

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Charakterizácia mutantov s poruchou samčej fertility u
*Drosophila melanogaster***

Bakalárska práca

Laura Mačejková

Školiteľ: Prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc
Školiteľ špecialista : Mgr. Lucie Kučerová, PhD.
MSc. Houda Ouns Maaroufi, PhD.

České Budějovice 2023

Bibliografický údaj

Mačejková, L., 2023: Charakterizácia mutantov s poruchou samčej fertility u *Drosophila melanogaster*. [Characterization of mutants with impaired male fertility in *Drosophila melanogaster*, Bc. Thesis, in Slovak.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotácia

My work focuses on male fertility disorders. *Drosophila melanogaster Idgf3* gene was previously found to interact with *cnt1* mutation, which is involved in male fertility. Simultaneously, earlier published studies mentioned that *Drosophila Idgf* genes and particularly *Idgf3* could influence male fertility. This work describes male fertility phenotype of *Idgf3* null mutant and verifies it.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som autorom tejto kvalifikačnej práce, a že som ju vypracovala len s použitím paramerov a literatúry uvedených v zozname použitých zdrojov.

V Českých Budějovicích dňa 12.4.2023

.....
Laura Mačejková

Pod'akovanie

Týmto, by som chcela poďakovať za vedenie práce a cenné rady vedúcemu laboratória prof. RNDr. Michalovi Žurovcovi, CSc., školiteľke špecialistke Mgr. Lucii Kučerovej, Ph.D za podporu mojej práce a štúdia, za pomoc pri riešení projektu, ako aj za ochotu vysvetliť a tiež ukázať niektoré výskumné metódy. Taktiež, by som vyjadrila vďaku školiteľke špecialistke MSc. Houda Ouns Maaroufi, Ph.D za usmernenie a pomoc pri mojom výskume. Vďaka patrí aj všetkým pracovníkom laboratória, ktorí mi poskytli pomocnú ruku, ako aj cenné rady počas môjho pôsobenia na projekte. Sú to Bc. Lucie Hodíková, Mgr. Václav Brož, RNDr. Anna Žaloudíková, Ph.D., Ing. Peter Kmet', Mgr. Lenka Rouhová, MSc. Wu Bulah Chia-Hsiang. Za svoje štúdium a podporu vďačím tiež mojej rodine, bez ktorej by to nebolo možné.

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Teoretická časť.....	2
2.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.1.1	Charakteristika <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.1.2	Reprodukcia <i>D. melanogaster</i>	3
2.1.3	Semenníky <i>D. melanogaster</i>	4
2.1.4	Spematogenéza u <i>D. melanogaster</i>	5
2.1.5	Genetika <i>D. melanogaster</i>	6
2.2	IDGF3	9
3	Ciele práce	11
4	Metodika.....	12
4.1	Kultivácia <i>D. melanogaster</i>	12
4.2	Test fertility samcov.....	12
4.3	Záchrana neplodného mutanta	13
4.4	Izolácia DNA	15
4.4.1	Purifikácia DNA pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).....	15
4.5	PCR	15
4.5.1	PCR s použitím Dream Taq polymerázou.....	15
4.5.2	PCR s použitím TaKaRa Ex Taq polymerázou pre dlhé produkty	16
4.6	Elektroforéza	16
4.7	Izolácia RNA.....	17
4.8	Reverzná transkripcia	18
4.9	Kvantitatívna PCR	18
5	Výsledky.....	19
5.1	Overenie mutanta <i>Idgf3^{L1}</i> pomocou polymerazovej reťazovej reakcie	19
5.2	Kopulačný test.....	20
5.3	Frekvencia párenia sa samcov	22
5.4	Pomer samíc kladúcich vajíčka	23
5.5	Pomer oplodnených samíc.....	24
5.6	Overenie heteroalelickej kombinácie	25
5.7	Overenie overexpresných línií pre záchranu mutanta pomocou Real-time qPCR	26
5.8	Rekombinačné kríženie pre overenie múch so záchranným konštruktom	27
5.9	Kopulačný test samcov so záchranným konštruktom	28
5.10	Frekvencia párenia sa samcov so záchranným konštruktom.....	30

5.11	Pomer samíc kladúcich vajíčka od samca s <i>Flyfos</i> konštruktom	31
5.12	Pomer samíc ktoré boli oplodnené samcom s <i>Flyfos</i> konštruktom	32
6	Diskusia	33
7	Záver	35
8	Zoznam literatúry	36
9	Prílohy.....	42

1 ÚVOD

Drosophila melanogaster sa používaná ako genetický modelový organizmus už približne 100 rokov. Prvý kto nakreslil a dôkladne popísal *D. melanogaster* bol John Curtis. K úspechu octomilky ako modelovému organizmu prispel William Ernest Castle, ktorý začal pokusy na muche a zistil, že sa dá s ňou ľahko manipulovať ako aj krátkosť životného cyklu. Druhým kto *D. melanogaster* vyniesol do výšin bol Tomas Hunt Morgan, ktorý svojimi pokusmi objavil genetickú rekombináciu. Dôležitosť jeho pokusov je možné badať do teraz (Roberts., 2006). Genóm mušky bol osekvenovaný a veľmi dobe anotovaný v roku 2000. Vďaka tomu je veľmi ľahké narábať s genóm, ktorý sa vyberie. (Allocca et al., 2018). *D. melanogaster* má štyri páry chromozómov. Prvý pár tvoria pohlavné chromozómy a ostatné sú autozomy (Kaufman, 2017). Približne 77% génov muchy je zhodných s ľudskými génmi, čo má veľmi potenciál pri výskume závažných ľudských chorôb (Kruger, Denton, 2020).

„Imaginal Discs Growth Factors“ (IDGF) sú sekretované glykoproteíny nachádzajúce sa u bezstavovcov. Rodina IDGF u *D. melanogaster* pozostáva zo šiestich členov (Žurovcová, Ayala, 2002). Sú štrukturálne podobné cicavčím chitinázam (CLP) (Kawamura et al., 1999). Medzi cicavčí CLP patrí napríklad oviduction, ktorý kóduje glykoprotein 1 (OVGP1) a produkuje sa vo vajíčkovodoch, kde má vplyv na dozrievanie spermíí ako aj ich schodnosť pohybu, životnosť (Zhao et al., 2022). Glykoprotein *Idgf3* je u *D. melanogaster* produkovaný v semenníkoch aj spermatéke (Chintapalli et al., 2007). Pilotné práce na nulovom mutantovi *Idgf3* zbežne zmiňujú, že samci sú neplodní a samice môžu mať zníženou plodnosť (Kučerová et al., 2016). Ďalej bolo v našom laboratóriu nedávno zistené, že *Idgf3* zrejme v semenníkoch interaguje s hladinou adenosinového transportéru *cnt1*. U adenosinového *cnt1* transportéru už bola dokázaná súvislosť s poruchami samčej plodnosti (Maaroufi et al., 2022). Plodnosť samcov je spojená s korektnou funkciou vývojových a fyziologických procesov. *D. melanogaster* sú vhodné organizmy pre výskum sterility u samcov (Wakimoto et al., 2004). Mutácie súvisiace so sterilitou u samcov vyznačujúce sa geneticky, fenotypovo a molekulárne by mohli viesť k lepšiemu porozumeniu geneticky podmienenej sterility u ľudí (Silber, 2004).

2 TEORETICKÁ ČÁST

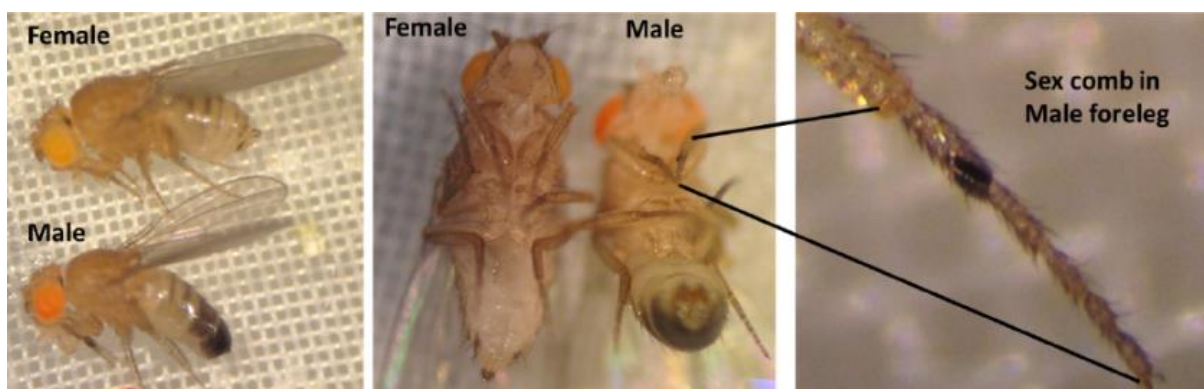
2.1 *Drosophila melanogaster*

2.1.1 Charakteristika *Drosophila melanogaster*

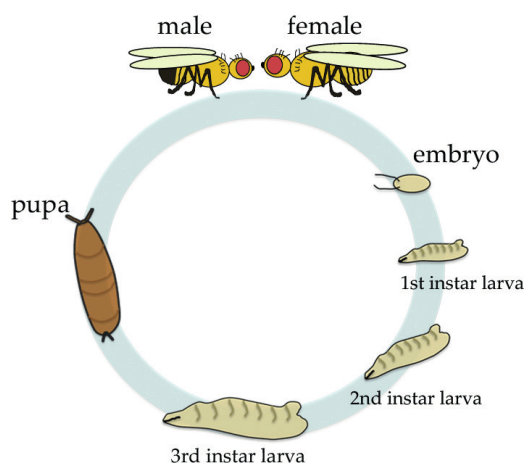
D. melanogaster je známa, aj ako ovocná muška. Octomilku radíme medzi Diptera (Campos-Ortega et al., 1985). Telo tejto muchy sa skladá s hlavy, hrudníkovej časti (thorax) a zadočku (abdomen) a dvoch krídel (Chyb, Gompel, 2013). U *D. melanogaster* je charakterizovaný pohlavný dimorfizmus: samček sa od samičky líši tým, že je menší a tiež má čiernu škvrnu na abdomenu (Obrázok č. 1) ako aj chlípky okolo genitálneho otvoru. Taktiež sa na nožičkách u samca nachádzajú hrebene (sex combs), ktoré sú využívané pri párení (Chyb, Gompel, 2013).

Životný cyklus *D. melanogaster* trvá pri teplote 25 °C 10 dní a pri 18 °C sa predlží na 20 dní (Obrázok č. 2). Najprv dochádza k páreniu medzi samcom a samičkou. Potom samička nakladie vajíčka na jedlo, ktorým sa aj živí. Samice sú schopné párenia so samcami po 12 hodinách od ich vyliahnutia (Allocca et al., 2018).

Z embrya vzniká po 24 hodinách prvé larválne štádium L1, celý larválny vývoj trvá 4 dni. Z L1 vzniká druhé štádium L2 a následne tretie štádium L3. Hlavná morfogenéza orgánov ako sú črevá, reprodukčné orgány začína zmenami počas vývoja kukly. Po štyroch dňoch vývoja sa z kukly vyvinie dospelý jedinec (Ong et al., 2015).



Obrázok. 1: Pohlavný dimorfizmus (Majeed et al., 2017).



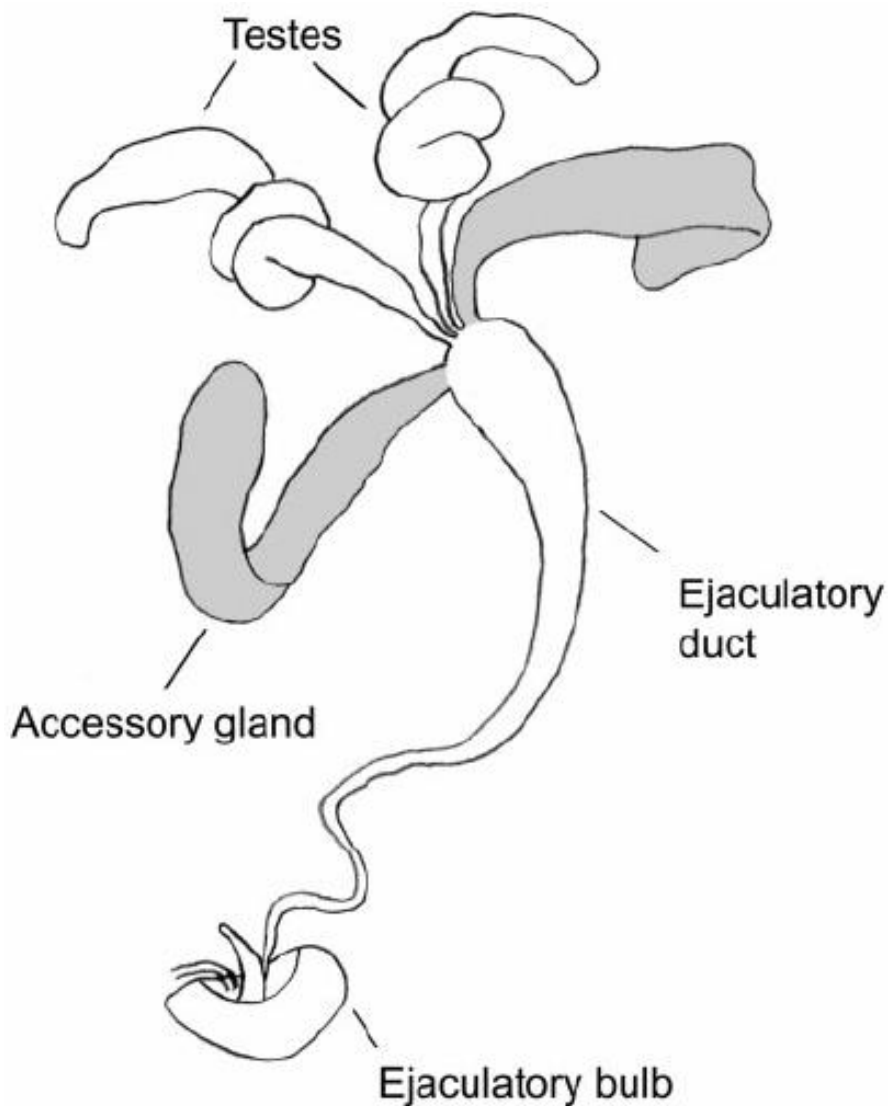
Obrázok č. 2: *Drosophila melanogaster* životný cyklus (Allocca et al., 2018).

