

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4 – Biologie a vědy o Zemi

Vliv příčin neurovývojových poruch na habituaci u octomilky

Štěpánka Matoušová
Jihočeský kraj

České Budějovice 2022/2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4 – Biologie a vědy o Zemi

Vliv příčin neurovývojových poruch na habituaci u octomilky

Effect of the genetic causes of neurodevelopmental disorders on habituation in *Drosophila*

Autoři: Štěpánka Matoušová

Škola: Česko-anglické gymnázium, Třebízského 1010/9, České Budějovice, 370 06

Kraj: Jihočeský kraj

Konzultant: RNDr. Květa Tůmová, Mgr. Michaela Fencková Ph.D.

České Budějovice 2022/2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Českých Budějovicích 25.12.2022

Štěpánka Matoušová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mým konzultantkám paní RNDr. Květě Tůmové a Mgr. Michaele Fenckové PhD, které mi pomáhaly se zpracováním mé SOČ práce a zodpovídaly na všechny mé otázky. Chtěla bych poděkovat Mgr. Michaele Fenckové PhD, která mi umožnila práci v laboratoři na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity. Dále bych poděkovala své rodině za veškerou podporu, ale především své matce MUDr. Alexandře Matoušové, která mi zodpovídala na externí otázky ohledně pacientů s PAS a PI. Nakonec bych chtěla poděkovat pedagogickému sboru z Česko-anglického gymnázia, který mi umožnil trávit čas v laboratoři na Jihočeské univerzitě přes vyučování.

Anotace

Tato SOČ práce se zabývá problematikou neurovývojových poruch a vlivem jejich genetických příčin na habituaci octomilky. Exprese genů byla manipulována pomocí RNAi a systému Gal4/UAS v imunometabolických tkáních octomilky (tukové těleso a hemocyty). Habituální odpověď byla testována pomocí „light-off jump habituace“. Praktická část byla provedena ve vědecké laboratoři na Jihočeské univerzitě pod vedením Mgr. Michaely Fenckové, PhD.

Klíčová slova

habituace; neurovývojové poruchy; Poruchy autistického spektra; Porucha intelektu; octomilka

Annotation

This SOČ thesis concerns neurodevelopmental disorders and influence of their genetic causes on habituation in *Drosophila*. The gene expression was manipulated with RNAi and the Gal4/UAS system in *Drosophila* immunometabolic tissues (fat body and haemocytes). Their effect on habituation was tested with light-off jump habituation assay. The practical part of this thesis was done in the research laboratory at the University of South Bohemia under the supervision of Mgr. Michaela Fenckova, PhD.

Keywords

habituation; neurodevelopmental disorders; Autism spectrum disorder; Intellectual disability; *Drosophila*

SEZNAM POJMŮ

- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- RNA – ribonukleová kyselina
- RNAi – RNA interference
- dsRNA – dvouvláknová RNA
- mRNA – messenger RNA (v češtině informační RNA)
- UAS – DNA sekvence, za níž je vložena informace pro tvorbu dsRNA
- Gal4 – transkripční faktor
- patogeneze – chorobný/špatný vývoj (řec. Pathos –choroba; genesis – vznik)

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	NEUROVÝVOJOVÉ PORUCHY	9
2.1	Poruchy autistického spektra	9
2.2	Porucha intelektu	10
2.2.1	Intelektuální funkce	10
2.3	Imunita a metabolismus u PAS a PI	11
3	HABITUACE	11
3.1	Habituace u PAS a PI.....	12
4	OCTOMILKA.....	13
4.1	Octomilka a laboratorní výzkumy	14
4.2	Manipulace s octomilkami	15
5	METODY A LABORATORNÍ PRAXE.....	16
5.1	Manipulace genové exprese	16
5.1.1	RNA interference	16
5.1.2	Gal4/UAS systém.....	16
5.2	Ortogeny	17
5.3	Křížení.....	18
5.3.1	Křížení a příprava octomilek pro testování.....	18
5.4	Testování octomilek pomocí light-off jump habituace	20
6	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	22
6.1	Pozitivní kontrola	22
6.2	Viditelné fenotypy	23
6.3	Skoková odpověď	23
6.4	Habituace	24
7	ZÁVĚR A DISKUZE	29
8	ZDROJE.....	30
8.1	Použitá literatura a citace v textu	30
8.2	Použité obrázky.....	31

1 ÚVOD

Tato středoškolská odborná práce se zabývá některými genetickými příčinami (monogenní) neurovývojových poruch a jejich vlivem na habituaci.

