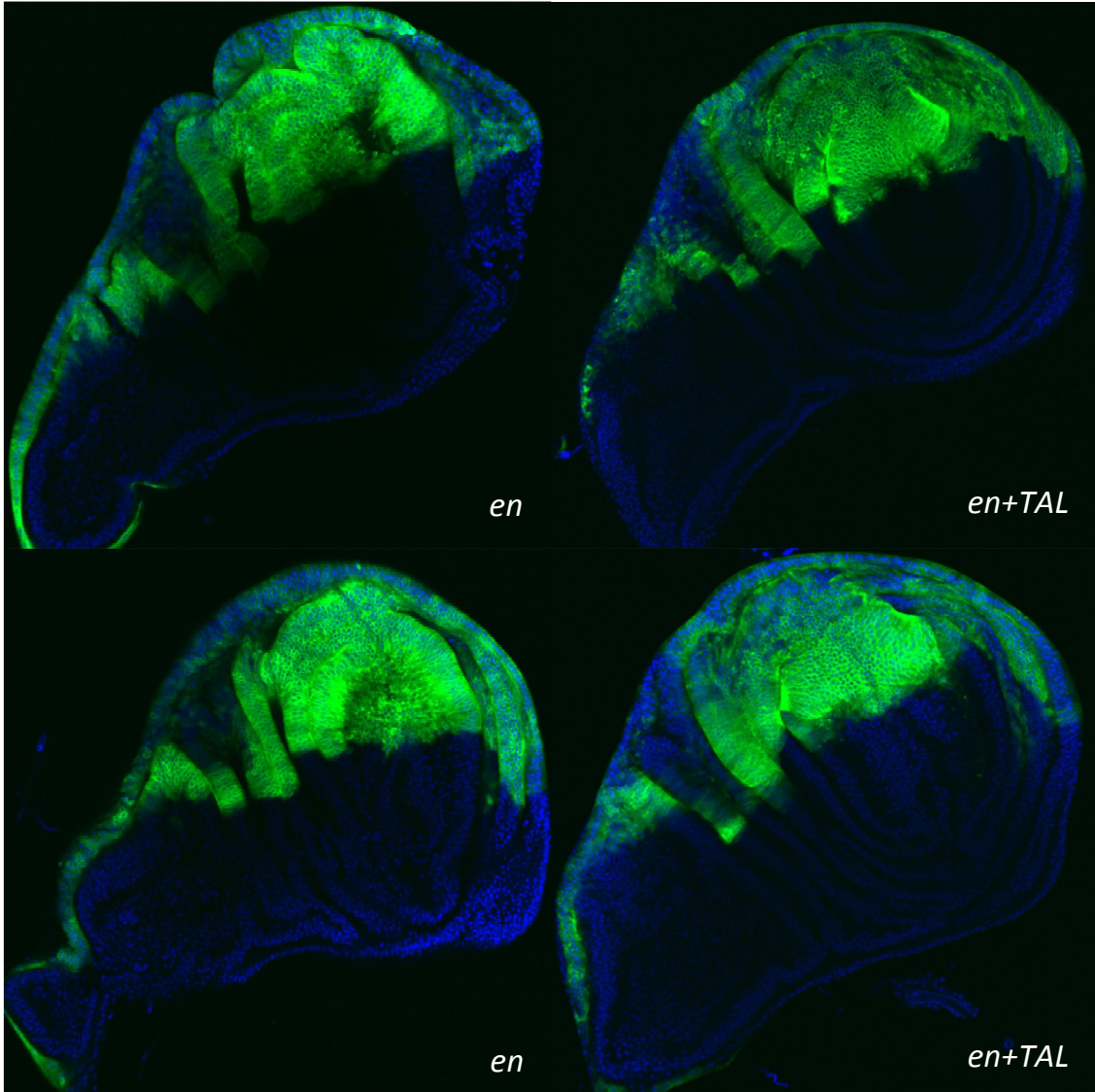
$\frac{eGFP F}{en Gal4 UAS-GFP}; \frac{eGFP R}{+}$	en+TAL	$\frac{+}{en Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+}$	en
$\frac{eGFP F}{esc Gal4 UAS-GFP}; \frac{eGFP R}{+}$	esc+TAL	$\frac{+}{esc Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+}$	esc
$\frac{eGFP F}{ptc Gal4 UAS-GFP}; \frac{eGFP R}{+}$	ptc+TAL	$\frac{+}{ptc Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+}$	ptc
$\frac{eGFP F}{GMR Gal4 UAS-GFP}; \frac{eGFP R}{+}$	GMR+TAL	$\frac{+}{GMR Gal4 UAS-GFP}; \frac{+}{+}$	GMR
$\frac{en Gal4 UAS-GFP}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{+}$	en+AdoR1 R	$\frac{en Gal4 UAS-GFP}{CyO}; \frac{+}{TM6B}$	en+CyO
$\frac{esc Gal4 UAS-GFP}{CyO}; \frac{AdoR1 R}{+}$	esc+AdoR1 R	$\frac{esc Gal4 UAS-GFP}{CyO}; \frac{+}{TM6B}$	esc+CyO

Obr. 4.19: Genotypy octomilek v následujících experimentech a jejich označení v textu. V levém sloupci indukce TALENů, v pravém kontrola.

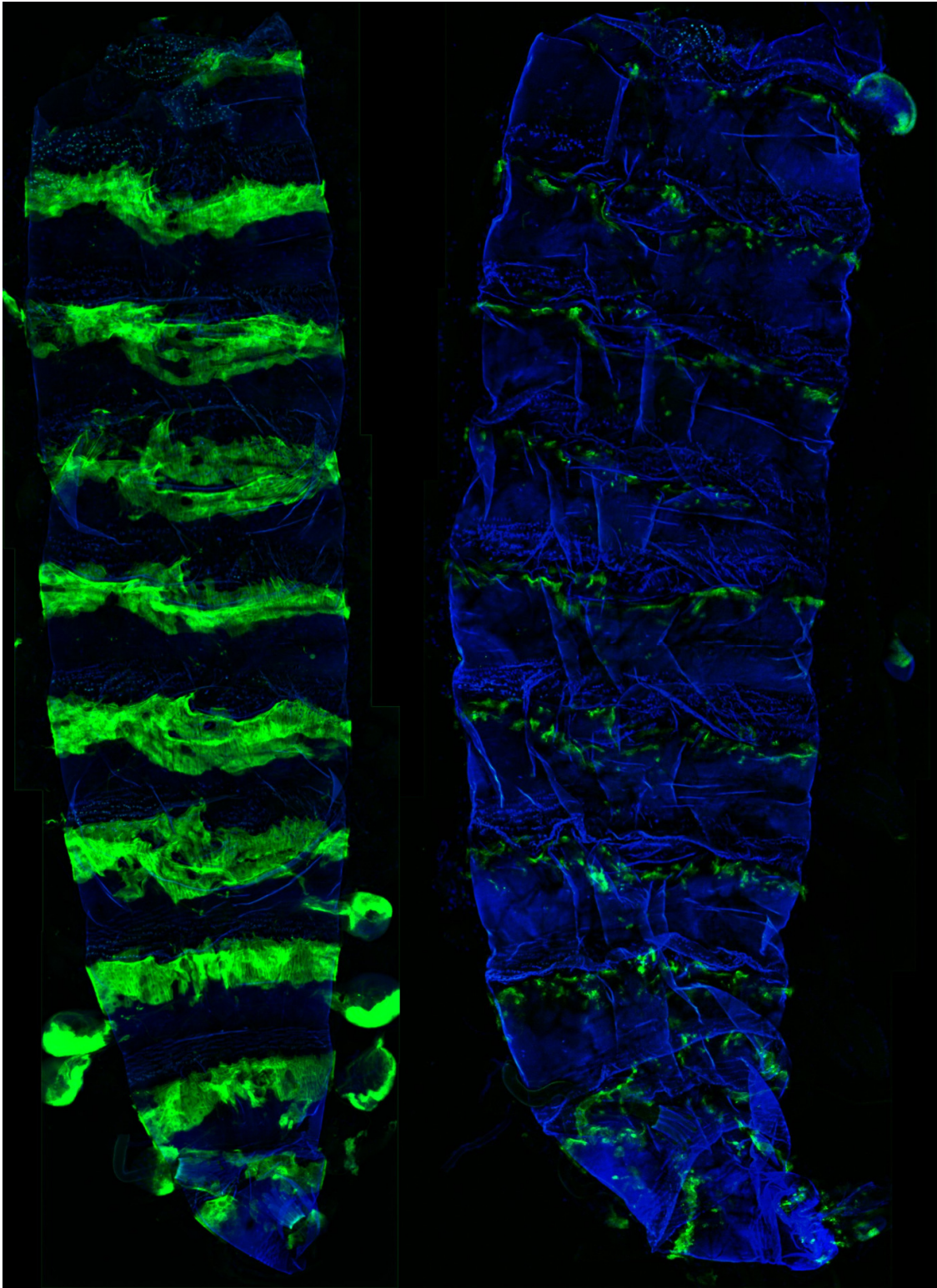
4.3.1 Engrailed Gal4

Indukce eGFP TAL nukleázy engrailed Gal4 driverem nevedla k viditelnému zhasínání GFP v křídelních i jiných imaginálních discích, jak je vidět na obrázku 4.20, přičemž jejich morfologie ani velikost nebyla negativně ovlivněna. Zhasínání GFP se ale silně projevilo na pruzích v oblasti hranic parasegmentů larev, viz obrázek 4.21. Absence fluorescence je patrná zhruba u 70% buněk v těchto pruzích. Fluorescence křídel u dospělců byla již viditelně zredukována a nebyl zde přítomný ostrý předěl fluorescence mezi dorsální a ventrální částí křídla, jako u kontroly. Fluorescence často ustupovala až za tuto hranici, byla velmi rozptýlená a fragmentovaná, u asi 25% dospělců nebyla v křídlech přítomná vůbec, nebo jen slabě ve ventrální žilnatině. Křídla dospělců byly menší asi o 17% oproti kontrole a byly u nich patrné defekty. Křídla byla často zmačkaná, popraskaná nebo vakuolizovaná, občas byl viditelný předěl těchto poškození podél dorso-ventrální linie dělící expresi Gal4 driveru, jak je vidět na obrázcích 4.22 vpravo dole a 4.23 B. Posterior cross-vein u křídel chyběla a cévy L4 až L6 byly více či méně zdeformované, okrajové chloupky často chyběly, nebo rostly nepravidelně. Překvapivě, správný vývoj nohou se zdál být nenarušen i přesto, že se zde engrailed Gal4 exprimoval.