2.1.2 Reprodukcia *D. melanogaster*

Reprodukcia u *D. melanogaster* závisí na úspešnom pohlavnom správaní a dvorení u samcov. Pri hľadaní partnera u *D. melanogaster* sú veľmi dôležité čuchové orgány. Samce používajú čuch, zároveň sluchové, vizuálne a chemosenzorické signálmi k nájdeniu samičky na párenie. Signály, informácie, ktoré sa snaží jedinec získať sa dajú zistiť pomocou orgánov, v ktorých sa nachádzajú neuróny. Tieto orgány sú: proboscis, tarsae nôh, krídla, oči, tykadlá, čelustné palpy. Na rozpoznanie pohlavia a druhu, samček použije feromónové signály a následne poklepe prednou končatinou na brucho samice. Neskôr samček vytvorí pomocou vibrácie svojich krídel dvornú pieseň. Po dvorení sa samček kopuluje so samicou v priemere 20 minút. Dvorenie môže byť prijaté alebo odmietnuté samicou. *D. melanogaster* využíva odmietavé správanie ako je „decamping“, vytlačanie vajcovodu, alebo kopanie, ktorým sa zbaví dvoreniu samca. Vďaka úspešnej kopulácii dôjde k prenosu spermií a semenných tekutín do pohlavného traktu. To spôsobuje povzbudenie uvoľňovania oocytov vaječníkom a tým dôjde obmedzeniu párenia sa samičiek s iným samcom (Pavlou, Goodwin, 2013 ; Ziegler et al., 2013).

2.1.3 Semenníky *D. melanogaster*

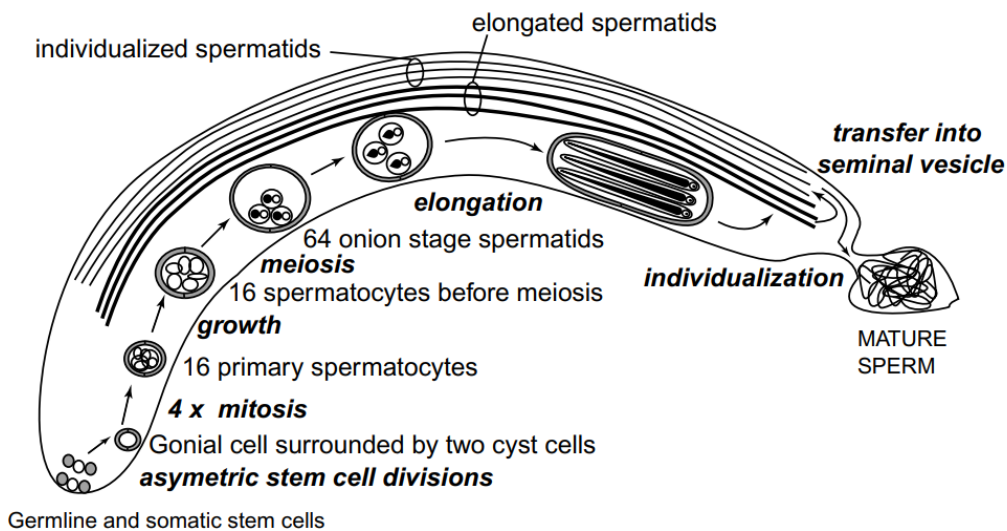
Semenníky u *D. melanogaster* sú párové orgány. Majú tvar stočenej trubice s dutým koncom (Obrázok č. 3). GSC (zárodečné kmenové bunky) sú lokalizované na slepom apikálnom konci semenníka. Tam sa delia asymetricky, čím dôjde k vzniku jednej bunky, ktorá ostáva kmeňovou bunkou. Druhá bunka gonioblast sa diferencuje. Pričom gonioblast je obalovaný dvoma bunkami somatických cyst. Štyri cysty sa delenia pri účasti goniálneho blastu zintenzívňujú tranzit pri vzniku zhluku 16 spermatogoniálnych buniek. Tieto bunky prechádzajú cez S fázu, spermatocytový program rastu a génovej expresie. Tu sú zväčša všetky génové produkty esenciálne pre vývoj spermatocytov a spermatíd prepísané. Spermatidy sú na konci spermiogenézy obklúčené plazmatickými membránami. Spermie ktoré dozrejú sa skladujú v semennej vezikule pre budúcnosť (de Cuevas, Matunis, 2011).



Obrázok č. 3: Reprodukčný systém *Drosophila melanogaster* (Ram, Wolfner, 2007).

2.1.4 Spematogenéza u *D. melanogaster*

Spematogenéza u *D. melanogaster* sa spúšťa v larvách L3 (tretí instar). Semenníky *D. melanogaster* obsahujú všetky štádia spermatogenézy. Na apikálnom konci semenníka sú situované zárodočné kmeňové bunky ako aj progenitory cyst. Kmeňové bunky sa delia asymetricky v apikálnej oblasti semenníka. Rodičovské bunky ostávajú pri konci semenníka. Dcérske bunky sa oddelia (Obrázok č. 4). Aby vzniklo 16 synciálnych, skorých spermatocytov musí prejsť spermatogonium 4 cyklami mitozy. V nich sa sústreďujú transkripty, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v ďalšej časti spermatogenézy. Niektoré spermatocyty prechádzajú meiozou za vzniku 64 spermatid. Dochádza k predlžovaniu spermatid až do 1,8 milimetra. Spolu so spermatidami sa predlžia aj dva mitochondriálne deriváty a axonéma. V individualizácii dochádza k zlikvidovaniu extra organel a skoro celej cytoplazmy, s výnimkou (axonema) hlavného a vedľajšieho mitochondriálneho derivátu. Vďaka individualizácii je každá spermia zabalená do svojej membrány. Po ich skončení sú spermie transportované do semenného vaku, kde sú uložené pred ejakuláciou (Castrillon et al., 1993; Demarco et al., 2014; Fabian, Brill, 2014; Fabrizio et al., 1998; Tokuyasu et al., 1972; Tokuyasu et al., 1975).



Obazok č. 4: Spematogenéza u *D. melanogaster* (Metzendorf, 2010).

2.1.5 Genetika *D.melanogaster*

Mutageneza

Mutácie sú zdrojom rozmanitosti génov v evolúcii. Ako prvá z mutagenéz bolo objavené röntgenové žiarenie ktoré, menilo fenotyp u ovocných mušiek. Následne boli vynájdené fyzikálne, chemické a biologické mutagenézy ktoré boli riadené mutagénom. Neskôr sa začal rozvoj cielenej mutagenézy (Zheng et al., 2017). Miestne-cielená mutageneza je využívaná pre rozmanité množstvo funkčných štúdií ako aj pre vytváranie proteínov a enzýmov s novými katalytickými aktivitami (Liu et al., 2008). Táto mutageneza vytvára mutácie v určených miestach ako je väzbové miesto pre ligand alebo aj katalytické miesto (Bloom et al., 2009). Medzi asi najznámejšiu cieleňú mutagenézu *in vitro* patri PCR. Programovateľné nukleázy majú široké použitie *in vivo* aj *in vitro* (Zheng et al., 2017).

Balancerové chromozómy

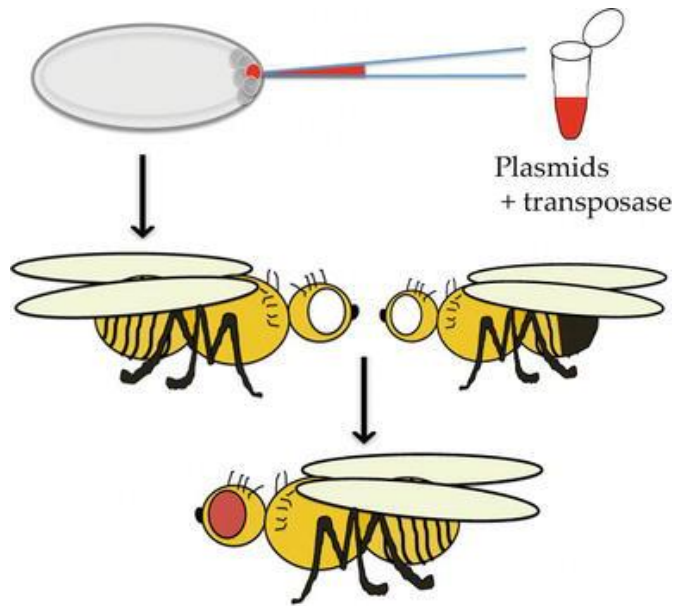
Balancerové chromozómy u múch zohrávajú veľmi dôležitú úlohu. Sú to chromozómy s viacerými inverziami. A práve vďaka nim nedochádza k rekombinácii s homologickým chromozómom. Udržujú letálne línie mutácií v heterozygotnom stave (Žurovec, 1999). V tejto práci je využívaný balancerový chromozóm s fenotypovou značkou „curly“.

Markery

Známe aj ako signálne znaky slúžia k označovaniu transgénov odvodených od morfológie ako sú biela alebo červená farba očí, zakrútené „curly“ krídla, (Greenspan, 2007) či fluorescenčné proteíny GFP alebo dsRed marker (Hander et al., 2001).

P- element

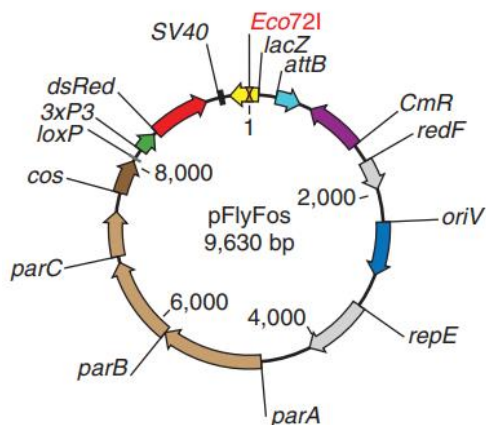
U *D. melanogaster* sa P-elementy používajú pre nešpecificky lokalizovanou integráciu transgénov (Obrázok č. 5). A to náhodnou mutagenezou pomocou mobilizácie a mimovoľného začlenenia do genómu a tiež pre cieleňú mutagenezou, kde môže byť P-element, ktorý je lokalizovaný v blízkosti alebo priamo v nekódujúcej oblasti génu mobilizovaný a vyštiepený a ak dôjde k jeho nepresnému vyštiepeniu vzniknú prestavby sekvencie génu ako aj delécie. Týmto spôsobom vznikol mutant *Idgf3^{L1}* (Obrázok č. 7) (Kučerová et al., 2016). Ďalej boli P-elementy dôležité aj pre vývoj GAL4/UAS (Brand, Perrimon, 1993), cielenej delécie (Ryder et al., 2004).



Obrázok č. 5: Vytvorenie transgenných múch. Dva typy plazmidov sa injikovali do embrya muchy s bielymi očami. Jeden s P-transponázou a druhý transpozom P-elementu s potrebným transgenom spojeným s markerovým genom ktorý tvorí červenú farbu očí. Po injikácii enzým transponáza vysekne traspozon z druhého plazmidu a vloží do genómu buniek vo vývoji. Po tom čo sa tieto muchy stanú dospelými tak pri ich parení bude u potomstva transgen. Výsledkom budú červené oči u potomkov (Allocca et al., 2018).

Flyfos

Flyfos sú génové fosmidové knižnice sprostredkujú modifikáciu veľkých genómových klonov a to pomocou vysokovýkonnej rekombinácie a cielenej transgenézy. Umožňujú tiež záchranu mutovaných fenotypov a zobrazovanie génových produktov u živých múch. Fosmid vektor (pFlyFos) vznikol pomocou systému P[acman] a rekombinčných techník (Obrázok č. 6). P[acman] využíva ϕ C31. Tu je integráza ktorá do genómu *Drosophily* vie zaviesť bakteriálne konštrukty veľkosti umelého chromozómu. Vďaka čomu je možné analyzovať hociaký aký gén v jeho neporušenom cis-regulačnom susedstve (Ejsmont et., al 2009).



Obrazok č. 6: pFlyfos schéma (Ejsmont et., al 2009).

pFlyFos sa skladá so sekvencie attB ktorá je rozpoznávaná ϕ C31 integrázou a dá sa využiť pre cielečné začlenenie do špecifického attP miesta v genome. Pre selekciu v živých muškách je konštrukt vybavený markerom dsRed (červený fluorescenčný protein), ktorý je riadený očným promotorom (3xP3) viditeľným v larvách kuklách a dospelých jedincoch (Ejsmont et., al 2009).

attP a attB

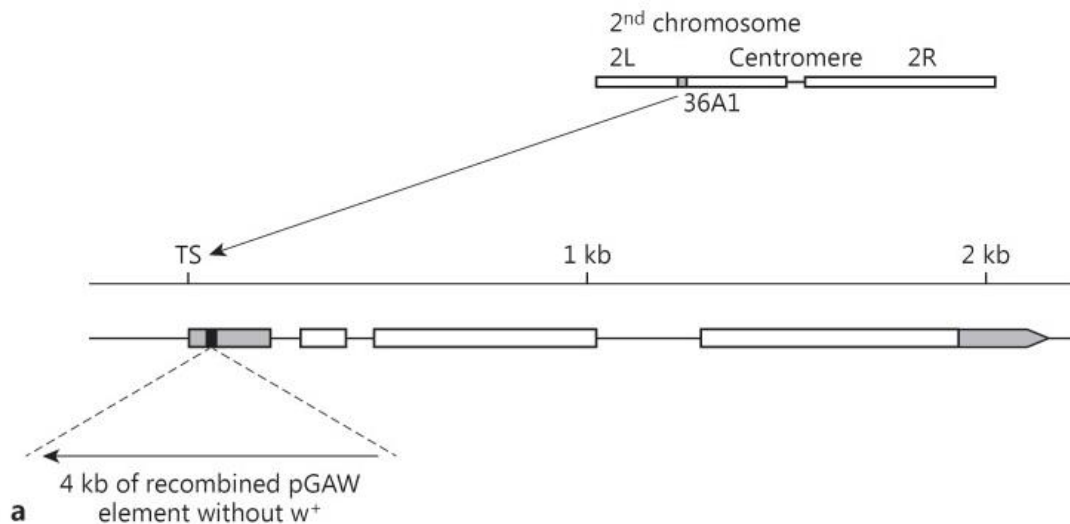
Výskum ktorý umožnil ľahšiu manipuláciu so sekvenciami DNA využíval ako modelový organizmus taktiež *Drosophila*. Zistilo sa, ako a opakovaním rýchlo včleniť transgénu do jedinej a tej istej polohy v genome. Všetky stratégie používajú špecifické rekombinázy, ktoré urýchľujú kríženia medzi definovanými cieľovými sekvenciami (Brand, Dymecki 2004). Jedna z nich integráza z fága ϕ C31 urýchľuje rekombináciu medzi attP a attB sekvenciami, ku ktorej dochádza v jadre TTG ktoré je pre nich spoločné. Výsledkom je produkcia dvoch nových sekvencií attL a attR. (Kuhstoss, Rao, 1991; Rausch, Lehmann, 1991). Pretože ich integráza nerozpozná nemožno ich vystrihnúť ani vymeniť (Thorpe et al., 2000). Neskôr bola vyvinutá (RMCE) teda integračná stratégia ktorej sa hovorilo aj výmena kaziet sprostredkovaná rekombinázou. Systém vedie k vyčisteniu výmene kazety cieľovej sekvencie s darcovou kazetou (Schlake, Bode, 1994; Bethk, Sauer, 1997; Bouhassira et al., 1997; Seibler, Bode, 1997; Seibler et al., 1998; Feng et al., 1999; Baer, Bode, 2001). Stabilita integrátora je zabezpečená tým že, kazety majú na okraji heterotypické alebo obrátenné rozpoznávacíe sekvencie. RMCE sa najprv používal v bunkovej kultúre, neskôr aj na úrovni organizmu (Thomason et al., 2001; Shmerling et al., 2005).