Nejrozšířenějšími neurovývojovými poruchami jsou poruchy autistického spektra a porucha intelektu. Jedním z faktorů, které mohou přispívat k patologii těchto poruch je zhoršená habituace. Habituace je schopnost učení se nereagovat na opakující se, nedůležité podněty. Snížená habituace může ovlivňovat schopnost soustředění. Je tedy obtížné pro jedince udržet pozornost právě na jednu věc, když reaguje na každý opakující se stimul (zvuk hodin nebo třesení podlahy, když jede tramvaj). Jako testovací modelový organismus jsem si vybrala Octomilku obecnou (lat. *Drosophila melanogaster*).

Již od mala se zajímám o lékařství. Moje matka je dětská lékařka a já sama bych se ráda tomuto oboru v budoucnu věnovala. Ovšem zajímám se také o výzkumnou stránku lékařství jako jsou genetické úpravy nebo vývoje léčiv a vakcín. Chtěla jsem, proto zaměřit svojí SOČ práci více na tento výzkumný aspekt lékařského oboru.

Cílem mé práce je zjistit, zda snížená exprese genů, u nichž částečná ztráta funkce vede ke vzniku neurovývojových poruch, má vliv na habituaci, a to ne v nervové tkáni (mozku) ale v imunometabolické tkáni (tuková tkáň a imunitní buňky, hemocyty). Tento výzkum by mohl být velmi užitečný a přínosný k dalšímu výzkumu mechanismů, které přispívají k patologii neurovývojových poruch (konkrétně poruch autistického spektra a poruch intelektu) a k vývoji nových terapeutických přístupů.

Zdroje pro teoretickou část byly především vědecké články a seminární práce, které se zabývají neurovývojovými poruchami, octomilkou (jako modelovým organismem) nebo habituací. Praktickou část mé práce jsem provedla sama s pomocí mé konzultantky Mgr. Michaely Fenckové, PhD. v laboratoři na Přírodovědecké fakultě Jihočeské Univerzity.

V laboratoři jsem zkřížila 12 linií indukujících snížení exprese (RNAi pro 10 genů) a zvýšení exprese (pro 2 geny) s Gal4 linií specifickou pro tukové těleso a hemocyty. Díky Gal4/UAS systému měli potomci těchto křížení sníženou nebo zvýšenou expresi těchto genů v obou imunometabolických tkáních. Efekt této manipulace jsem následně testovala s pomocí habituace skokové odpovědi

2 NEUROVÝVOJOVÉ PORUCHY

Abnormální vývoj nervového systému může vést k neurovývojovým poruchám. Ty se mohou projevit brzy po narození nebo v průběhu celého dětství a dospívání. Nejpozději však do osmnácti let věku (Ošlejšková Hana, 2010). Tyto poruchy mohou ovlivňovat emoce, paměť, schopnost učení či sebeovládání. Diagnóza je stanovena obvykle již v dětství. Porucha však přetrvává i do dospělosti. Je možné je rozdělit do tří hlavních skupin: (1) mentální poruchy, (2) poruchy psychického vývoje a (3) poruchy emocí a chování. Neurovývojové poruchy jsou celoživotní, ovšem s vývojem člověka se jejich projevy mění (Ošlejšková Hana, 2010).