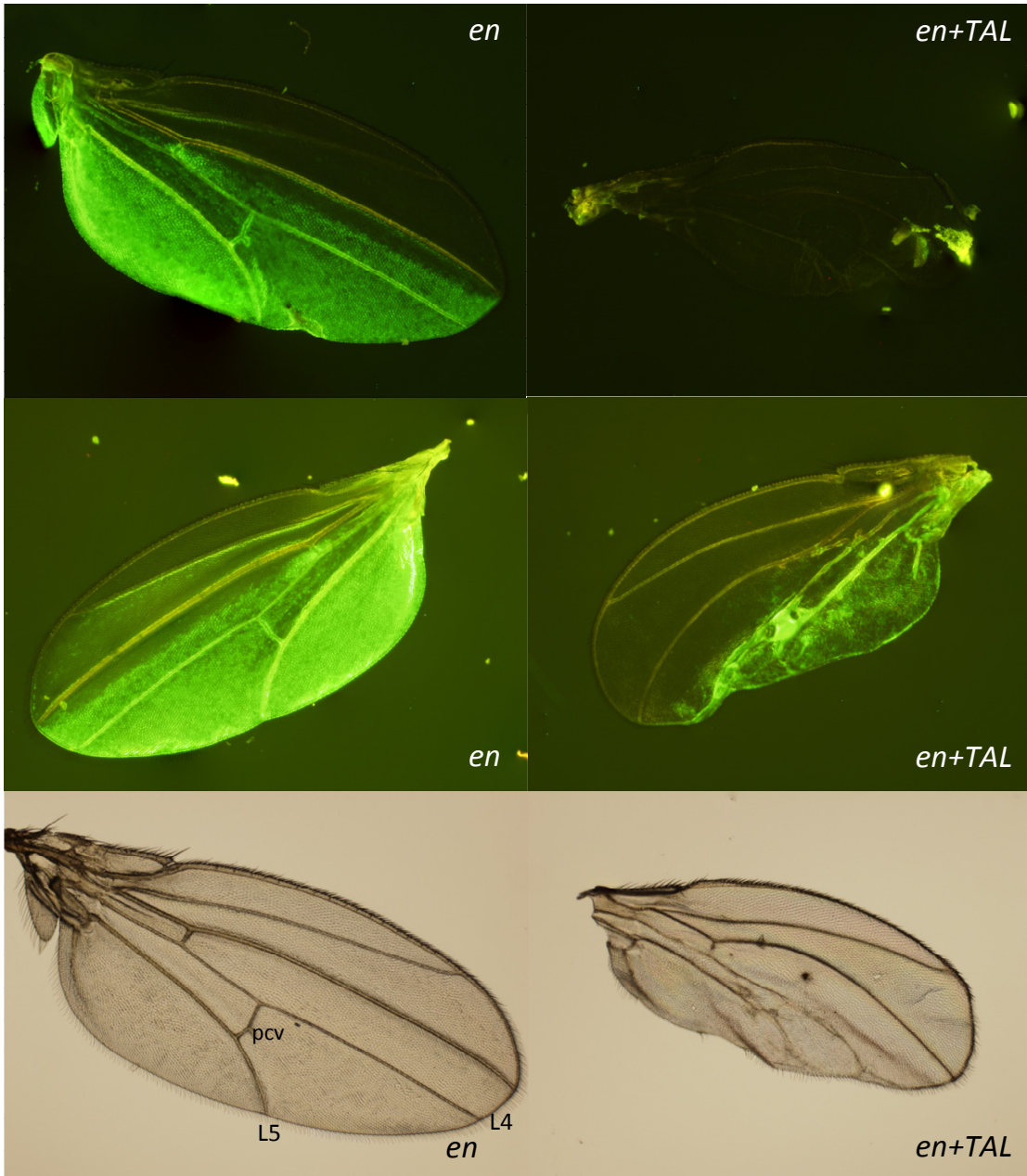
Dospělci byli ve vývoji opožděni asi o 1-2 dny oproti kontrole a vykazovali vývojové poruchy viditelné nejvíce v dorsální části abdomenu, kde byly narušeny hranice jednotlivých segmentů a pruhy u těchto hranic, které byly tenčí a přerývané. Růst chloupků v těchto místech byl nepravidelný a směr růstu se často odchyloval od antero-posteriorního (obr. 4.23 A, C), chloupky na humeru chyběly úplně, jak je vidět na obrázku 4.23 D vpravo.



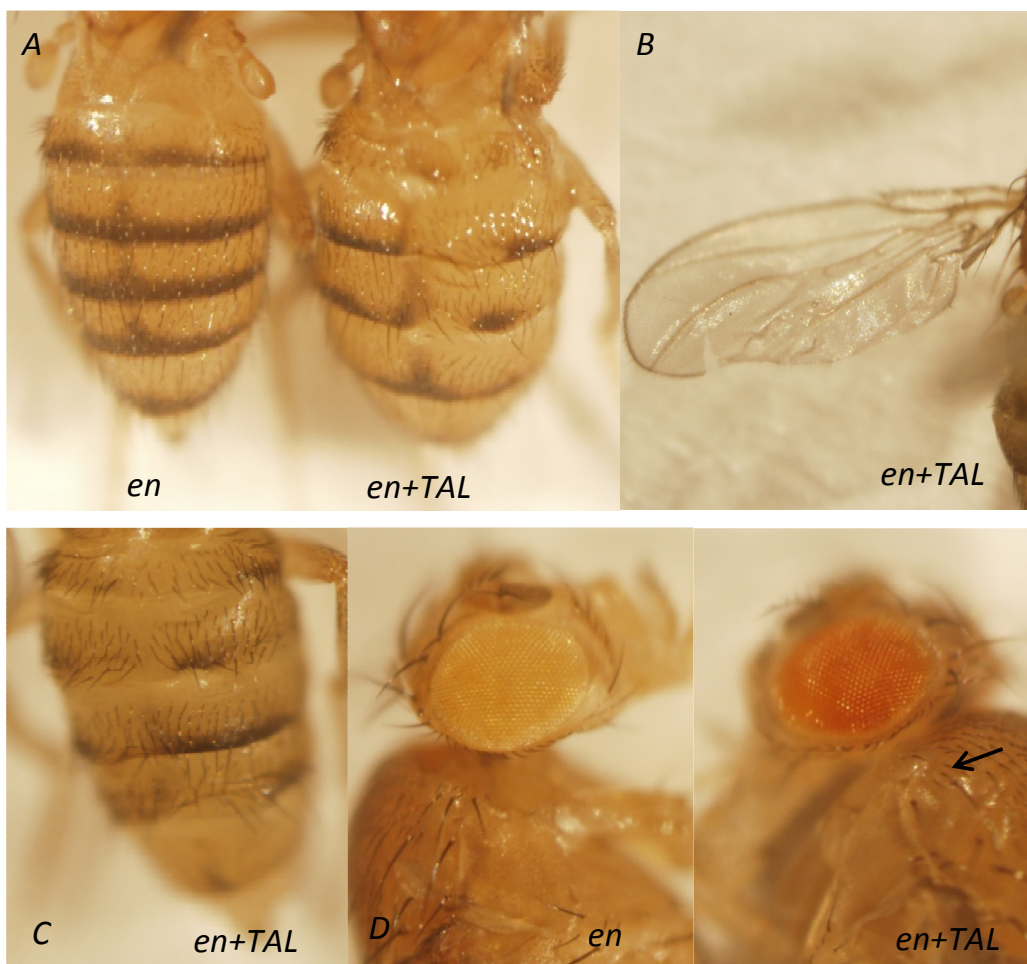
Obr. 4.20: Efekt indukce eGFP TALENu na fluorescenci křídleních disků.



Obr. 4.21: Efekt indukce eGFP TALENu engrailed Gal4 driverem na fluorescenci pruhů na kutikule. Vlevo engrailed, vpravo engrailed + eGFP TALEN.



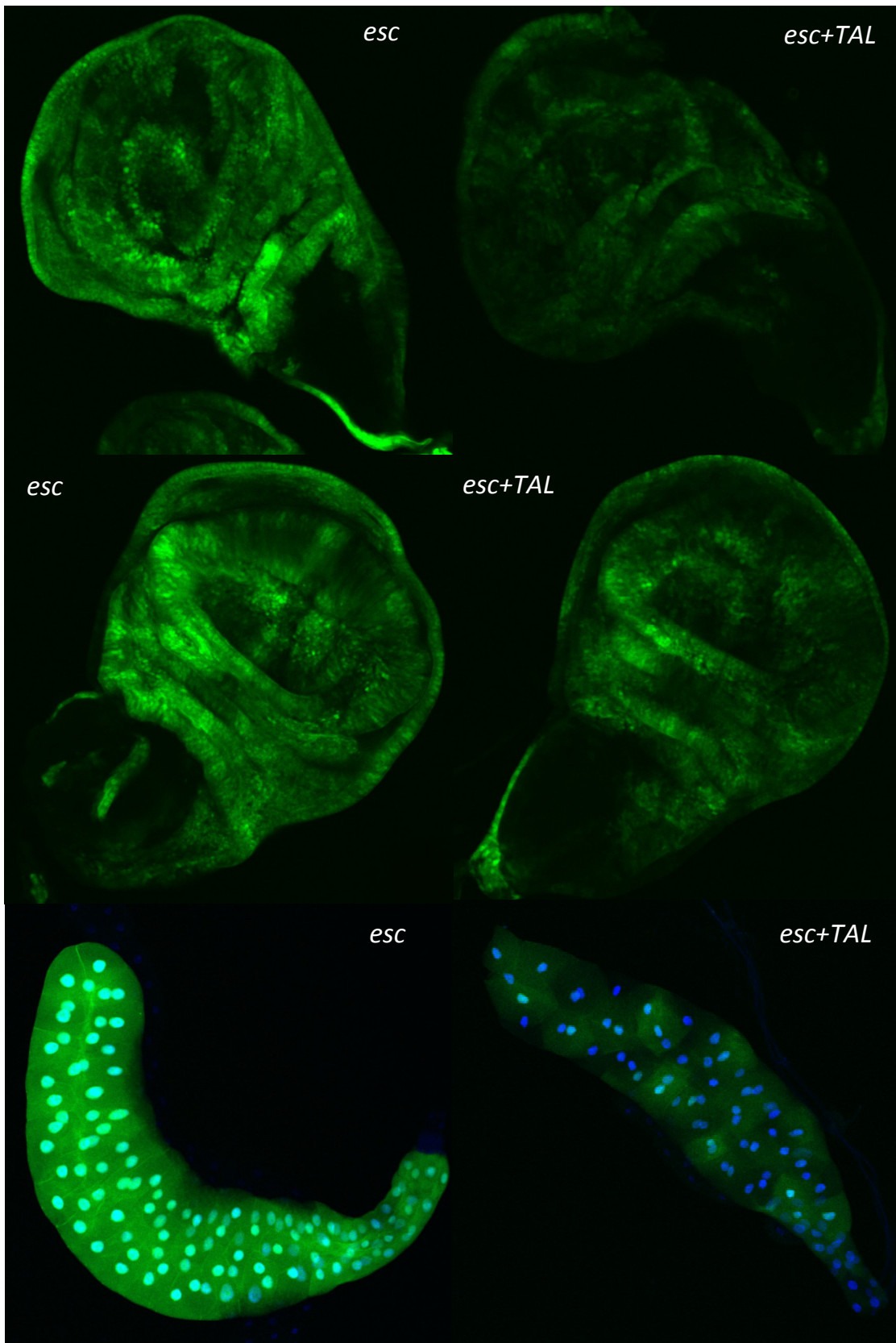
Obr. 4.22: Křídla s indukovaným eGFP TALENem engrailed Gal4 driverem (vpravo). L4, L5 a pcv (posterior cross vein) - cévy které chybí, nebo jsou po indukci deformované.