2.2 IDGF3

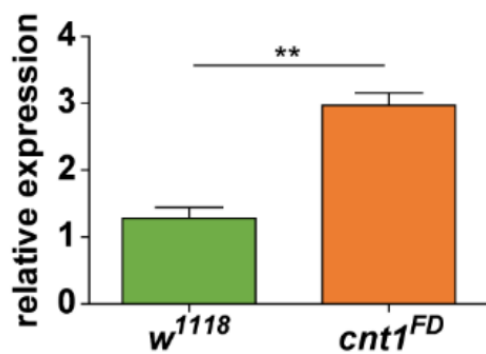
„Imaginal Disc Growth Factors“ (IDGF) sú polypeptidové rastové faktory objavené u bezstavcov (Kawamura et al., 1999). Všetky IDGF sa vyvinuli zo spoločného predka Polyneoptera, Condylgnatha a Holometabola (Žurovcová et al., 2019).

IDGF sú štruktúrou podobné chitinázam avšak, nemajú enzymatickú funkciu (Kawamura et al., 1999), čo je pôsobené pravé ich štruktúrou, kde v hydrolázovom aktívnom centre je situovaná aminokyselinová substitúcia kyseliny glutámovej. Stále však môžu slúžiť, ako lektíny a pútať určité sacharidové skupiny (Žurovcová et al., 2019). Patria do rodiny 18 glykosidových hydroláz, ktoré sú vytvorené pomocou $(\alpha\beta)_8$ barela. Avšak odlišujú sa extra slučkou medzi $\beta 4$ listom a $\alpha 4$ helixom (Varela et al., 2002).

Génová rodina IDGF u *Drosophila melanogaster* má 6 členov (Žurovcová, Ayala, 2002). *Idgf1* spolu s *Idgf2* sú umiestnené na ľavom ramene druhého chromozómu v úseku 36A (Vierstraete, 2004). *Idgf1* povzbudzuje proliferáciu a polaritu buniek imaginárnych terčikov *in vitro* (Kawamura et al., 1999). V článku z roku 2017 je napísané že, *Idgf2* chráni bunky pred bunkovou smrťou (Brož et al., 2017). *Idgf3* je lokalizovaný na druhom chromozóme, na 2L ramene v oblasti 36A. Proteín ktorý *Idgf3* produkuje je dôležitý ako ochrana organizmu pred hlístovcami. Tiež bolo dokázané, že gén *Idgf3* pomáha pri hojení rán, ako aj pri zrážaní hemolymfy (Kučerová et al., 2016). Dôležitú úlohu hrá aj v reprodukcií, kde spôsobuje poruchy plodnosti (Kučerová et al., 2016). *Idgf3* nulový mutant bol vytvorený pomocou mobilizácie mobilného elementu (Obrázek č. 7). V práci roku 2022 bolo odpublikované že, poruchy plodnosti u génu *Idgf3* môžu mať súvis s génom *cnt1* (Obrázok č. 8), pretože tento gén overexprimuje *Idgf3* a tiež, u neho už neplodnosť bola dokázaná (Maaroufi et al., 2022). Jediný gén z rodiny *Idgf* ktorý je lokalizovaný na pohlavnom chromozóme X v oblasti 9A je *Idgf4*. Nachádza sa najmä v zreých oocytoch. Exprimuje sa počas gastrulácie ako aj v bunkách žltka (Butler et al., 2003). *Idgf5* je na druhom chromozóme v oblasti 55C, bol však objavený ako posledný pomocou sekvencií v genómovej databáze (Zhu et al., 2004). *Idgf6* známi aj ako glykoprotein DS47. Je umiestnený na pravom ramienku 2. chromozómu a to v úseku 53D. DS47 je vyrábaný hemocytmi ale aj tukovým telieskom pričom po prekonaní bakteriálnej infekcie jeho množstvo klesá (Vierstraete et al., 2004).



Obrázok č. 7: Mutant *Idgf3^{LI}*. Vytvorenie mutantu *Idgf3^{LI}* bolo možné, pomocou mobilizácie P-elementu pGawB (Inzerčná línia NP2446). Tento element je situovaný po začiatku transkripcie génu *Idgf3* na +45 bp. Mutanty *Idgf3^{LI}* sú schopné života ako homozygoti. Vďaka strate *w+* markeru P-elementu ma duplikáciu 8 bp hneď na začiatku transkripcie génu *Idgf3*, čo spôsobilo úplnú stratu prepisu (Kučerová et al., 2016).



Obrázok č. 8: Relatívna expresia *Idgf3* v samčích semenníkoch mutantu *cnt1* (Maaroufi et al., 2022).

3 CIELE PRÁCE

- Overenie neplodnosti mutanta *Idgf3^{L1}*.
- Overenie overexpresných línií pre pokračovanie pokusu.
- Záchrana mutanta *Idgf3^{L1}* pomocou múch z línií *attP40 (Flyfos Idgf3)* a *attP40 (Flyfos IDGF3::*GFP*)*.

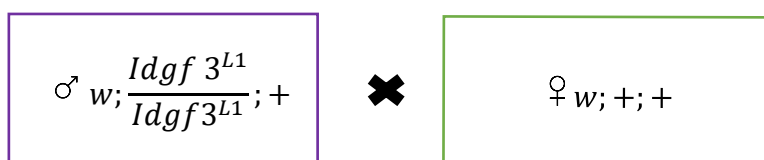
4 METODIKA

4.1 Kultivácia *D. melanogaster*

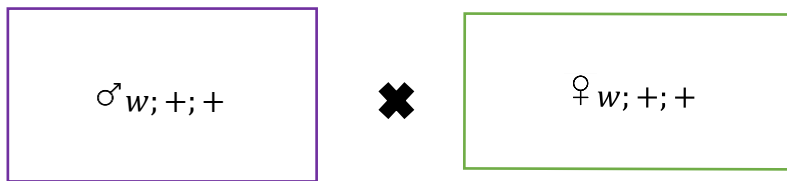
Octomilky boli chované v laboratórnych podmienkach pri 25 °C. Iba v prípade potreby predĺženia cyklu octomilky boli preložené do inkubátora s 18 °C. Samotné muchy s genotypmi (Príloha č. 1) boli uchovávané v sklenených vialkách, ktoré boli uzavreté vatou. Vo vialkách sa nachádzala predpripravená potrava. Tá bola zložená s 8% kukuričnej múky 5% cukru, 1% agar, 4% kvasnice, 0,2% konzervant metyl paraben. Do nej muchy nakládli vajíčka a slúžila aj ako potrava pre larvy, tak aj pre dospelé jedince. Octomilky boli prenášané zo starej vialky do novej po 14 dňoch.

4.2 Test fertility samcov

Pre test bolo treba rozlíšiť samca octomilky od samičky. Pre test boli vyzbierané panny octomiliek w^{1118} . Kvôli cirkadiálnym rytmom boli zbierané z rána. V našom pokuse boli použité 3 dni staré samce kvôli efektívnosti ich párenia. Samci mali buď experimentálny či kontrolný genotyp (Obrázok č. 9, 10) a boli vždy krížení so samicami z kontrolným genotypom w^{1118} . Výsledok experimentu teda ovplyvňovala plodnosť samcov. V jednej vialke sa vždy nachádzal jeden samec a päť samíc. Potom boli muchy sledované 90 minút a zaznamenalo sa s koľkými samičkami sa samček spáril (pre výpočet frekvencie párenia) a ako dlho párenie prebiehalo (pre výpočet dĺžky kopulácie). Následne boli samičky nechané vo vialke 24 hodín so samcom. Na ďalší deň došlo k oddeleniu samičiek od samca. O deň neskôr boli spočítané, ktoré samičky od konkrétneho samca nakládli vajíčka. O ďalších 24 hodín bolo zistené koľko samičiek bolo oplodnených a teda došlo k vyliahnutiu lariev.



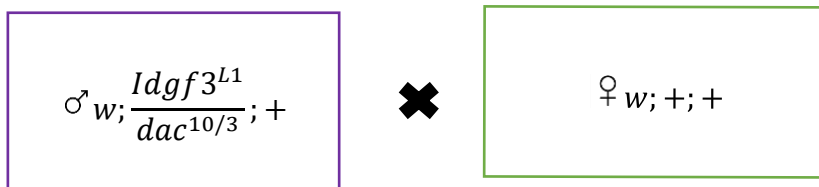
Obrázok č. 9: Schéma kríženia mutanta *Idgf3* a virginálnymi samicami s kontrolných múch.



Obrázok č. 10: Schéma kríženia kontrolných samcov s viginálnymi samicami.

Heteroalelická kombinácia (kombinácia mutácie aj delecie).

Pre toto kríženie boli zbieraný samci s genotypom (Obrázok č. 11) s viditeľným markerom polovičného oka ako aj bez kučeravých krídel. Pre test fertility samcov boli použité tie isté podmienky ako u predchádzajúcich.



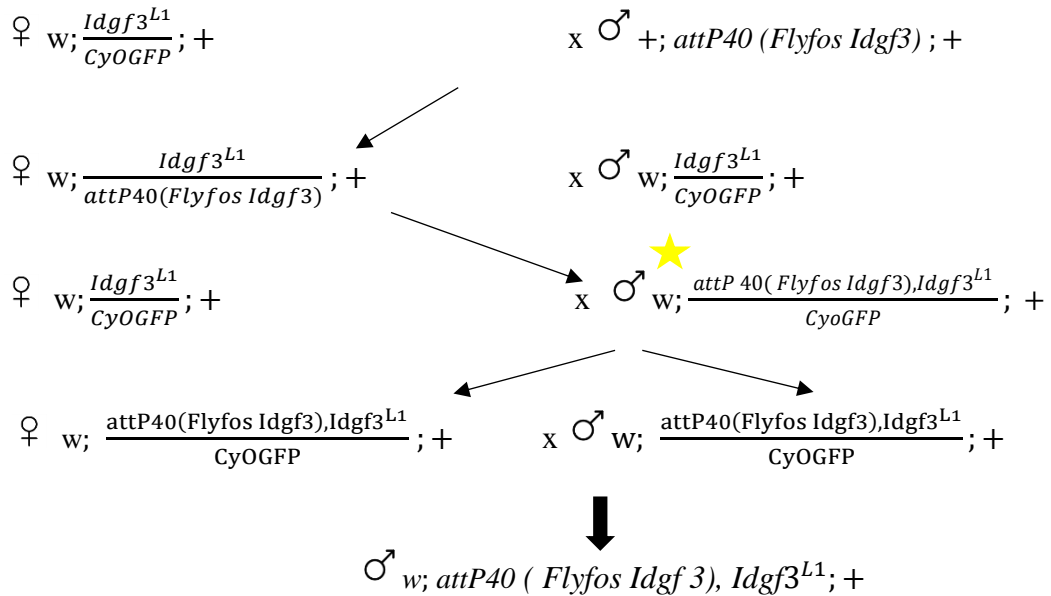
Obrázok č. 11: Schéma kríženie heteroalelickej kombinácie so samicami s kontrolných múch.

Test záchrany

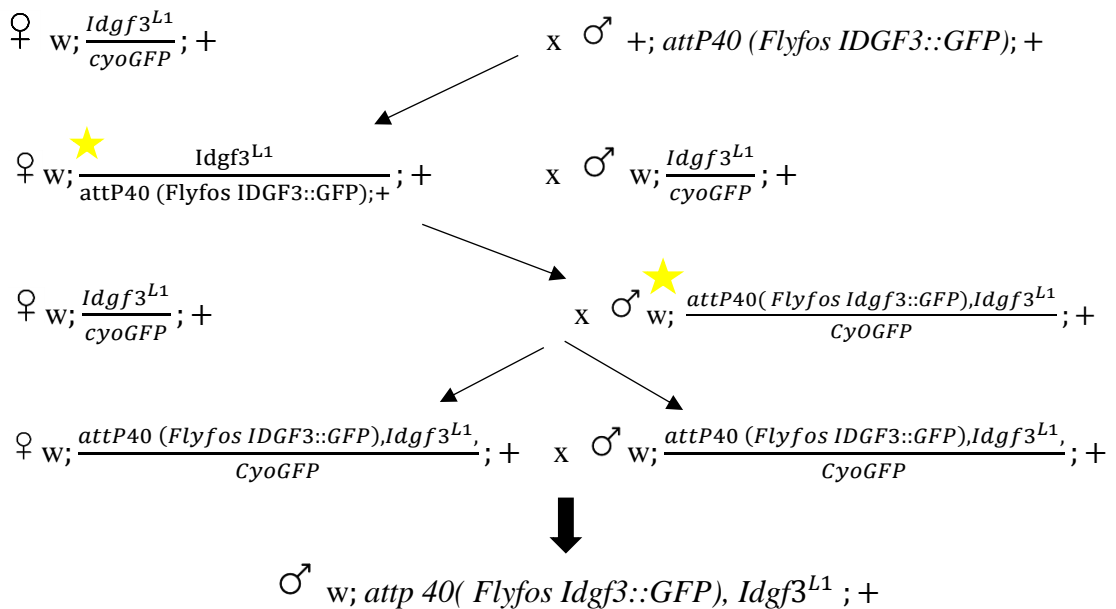
4.3 Záchrana neplodného mutanta

Pre tento test bolo použité kríženie (Obrázok č. 12 a Obrázok č. 13). Všetky muchy boli uspané CO₂ vďaka ktorému bolo možné rozoznať samca-samičku (pannu) a tiež markery dôležité pre kríženie. Najprv boli vyzbierané panny samičiek z mutanta $w; Idgf3^{L1}/CyOGFP; +$. Samičky mutanta ponechané krížiť sa so samcom $+; attP40 (Flyfos Idgf3); +$ alebo $+; attP40 (Flyfos Idgf3::GFP); +$. Následne z tohto kríženia boli vybrané samičky ktoré boli skontrolované pod mikroskopom či spĺňajú kritéria pre ďalšie kríženie (červeno fluorescenčne svietiace omatidia, bez kučeravých krídel) ich súrodenci samci s rovnakým genotypom boli použiti na overenie pre PCR. K samičkám ktoré splnili podmienky boli pridaný samci s balancerom na druhom chromozóme. Z tohto kríženia boli vybraný samci taktiež s kučeravými krídlami, červeno fluorescenčne svietiacimi omatidiami a k nim boli pridané opäť samičky s balancerom na druhom chromozómu. Samci boli následne overení PCR (označení hviezdičkou). Potomkovia s rovnakým genotypom $w; attP40(Flyfos Idgf3), Idgf3^{L1}/CyOGFP; +$ alebo $w; attP40$

(*Flyfos Idgf3::GFP*),*Idgf3^{L1}/CyOGFP*; + boli skrížený dokopy. Výsledný samec už s genotypom *w; attP40 (Flyfos Idgf3), Idgf3^{L1}*; + alebo *w; attP40 (Flyfos Idgf3::GFP), Idgf3^{L1}*; + bol použitý pre následný test fertility s tých istých podmienkach ako mali samci *w¹¹¹⁸*, heteroalelická kombinácia a mutant.