Neurovývojové poruchy mají často genetické příčiny a podle nich se dají rozdělit do čtyř skupin. (1) Aneuploidie neboli abnormální počet chromozomů. Sem spadá například Downův syndrom, který je zapříčiněn trizomií (tři stejné chromozomy) chromozomu 21 nebo Turnerův syndrom, který se vyskytuje pouze u žen, protože se jedná o ztrátu jednoho X chromozomu. (2). Mikrodelece chromozomu, které mohou vzniknout nerovnoměrnou výměnou sesterských chromatid při dělení pohlavních buněk. Příkladem mikrodelece je Angelmanův syndrom (Margolis et al., 2015). (3) Monogenní poruchy, což jsou neurovývojové poruchy, které jsou způsobeny mutací v jednom genu. Nejznámějším příkladem je Syndrom Fragilního X, kde dochází k expanzi trinukleotidů CGG (Hagerman & Hagerman, 2021). (4) Skupina neurovývojových poruch, která je ovlivněna genetickými, epigenetickými (změny v genové expresi) ale i environmentálními vlivy. Spadají sem některé poruchy autistického spektra a intelektu nebo schizofrenie (Martens & van Loo, 2009).

2.1 Poruchy autistického spektra

Poruchy autistického spektra (PAS) jsou poruchy nervového systému, které jsou charakterizovány třemi deficity: deficit v komunikaci, například absence řeči, snížená kvalita interakcí s okolím a omezený rozsah zálib a aktivit (Hodges et al., 2020). U dvou třetin jedinců s PAS se také obvykle vyskytuje porucha intelektu (Simpson et al., 2020) (viz. kapitola 2.2). Do PAS patří například Aspergerův syndrom (Faridi & Khosrowabadi, 2017; Gorina et al., 2011) a Dětský autismus, tj. Kannerův syndrom (Gorina et al., 2011). Tyto poruchy se mohou projevit již od narození dítěte, ale většinou se objeví okolo druhého až třetího roku života. Jedinci s poruchou autistického spektra mají z 50-60 % také poruchu intelektu (Dobešová Jana, 2009).

V České republice je u pediatra v 18. měsíci každé dítě testováno pomocí MChat (Modified Checklist for Autism in Toddlers neboli modifikovaný dotazníkový test pro záchyt poruchy autistického spektra u batolat) testu. V testu jsou otázky, které se především ptají na chování dítěte jako oční kontakt, manipulace s věcmi a jiné. Rodič na tyto otázky odpovídá hlavně odpovědi ano/ne. Tento test se znovu opakuje ve 24. měsíci batolete. Podle výsledků testu se dá určit nebo alespoň předpokládat, zda by zachycená odchylka ve vývoji mozku mohla vyústit v poruchu autistického spektra. Tato informace mi byla sdělena praktickým pediatrem MUDr. Alexandrou Matoušovou (*MCHAT*, n.d.).

Jednotná příčina autismu není stanovena, protože je tato porucha ovlivněna mnoha faktory. Roli zde hraje několik faktorů: genetická predispozice, vliv prostředí (chemizace, škodlivé látky) a věk rodičů. Starší rodiče mohou mít větší riziko, že by mohli mít dítě s projevy autismu. Z genetického hlediska jsou poruchy autistického spektra způsobeny jak polygenními (delece nebo duplikace části chromozomu, které zahrnují více genů, které zapříčiňují PAS) tak i monogenními (jeden gen způsobuje PAS) mutacemi (Dobešová Jana, 2009).

2.2 Porucha intelektu

Pacienti s poruchou intelektu (PI) mají omezení adaptivního chování a intelektuálních funkcí. IQ je nižší než 70 bodů IQ (Simpson et al., 2020)(viz. kapitola 2.2.1). U jedinců s touto poruchou se často vyskytují další neurovývojové a psychické poruchy, jako například úzkost a deprese, PAS anebo ADHD (porucha pozornosti s hyperaktivitou) či jen porucha pozornosti.

Poruchu intelektu mohou, kromě genetických příčin, také způsobit infekční poruchy (např. meningitida neboli zánět mozkových blan) či neurologické poruchy, např. dětská mozková obrna (Lee Keun et al., 2022; Mehndiratta et al., 2014).

2.2.1 Intelektuální funkce

Obecný název pro intelektuální funkce je inteligence. Jsou to funkce zahrnující mnohé rozumové schopnosti, jako je logické přemýšlení a uvažování, řešení problémů, schopnost učení a jiné. Prostřednictvím chování, myšlení a emocí se inteligence projevuje. Inteligence nám pomáhá s chápáním a komunikací s realitou.