Obr. 4.23: Fenotyp dospělců s eGFP TALENem indukovaným engrailed Gal4 driverem. Šipka označuje absenci chloupků na humeru u dospělého s indukovaným TALENem.

4.3.2 Escargot Gal4

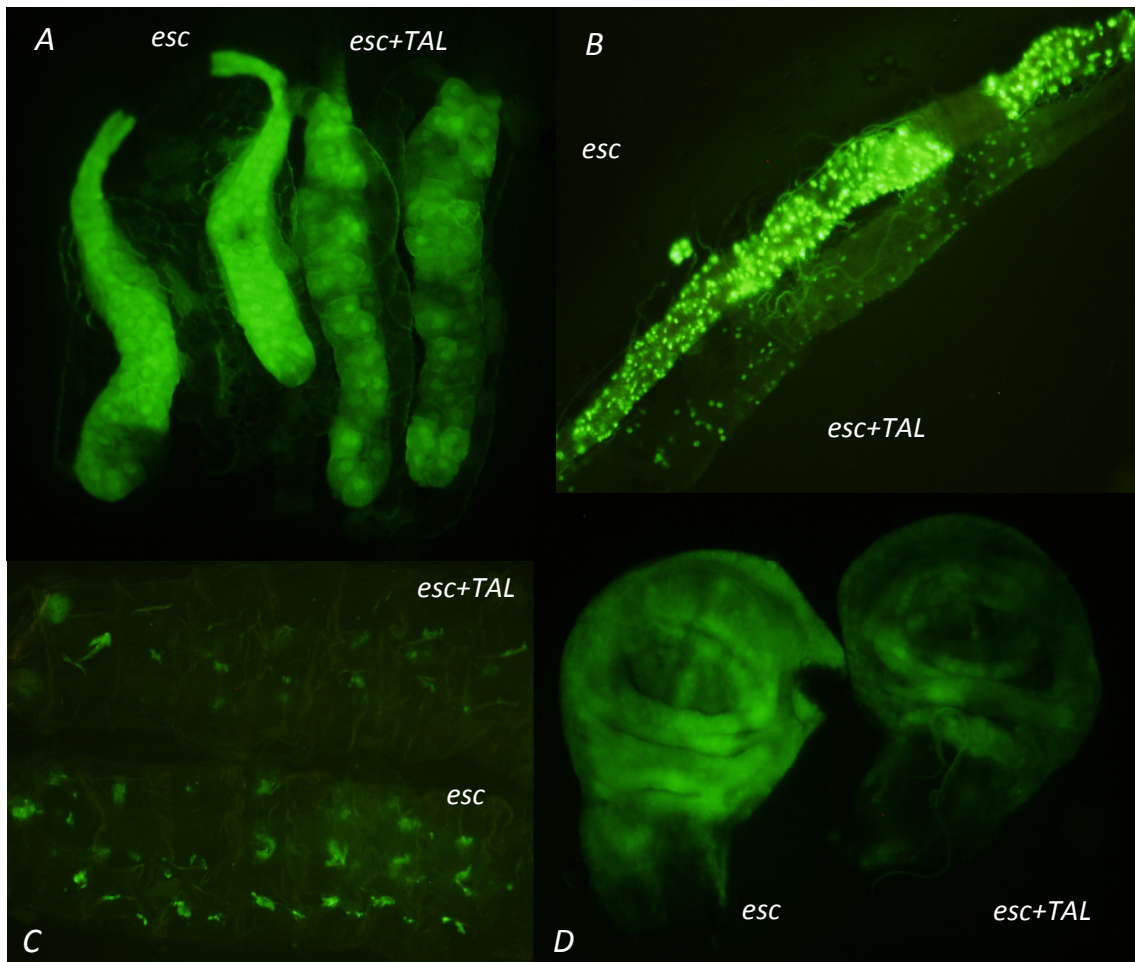
Indukce eGFP TAL nukleázy escargot Gal4 driverem měla za následek viditelné zhasínání GFP fluorescence víceméně ve všech tkáních s GFP expresí. Efekt byl nejlépe viditelný na slinných žlázách, kde docházelo k poklesu fluorescence u asi 40-85% buněk. Intenzita fluorescence u disků klesala rovnoměrně, nebyly zde patrné větší klony buněk bez GFP, mutagenese tedy zřejmě probíhala na úrovni jednotlivých buněk poté, co byl již základ disku vytvořen. Efekt indukce TALENu měl zřejmě určitý negativní efekt na vitalitu – dospělci s escargot Gal4 driverem se líhli velmi málo, asi jen 1/10 oproti jedincům bez Gal4 driveru, ve vialkách jsem ale nepozoroval větší množství uhynulých kulek nebo larev. Dospělci se líhli se zpožděním asi 2 dny a objevovaly se u nich závažné vývojové defekty v dorsální části abdomenu. Svrchní vrstva kutikuly byla poškozená a odlupovala se, hranice segmentů netvořily ostré hrany a splývaly.



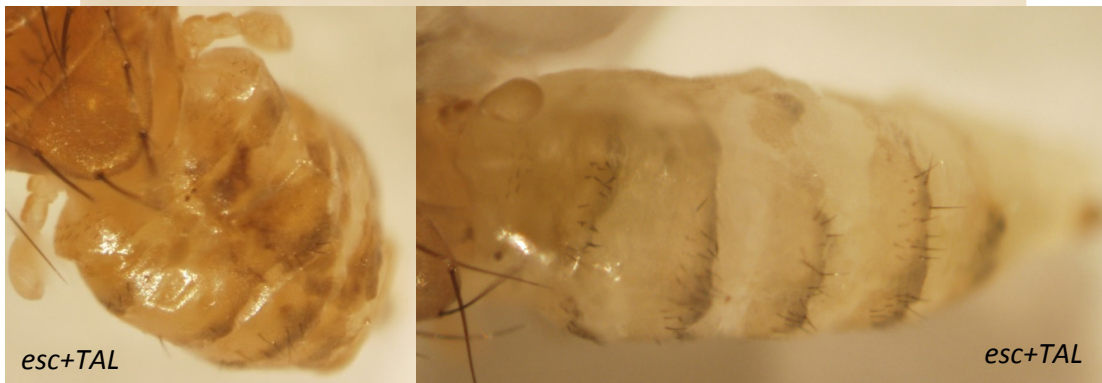
Obr. 4.24: Efekt indukce eGFP TALENu escargot Gal4 driverem na fluorescenci křídelních disků (nahore) a slinných žláz (dole).



Obr. 4.25: Efekt indukce eGFP TALENu escargot Gal4 driverem na fluorescenci slinných žláz.



Obr. 4.26: Efekt indukce eGFP TALENu escargot Gal4 driverem na pokles fluorescence ve slinných žlázách – A, středním střevě – B, kutikule – C, křídelním disku – D.



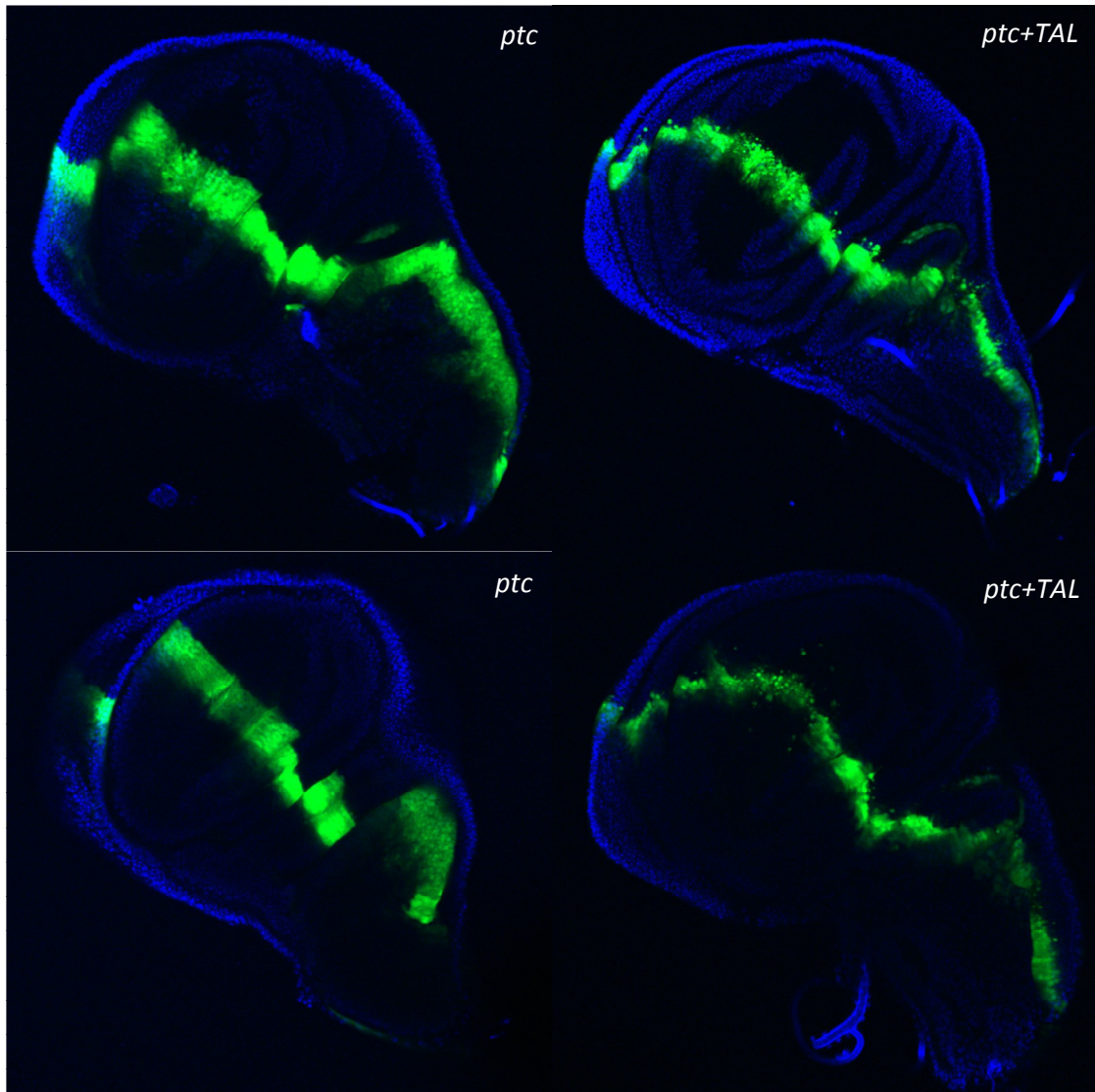
Obr. 4.27: Fenotyp dospělců s indukovaným eGFP TALENem *escargot* Gal4 driverem.