Obrázok č. 12: Schéma kríženia múch so záchrany $+; attP40 (Flyfos Idgf3); +$



Obrázok č. 13: Schéma kríženia múch so záchrany $+; attP40 (Flyfos Idgf3::GFP); +$

4.4 Izolácia DNA

4.4.1 Purifikácia DNA pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Bol použitý modifikovaný protokol pre izoláciu DNA z hmyzu, za pomoci homogenizácie plastovým tľčíkom v skúmavke. 1 jedinec *D. melanogaster* bol daný do vysterilizovanej 1,5 ml mikroskúmavky. Živé muchy boli ponechané 3 minúty na ľade, aby sa prestali hýbať. K organizmu, ktorý sa nachádzal v mikroskúmavke, bolo pridaných 180 µl pufru 1× PBS. Potom došlo k homogenizácii s pomocou ručného tľčiku. Ďalej bolo pridaných 20 µl proteínázy K a 200 µl pufru AL. Mikroskúmavka bola zamiešaná a daná do termobloku vyhriateho na 56°C na 10 minút. Následne bolo ku vzorke pridaných 200 µl etanolu (98%). Obsah mikroskúmavky bol premiestený do skúmavky so silikonovou membránou, ktorá bola súčasťou kitu (DNeasy Mini spin Column) a bolo pokračované podľa štandardného protokolu. Elucia bola urobená do 100 µl AE pufru s 2× opakovanou elúciou pre získanie maximálneho výťažku a zvýšenie koncentrácie DNA. Výsledok koncentrácie DNA bol overený na NanoDrope 2000 (Thermo scientific) pri 260 nm. Vzorky boli uskladnené pri 4 °C na ďalšiu časť reakcie.

4.5 PCR

4.5.1 PCR s použitím Dream Taq polymerázou

Všetky komponenty potrebné pre reakciu boli rozmrazené, premiešané na cetrifuge. Následne bola z ich namiešaná reakcia v ktorej bolo 1× DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,5 µl IGF14 a GROR5 primeru (koncentrácia 5 µM). Primery sú uvedené v Príloha č. 2. Potom bol pridaný 1 µl templátovej DNA. Taktiež bola namiešaná beztemplátová kontrola, v ktorej bola mesto templátovej DNA použitá sterilizovaná destilovaná voda. Skúmavky boli premiešané a stočené následne vložené do termocyklieru Gene Pro Thermal Cycler (BIOER), pričom annealingová teplota bola navrhnutá podľa použitých primerov.

Program použitý Thermo Cycleru bol nasledovný:

Predenaturacia: 94 °C na 1 minútu

Denaturacia: 95°C na 30 sekund

„Annealing“: 55°C na 30 sekund

Extenzia: 72°C na 1 minútu

} 35 cyklov

Postextenzia: 72°C na 5 minút

Uchovanie vzoriek: 16 °C

Vzorky boli následne použité na elektroforézu.

4.5.2 PCR s použitím TaKaRa Ex Taq polymerázou pre dlhé produkty

Komponenty pre polymerazovú reťazovú reakciu boli premiešané a stočené na centrifuge. Boli použité 1× Ex Taq pufru (TaKaRa), 0,2 mM dNTP Mix (TaKaRa), 0,2 µg/µl BSA, 0,025 U/µl enzemu Ex Taq , 0,8 µM IGF13b a GROR5 primeru (Príloha č. 2), 1 µl templátovej DNA. U kontrolnej vzorky bola namiesto DNA pridaná ddH₂O. Vzorka prešla následným premiešaním a stočením v centrifúge ako aj vložením do Gene Pro Thermal Cycler (BIOER).

Tam už bol nastavený nasledovný program:

Predenaturacia: 95 °C na 3 minúty

Denaturácia: 95 °C na 30 sekúnd

„Annealing“: 57 °C 30 sekúnd

Elongacia: 72 °C na 3,5 minúty

Postelongacia: 72 °C na 5 minút

Uchovanie vzoriek: 16 °C

} 35 cyklov

Pred elektroforézou boli vzorky ofarbené pomocou 6x loading Dye Blue (NEB).

4.6 Elektroforéza

Pre overenie vzoriek bola použitá elektroforéza. Pripravený bol 1,5% agarozový gél. Z 0,45 g agarózy (Lonza) a 30 ml 1× TAE pufru. Namiešaný roztok TAE a agarózy bol potom rozpustený v mikrovlnke za častého premiešania a kontroly. Neskôr bol schladený tečúcou vodou. Do roztoku bol pridaný 1 µl etidium bromid (15 mg/ml). Výsledná tekutina bola naliata do vaničky kde bol pridaný hrebeň. Gél bol nechán tuhnúť 20-30 minút. Následne bol hrebeň z vaničky vybraný. Gél bol pretočený o 90 °C vľavo aby jamky boli hore. Potom došlo k zaliatu gélu 1× TAE pufrom, tak aby hladina nad gélom bola zhruba 5 mm. Vzorky vybrané z Thermo Cycleru boli pridané do gélu každý do 5 µl. Taktiež bol pridaný do jednej

jamky 5 μ l veľkostného štandardu „GeneRuler“ 100 bp (Thermo Scientific) alebo 1 Kb DNA „ladderu“ (NEB). Ktorý určoval veľkosť fragmentu použitej DNA. Po pridaní všetkých vzoriek bol k elektroforetickej vaničke pripojený zdroj s elektrickým napätím (PowerPac Basic Power Supply BIO RAD). Miera napätia závisela od veľkosti danej použitej vaničky. Následné bol gél s vaničky vybraný a overený pomocou transiluminátoru SMART5 (VWR).

4.7 Izolácia RNA

Homogenizácia buniek, trizolová izolácia

Do každej skúmavky 1,5 ml bolo nazbieraných 15 kusov rovnako starých *D.melanogaster*. Skúmavky boli nechané na ľade kým sa muchy neprestali hýbať. Následne boli muchy spolu s tekutým dusíkom a 400 μ l Trizolu (Thermo Fisher Scientific) homogenizované tĺčikom v mažiariku. Vzniknutá zmes bola presunutá naspäť do mikroskúmavky a na ľad. Po homogenizácii bolo pridaných 600 μ l Trizolu a premiešané na vortexe (FVL-2400N Combi-Spin, Biosan). Vzorka bola inkubovaná 10 minút pri pokojovej teplote, kvôli disociácii nukleoproteinových komplexov. Ďalej bolo pokračované podľa štandardného protokolu na izoláciu RNA pomocou Trizolu. Po precipitácii bol získaný pelet s RNA rozpustený v 100 μ l DEPC H₂O.

Kit NuCleo spin „RNA“ (Macherey-Nagel)

Ku 100 μ l vodného roztoku RNA z minulého kroku bolo napipetovaných 600 μ l zmesi (300 μ l pufru RA1 + 300 μ l 100% etanolu). Potom bola celá tekutina z mikroskúmavky presunutá do priloženej mikroskúmavky z kitu (NucleoSpin RNA Column). Následne bola vzorka centrifugovaná pri 0,5 minúty pri 11 000 g za pokojovej teploty a ďalej bolo postupované podľa štandardného protokolu vrátane ošetrenia RNA na kolónke pomocou DNázy. Elucia bola urobená do 40 μ l sterilnej vody bez RNáz (súčasťou kitu), pre vyšší výťažok a koncentrácii bola elucia opakovaná do rovnakého objemu. Výsledok koncentrácie RNA bol overený na NanoDrope 2000 (Thermo scientific) pri 260 nm. Vzorky boli uskladnené pri -80 °C na ďalšiu časť reakcie.

4.8 Reverzná transkripcia

Na reverznú transkripciu bol použitý návod z protokolu: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific). Pred samotnou reakciou bolo vypočítané množstvo teplákovej RNA ktoré je potrebné k reverznej transkripcii na 1000 ng, pričom k tomuto množstvu RNA bol pridaný 1 μ l oligo (dT)₁₈ primer. Celá reakcia mala objem 20 μ l a inkubácia a inaktivovanie prebiehala na termocykleri Gene Pro Thermal Cycler (BIOER).

4.9 Kvantitatívna PCR

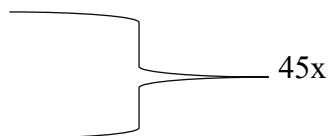
Pre reakciu boli použité 1 \times „SolisBiodyne“ Mix, Rack1, Idgf3, rp49 primer 0,25 μ M (Príloha č. 3), templát s objemom 5 μ l, ktorým bol produkt s reverznej transkripcie 25 \times riedený alebo ddH₂O (u beztemplátovej kontroly). Reakcia bola namiešaná v 20 μ l. Následne došlo k premiešaniu vzorky a vloženiu do termocykleri Rotor Gene Q (QIAGEN) v ktorom bol nastavený program:

Predenaturácia (Inicializácia Hs Taq): 95 °C na 15 minút

Denaturácia: 95 °C na 15 sekúnd

„Annealing“: 60 °C na 30 sekúnd

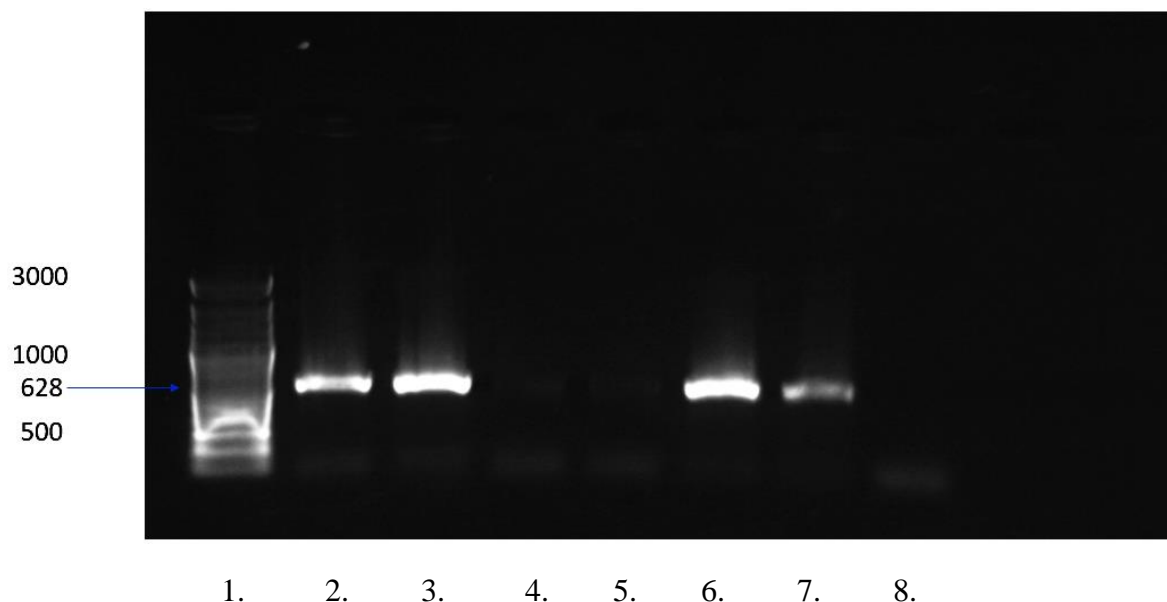
Elongácia: 72 °C na 20 sekúnd



5 VÝSLEDKY

5.1 Overenie mutanta *Idgf3^{L1}* pomocou polymerazovej reťazovej reakcie

Pred samotným začiatkom experimentu bol overený mutant *Idgf3^{L1}*. Pomocou izolácie DNA podľa štandardného kitu, PCR s Dream Taq polymeráziou a následnou elektroforézou. Z (Obrázok č. 14) je známe, že *Idgf3^{L1}* je mutant. Došlo k naviazaniu oboch primerov a tým bol badateľný ako heterozygot *Idgf3* tak aj pozitívna kontrola. U homozygota *Idgf3* k naviazaniu primeru IGF14 nedošlo. Pretože na mieste kde je promotor primer nemal kde nasadnúť. Na jeho začiatku je tzv. vlásenka vzniknutá rekombináciou (P- element inzercia+delecia v leader sekvencií) (Obrázok č. 7). Očakávaný produkt primerov IGF14 a GROR5 (628 bp).