Intelektuální funkce je možné měřit podle inteligenčního kvocientu (IQ). Pro zjištění IQ je nutno podstoupit standardizované tzv. IQ testy. Průměrná inteligence člověka je 100 bodů IQ

s odchylkou 15 bodů. Pod 70 bodů IQ se pacient považuje za intelektuálně handicapovaného (*Kritéria IQ*, n.d.).

Inteligenci je možné dělit mnoha způsoby. Jednou z teorií dělení intelektuálních funkcí je *Teorie mnohonásobné inteligence* podle amerického psychologa Howarda Gardnera. Tato teorie rozděluje inteligenci do osmi odvětví: jazykově-verbální, logicko-matematická, zvukově-hudební, tělesně-pohybová, vizuálně-prostorová, vnitřní neboli intrapersonální, společenská neboli interpersonální a přírodní. Ovšem pouze jazykově-verbální a logicko-matematická inteligence se nejčastěji testuje a lze nejlépe měřit v IQ testech. Tyto dvě inteligence ovšem nepokryjí celou osobnost pacienta (Holá Marta, 2017).

2.3 Imunita a metabolismus u PAS a PI

PAS a PI jsou často také spojeny s imunitními a metabolickými problémy.

Příkladem jednoho z těchto problémů je obezita. Podle americké studie je dokázáno, že jedinci s PAS a PI mají vyšší riziko obezity než jedinci bez těchto neurovývojových poruch. V případě obezity se nadměrné množství tuku chová jako zánět. Na zánět začne tělo reagovat s pomocí svých imunitních buněk. Tento proces konzumuje obrovské množství energie. (Hill AP et al., 2015)

3 HABITUACE

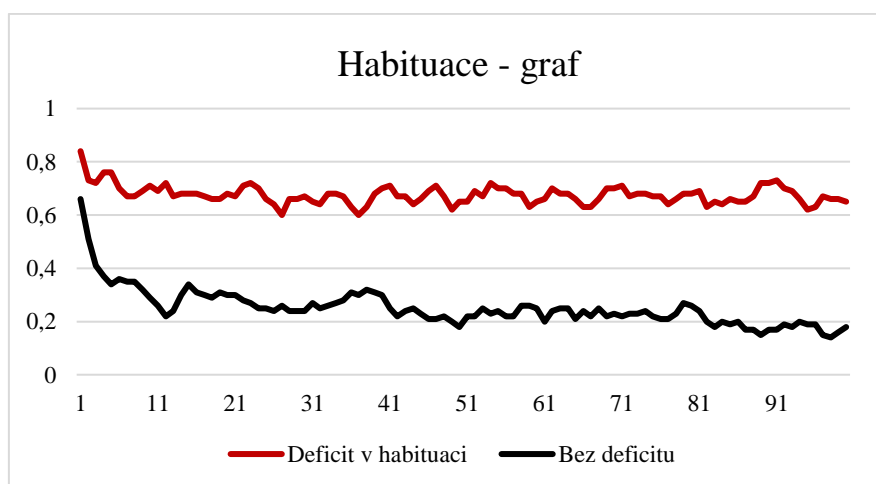
Už od začátku našeho života se učíme vnímat našimi smysly. Jako děti jsme naše smysly využívaly k učení se chápat, myslet a rozumět. Jedna ze základních forem učení našeho mozku je habituace. Je to forma učení, která nám pomáhá odfiltrovat nepodstatné podněty, které by mohly teoreticky narušovat naše smyslové vnímání. Příkladem rušivých podnětů může být například tikot hodinek; šum desktopového počítače; blikání světel. Nejedná se ovšem pouze o stimuly, na které reaguje jen náš zrak a sluch, ale také náš hmat, čich a chuť. Příkladem hmatu je nošení oblečení. Ráno se oblékneme, ale již po pár sekundách si nejsme vědomi, že máme nějaké oblečení na sobě. Přesně tyto podněty jsou díky habituaci odfiltrovány, tudíž osoba, která je z počátku vnímala a považovala za nepříjemné, si po chvíli na tyto stimuly zvykla a naučila se je ignorovat. Habituace se nám hodí v situacích, kdy se náš mozek musí soustředit na konkrétní, důležité věci, například soustředění při písemné práci ve škole nebo řízení na silnici při rušném provozu (Schmid Susane et al., 2015).