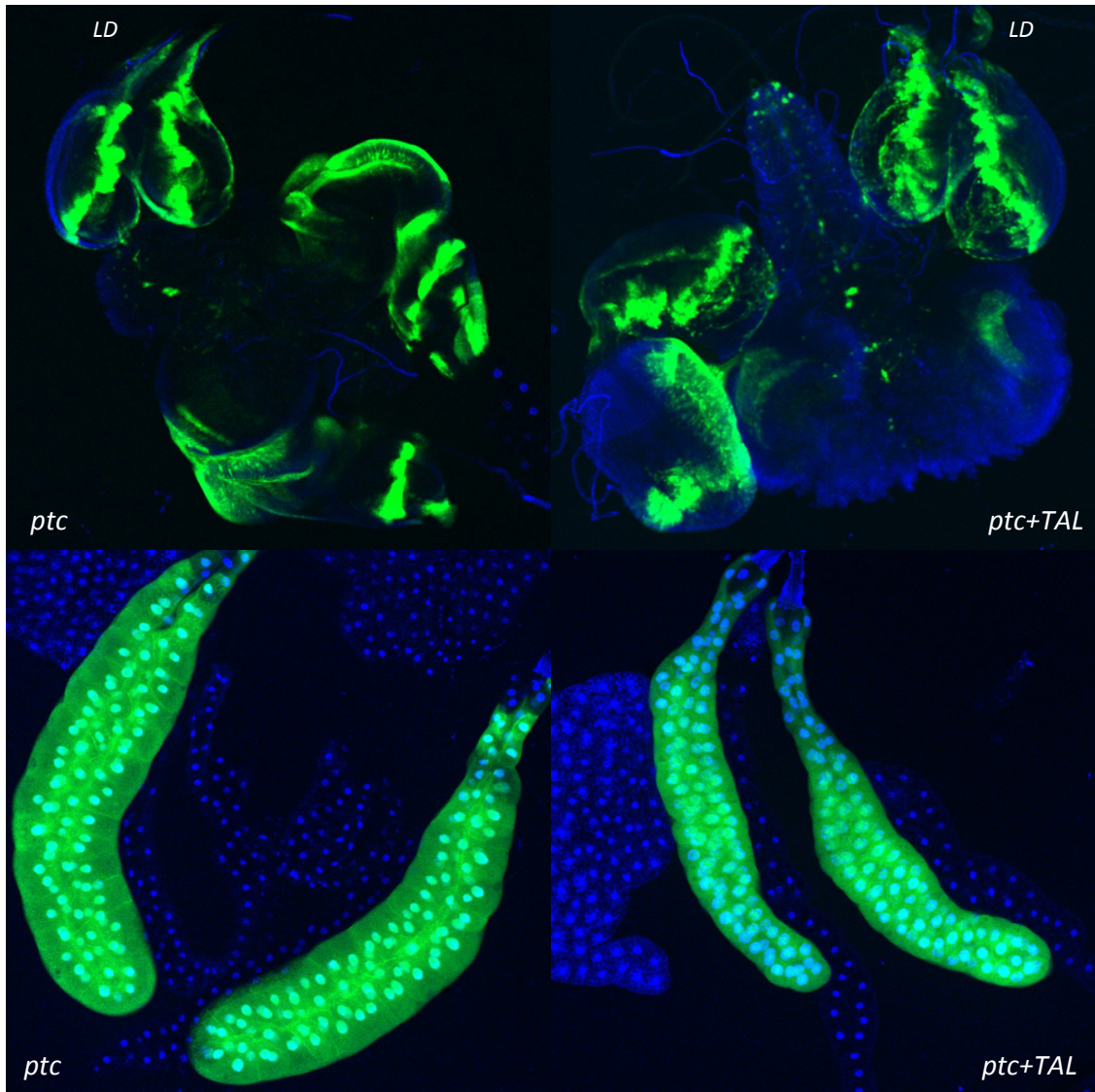
Obr. 4.28: Fenotyp křídel dospělců s indukovaným eGFP TALENem *escargot* Gal4 driverem.

4.3.3 Patched Gal4

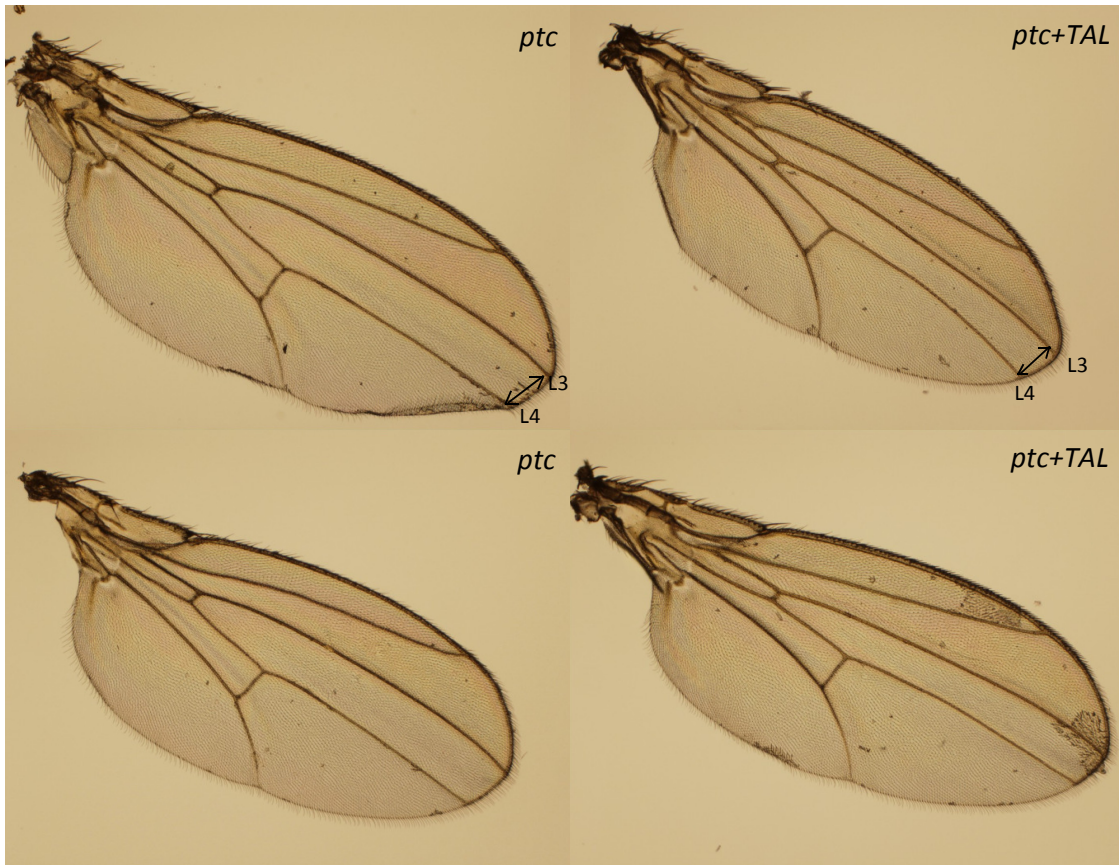
Indukce eGFP TALENu patched Gal4 driverem vedla ke snížení GFP fluorescence ve všech imaginálních discích, normální pruh exprese podél antero-posteriorní linie byl po indukci TALENu narušován z obou stran, výsledkem byla slabší linie s méně ostrými okraji a s občasnými GFP pozitivními buňkami na okrajích, některé zasahovaly i více do stran, než byl původní pás exprese GFP. Narušená linie exprese GFP byla nejlépe patrná na dospělých křídlech, jak je vidět na obrázku 4.32. Morfologie disků ani křídel dospělců nebyla nijak negativně ovlivněna, na dospělících nebyly patrné žádné vývojové vady, jako u předchozích Gal4 driverů. U všech křídel ale byla mírně zúžená oblast mezi cévami L3 a L4, jak je vidět na obrázku 4.34. Zajímavé je, že GFP fluorescence ve slinných žlázách se nezdála být odlišná od kontroly, na rozdíl od silného efektu při indukci escargot Gal4 driverem. Většina dospělců se zdála být morfologicky v pořádku, vývojové zpoždění jsem nepozoroval. U malého množství dospělců (5-10%) se ale objevovaly závažné vývojové vady abdomenu (obrázek 4.33), kde se sousední segmenty spojovaly v jeden, nebo se jeden segment rozděloval ve dva, někteří jedinci měli rozdílnou šířku segmentů abdomenu.



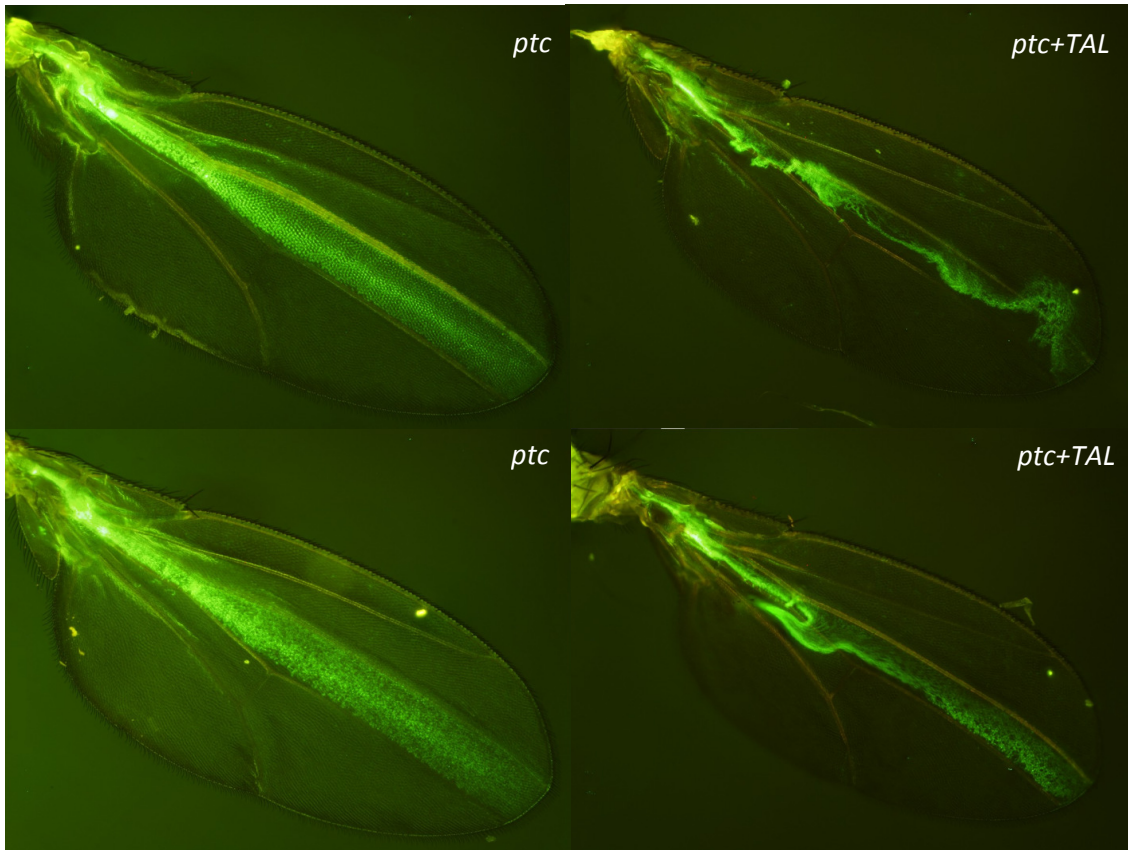
Obr. 4.29: Efekt indukce eGFP TALENu patched Gal4 driverem na fluorescenci křídelních disků.