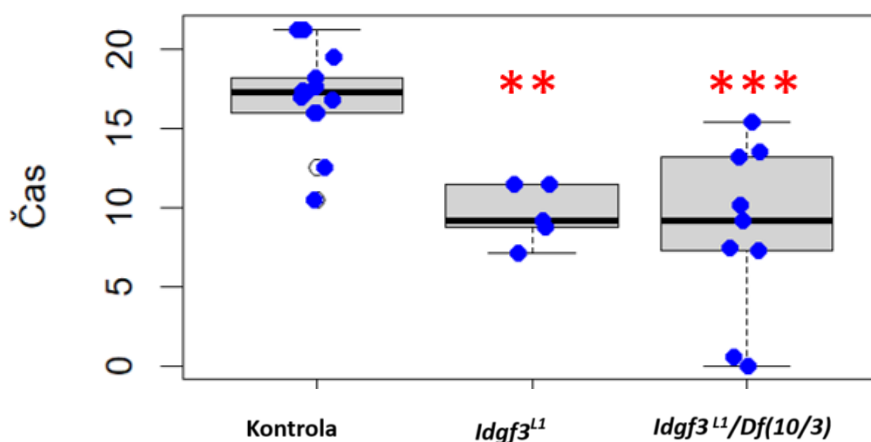


Obrázok č. 14: Overenie mutanta

1.ladder (100bp); 2.,3. Heterozygot *Idgf3^{L1}*; 4.,5. Homozygot *Idgf3^{L1}*; 6.,7. *w¹¹¹⁸* +; + (pozitívna kontrola); 8. beztemplátová kontrola.

5.2 Kopulačný test

V tomto teste bol do každej vialky daný jeden samec. K nemu bolo pridaných päť samiciek z kontroly. Následne bol nameraný čas kopulácie počas 90 minút u každého samca. Pre výpočet bolo použité Rstudio, v ktorom sa najprv vypočítal Bartlettov test. Hodnota testovej štatistiky bola 5,9414 a hladina signifikancie 5,127% pri dvoch stupňoch voľnosti. Homogenita bola splnená, preto bola použitá parametrická ANOVA. Hladina signifikancie 0,00598% , výsledok testovej štatistiky bol 14,98. Aby sme zistili aký veľký je rozdiel medzi kopuláciou u mutantu a heteroalelickej kombinácie voči kontrole, bol použitý TukeyHSD. Tukeyho test ukazuje že, dĺžka kopulácie mutantov je významne nižšia oproti kontrole, hladina signifikancie je 0,35096%. Taktiež sa líšia heteroalelická kombinácia a kontrola 0,00996%. Ale nie je rozdiel medzi heteroaleickou kombináciou a mutantom. Výsledky sú znázornené na (Obrázok č. 15). Mediány hodnôt a vypočítaná štatistika sú uvedené v Tabuľke 1.



Obrázok č. 15: Dĺžka kopulácie samcov. Ako pozitívna kontrola boli použité muchy s w^{1118} , ďalej mutantný samec $Idgf3^{L1}$ ako aj jeho heteroalelická kombinácia $Idgf3^{L1}/Df(10/3)$. Mieru významnosti rozdielu dĺžky kopulácie medzi experimentálnymi muchami a kontrolou označujú hviezdičky ** $p < 1\%$, *** $p < 0,1\%$.

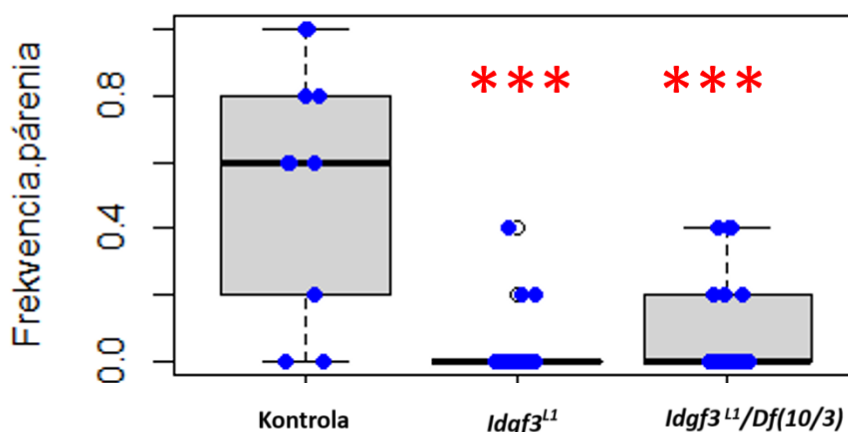
Tabuľka č. 1: Tabuľka hodnôt kopulácie.

Genotyp	Medián	p-value*
Kontrola	0:17:21	---
<i>Idgf3^{L1}</i>	0:09:13	0,35096%
<i>Idgf3^{L1}Df(10/3)</i>	0:09:11	0,00996%.

Z tabuľky č. 1 je vidno že mutant *Idgf3^{L1}* a jeho heteroalelická kombinácia *Idgf3^{L1}Df(10/3)* sa v dĺžke kopulácie nelíšia. Pre výpočet mediánu bol použitý excel. Toto tvrdenie potvrdzuje aj Tuckeyho test ktorý zistil že medzi heteroalelickou kombináciou a mutantom nie je signifikantný rozdiel. Hladina signifikancie je 82,2009 %. P-value sú hodnoty štatistiky voči kontrole.

5.3 Frekvencia párenia sa samcov

V tomto teste bolo sledované s koľkými s piatich samičiek sa je schopný samec spáriť počas 90 minút. Pre spracovanie výsledkov bol použitý Bartlettov test. Hodnota testovej štatistiky bola 41,429 a hladina signifikancie 0,0000001% pri dvoch stupňoch voľnosti. Nulovú hypotézu o homogenite variancií zamietame. Následne bola použitá neparametrická obdoba jednocestnej ANOVy (Kruskal-Wallisov test). Hodnota testovanej štatistiky 25,018 a hladina signifikancie 0,00034% pri dvoch stupňoch voľnosti. Wilcoxonov test bol použitý pre zistenie miery významnosti akej sa línie líšia. Mutant sa signifikatne líši od kontroly 0,00021% Hetroalelická kombinácia sa taktiež výrazne líši od kontroly 0,054 %.

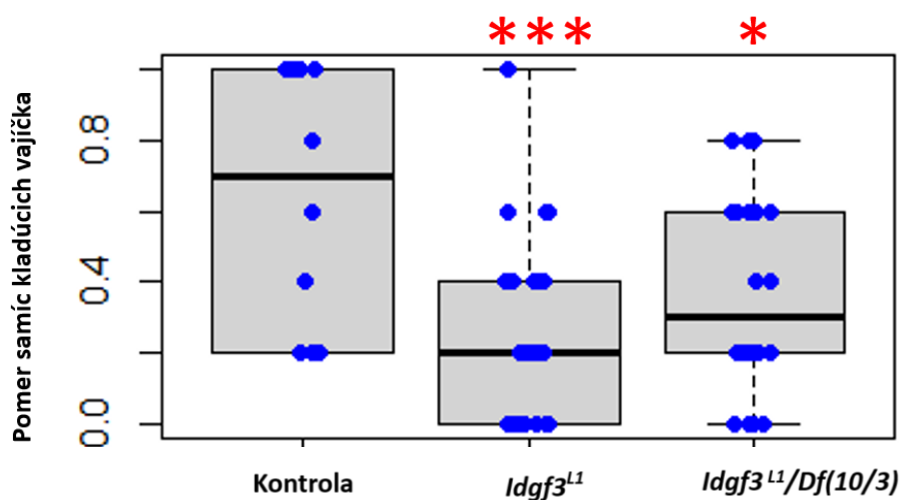


Obrázok č. 16: Frekvencia párenia samcov. Prví boli použitý samci z w^{1118} ako pozitívna kontrola ďalej mutantný samec $Idgf3^{L1}$ a heretoalelická kombinácia $Idgf3^{L1}/Df(10/3)$. Význanosť rozdielu medzi kontrolou, mutantom a heteroalelickou kombináciou označujú hviezdičky nad grafom *** $p < 0,1\%$.

Z výsledkov je zjavné že mutantný samec sa počas 90 minút bol schopný spáriť maximálne s dvoma samičkami (Obrázok č. 16). Heteroalelická kombinácia sa taktiež stihla spáriť maximalne s dvoma samičkami z jednej vialky.

5.4 Pomer samíc kladúcich vajčka

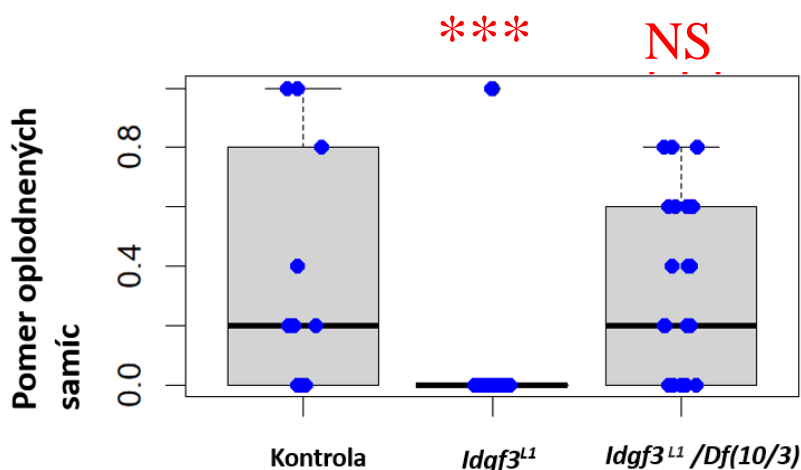
Po teste kopulácie a fertility bolo päť samičiek ponechané s jedným samcom 24 hodím v spoločnej vialke. Do 24 hodín došlo k oddeleniu každej samičky do vlastnej vialky. Samička nakladla vajčka. Pre spracovanie výsledkov koľko samičiek od jedného samca nakladlo vajčok bol použitý Bartlettov test. Hodnota testovej štatistiky bola vypočítaná 3,123 a hladina signifikancie 20,98% pri dvoch stupňoch voľnosti. Homogenita bola splnená, preto bola použitá parametrická ANOVA. Hladina signifikancie 0,0709% , výsledok testovej štatistiky bol 8,17. Na základe ktorej vieme že, každá samička od iného samca nakládla rozdiely počet vajčok. Ale na to aby sme zistili jednotlivý rozdiel medzi nakladenými vajčkami od rôznych samcov bol použitý TukeyHSD. Z testu bolo zistené, že pomer nakladených vajčok sa najviac líši medzi mutantom a kontrolou ktorej hladina signifikancie je 0,051% Taktiež medzi heteroalelickou kombináciu a kontrolou 3,879%. Ale nelíši sa medzi heteroaleickou kombináciu a mutantom 18,727%. Výsledky sú znázornené na (Obrázok č. 17).



Obrázok č. 17: Pomer samíc kladúcich vajčka. Ako pozitívna kontrola boli použité samci z w^{1118} , mutantný samec $Idgf^{L1}$ a heteroalelická kombinácia $Idgf3^{L1}/Df(10/3)$. Mieru signifikancie vyjadrujú hviezdičky nad grafom * $p < 5\%$, *** $p < 0,1\%$.

5.5 Pomer oplodnených samíc

Samice boli po 24 hodinách strávených so samcom oddelené do vlastných vialiek. O deň neskôr boli spočítané nakladené vajíčka (Obrázok č. 17). Následne koľko sa z nakladených vajíčok sa vyliahlo v larvu (Obrázok č. 18). Zo zozbieraných hodnôt bol vypočítaný Bartlettov test. Testová štatistika bola vypočítaná 13,428 a hladina signifikancie 0,121% pri dvoch stupňoch voľnosti. Tým že nie je splnená homogenita variácií nastupuje neparametrická obdoba jednocestnej ANOVy teda Kruskal-Wallisov test. Testová štatistika mala hodnotu 25,216 a hladina signifikancie 0,00035% pri dvoch stupňoch voľnosti. Pre zistenie miery významnosti rozdielu bol použitý Wilcoxonov test. Wilcoxonov test ukázal signifikantný rozdiel medzi kontrolou a mutantom 0,00052% ako aj medzi mutantom a heteroalelickou kombináciou 0,00032%.

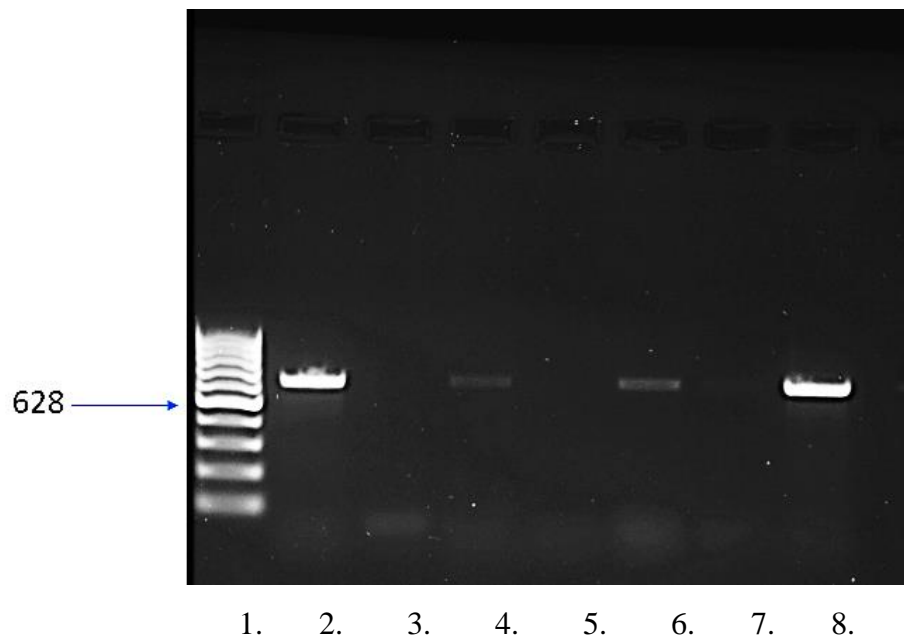


Obrázok č. 18: Pomer oplodnených samíc. Ako kontrola boli použité samce z w^{1118} , ďalej mutantný samec $Idgf^{L1}$ a heretoalelická kombinácia $Idgf3^{L1}/Df(10/3)$. Mieru signifikancie označujú hviezdičky *** $p < 0,1\%$.

Heteroalelická kombinácia a kontrola sa nelíšia. Z čoho vyplýva že mutant nie je plodný. Samičky vajíčka nakládli ale nevyliarli sa larvy, iba v jednom prípade z 33 pozorovaných jedincov, to môže byť spôsobné chybou pri výbere panny/nepanny.

5.6 Overenie heteroalelickej kombinácie

Na pokus boli použítí mutanti $w; dac^{10/3} / CyO; +$ ktorí majú deleciiu v *Idgf* 1, 2, 3 génoch a tiež im chýba časť génu *dachshund*. Samci $w; dac^{10/3} / CyO; +$ boli krížení so samičkami $w; Idgf3^{L1} / Idgf3^{L1}; +$. Následne boli z potomstva vyzbieraní samci s polovičným okom a „necurly“ krídlami. Ktorý boli použítí na všetky predom spomínané pokusy fertility. Heteroalelická kombinácia $w; Idgf3^{L1} / dac^{10/3}$ bola overená pomocou PCR. Tá vyvrátila možné následné použitie pretože niektoré muchy niesli *Idgf3*. Na snímke z transimimulátora (Obrázok č. 19) je vidieť, že polovica testovaných much nesie neporušenou sekvenciu *Idgf3* a polovica ju nenesie. Je možné že dlhým skladovaním bola línia znehodnotená kontamináciou a následnou rekombináciou so susedným markerom polycomb.