Habituační, jak už bylo uvedeno, je jedna ze základních forem učení. Je velmi důležitá nejen u lidí, ale i u ostatních živočichů. Dá se tak o ní říct, že je geneticky konzervovaná. Neustále se dědí do dalších a nových generací u více organismů. Díky tomuto faktu je možné testovat habituaci na jiných organismech jako jsou např. myši či octomilky (Blok LER et al., 2022).

I přesto, že je octomilka (viz. kap. 4) velice drobný živočich je to velmi vhodný model pro testy a výzkumy v laboratořích molekulární genetiky. Její nervový systém je poměrně jednoduchý, ale schopnosti habituace má také, proto je možné testovat její habituaci odpověď. Habituaci odpověď octomilky je ekvivalentní k habituaci odpovědi člověka.

3.1 Habituace u PAS a PI

Jedinci s PAS (s PI i bez PI) se necítí komfortně v rušném prostředí. Může k tomu přispět deficit v habituaci. Příklad rozdílu v habituaci u zdravého jedince, který se dokáže habituovat bez problémů, a habituace u jedince s deficitem, je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1 – deficit v habituaci a kontrola bez deficitu; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi

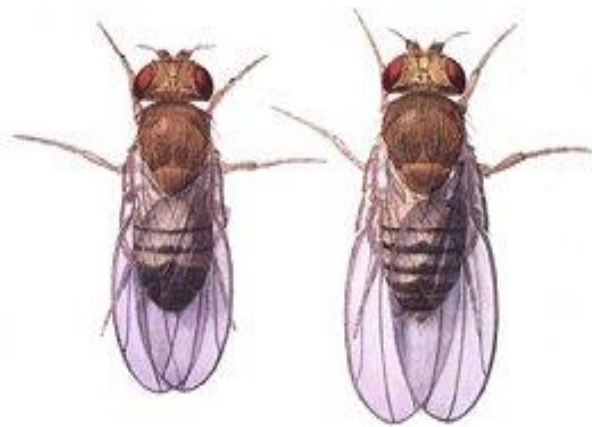
Tento graf znázorňuje viditelné rozdíly mezi jedinci s deficitem a bez. Osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou (100 stimulů) a osa y zobrazuje hodnotu odpovědi (maximum 1 – tento případ by nastal, kdyby všichni testovaní jedinci odpověděli na stimuly). U jedinců bez deficitu je vidět, jak habituaci odpověď výrazně klesá od 1. do 11. stimulu a postupně se přibližuje k nule. Jedinci si celkem rychle zvykli na opakované stimuly a postupně na ně přestali reagovat. Naopak jedinci s deficitem během celého testu konstantně reagovali na stimuly. Takto mohou reagovat na opakující se stimuly většina pacientů s PAS a PI.

4 OCTOMILKA

Octomilka obecná známá také jako drozofila (lat. *Drosophila melanogaster*) je malá ovocná muška. Je zástupcem hmyzu řádu *Diptera* (dvoukřídlí). Původem je rod *Drosophila* z Euroasijských tropů, dnes je však rozšířena kosmopolitně. Podle jména ji najdeme nejčastěji na ovoci. Dorůstá délky 2-3 mm. Octomilky nacházející se volně v přírodě jsou druhy divoké. Divoký typ octomilky má zbarvení žluté či světle hnědé. Mladé octomilky zbarvení bílé a během dospívání začne jejich zbarvení tmavnout. Oči divokého typu jsou červené.