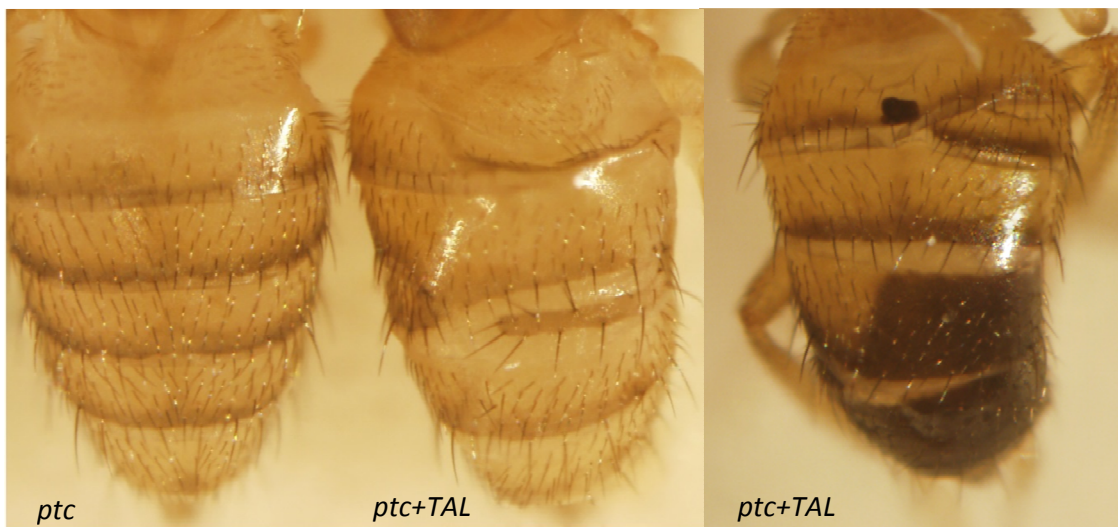
Obr. 4.30: Efekt indukce eGFP TALENu v mozku, nožních imaginálních discích (LD) a slinných žlázách (dole) pomocí patched Gal4 driveru.



Obr. 4.31: Efekt indukce eGFP TALENu v dospělém křídle pomocí patched Gal4 driveru. Morfologie křídla zde není viditelně poznamenána, oblast mezi cévami L3 a L4 je však mírně zúžená u dospělců s indukovaným TALENem.



Obr. 4.32: Efekt indukce eGFP TALENu patched Gal4 driverem na fluorescenci křídel, je zde vidět, že fluorescence přesahuje hranici exprese, která je viditelná u *ptc* kontroly.



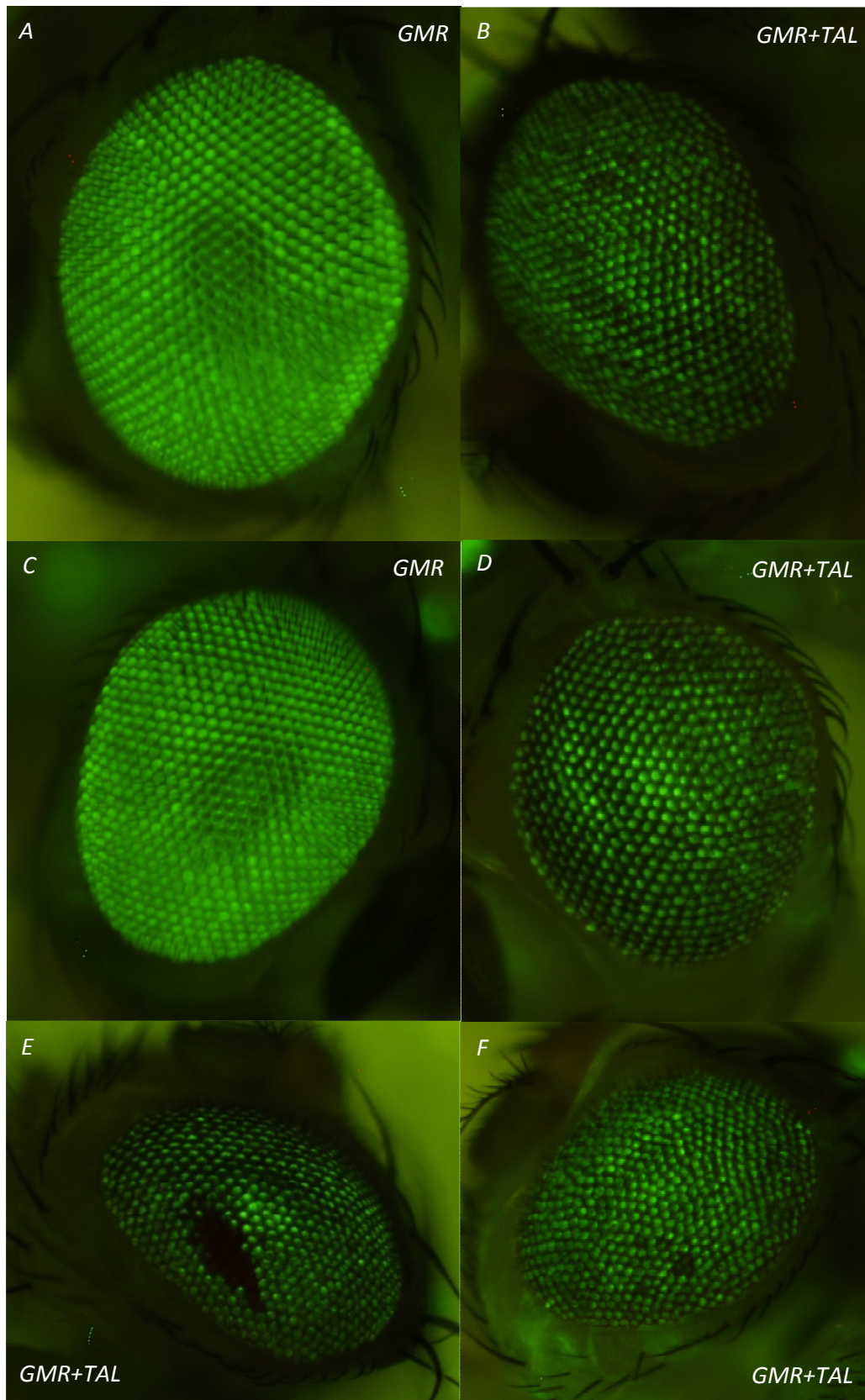
Obr. 4.33: Abdomen dospělců s eGFP TALENem indukovaným patched Gal4 driverem.

4.3.4 GMR Gal4

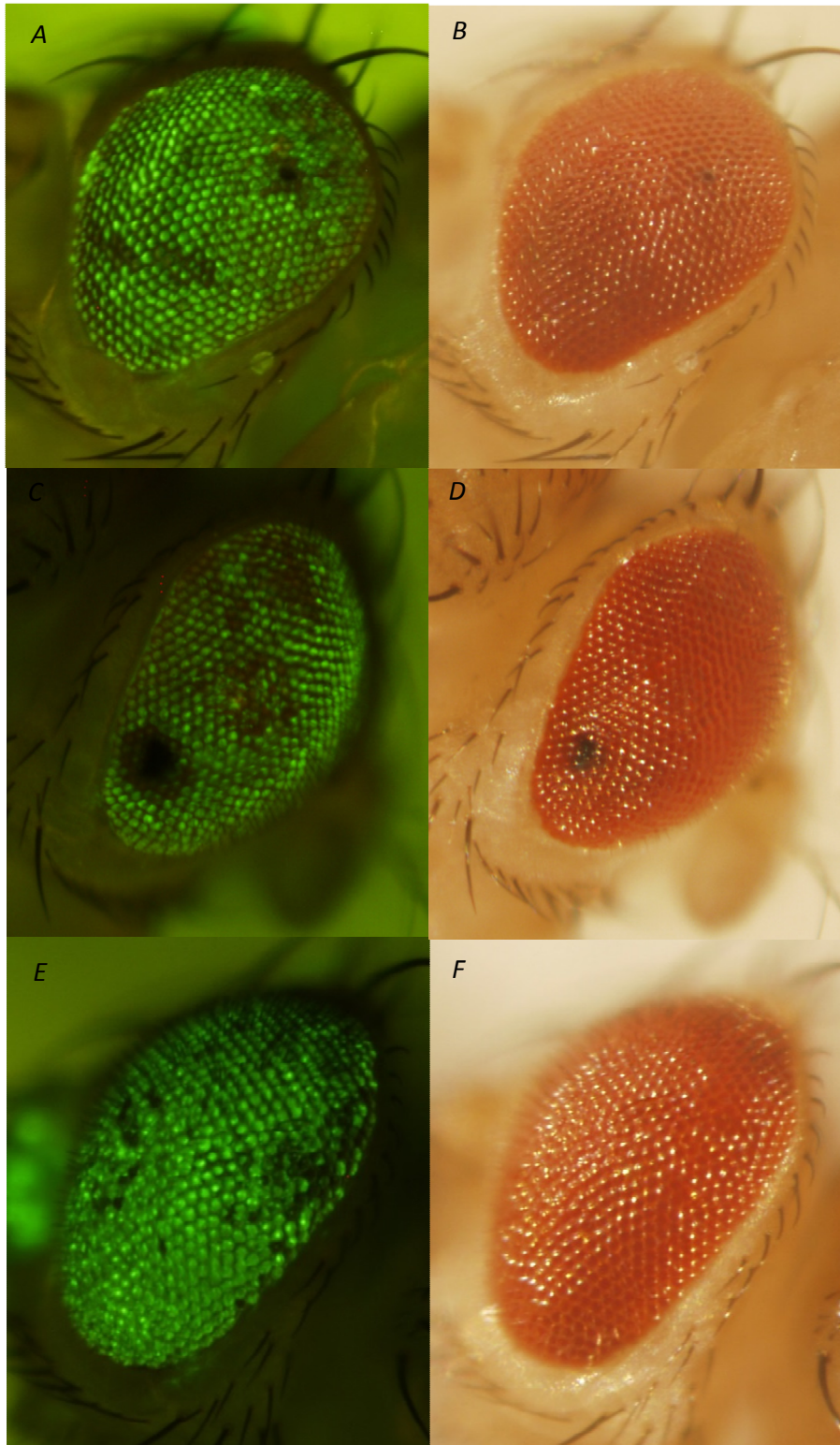
Indukce eGFP TALENu GMR Gal4 driverem vedla k silné redukci exprese GFP v očích. Standartní fenotyp indukce eGFP TALENu je na obrázcích 4.34 a 4.35 B, D. Po jeho indukci bylo patrné nepřesné uspořádání omatidií a oči byly také mírně zmenšené s přečnávající oblastí vespod oka, výskyt štětín byl u některých očí také redukovaný, vyskytovaly se spíše po obvodu oka. Asi u 10% jedinců vedla indukce TALENu k vážnějším defektům oka, až k nekróze tkáně, která měla tendenci se šířit z určitého centrálního bodu, jak je vidět na obrázcích 4.35 E a 4.36 A-D.