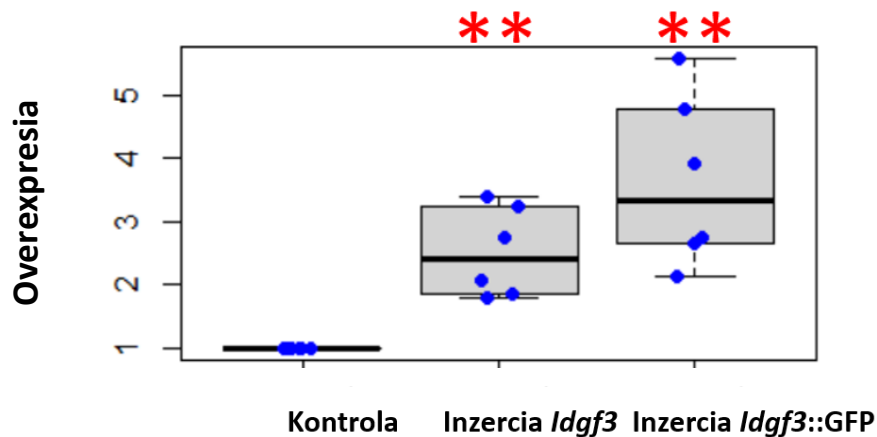


Obrázok č. 19: Overenie heteroalelickej kombinácie.

1.ladder (100bp); 2. $w^{1118} +; +$ (pozitívna kontrola); 3. beztemplátová kontrola; 4.,5.,6.,7. $w; Idgf3^{L1} / Idgf3^{L1}; +$; 8. $w^{1118} +; +$ (pozitívna kontrola).

5.7 Overenie overexpresných línií pre záchranu mutanta pomocou Real-time qPCR

Pre záchranu boli použité línie múch vytvorené pomocou *Flyfos* konštruktú. Muchy obsahujú dva krát viac kópií *Idgf3* genu ako kontrolná mucha divokého typu. Pomocou qPCR bolo overené ak produkujú viac *Idgf3* transkriptov. Muchy obsahovali natívny *Idgf3* na druhom chromozóme na ľavom ramienku v pozícii 36A1 a *Flyfos* inzerciu *Idgf3* taktiež na druhom chromozóme, ľavé ramienko 25C6. Následne boli dáta spracované pomocou RStudia. Pre zistenie homogenity bol použitý Bartlettov test. Hladina signifikancie bola 0,000000000000022% pri dvoch stupňoch voľnosti. Vďaka čomu zamietame nulovú hypotézu o homogenite variácií. Následne došlo k použitiu neparametrickej obdoby jednocestnej ANOVy (Kruskal-Wallisov test). Testová štatistika mala hodnotu 12,903 a hladina signifikancie 0,1578% a dva stupne voľnosti. Kruskal Wallisov test odhalil rozdiel medzi skupinami. Pre zistenie miery významnosti rozdielu bol použitý Wilcoxonov test. Ako je zjavné z grafu línie použité pre už spomínanú záchranu sa výrazne líšia od kontroly. Hladina signifikancie pre odlišnosť línií s *Flyfos* konštruktom oproti kontrole divokého typu bola 0,28%.

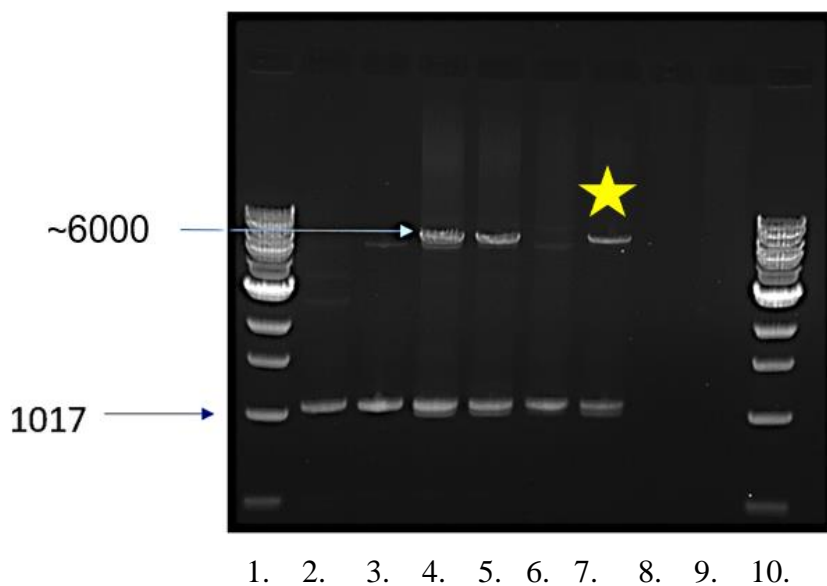


Obrázok č. 20: Graf overexpresie línií pre záchranu mutanta. Pre kontrolu bola ako zvyčajne použitá mucha z w^{1118} ktorá bola porovnávaná s $+$; $attP40 (Flyfos Idgf3); +$ $+$; $attP40 (Flyfos Idgf3::GFP); +$. Miera signifikancie výsledku je vyjadrená hviezdikami ** $p < 1\%$.

Línie s *Flyfosom* preto môžeme použiť nie len ako záchranné konštrukty ale aj na overexpresiu, pretože nadprodukujú *Idgf3* (Obrázok č. 20).

5.8 Rekombinačné kríženie pre overenie múch so záchranným konštruktom

Pre overenie úspešnej rekombinácie medzi *Idgf3^{L1}* a *Flyfos* bol najprv pomocou mikroskopu overený dsRed marker. Následne bola mutácia detekovaná pomocou PCR. Očakávaný výsledok veľkostného štandardu primerov bol 1017bp ak *Idgf3^{L1}* pochádza z divokej formy alebo so záchrany. Ak je mutovaný *Idgf3^{L1}* blízko translačného štartu rekombinantného P-elementu (Obrázok č. 7) veľkosť je ~6 Kb. Na snímku z transilátora je vidieť že, kríženie ktorej výsledkom je záchrana neplodných samcov bolo na 50% úspešné. Mucha u ktorej záchrana prebehla *w; attP40 (FlyfosIdgf3::GFP), Idgf3^{L1}/Cyo GFP ; +* (označená hviezdou) získala na jednom chromozóme *Flyfos* aj *Idgf3^{L1}* (Obrázok č.21). Boli použité primery IGF13b a GROR5.

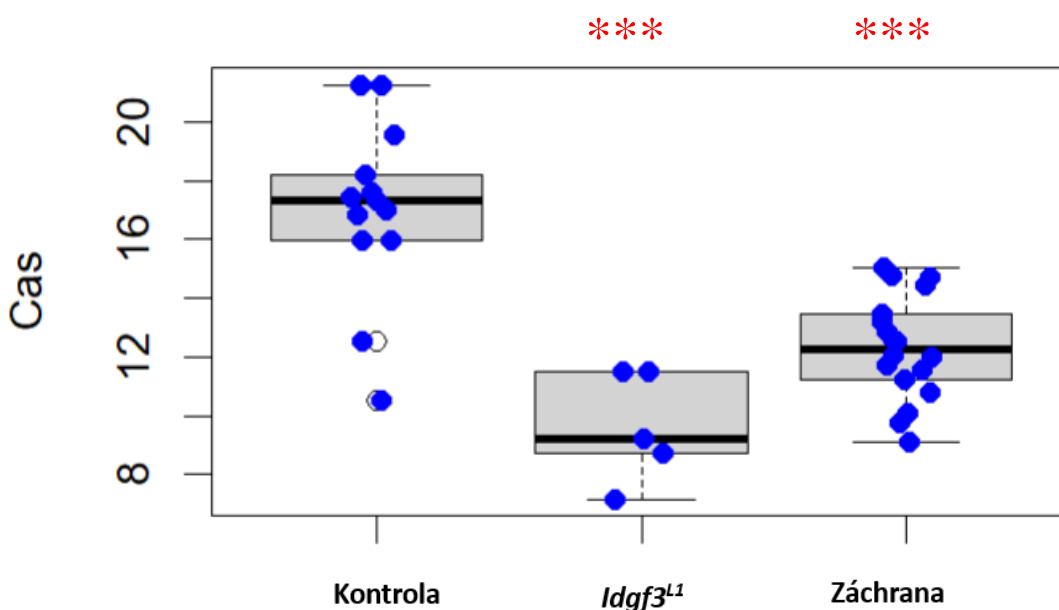


Obrázok č. 21: Overenie záchrany neplodných samcov.

1. ladder (1Kb); 2.,3. *w¹¹¹⁸ +; +* (pozitívna kontrola); 4.,5. *w; $\frac{Idgf3^{L1}}{attP40 (Flyfos Idgf3::GFP)}$; +; +*; 6. *w; $\frac{attP40 (Flyfos Idgf3), Idgf3^{L1}}{CyoGFP}$; +; +*; 7. *w; $\frac{attP40 (Flyfos Idgf3::GFP), Idgf3^{L1}}{GyoGFP}$; +; +*; 8.,9. beztemplátová kontrola; 10., ladder (1Kb).

5.9 Kopulačný test samcov so záchranným konštruktom

V teste bol do každej vialky vložený jeden samec, k nemu bolo pridaných päť panien samičiek z kontroly. Potom bol zaznamenaný čas kopulácie u každého samca, počas 90 minút sledovania. Pre výpočet bolo použité Rstudio, v ktorom bola overená najprv homogenita pomocou Bartlettovho testu. Hodnota testovej štatistiky bola 4,2233 a hladina signifikancie 12,1% pri dvoch stupňoch voľnosti. Homogenita bola splnená, preto sa na ďalší výpočet použila parametrická ANOVA. Hladina signifikancie bola 0,0000286% , výsledok testovej štatistiky mal hodnotu 42,62. Aby sme zistili aký veľký je rozdiel medzi kopuláciou u mutanta a záchrany voči kontrole bol použitý TukeyHSD. Tukeyho test ukazuje že, dĺžka kopulácie mutanta sa líši od kontroly, hladina signifikancie je 0,00020%. Taktiež sa líšia záchrana a kontrola 0,00089% záchrana a mutant sa však významne nelíšia. Výsledky sú znázornené na (Obrázok č. 22). Mediány hodnôt a vypočítaná štatistika sú uvedené v Tabuľke 2.



Obrázok č. 22: Kopulačný test samcov so záchranným konštruktom. Ako kontrola boli použité samci z w^{1118} , ďalej mutantný samec $Idgf^{L1}$ a záchrana s konštruktom $Flyfos$ a GFP modifikovaným $Idgf3$. Mieru signifikancie označujú hviezdičky *** $p < 0,1\%$.

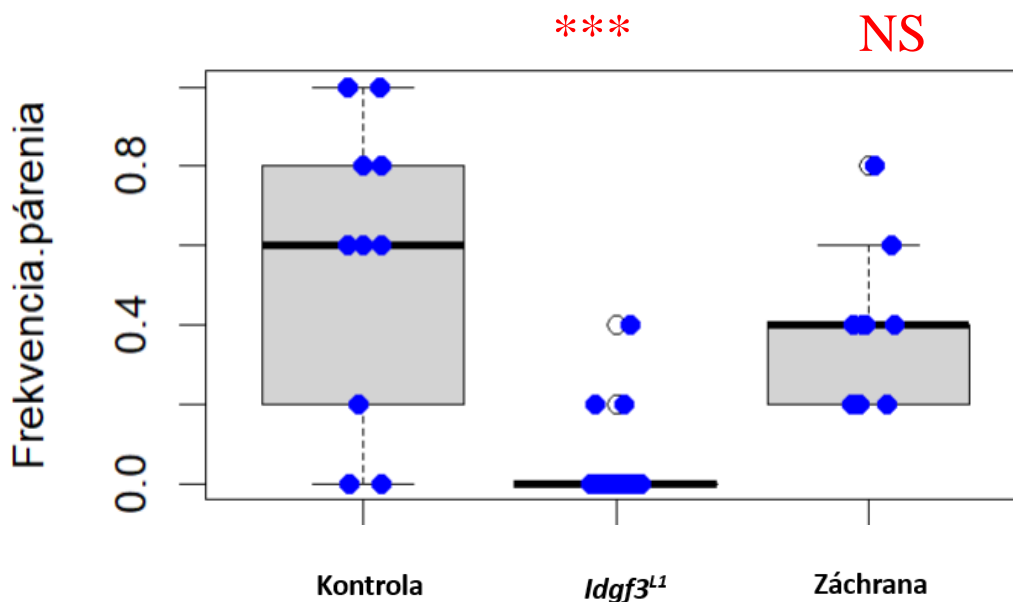
Tabuľka č. 2: Tabuľka hodnôt kopulácie múch so záchranným konštruktom.

Genotyp	Medián	p-value*
Kontrola	0:17:21	---
<i>Idgf3^{L1}</i>	0:09:13	0,00020%
Záchrana	0:12:16	0,00089%.

Z tabuľky č. 2 je vidieť že samce so záchranným genotypom oproti mutantovi *Idgf3^{L1}* majú dĺžku kopulácie približne o 3 minúty dlhšie, tento rozdiel, ale nie je signifikantný. Pre výpočet mediánu bol použitý excel a pre potvrdenie RStudio. P-value sú hodnoty štatistiky voči kontrole.

5.10 Frekvencia párenia sa samcov so záchranným konštruktom

V teste bolo sledované s koľkými s piatich samičiek sa je schopný samec spáriť počas 90 minút sledovania. Výsledky boli spracované RStudiom kde bola najprv overená homogenita pomocou Bartlettovho testu. Hodnota testovej štatistiky bola 39,295 a hladina signifikancie 0,00000029% pri dvoch stupňoch. V ďalšom kroku pre nesplnenie homogenity bola použitá neparametrická obdoba jednocestnej ANOVy (Kruskal-Wallisov test). Testová štatistika mala hodnotu 33,817 a hladina signifikancie 0.0000045% pri dvoch stupňoch voľnosti. Wilcoxonov test bol použitý pre zistenie miery významnosti akej sa línie líšia. Mutant sa signifikatne líši od kontroly 0,00021%, ako aj záchrana od mutanta 0,0000068 % avšak medzi záchranou a kontrolou nie je signifikantný rozdiel. Výsledky sú ukázané na (Obrázok č. 23).