Životní cyklus octomilky je přibližně 10 dní pokud je chována ve 25 °C. Počátek životního cyklu začíná po naklazení vajíček. Divoký typ octomilky klade vajíčka na ovoce. Po prvních 24 hodinách se z vajíčka vylíhne první larví stádium neboli první instar. Tento 24hodinový proces se zopakuje znovu dvakrát, kde posledním larvím stádiem je třetí instar. Larva přetrvá ve třetím stádiu 48 hodin. Po 48 hodinách se larva zakuklí v suchém prostředí. Za čtyři dny se z kukly vyklubá dospělá octomilka. Nově vyklubané octomilky mají ještě nevyvinutá křídla a jak už bylo uvedeno, jsou velice světlé až bílé. Samci po dobu 4-5 hodin od vyklubání nejsou plodní, proto je možné oddělit od nich samice (panny) a zkřížit je s jinými samci (viz. kapitola 5.3).

Sexuální dimorfismus octomilek se nejvíce pozná podle zadečku. Samci mají konec zadečku tmavý, na rozdíl od nich zadeček samice má pouze tmavé proužky (viz. obr. 2). Na zadečku břišní strany samců se také nachází černá až červeno-černá tečka. Tato tečka je viditelná část sexuálního orgánu samce. Samice žádné viditelné sexuální orgány nemají, proto je jejich břišní strana čistá, tj. bez tečky (Tomanová Kateřina, 2007).



Obrázek 2 – *Drosophila melanogaster* – divoký typ – samec (nalevo), samice (napravo)

(<https://www.nbcnews.com/id/wbna39971264> – cit. 16.11.2022)

Octomilka obecná má 4 páry chromozomů. Označení těchto chromozomů je X/Y, 2, 3, 4. První chromozom určuje pohlaví octomilky (X – samice, Y – samec), tyto chromozomy se nazývají pohlavní. Na rozdíl od ostatních chromozomů je 4. chromozom poměrně malý (Tomanová Kateřina, 2007).

4.1 Octomilka a laboratorní výzkumy

Jeden z hlavních důvodů, proč se octomilka používá jako modelový organismus je, že životní cyklus octomilky je poměrně krátký, proto jsou potomci s genetickými mutacemi rychle dostupní. Chov octomilek není finančně příliš náročný. Octomilky se uchovávají ve skleněných vialkách o průměru ~ 2,5 cm, na dietě, která se skládá z kukuřičné mouky, kvasnic, cukru a agaru. Jídlo slouží také k naklazení vajíček. Larvy octomilky obecné v této směsi zůstávají do poslední larvální fáze. Před zakuklením vylezou ven, na čistý povrch. Tyto vialky jsou zazátkovány vatou. Vata zamezuje octomilkám k odletu z vialky a propouští vzduch k dýchání.

V laboratořích se octomilka uchovává v inkubátorech. Tyto inkubátory jsou nastaveny na 25 °C, nebo na 18 °C. Inkubátory s 25 °C mají neoptimálnější teplotu pro octomilky. V těchto inkubátorech se doba od naklazení vajíček po vyklubání panen a paniců pohybuje okolo deseti dnů. Na rozdíl v inkubátorech s teplotou 18 °C se tato doba vývinu zdvojnásobí (Markstein Michele, 2018; Tomanová Kateřina, 2007).

4.2 Manipulace s octomilkami

Pro manipulaci se octomilky uspávají oxidem uhličitým (CO₂). V laboratoři, kde jsem vypracovala tuto práci, se pro uspání používá The Flowbuddy™ (Flystuff.com). Je to regulátor toku CO₂ přímo určený pro anestezii octomilek. Tento regulátor je připojen k tlakové lahvi s kapalným CO₂. Jeho další komponenty jsou tenká jehla, která umožní k uspání octomilek ve vialce, a destička s póry, na kterou se uspané mouchy přenesou (viz. obr. 3).



Obrázek 3 – The Flowbuddy – komplet (regulátor, jehla a destička)

(<https://geneseesci.com/shop-online/product-details/59-122BC/flystuff-59-122bc-benchtop-flowbuddy-complete-with-standard-flypad-1-system-unit> - cit. 23.12.2022)

Při uspávání je vhodné naklonit vialku do téměř vodorovné polohy. Důvodem této pozice je, že dieta na dně vialky je lepkavá, a když octomilka usíná pod vlivem CO₂, je možné, že spadne do diety a uváže v ní. I po vrácení octomilek do staré nebo nové vialky se zanechává vodorovná pozice až do doby probuzení.