Obr. 4.34: Indukce eGFP TALENu v oku pomocí GMR Gal4 UAS-GFP driveru. Vlevo GMR, vpravo GMR+TALEN.



Obr. 4.35: Indukce eGFP TALENu v oku GMR Gal4 driverem.



Obr. 4.36: Indukce eGFP TALENu v oku GMR Gal4 driverem, vždy stejné oko vlevo s fluorescenčním filtrem, vpravo s normálním osvětlením.

4.4 Charakterizace fenotypů indukce AdoR1 TALENu

Po indukci AdoR1 TALENu Gal4 drivery jsem efekt pozoroval pouze na úrovni fenotypu. Mutace adenosinového receptoru *adoR* nemá na životaschopnost octomilek negativní vliv (Dolezal et al. 2005), pozorované efekty by tedy měly být nespecifickým efektem indukce AdoR1 TALENu nezávislým na mutagenezi *AdoR*. Experimenty v současnosti stále probíhají, zatím jsem ale z křížení nedostal jedince, kteří by měli zároveň obě poloviny TALENu AdoR1 F a AdoR1 R, následující fenotypy jsou způsobené expresí pouze AdoR1 R TALENu.

4.4.1 Engrailed Gal4

Indukce Reverse poloviny AdoR1 TALENu engrailed Gal4 driverem měla za následek defekty v místě spojování segmentů A2 a A3, směr růstu chloupků byl v těchto místech také narušen. Ostatní segmenty se zdály být z velké části v pořádku. Na křídlech bylo opět viditelné poškození především v posteriorní části, kde byl exprimován engrailed Gal4 driver, křídla byla zmačkaná, popraskaná a občas vakuolizovaná, jejich velikost byla o něco menší.



Obr. 4.37: Indukce AdoR1 R TALENu engrailed Gal4 driverem.



Obr. 4.38: Abdomen dospělce a křídla po indukci AdoR1 R TALENu engrailed Gal4 driverem.

4.4.1 Escargot Gal4

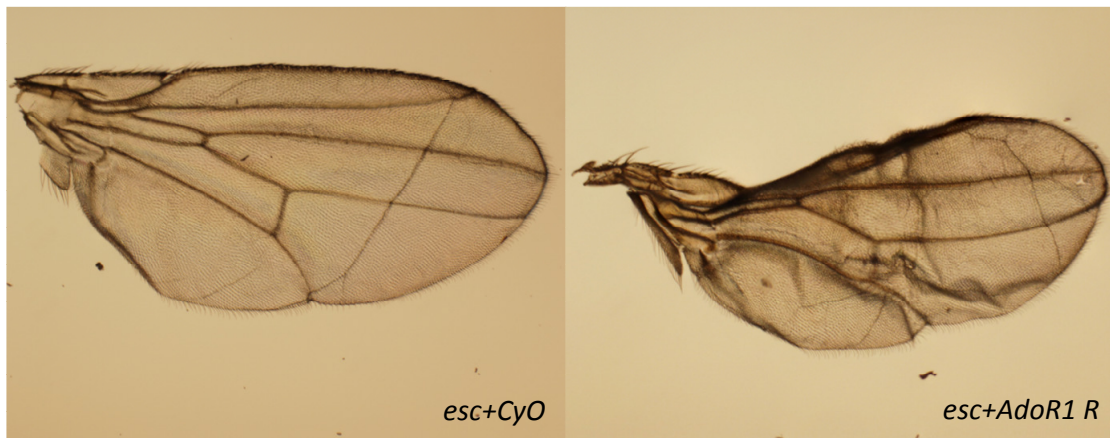


Obr. 4.39: Indukce Reverse poloviny AdoR1 TALENu escargot Gal4 driverem.



Obr. 4.40: Indukce AdoR1 R TALENu escargot Gal4 driverem, zde pro oba dospělé.

Indukce Reverse poloviny AdoR1 R TALENu escargot Gal4 driverem vedla k defektům abdomenu, na kutikule byly přítomny světlé pruhy, které se rozšiřovaly směrem k ventrální části abdomenu, tmavé pruhy byly zeslabené a jejich linie nerovnoměrná a narušená. Chloupky byly zkrácené a jejich počet redukován. Křídla byla u některých jedinců zmačkaná a mírně deformovaná, poškození křídel jako je na obrázku 4.40 se však nevyskytovalo u všech dospělců, většina křídel se zdála být relativně v pořádku.



Obr. 4.41: Křídla dospělé po indukci AdoR1 R TALENu engrailed Gal4 driverem.

5. Diskuse

V této práci jsem se testoval nový způsob tkáňově specifické mutagenese u organismu *Drosophila melanogaster* pomocí TAL nukleáz aktivovaných v různých tkáních UAS-Gal4 systémem. Podařilo se mi vytvořit transgenní linie nesoucí Forward a Reverse konstrukty pro eGFP a AdoR1 TALEN, přítomnost konstruktů v genomu jsem ověřil pomocí PCR. Dalším krokem bude ověření mutagenese přímo ve tkáních, studie (Dahlem et al. 2012) ukázala, že je možné detekovat mutace tvořené TALENy pomocí high resolution melting analýzy – změny délky PCR produktu způsobené opravami zlomů NHEJ mají za následek změnu teploty tání těchto produktů. Tato studie byla schopná detekovat změny přítomné u pouhé 1/70 mutantních produktů. Při návrhu jsem nenalezl páry TALENů s vhodným restrikcčním místem ve štěpící sekvenci, detekovat mutagenesi metodou RFLP tedy nebude možné.

Indukce eGFP TALENu mnou používanými Gal4 drivery měla ve všech případech jasně viditelný efekt na potlačení GFP fluorescence, který nevykazoval velké rozdíly mezi jedinci. Tento efekt byl nejvíce patrný například na pruzích kutikuly po indukci engrailed Gal4 driverem, nebo na potlačení fluorescence slinných žláz a střeva u escargot Gal4, efekty mutagenese v očích byly také velmi silné. Na základě těchto prvotních výsledků je patrné, že TAL nukleázy je skutečně možné k tkáňově specifické mutagenesi využít, a že jsou schopné mutagenesi provádět s velkou efektivitou u většiny buněk tkáně. Tato efektivita je zřejmě závislá na tom, jak brzy ve vývoji se ve tkáni začne TALEN exprimovat, a nehraje roli, jestli jde o tkáň diploidní, nebo polyploidní.

Po indukci eGFP TALENu engrailed Gal4 driverem bylo zhasnutí GFP viditelné u larev 3. instarů především na pruzích kutikuly, efekt nebyl viditelný na poklesu fluorescence imaginálních disků. To je možné vysvětlit tím, že štěpení v oblasti pruhů proběhlo dříve ve vývoji, než u imaginálních disků, jejichž základy se tvoří až později. Dřívější štěpení se mohlo u larev 3. instarů projevit tak, že zde již byla zdegradovaná mRNA i protein eGFP (ten má relativně dlouhý poločas života, asi 26 hodin (Corish and Tyler-Smith 1999)). Buňky disků tedy mohly mít relativně silnou fluorescenci GFP i poté, co TALEN úspěšně mutoval sekvenci genu, pozorovaná fluorescence u larev tedy nemusela být přesným ukazatelem toho, jestli v dané buňce nebo tkáni již proběhla mutagenese. Jak ale bylo vidět na křídlech dospělců s eGFP TALENem indukovaným engrailed Gal4 driverem, mutagenese proběhla z velké části i v křídlech.

Zajímavý je rozdíl ve fluorescenci slinných žláz mezi jedinci, kde byl eGFP TALEN indukován escargot Gal4 driverem, kde bylo patrné silné potlačení exprese GFP, a mezi jedinci s patched Gal4 driverem, kde jsem rozdíl v intenzitě nepozoroval. Ani jeden z obou genů nemá přirozenou expresi ve slinných žlázách, ta je zřejmě artefaktem Gal4 driverů – již u 51% původních Gal4 linií vytvořených (Brand and Perrimon 1993) se projevovala exprese kromě specifických tkání také tam, zřejmě tak nechtěně při tvorbě P elementu s Gal4 vytvořili pozičně specifický enhancer do slinných žláz. Ten nejspíše funguje jinak u obou linií, je možné, že u escargot Gal4 driveru začíná exprese ve slinných žlázách o něco dříve ve vývoji a TALENy tak mají šanci štěpit eGFP sekvenci ještě před polyploidizací buněk, tím pádem se kopíruje již zmutovaná sekvence a buňky netvoří GFP.

Spolu s požadovaným efektem mutagenese GFP se ale po vykřížení eGFP TALENU s každým Gal4 driverem projevily morfologické defekty, které ve výskytu do velké míry kopírovaly expresi daného Gal4 driveru. U linií, kde byl eGFP TALEN aktivován engrailed a escargot Gal4 driverem byli jedinci opoždění ve vývoji přibližně o 2 dny. V případě indukce escargot Gal4 driverem jsem pozoroval, že z křížení esg Gal4/CyO s homozygotem pro eGFP F a R (viz obrázek 3.7) se vždy líhne přibližně 1/10 jedinců s Gal4 driverem, většina dospělců měla balancer CyO. Zvýšený úhyn larev ani kukel jsem však nepozoroval, je ale pravděpodobné, že vitalita jedinců, kde byl TALEN aktivován byla do určité míry snížena.

U linií, kde byl eGFP TALEN aktivován engrailed a escargot Gal4 driverem bylo srovnatelné poškození abdomenu a křídel viditelné u každého jedince daného genotypu, na rozdíl od jedinců, kde byl eGFP TALEN indukován patched a GMR Gal4 driverem. U patched Gal4 driveru bylo vždy viditelné zúžení části křídla mezi cévami L3 a L4, pouze asi u 5-10% jedinců se ale projevily závažné defekty abdomenu. U GMR Gal4 driveru bylo v naprosté většině případů patrné narušené uspořádání omatidií a mírné zmenšení oka, opět pouze u menší části jedinců se projevily nekrotické oblasti a jiné rozsáhlejší vady.

Výjimečnost výskytu těchto závažnějších projevů u dospělců s patched a GMR Gal4 driverem by mohla být vysvětlena nějakou náhodnou událostí v buňkách s TALENem na začátku vývoje. Patched je nejdříve exprimován jako segment polarity gen, je možné, že u jedinců s defektním abdomenem TALEN na začátku způsobil poškození, nebo smrt důležité skupiny buněk (například se jim nepodařilo opravit zlom DNA), která měla později hrát roli v signalizaci a správném vývoji segmentů. GMR Gal4 se exprimuje v očním disku v oblasti

morfogenní rýhy a posteriorně za ní, která dělí nediferencované dělicí se buňky anteriorně od diferencovaných základů omatidií posteriorně (Curtiss and Mlodzik 2000). Vzhledem k tomu že se tyto buňky dál nedělí a je jich relativně málo, se zde větší defekt jako nekróza projevit nemusí. Je možné, že tato náhodnost nehraje takovou roli u engrailed a escargot Gal4 driverů, protože jsou rozsáhleji a dříve exprimované - engrailed je přítomný v pruzích podél embrya již od embryonálního vývoje a escargot se exprimuje ve shlucích histoblastů, které se po zakuklení dělí, migrují a dávají vzniknout kutikule abdomenu dospělé.