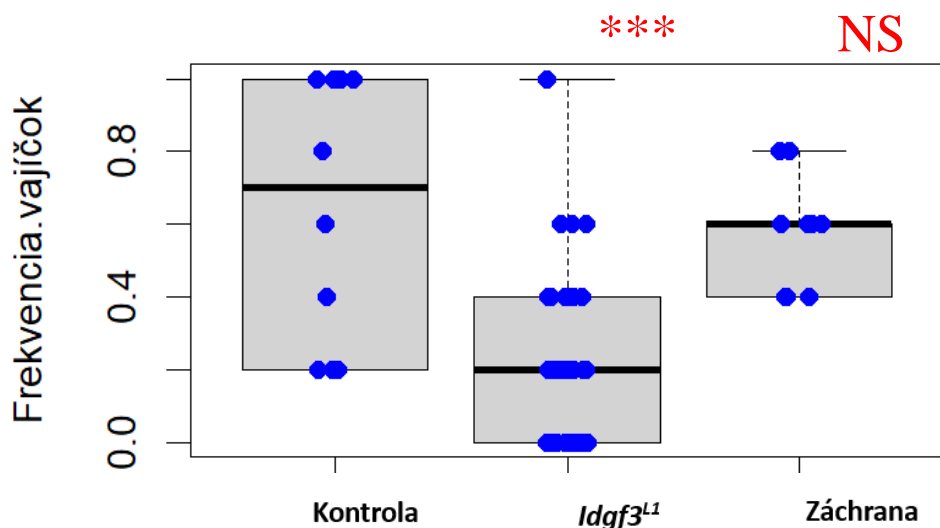


Obrázok č. 23: Frekvencia párenia sa samcov so záchranným konštruktom. Ako kontrola slúžili samci z w^{1118} , ďalej mutantný samec $Idgf^{L1}$ a záchrana s konštruktom $Flyfos$ a GFP modifikovaným $Idgf3$. Mieru signifikancie označujú hviezdičky *** $p < 0,1\%$.

Z Obrázku č. 23 je vidieť viditeľný rozdiel medzi počtom samičiek s ktorými stihol za 90 minút kopulovať mutantný samec a medzi záchranou ktorej median je 0,40%.

5.11 Pomer samíc kladúcich vajíčka od samca s *Flyfos* konštruktom

Po kopulácií bolo päť samičiek nechaných s jedným samcom 24 hodím vo vialke. Po 24 hodinách bola každá so samičiek daná do vlastnej vialky. Samička nakládla vajíčka, potom boli sčítané samičky od jedného samca ktoré nakládli vajíčka. Pre výpočet bol využitý Bartlettov test, ktorého hodnota testovej štatistiky bola vypočítaná 5,7915 a hladina signifikancie 5,526% pri dvoch stupňoch voľnosti. Homogenita bola splnená, preto bola využitá parametrická ANOVA. Hladina signifikancie 0,00226% , výsledok testovej štatistiky bol 13,26. ANOVA ukázala významný rozdiel, ale na to aby sme zistili rozdiely medzi nakladenými vajíčkami od rôznych samcov bol použitý TukeyHSD. Tukeyho test preukázal signifikantný rozdiel medzi mutantom a kontrolou ktorej hladina signifikancie je 0,01747%. Taktiež medzi záchranou a mutantom 0,23271%. Avšak nie medzi záchranou a kontrolou. Výsledky sú znázornené na (Obrázok č. 24).

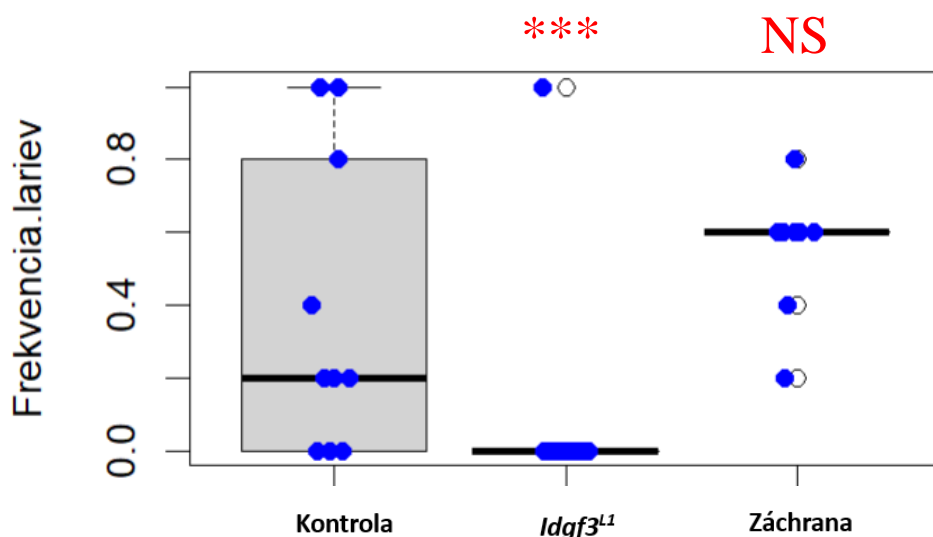


Obrázok č. 24: Pomer samíc kladúcich vajíčka od samca so záchranným konštruktom. Ako kontrola slúžili samci z w^{1118} , ďalej mutantný samec *Idgf^{L1}* a záchrana s konštruktom *Flyfos* a GFP modifikovaným *Idgf3*. Mieru signifikancie označujú hviezdičky *** $p < 0,1\%$.

Z grafu je zrejmé, že samice spárené so záchranným genotypom kládli vajíčka častejšie ako samice spárené s mutantom, kde je stredná hodnota 20% zatiaľ čo medián pri záchrane dosahuje až 60%.

5.12 Pomer samíc ktoré boli oplodnené samcom s *Flyfos* konštruktom

Z vajčiek v predchádzajúcom kroku bolo o deň neskôr spočítané, koľko sa vyľahlo v larvu (Obrázok č. 25). Na výpočet zozbieraných dát bol použitý Bartlettov test. Hodnota testovej štatistiky bola vypočítaná 13,65 a hladina signifikancie 0,1086% pri dvoch stupňoch voľnosti. Kvôli veľmi nízkej hodnote signifikancie zamietame homogenitu variácií a pre výpočet sa použila obdoba jednocestnej ANOVy teda Kruskal-Wallisov test. Testová štatistika mala hodnotu 33,809 a hladina signifikancie 0,0000046% pri dvoch stupňoch voľnosti. Pre zistenie miery významnosti rozdielu skúmaných línií bol použitý Wilcoxonov test. Wilcoxonov test ukázal signifikantný rozdiel medzi kontrolou a mutantom 0,00052% ako aj medzi mutantom a kontrolou 0,0000011%.



Obrázok č. 25: Pomer oplodnených samíc samcom so záchranným konštruktom. Ako kontrolní jedinci boli použité samce z w^{1118} , ďalej mutantný samec $Idgf3^{L1}$ a ako aj záchrana s konštruktom *Flyfos* a GFP modifikovaným *Idgf3*. Mieru signifikancie označujú hviezdičky *** $p < 0,1\%$.

Z Obrázku č. 25 teda vyplýva že záchranný konštrukt fungoval a medián oplodnených múch je 60%. Záchrana sa výrazne líši od mutantu kde došlo k oplodneniu len u samičiek od jedného samca.

6 DISKUSIA

Octomilka sa používa ako modelový organizmus v rôznych oblastiach molekulárnej biológie, fyziológie, genetiky ako aj iných, v tejto práci slúži na charakterizáciu fertility *Idgf3* mutanta.

Vykonalé testy ukázali že, mutantný samec má problém už pri samotnej kopulácii. Za 90 minút sa samec bol schopný páriť iba s dvoma samičkami, pretože väčšina pokusov o párenie skončila odmietavým správaním zo strany samíc. Je možné to že, mutantní samci možno používajú nesprávny princíp dvorenia, zásnubného tanca preto sú samičkami odmietané. Predchádzajúca práca uvádza, že až 30% samcov s mutáciou *Idgf3^{L1}* vykazuje zmeny v usporiadaní žilnatin v krídle, konkrétne im chýba žilka číslo 5 (Kučerová et al., 2015). Uplynulé pokusy s RNAi proti génom *Idgf* naznačili, že *Idgf* gény sú dôležité pre správnu štruktúru kutikuly u lariev (Pesch et al., 2016). Je možné, že na rovnakom princípe ovplyvňujú aj štruktúru krídiel, ktoré potom pri rituáli párenia vydávajú nesprávny zvuk. Keď došlo k samotnej kopulácii samčiek sa páril kratšiu dobu ako kontrolná mucha podobne ako u *cnt1* mutanta (Maaroufi et al., 2022). Samičky spárené s mutovaným samcom počas 24 hodín tiež kládli vajíčka menej často ako samice spárené s kontrolným samcom. To môže mať dve vysvetlenia. Kladenie vajíčok je u samíc *Drosophily* súčasťou odpovede na párenie (PMR), ktorá je indukovaná proteínami odovzdanými samcom buď vo viazanej forme na spermie alebo v seminálnej tekutine. Tieto samčie špecifické proteíny sú produkované v prídavnej žľaze (Sitnik et al., 2016). Nespárené mladé samice vajíčka väčšinou samovoľne nekladú. Bud' teda väčšina samíc nebola s mutantom spárená ani po 24 h. Alebo samec mutanta neodovzdáva pri kopulácii samiciam spermie, prípadne môže mať aj problémy s prídavnou žľazou. V teste plodnosti sa ukázalo, že plodný bol iba 1 samec mutantného genotypu z pozorovaných 33. Ostatné vajíčka boli neoplodené.

Pre overenie bola použitá heteroalelická kombinácia *w; Idgf3^{L1}/dac^{10/3}*; + ktorá pri testoch kopulácie, frekvencií parení sa samcov ako aj kladení vajíčok bola skoro totožná s mutovaným samcom, avšak pri teste oplodnených samíc vykazovala významný rozdiel, preto bola heteroalelická kombinácia overená na PCR ktorá potvrdila, že došlo ku čiastočnej kontaminácii a následnej rekombinácii s markerom *polycomb*, čo viedlo k skresleniu výsledkov. Nie je možné odhanúť vplyv, pretože nebolo zistené kedy došlo ku kontaminácii línie počas experimentu. Výsledky sa však v určitom ohľade zhodujú s mutantom, preto sa domnievam že línia bola na začatku pokusu ešte nekontaminovaná a ku konaminácii došlo až po určitom čase od začatia experimentu.

Pre vytvorenie rekombinačného kríženia slúžiaceho ako záchrana boli overené overexpresné línie múch s +; *attP40 (Flyfos Idgf3)*;+ a +; *attP40 (Flyfos Idgf3::GFP)*; +, ktoré mali inzerciu génovej oblasti s *Idgf3* aj v pozícii 25C taktiež na druhom chromozóme ako sa uvádza v článku (Brož et al., 2017, Kučerová et al., 2016). Línie boli preto použité na následné pokusy s rekombinačným krížením.

Z rekombinačného kríženia, teda záchrany samcov boli urobené tie isté testy ako s mutantom *Idgf3*. Z nich bolo zistené že záchrana fungovala skoro vo všetkých aspektoch a samec s *Idgf3* a *Flyfos* konštruktom bol na 60% plodný. Jediný test, kde sa záchrana signifikantne neodlišovala od mutantu bol test dĺžky kopulácie. Doba kopulácie samcov so záchranným genotypom bola v priemere 3 minúty dlhšia ako u mutantov a o 5 minút kratšia ako dĺžka kopulácie kontrolných samcov. Nesignifikantný výsledok testu môže byť ovplyvnený nízkym počtom pozorovania u mutantov kde sa mi nepodarilo získať vyšší počet pozorovania, pretože v pokuse bolo použitých 33 samcov mutantov a 165 rôznych kontrolných samíc. Nižší počet pozorovaní môže ovplyvniť výsledky posthoc testu (Faber, Fonseca, 2014). Je tiež možné, že vďaka použitej inzercii s modifikovaným *Idgf3::GFP* nie je záchranný konštrukt plne funkčný a preto je záchrana iba čiastočná. Predchádzajúce pokusy s *Flyfos* inzerciami odhalili, že plne funkčné boli iba 2/3 GFP modifikovaných génov (Sarov et al. 2016).

Pokusy so záchranou potvrdili, že gén *Idgf3* má vplyv na párenie a plodnosť u *D. melanogaster*, ako bolo naznačené v predchádzajúcich prácach (Kučerová et al., 2016, Sustar et al., 2023). Zatiaľ nie je jasné, či má *Idgf3* vplyv na kutikulu krídel, zloženie ejakulátu alebo počet aktívnych spermíí. Čo je príčinou problémov by bolo treba odhaliť imunohistochemiou reprodukčných orgánov. Pre ďalší výskum je tiež zaujímavá interakcia s *cnt1*, ktorý vykazuje podobné fenotypy.

7 ZÁVER

Pomocou testov fertility, ako aj PCR boli dokázané poruchy pri párení a plodnosti *Idgf3* mutanta. Pre záchranu skoro neplodného *Idgf3* mutanta bolo použité rekombinačné kríženie s *Flyfos* konštruktom. Vzniknutý jedinec *w; attp 40(Flyfos Idgf3::GFP), Idgf3^{L1} ;+* bol použitý na tie isté pokusy plodnosti ako mutant. Obsahoval ako *Flyfos* konštrukt, tak aj *Idgf3^{L1}* vďaka čomu bol schopný plodnosti.

Overila som, že *Flyfos* konštrukty s *Idgf3* je možné použiť nielen na záchranu, ale aj na prípadné budúce overexpresné pokusy.

Problematika sterility ako u zvierat tak aj u ľudí je ešte malo prebádanou témou. Táto práca by mohla viesť k lepšiemu pochopeniu problémov sterility, prípadne napomôcť riešeniu.