Jakmile jsou octomilky přeneseny na destičku s póry, která propouští CO₂ na svůj povrch, je možné s nimi manipulovat pod mikroskopem. Lze rozlišit samce od samic a oplozené samice od neoplozených (panen) (viz. kap. 5). K práci s octomilkami pod mikroskopem se používá jemný štětec.

Pro křížení je nezbytné používat panny, jelikož oplozené samice po dlouhou dobu nepřijímají jiné samce a kladou pouze vajíčka oplozená prvním samcem. Pokud octomilky uchováváme

v 25° C, jsou samci po vylíhnutí z kulek po dobu 4 hodin neplodní. Proto, pokud chceme mouchy zkřížit s jinou genetickou linií, se každé 4 hodiny vybírají a separují panny. Tím se zamezí jejich oplodnění a je možné zkřížit je se samci jiné linie, což se dělá jednoduše, umístěním panen a samců do stejné vialky (Markstein Michele, 2018).

Pro pouhé přesypání octomilek do nové vialky je buď možné použít CO₂ anestezii pomocí jehly anebo je možné sklepat octomilky na dno vialky. Octomilky mají zvyk lézt směrem vzhůru – proti gravitaci, proto se musí sklepat. Předem připravená čistá vialka bez vatového uzávěru se přiloží shora a vialky se překlopí tak, aby čistá vialka byla dole a stará byla nahoře vzhůru nohama. Nakonec se octomilky znovu sklepu dolů do nové vialky a zazátkují se vatou.

Manipulaci s octomilkami jsem dělala podle instrukcí konzultantky.

5 METODY A LABORATORNÍ PRAXE

5.1 Manipulace genové exprese

Transgenní octomilky (octomilky, které jsou geneticky modifikované) jsou velice často vytvářeny a využívány ke genetickým výzkumům.

Manipulace genové exprese nám může pomoci k pochopení molekulární patogeneze a pro vývoj léčiv.

5.1.1 RNA interference

RNA interference (RNAi) je metoda, která využívá krátkou dvouvláknovou RNA (anglicky “double-strand” tedy dsRNA). Ta umožňuje regulaci exprese genů v organismu. Jejím úkolem je zamezení buď translace z messengerové (mRNA) nebo přímo její degradace.

V případě, že se dsRNA naváže na mRNA nesoucí informaci genu v DNA organismu, způsobí tím takzvaný knockdown (snížení exprese) cílového genu. Ovšem nedojde k žádné delecii (vymazání) genu ze sekvence DNA, pouze k jeho částečnému vyřazení „z provozu“ (Gregor Tomáš, 2013; Prokop A, n.d.).

5.1.2 Gal4/UAS systém

Gal4/UAS systém se často využívá v molekulární biologii u octomilky (Brand & Perrimon, 1993). Tento systém je složen ze dvou částí. Gal4 je transkripční faktor (protein, který začíná a určuje, kde a kdy se bude gen přepisovat do mRNA – transkripce). Jeho úkolem je napojit se

na UAS sekvenci. UAS (Upsteram activating sequence) sekvence je DNA sekvence, za níž je vložena informace pro tvorbu dsRNA. Když se sameček s UAS sekvencí zkříží se samičkou s Gal4, jejich potomci exprimují dsRNA proti konkrétnímu genu. Za UAS sekvencí ale může být vložena i jiná sekvence, například kódující sekvence určitého genu. Pak dojde k jeho overexpresi (zvýšení exprese) Gal4 faktor i sekvence UAS jsou převzaty z kvasinek (Prokop A, n.d.; Štros Jiří, 2013).

5.2 Ortogeny

K lidským PAS a PI genům, které jsou spojeny s imunními, metabolickými a endokrinními poruchami/anomáliemi, jako je obezita, byly přiřazeny geny (ortogeny) octomilky (viz. tabulka 1). Jedinci s mutacemi v těchto genech mají metabolické či imunitní problémy.