Vzhledem k tomu, že se velmi podobné vývojové defekty objevily i po indukci AdoR TALENem, a to i přesto, že zde byla indukována jenom jeho reverse část, se zdá vysvětlení toxicity off-targetovým efektem obou konstruktů jako krajně nepravděpodobné. Zřejmě má tedy toxický efekt sama přítomnost TALENů v buňkách (jádrech) a jejich specifita k určité sekvenci je vedlejší. Zajímavé je, že se negativní efekt TALENu zdá být závislý na jeho dávce – exprese jedné poloviny AdoR1 TALENu nevedla až k tak výrazným defektům, jako exprese obou konstruktů eGFP F a eGFP R. Z toho ale nelze usoudit, jakým způsobem TALENy buňky poškozují.

Negativní efekt by mohl být způsoben buď nescifickou štěpící aktivitou – je možné, že přítomnost TALENů v jádře vede k jejich nescifické dimerizaci přes FokI nukleázy (jak by mohl dimerizovat i samotný AdoR1 R TALEN) a k následnému nescifickému štěpení genomu, které by mohlo mít za následek buněčnou smrt. V přírodě se vyskytující FokI nukleázy mají v nenavázaném stavu DNA štěpící doménu sekvestrovanou DNA vazebnou doménou, zřejmě proto, aby štěpící aktivita nebránila DNA vazebné doménu v hledání rozpoznávací sekvence (Bitinaite et al. 1998). Je tedy otázka, jak modifikace FokI nukleázy nahrazením DNA vazebné domény TALENem tuto inaktivaci změnila. FokI dimerizační oblast je velmi malá (Wah et al. 1998), díky tomu se zřejmě FokI vyskytuje v roztoku jako monomer a ke štěpení vyžaduje vazbu obou podjednotek na DNA. Tato studie ani nefavorizuje takový model štěpení, že by se napřed navázala jedna FokI nukleáza na DNA a druhá by nescificky dimerizovala přes štěpící doménu bez vazby na DNA. Je ale možné, že silná exprese TALENů Gal4 driverem a jejich cílení do jádra kompenzuje tuto malou pravděpodobnost dimerizace a ke štěpení dochází.

Další možností by bylo, že toxický efekt není způsoben štěpením DNA, ale nějakým jiným vlivem TALENu – je možné, že velké množství cizích DNA vazebných proteinů v jádře může inhibovat replikaci, transkripci, nebo mít nějaký jiný negativní efekt. Tento problém nebyl pozorován u ZFN, kde je zřejmě toxický efekt způsoben štěpící aktivitou (Beumer 2005) a jejich toxický efekt byl tím větší, čím nižší byla jejich specifita k určité sekvenci (Cornu et al. 2008). Vzhledem k odlišné struktuře TALENů a ZFN ale podobný nespecifický efekt TALENů v jádře nelze vyloučit.

Studie (Heidmann and Lehner 2001) se pokoušela o mutagenезi *Drosophily* Cre-Lox systémem, kde byla Cre rekombináza pod UAS promotorem aktivována různými Gal4 drivery. Tato overexprese měla silně toxický efekt zejména na dělící se buňky. Fenotyp indukce Cre rekombinázy například engrailed Gal4 driverem měl za následek velmi podobnou deformaci křídla, jakou jsem pozoroval po expresi obou TALENů, indukce dpp Gal4 driverem, který má téměř shodnou expresi s mnou používaným patched Gal4 driverem, také vedla ke zmenšení oblasti mezi cévami L3 a L4. Tyto toxické efekty byly doprovázeny zvýšenou apoptózou buněk v daných oblastech. K omezení toxického efektu autoři provedli fúzi Cre rekombinázy s estrogen vazebnou doménou (EBD), což umožnilo regulaci její aktivity množstvím přidaného estrogenu, přičemž množství rekombinázy v buňkách bylo vždy relativně stejné. Toxické efekty se stupňovaly s přidaným množstvím estrogenu, a tedy aktivitou rekombinázy, což naznačuje, že toxicita je způsobena aktivitou rekombinázy a ne její přítomností v buňkách. Bez přidaného estrogenu byla většina jedinců v pořádku.

Vzhledem k tomu, že většina studií uvádí, že k negativnímu efektu genetických nástrojů, které provádějí změny na DNA, na fenotyp přispívá jejich aktivita - štěpící aktivita ZFN, nebo rekombinační aktivita Cre rekombinázy, bych se přikláněl k možnosti, že negativní efekt TALENu je způsoben nespecifickým štěpením genomu následovaným buněčnou smrtí. Velkou roli zde podle mě hraje i silná exprese TALENů Gal4 drivery. V budoucnu chceme vyzkoušet, jestli inhibice Gal4 driveru proteinem Gal80 povede k záchraně těchto toxických efektů, při zachování stejné efektivity TALENu na mutagenезi. Výše zmíněná studie toho dosáhla fúzí Cre rekombinázy s EBD, nakonec byli schopní získat efektivní rekombinaci nedoprovázenou toxicitou, plné penetrance rekombinace však bez morfologických defektů nedosáhli.

6. Závěr

Výsledky této práce ukazují, že TAL nukleázy mají velmi dobrý potenciál k tomu, aby byly využívány nejen pro mutagenezi celého organismu, ale i pro tkáňově specifickou mutagenezi. Pro plné využití tohoto potenciálu ale bude nutné se zabývat toxickým efektem, který je spojen s expresí TAL nukleáz, a který zřejmě nesouvisí s jejich specifitou ke konkrétní sekvenci DNA. Je možné, že použití UAS-Gal4 systému k aktivaci TAL nukleáz zde může být oním limitujícím faktorem – tento nástroj sice zajišťuje tkáňovou specifitu, není s ním ale možné regulovat míru exprese TALENu. Zdá se jako pravděpodobné, že pokud bychom byli schopni jemněji regulovat expresi TALENů, mohli bychom tento potenciál plně využít a mít v rukou velmi dobrý nástroj pro tkáňově specifickou mutagenezi.

7. Literatura

- Ahnesorg, Peter, Philippa Smith, and Stephen P. Jackson. 2006. "XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining." *Cell* 124 (2): 301–13. doi:10.1016/j.cell.2005.12.031.
- Aylon, Yael, Batia Liefshitz, and Martin Kupiec. 2004. "The CDK Regulates Repair of Double-strand Breaks by Homologous Recombination During the Cell Cycle." *The EMBO Journal* 23 (24): 4868–75.
- Beumer, K. 2005. "Efficient Gene Targeting in Drosophila With Zinc-Finger Nucleases." *Genetics* 172 (4): 2391–2403. doi:10.1534/genetics.105.052829.
- Bibikova, Marina, Mary Golic, Kent G. Golic, and Dana Carroll. 2002. "Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-finger Nucleases." *Genetics* 161 (3): 1169–75.
- Bischof, Johannes, Robert K. Maeda, Monika Hediger, François Karch, and Konrad Basler. 2007. "An Optimized Transgenesis System for Drosophila Using Germ-line-specific ϕ C31 Integrases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9): 3312–17.
- Bitinaite, Jurate, David A. Wah, Aneel K. Aggarwal, and Ira Schildkraut. 1998. "FokI Dimerization Is Required for DNA Cleavage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (18): 10570–75.
- Bogdanove, Adam J, Sebastian Schornack, and Thomas Lahaye. 2010. "TAL Effectors: Finding Plant Genes for Disease and Defense." *Current Opinion in Plant Biology* 13 (4): 394–401. doi:10.1016/j.pbi.2010.04.010.
- Boch, Jens, and Ulla Bonas. 2010. "Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function." *Annual Review of Phytopathology* 48 (1): 419–36. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
- Boch, Jens, Heidi Scholze, Sebastian Schornack, Angelika Landgraf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaye, Anja Nickstadt, and Ulla Bonas. 2009. "Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors." *Science* 326 (5959): 1509–12. doi:10.1126/science.1178811.
- Brand, Andrea H., and Norbert Perrimon. 1993. "Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes." *Development* 118 (2): 401–15.
- Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2011. "Efficient Design and Assembly of Custom TALEN and Other TAL Effector-based Constructs for DNA Targeting." *Nucleic Acids Research* 39 (12): e82–e82. doi:10.1093/nar/gkr218.

- Corish, Pete, and Chris Tyler-Smith. 1999. "Attenuation of Green Fluorescent Protein Half-life in Mammalian Cells." *Protein Engineering* 12 (12): 1035–40. doi:10.1093/protein/12.12.1035.
- Cornu, Tatjana I, Stacey Thibodeau-Beganny, Eva Guhl, Stephen Alwin, Magdalena Eichtinger, Jk Joung, and Toni Cathomen. 2008. "DNA-binding Specificity Is a Major Determinant of the Activity and Toxicity of Zinc-finger Nucleases." *Molecular Therapy* 16 (2): 352–58. doi:10.1038/sj.mt.6300357.
- Curtiss, Jennifer, and Marek Mlodzik. 2000. "Morphogenetic Furrow Initiation and Progression During Eye Development in *Drosophila*: The Roles of Decapentaplegic, Hedgehog and Eyes Absent." *Development* 127 (6): 1325–36.
- Dahlem, Timothy J., Kazuyuki Hoshijima, Michael J. Jurynek, Derrick Gunther, Colby G. Starker, Alexandra S. Locke, Allison M. Weis, Daniel F. Voytas, and David Jonah Grunwald. 2012. "Simple Methods for Generating and Detecting Locus-Specific Mutations Induced with TALENs in the Zebrafish Genome." Edited by Mary C. Mullins. *PLoS Genetics* 8 (8): e1002861. doi:10.1371/journal.pgen.1002861.
- Ding, Qi, Yeturu V. R. Reddy, Wei Wang, Timothy Woods, Pauline Douglas, Dale A. Ramsden, Susan P. Lees-Miller, and Katheryn Meek. 2003. "Autophosphorylation of the Catalytic Subunit of the DNA-Dependent Protein Kinase Is Required for Efficient End Processing During DNA Double-Strand Break Repair." *Molecular and Cellular Biology* 23 (16): 5836–48. doi:10.1128/MCB.23.16.5836-5848.2003.
- Do, A. T., J. T. Brooks, M. K. Le Neveu, and J. R. LaRocque. 2014. "Double-Strand Break Repair Assays Determine Pathway Choice and Structure of Gene Conversion Events in *Drosophila Melanogaster*." *G3 & Genes/Genomes/Genetics* 4 (3): 425–32. doi:10.1534/g3.113.010074.
- Dolezal, Tomas, Eva Dolezelova, Michal Zurovec, and Peter J. Bryant. 2005. "A Role for Adenosine Deaminase in *Drosophila* Larval Development." *PLoS Biology* 3 (7): e201. doi:10.1371/journal.pbio.0030201.
- Doyle, E. L., N. J. Booher, D. S. Standage, D. F. Voytas, V. P. Brendel, J. K. VanDyk, and A. J. Bogdanove. 2012. "TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL Effector Design and Target Prediction." *Nucleic Acids Research* 40 (W1): W117–W122. doi:10.1093/nar/gks608.
- Ellis, Michael C., Elizabeth M. O'Neill, and Gerald M. Rubin. 1993. "Expression of *Drosophila* Glass Protein and Evidence for Negative Regulation of Its Activity in Non-neuronal Cells by Another DNA-binding Protein." *Development* 119 (3): 855–65.
- Ferguson, David O., and Frederick W. Alt. 2001. "DNA Double Strand Break Repair and Chromosomal Translocation: Lessons from Animal Models." *Oncogene* 20 (40): 5572–79.
- Freeman, Matthew. 1996. "Reiterative Use of the EGF Receptor Triggers Differentiation of All Cell Types in the *Drosophila* Eye." *Cell* 87 (4): 651–60.