8 ZOZNAM LITERATÚRY

- Allocca, M., Zola, S., & Bellosta, P. (2018). The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: The Making of a Model (Part I). *Drosophila melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. doi:10.5772/intechopen.72832
- Baer, A., & Bode, J. (2001). Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12(issue 5), 473-480. doi:10.1016/S0958-1669(00)00248-2
- Bethk, B. & Sauer, B. (1997). Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants. *Nucleic Acids Research*, vol. 25(issue 14), 2828-2834. doi:10.1093/nar/25.14.2828
- Bloom, J., & Arnold, F. (2009). In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106(supplement_1), 9995-10000. doi:10.1073/pnas.0901522106
- Bouhassira, E., Westerman, K., & Leboulch, P. (1997). Transcriptional Behavior of LCR Enhancer Elements Integrated at the Same Chromosomal Locus by Recombinase-Mediated Cassette Exchange. *Blood*, vol. 90(issue 9), 3332-3344. doi:10.1182/blood.V90.9.3332
- Brand, A., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, vol. 118(issue 2), 401-415. doi:10.1242/dev.118.2.401
- Branda, C., & Dymecki, S. (2004). Talking about a Revolution. *Developmental Cell*, vol. 6(issue 1), 7-28. doi:10.1016/S1534-5807(03)00399-X
- Brož, V., Kučerová, L., Rouhová, L., Fleischmannová, J., Strnad, H., Bryant, P., & Žurovec, M. (2017). *Drosophila* imaginal disc growth factor 2 is a trophic factor involved in energy balance, detoxification, and innate immunity. *Scientific Reports*, vol. 7(issue 1), 15. doi:10.1038/srep43273
- Butler, M., Jacobsen, T., Cain, D., Jarman, M., Hubank, M., Whittle, J., Phillips, R., Simcox, A. (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development*, vol. 130(issue 4), 659-670. doi:10.1242/dev.00293
- Campos-Ortega, J., & Hartenstein, V. (1985). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-02454-6
- Castrillon, D., Gönczy, P., Alexander, S., Rawson, R., Eberhart, C., Viswanathan, S., Dinardo, S., Wasserman, S. (1993). Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants

- generated by single P element mutagenesis. *Genetics*, vol. 135(issue 2), 489-505. doi:10.1093/genetics/135.2.489
- de Cuevas, M., & Matunis, E. (2011). The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis. *Development*, vol. 138(issue 14), 2861-2869. doi:10.1242/dev.056242
- Demarco, R., Eikenes, Å., Haglund, K., & Jones, D. (2014). Investigating spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Methods*, vol. 68(issue 1), 218-227. doi:10.1016/j.ymeth.2014.04.020
- Ejsmont, R., Sarov, M., Winkler, S., Lipinski, K., & Tomancak, P. (2009). A toolkit for high-throughput, cross-species gene engineering in *Drosophila*. *Nature Methods*, vol. 6(issue 6), 435-437. doi:10.1038/nmeth.1334
- Faber, J., & Fonseca, L. (2014). How sample size influences research outcomes. *Dental Press Journal of Orthodontics*, vol. 19(issue 4), 27-29. doi:10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo
- Fabian, L., & Brill, J. (2014). *Drosophila* spermiogenesis. *Spermatogenesis*, vol. 2(issue 3), 197-212. doi:10.4161/spmg.21798
- Fabrizio, J., Hime, G., Lemmon, S., & Bazinet, C. (1998). Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development*, vol. 125(issue 10), 1833-1843. doi:10.1242/dev.125.10.1833
- Feng, Y.-Q., Seibler, J., Alami, R., Eisen, A., Westerman, K., Leboulch, P., Fiering, S., Bouhassira, E. (1999). Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *Journal of Molecular Biology*, vol. 292(issue 4), 779-785. doi:10.1006/jmbi.1999.3113
- Fleischmannová, J., Kučerová, L., Sandová, K., Steinbauerová, V., Brož, V., Simek, P., & Zurovec, M. (2012). Differential response of *Drosophila* cell lines to extracellular adenosine. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 42(issue 5), 321-331. doi:10.1016/j.ibmb.2012.01.002
- Greenspan, R. (2007). *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics* (druhé. vyd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Handler, A., & Harrell, R. (2001). Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 31(issue 2), 199-205. doi:10.1016/S0965-1748(00)00119-3
- Chintapalli, V., Wang, J., & Dow, J. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature Genetics*, vol. 39(issue 6), 715-720. doi:10.1038/ng2049
- Chyb, S., & Gompel, N. (2013). *Atlas of Drosophila Morphology*. Elsevier. doi:10.1016/C2009-0-61936-X

- Kaufman, T. (2017). A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics: Chromosome Aberrations, Forward Genetic Screens, and the Nature of Mutations. *Genetics*, vol. 206(issue 2), 665-689. doi:10.1534/genetics.117.199950
- Kawamura, K., Shibata, T., Saget, O., Peel, D., & Bryant, P. (1999). A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development*, vol. 126(issue 2), 211-219. doi:10.1242/dev.126.2.211
- Kruger, L., & Denton, T. (2020). A standardized method for incorporation of drugs into food for use with *Drosophila melanogaster*. *Analytical Biochemistry*, vol. 599. doi:10.1016/j.ab.2020.113740
- Kučerová, L., Brož, V., Arefin, B., Maaroufi, H., Hurychova, J., Strnad, H., Žurovec, M., Theopold, U. (2016). The *Drosophila* Chitinase-Like Protein IDGF3 Is Involved in Protection against Nematodes and in Wound Healing. *Journal of Innate Immunity*, vol. 8(issue 2), 199-210. doi:10.1159/000442351
- Kuhstoss, S., & Rao, R. (1991). Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage ϕ C31. *Journal of Molecular Biology*, vol. 222(issue 4), 897-908. doi:10.1016/0022-2836(91)90584-S
- Liu, H., & Naismith, J. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnology*, vol. 8(issue 1), 10. doi:10.1186/1472-6750-8-91
- Maaroufi, H., Pauchova, L., Lin, Y.-H., Wu, B.-H., Rouhova, L., Kučerová, L., Vieira, L. Cota., Renner, Marek., Sehadova, Hana., Hradilova, M., Žurovec, M. (2022). Mutation in *Drosophila* concentrative nucleoside transporter 1 alters spermatid maturation and mating behavior. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 10. doi:10.3389/fcell.2022.945572
- Metzendorf, C. (2010). *Mitochondrial Iron Metabolism*. disertačná, Asta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Majeed, Z., Koch, F., Morgan, J., Anderson, H., Wilson, J., & Cooper, R. (2017). A novel educational module to teach neural circuits for college and high school students: NGSS-neurons, genetics, and selective stimulations. *F1000Research*, vol. 6(2), 26. doi:10.12688/f1000research.10632.1
- Ong, C., Yung, L.-Y., Cai, Y., Bay, B.-H., & Baeg, G.-H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, vol. 9(issue 3), 396-403. doi:10.3109/17435390.2014.940405
- Pavlou, H., & Goodwin, S. (2013). Courtship behavior in *Drosophila melanogaster*: towards a 'courtship connectome'. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 23(issue 1), 76-83. doi:10.1016/j.conb.2012.09.002
- Pesch, Y.-Y., Riedel, D., Patil, K., Loch, G., & Behr, M. (2016). Chitinases and Imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects. *Scientific Reports*, vol. 6(issue 1), 14. doi:10.1038/srep18340

- Rausch, H., & Lehmann, M. (1991). Structural analysis of the actinophae ΦC31 attachment site. *Nucleic Acids Research*, vol. 19(issue 19), 5187-5189. doi:10.1093/nar/19.19.5187
- Ravi Ram, K., & Wolfner, M. (2007). Seminal influences: Drosophila Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology*, vol. 47(issue 3), 427-445. doi:10.1093/icb/icm046
- Roberts, D. (2006). Drosophila melanogaster: the model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 121(issue 2), 93-103. doi:10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Russell, S. (2004). The DrosDel Collection: A Set of P-Element Insertions for Generating Custom Chromosomal Aberrations in Drosophila melanogaster. *Genetics*, vol. 167(issue 2), 18. doi:10.1534/genetics.104.026658
- Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M., Schmied, C., Suchold, D., Schnorrer, F. (2016). A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in Drosophila. *eLife*, vol. 5(4), 38. doi:10.7554/eLife.12068
- Seibler, J., & Bode, J. (1997). Double-Reciprocal Crossover Mediated by FLP-Recombinase: A Concept and an Assay. *Biochemistry*, vol. 36(issue 7), 1740-1747. doi:10.1021/bi962443e
- Seibler, J., Schübeler, D., Fiering, S., Groudine, M., & Bode, J. (1998). DNA Cassette Exchange in ES Cells Mediated by FLP Recombinase: An Efficient Strategy for Repeated Modification of Tagged Loci by Marker-Free Constructs. *Biochemistry*, vol. 37(issue 18), 6229-6234. doi:10.1021/bi980288t
- Shmerling, D., Danzer, C.-P., Mao, X., Boisclair, J., Haffner, M., Lemaistre, M., . . . Müller, M. (2005). Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the β-actin locus by Cre/lox cassette replacement. *genesis*, vol. 42(issue 4), 229-235. doi:10.1002/gene.20135
- Schlake, T., & Bode, J. (1994). Use of Mutated FLP Recognition Target (FRT) Sites for the Exchange of Expression Cassettes at Defined Chromosomal Loci. *Biochemistry*, vol. 33(issue 43), 12746-12751. doi:10.1021/bi00209a003
- Sitnik, J., Gligorov, D., Maeda, R., Karch, F., & Wolfner, M. (2016). The Female Post-Mating Response Requires Genes Expressed in the Secondary Cells of the Male Accessory Gland in Drosophila melanogaster. *Genetics*, vol. 202(issue 3), 1029-1041. doi:10.1534/genetics.115.181644
- Sustar, A., Strand, L., Zimmerman, S., & Berg, C. (2023). Imaginal disk growth factors are Drosophila chitinase-like proteins with roles in morphogenesis and CO2 response. *Genetics*, vol. 223(issue 2), 20. doi:10.1093/genetics/iyac185

- Silber, S. (2004). Genetics of Male Infertility: Evolution of the X and Y Chromosome and Transmission of Male Infertility to Future Generations. *Essential IVF*, 111-149. doi:10.1007/978-1-4419-8955-0_5
- Thomason, L., Calendar, R., & Ow, D. (2001). Gene insertion and replacement in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by the *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 site-specific recombination system. *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 265(issue 6), 1031-1038. doi:10.1007/s004380100498
- Thorpe, H., Wilson, S., & Smith, M. (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage ϕ C31. *Molecular Microbiology*, vol. 38(issue 2), 232-241. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02142.x
- Tokuyasu, K. (1975). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of "onion" nebenkern formation. *Journal of Ultrastructure Research*, vol. 53(issue 1), 93-112. doi:10.1016/S0022-5320(75)80089-X
- Tokuyasu, K., Peacock, W., & Hardy, R. (1972). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, vol. 124(issue 4), 479-506. doi:10.1007/BF00335253
- Varela, P., Llera, A., Mariuzza, R., & Tormo, J. (2002). Crystal Structure of Imaginal Disc Growth Factor-2. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277(issue 15), 13229-13236. doi:10.1074/jbc.M110502200
- Vierstraete, E., Verleyen, P., Sas, F., Van den Bergh, G., De Loof, A., Arckens, L., & Schoofs, L. (2004). The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 317(issue 4), 1052-1060. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.150
- Wakimoto, B., Lindsley, D., & Herrera, C. (2004). Toward a Comprehensive Genetic Analysis of Male Fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, vol. 167(issue 1), 207-216. doi:10.1534/genetics.167.1.207
- Žurovcová, M., & Ayala, F. (2002). Polymorphism Patterns in Two Tightly Linked Developmental Genes, *Idgf1* and *Idgf3*, of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, vol. 162(issue 1), 177-188. doi:10.1093/genetics/162.1.177
- Zhao, Y., Vanderkooi, S., & Kan, F. (2022). The role of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) in modulating biological functions of gametes and embryos. *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 157(issue 3), 371-388. doi:10.1007/s00418-021-02065-x
- Zheng, X., Xing, X.-H., & Zhang, C. (2017). Targeted mutagenesis: A sniper-like diversity generator in microbial engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology*, vol. 2(issue 2), 75-86. doi:10.1016/j.synbio.2017.07.001
- Zhu, Q., Deng, Y., Vanka, P., Brown, S., Muthukrishnan, S., & Kramer, K. (2004). Computational identification of novel chitinase-like proteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *Bioinformatics*, vol. 20(issue 2), 161-169. doi:10.1093/bioinformatics/bth020

- Ziegler, A., Berthelot-Grosjean, M., & Grosjean, Y. (2013). The smell of love in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, vol. 4. doi:10.1016/j.cell.2008.12.001
- Žurovcová, M., Benes, V., Žurovec, M., & Kučerová, L. (2019). Expansion of Imaginal Disc Growth Factor Gene Family in Diptera Reflects the Evolution of Novel Functions. *Insects*, vol. 10(issue 10), 14. doi:10.3390/insects10100365
- Žurovec, M. (1999). *Molekulární biologie živočichů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita.

9 PRÍLOHY

Príloha č.1: Genotypy *D.melangaster* línií.

Genotyp	Charakteristika
<i>w; Idgf3^{L1} / CyOGFP; +</i>	Delécia <i>Idgf3</i> , chýbajúci promotor (Kučerová et al., 2016).
<i>w1118; +; +</i>	Kontrolná mucha white.
<i>+; attP40(Flyfos Idgf3) ; +</i>	Genová oblasť obsahujúca <i>Idgf3</i> . (Brož et al., 2017).
<i>+; attP40(Ffyfos Idgf3::GFP) ; +</i>	<i>Idgf3</i> oblasť génu modifikovaná rekombináciou v <i>E. coli</i> , pridaný GFP. (Kučerová et al., 2015).
<i>w; dac^{10/3} / CyO; +</i>	Delecia zahrňujúca <i>Idgf</i> gény 1,2,3 a <i>dachshund</i> (Saget, unpublished).

Príloha č. 2: Primery použité u PCR.

Použité primery pre PCR	Primery (orientácia 5' → 3')
GROR5	ACTTGATGTGGGGATAGCG
IGF14	ACTGCGTTGCTATTGTTCG
IGF13b	AAAGTTTAAGCTCTGCCGAG

Príloha č.3: Primery použité u qPCR.

Použité primery pre qPCR	
Rack1	CCCGTGACAAGACCCTGAT TAGTTGCCATCG-GAGGAGAG (Fleischmannová et al., 2012)
rp49	CTTCATCCGCCACCAGTC GGCGACGCACTCTGTTGT (Kučerová et al., 2016)
Idgf3	GATCTGCTGCTCAGTCTCACC TCGACGGGGCATCATAGTA (Maaroufi., 2022)

Príloha č. 4: Použité komponenty pre reakcie.

1× PBS – 137 mM chloridu sodného; 2,7 mM chloridu draselého; 10 mM hydrogénfosforečnanu sodného; 1,8 mM dihydrogénanufosforečnanu draselého; pH 7,4

1× TAE pufor – 20 mM kyseliny octovej; 40 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0