- Golic, K. G., and S. Lindquist. 1989. "The FLP Recombinase of Yeast Catalyzes Site-specific Recombination in the *Drosophila* Genome." *Cell* 59 (3): 499–509.
- Gorski, Marcin M., Jan CJ Eeken, Anja WM de Jong, Ilse Klink, Marjan Loos, Ron J. Romeijn, Bert L. van Veen, Leon H. Mullenders, Wouter Ferro, and Albert Pastink. 2003. "The *Drosophila Melanogaster* DNA Ligase IV Gene Plays a Crucial Role in the Repair of Radiation-induced DNA Double-strand Breaks and Acts Synergistically with Rad54." *Genetics* 165 (4): 1929–41.
- Hay, Bruce A., Tanya Wolff, and Gerald M. Rubin. 1994. "Expression of Baculovirus P35 Prevents Cell Death in *Drosophila*." *Development* 120 (8): 2121–29.
- Hayashi, Shigeo, Susumu Hirose, Tony Metcalfe, and Alan D. Shirras. 1993. "Control of Imaginal Cell Development by the Escargot Gene of *Drosophila*." *Development* 118 (1): 105–15.
- Heidmann, Doris, and Christian Lehner. 2001. "Reduction of Cre Recombinase Toxicity in Proliferating *Drosophila* Cells by Estrogen-dependent Activity Regulation." *Development Genes and Evolution* 211 (8-9): 458–65. doi:10.1007/s004270100167.
- Helleday, T, J Lo, D Vangent, and B Engelward. 2007. "DNA Double-strand Break Repair: From Mechanistic Understanding to Cancer Treatment." *DNA Repair* 6 (7): 923–35. doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.006.
- Hooper, Joan E., and Matthew P. Scott. 1989. "The *Drosophila* Patched Gene Encodes a Putative Membrane Protein Required for Segmental Patterning." *Cell* 59 (4): 751–65. doi:10.1016/0092-8674(89)90021-4.
- Chapman, J. Ross, Martin R.G. Taylor, and Simon J. Boulton. 2012. "Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice." *Molecular Cell* 47 (4): 497–510. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029.
- Christian, M., T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2010. "Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases." *Genetics* 186 (2): 757–61. doi:10.1534/genetics.110.120717.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, et al. 2012. "Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data." *Bioinformatics* 28 (12): 1647–49. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Lexow, J., T. Poggioli, P. Sarathchandra, M. P. Santini, and N. Rosenthal. 2013. "Cardiac Fibrosis in Mice Expressing an Inducible Myocardial-specific Cre Driver." *Disease Models & Mechanisms* 6 (6): 1470–76. doi:10.1242/dmm.010470.
- Li, W.-Z., S.-L. Li, H.Y. Zheng, S.-P. Zhang, and L. Xue. 2012. "A Broad Expression Profile of the GMR-GAL4 Driver in *Drosophila Melanogaster*." *Genetics and Molecular Research* 11 (3): 1997–2002. doi:10.4238/2012.August.6.4.

- Lieber, Michael R. 2010. "The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway." *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Miller, Jeffrey C, Michael C Holmes, Jianbin Wang, Dmitry Y Guschin, Ya-Li Lee, Igor Rupniewski, Christian M Beausejour, et al. 2007. "An Improved Zinc-finger Nuclease Architecture for Highly Specific Genome Editing." *Nature Biotechnology* 25 (7): 778–85. doi:10.1038/nbt1319.
- Moore, Finola E., Deepak Reyon, Jeffry D. Sander, Sarah A. Martinez, Jessica S. Blackburn, Cyd Khayter, Cherie L. Ramirez, J. Keith Joung, and David M. Langenau. 2012. "Improved Somatic Mutagenesis in Zebrafish Using Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)." Edited by Joshua L. Bonkowsky. *PLoS ONE* 7 (5): e37877. doi:10.1371/journal.pone.0037877.
- Morata, G., and P. A. Lawrence. 1975. "Control of Compartment Development by the Engrailed Gene in *Drosophila*." *Nature* 255 (5510): 614–17. doi:10.1038/255614a0.
- Moscou, Matthew J., and Adam J. Bogdanove. 2009. "A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5959): 1501. doi:10.1126/science.1178817.
- Moses, K., and G. M. Rubin. 1991. "Glass Encodes a Site-specific DNA-binding Protein That Is Regulated in Response to Positional Signals in the Developing *Drosophila* Eye." *Genes & Development* 5 (4): 583–93. doi:10.1101/gad.5.4.583.
- Mussolino, C., R. Morbitzer, F. Lutge, N. Dannemann, T. Lahaye, and T. Cathomen. 2011. "A Novel TALE Nuclease Scaffold Enables High Genome Editing Activity in Combination with Low Toxicity." *Nucleic Acids Research* 39 (21): 9283–93. doi:10.1093/nar/gkr597.
- Nakano, Masakazu, Kazuhiko Odaka, Masakazu Ishimura, Saki Kondo, Naoto Tachikawa, Joe Chiba, Yumi Kanegae, and Izumu Saito. 2001. "Efficient Gene Activation in Cultured Mammalian Cells Mediated by FLP Recombinase-expressing Recombinant Adenovirus." *Nucleic Acids Research* 29 (7): e40.
- Pastink, Albert, Jan CJ Eeken, and Paul HM Lohman. 2001. "Genomic Integrity and the Repair of Double-strand DNA Breaks." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 480: 37–50.
- Preibisch, S., S. Saalfeld, and P. Tomancak. 2009. "Globally Optimal Stitching of Tiled 3D Microscopic Image Acquisitions." *Bioinformatics* 25 (11): 1463–65. doi:10.1093/bioinformatics/btp184.
- Reyon, Deepak, Shengdar Q Tsai, Cyd Khayter, Jennifer A Foden, Jeffry D Sander, and J Keith Joung. 2012. "FLASH Assembly of TALENs for High-throughput Genome Editing." *Nature Biotechnology* 30 (5): 460–65. doi:10.1038/nbt.2170.

- Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson, and M. Lobrich. 2003. "Pathways of DNA Double-Strand Break Repair During the Mammalian Cell Cycle." *Molecular and Cellular Biology* 23 (16): 5706–15. doi:10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003.
- Sauer, B. 1987. "Functional Expression of the Cre-lox Site-specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 7 (6): 2087–96.
- Shibata, Atsushi, Sandro Conrad, Julie Birraux, Verena Geuting, Olivia Barton, Amani Ismail, Andreas Kakaroukas, et al. 2011. "Factors Determining DNA Double-strand Break Repair Pathway Choice in G2 Phase." *The EMBO Journal* 30 (6): 1079–92.
- Scholze, Heidi, and Jens Boch. 2011. "TAL Effectors Are Remote Controls for Gene Activation." *Current Opinion in Microbiology* 14 (1): 47–53. doi:10.1016/j.mib.2010.12.001.
- Spitzner, J. R., I. K. Chung, T. D. Gootz, P. R. McGuirk, and M. T. Muller. 1995. "Analysis of Eukaryotic Topoisomerase II Cleavage Sites in the Presence of the Quinolone CP-115,953 Reveals Drug-dependent and -independent Recognition Elements." *Molecular Pharmacology* 48 (2): 238–49.
- Stark, J. M., and M. Jasin. 2003. "Extensive Loss of Heterozygosity Is Suppressed During Homologous Repair of Chromosomal Breaks." *Molecular and Cellular Biology* 23 (2): 733–43. doi:10.1128/MCB.23.2.733-743.2003.
- Su, Tin Tin. 2006. "Cellular Responses to DNA Damage: One Signal, Multiple Choices." *Annual Review of Genetics* 40 (1): 187–208. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090428.
- Sugawara, N., E. L. Ivanov, J. Fishman-Lobell, B. L. Ray, X. Wu, and J. E. Haber. 1995. "DNA Structure-dependent Requirements for Yeast RAD Genes in Gene Conversion." *Nature* 373 (6509): 84–86. doi:10.1038/373084a0.
- Sung, Patrick, and Hannah Klein. 2006. "Mechanism of Homologous Recombination: Mediators and Helicases Take on Regulatory Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (10): 739–50. doi:10.1038/nrm2008.
- Szczepek, Michal, Vincent Brondani, Janine Büchel, Luis Serrano, David J. Segal, and Toni Cathomen. 2007. "Structure-based Redesign of the Dimerization Interface Reduces the Toxicity of Zinc-finger Nucleases." *Nature Biotechnology* 25 (7): 786–93. doi:10.1038/nbt1317.
- Szostak, Jack W., Terry L. Orr-Weaver, Rodney J. Rothstein, and Franklin W. Stahl. 1983. "The Double-strand-break Repair Model for Recombination." *Cell* 33 (1): 25–35. doi:10.1016/0092-8674(83)90331-8.
- Szurek, Boris, Eric Marois, Ulla Bonas, and Guido Van den Ackerveken. 2001. "Eukaryotic Features of the *Xanthomonas* Type III Effector AvrBs3: Protein Domains Involved in Transcriptional Activation and the Interaction with Nuclear Import Receptors from Pepper." *The Plant Journal* 26 (5): 523–34.

- Treen, N., K. Yoshida, T. Sakuma, H. Sasaki, N. Kawai, T. Yamamoto, and Y. Sasakura. 2014. "Tissue-specific and Ubiquitous Gene Knockouts by TALEN Electroporation Provide New Approaches to Investigating Gene Function in *Ciona*." *Development* 141 (2): 481–87. doi:10.1242/dev.099572.
- Van Dyck, Eric, Alicja Z. Stasiak, Andrzej Stasiak, and Stephen C. West. 2001. "Visualization of Recombination Intermediates Produced by RAD52-mediated Single-strand Annealing." *EMBO Reports* 2 (10): 905–9. doi:10.1093/embo-reports/kve201.
- Van Heemst, Diana, Linda Brugmans, Nicole S. Verkaik, and Dik C. van Gent. 2004. "End-joining of Blunt DNA Double-strand Breaks in Mammalian Fibroblasts Is Precise and Requires DNA-PK and XRCC4." *DNA Repair* 3 (1): 43–50. doi:10.1016/j.dnarep.2003.09.004.
- Wah, David A., Jurate Bitinaite, Ira Schildkraut, and Aneel K. Aggarwal. 1998. "Structure of FokI Has Implications for DNA Cleavage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (18): 10564–69.
- Whiteley, Mary, Philip D. Noguchi, Suzanne M. Sensabaugh, Ward F. Odenwald, and Judith A. Kassis. 1992. "The *Drosophila* Gene *Escargot* Encodes a Zinc Finger Motif Found in Snail-related Genes." *Mechanisms of Development* 36 (3): 117–27. doi:10.1016/0925-4773(92)90063-P.