Ortogeny jsou geny, které mají podobnou sekvenci a funkci s geny jiného druhu. Podobné je i pořadí aminokyselin v proteinu, pro jehož tvorbu daný gen nese informaci. Takto se dají nalézt geny octomilky, které jsou ekvivalentní ke genům člověka. Pokud tyto geny mají podobnou sekvenci, jedná se o ortogeny sekvenční. Pokud mají tyto geny podobnou funkci, jsou to ortogeny funkční. V mém případě jsem měla předem určené a přiřazené ortogeny octomilek ke genům člověka (viz. tab. 1). Ortologie byla určena podle (Fenckova et al., 2019).

Lidský gen	Gen octomilky	LOF/GOF
<i>EHMT1</i>	<i>G9a</i>	LOF
<i>NF1</i>	<i>Nf1</i>	LOF
<i>KRAS & HRAS</i>	<i>Ras85D</i>	GOF
<i>PTPN11</i>	<i>csw</i>	GOF
<i>MTRR</i>	<i>CG14882</i>	LOF
<i>GK</i>	<i>Gyk</i>	LOF
<i>GALE</i>	<i>Gale</i>	LOF
<i>CBS</i>	<i>Cbs</i>	LOF
<i>EIF2AK3</i>	<i>PEK</i>	LOF
<i>ALG1</i>	<i>CG18012</i>	LOF
<i>HSD17B10</i>	<i>scu</i>	LOF

Tabulka 1 – v levém sloupci jsou lidské geny, jejichž mutace způsobují PI/PAS, v prostředním sloupci jsou ortogeny octomilky, které byly studovány v této práci a v pravém sloupci je typ mutace (LOF – loss-of-function neboli ztráta funkce a GOF – gain-of-function neboli zvýšená funkce)

(<http://flybase.org> – cit. 23.12.2022)

Mutace lidských genů, způsobují různé poruchy (homocystinurii, poruchy glycerol kinázy, Leopardí syndrom, Syndrom Noonanové atd.). Některé jsou spojeny pouze s PI (př. defekt genu *EHMT1* způsobuje Keefstra syndrom a je charakterizovaný jako PI) nebo PI s PAS (př. mutace genu *KRAS* zapříčiňuje Syndrom Noonanové, který je spojen s PI s PAS) (*Určení Syndromů a Defektů*, n.d.).

Tyto ortogeny se exprimují v tukovém tělese octomilky a v jejích hemocytech. Jejich exprese se navíc zvýší, pokud dojde k infekci (M. Fencková, nepublikováno). Tukové těleso je největší orgán octomilky, a má funkci jak obranyschopnou, tak i jako „zásobárna energie“ (Arrese & Soulages, 2010). Hemocyty jsou cirkulující imunitní buňky octomilky.

Má hypotéza je, že jedinci s těmito mutacemi (v mém případě pacienti s PAS a PI) mají zhoršenou habituaci, protože energie, která je potřebná pro správnou práci mozku při habituaci, je použita na imunometabolické procesy.

5.3 Křížení

Křížení se také nazývá hybridizace. Znamená to, že zkřížením dvou různých organismů dostaneme novou generaci hybridů/mutantů. Tito hybridi mohou často mít znaky svých rodičů. Jedná se o jedny ze základních poznatků dědičnosti, které zkoumal mnich a přírodovědec Řehoř Jan Mendel.

Nejčastěji se křížení využívá jako genetická modifikace organismů k vývoji lepších (funkčně nebo i vzhledově) a odolnějších organismů. Tomuto křížení se nejčastěji říká šlechtění.

5.3.1 Křížení a příprava octomilek pro testování

Křížením jsem dokázala vytvořit octomilky, vhodné pro testování v habituaci. Použila jsem UAS/Gal4 systém. Pro manipulaci s geny v imunometabolických tkáních jsem použila Gal4 linii specifickou pro hemocyty a tukové těleso (*srp-Gal4* (FBtp0019449)). Genotyp této Gal4 linie je *w**; *2xGMR-wIR-3/2-25/1*; *srp-Gal4*.(stock 9462). Tuto linii jsem zkřížila s UAS-RNAi liniemi, uvedenými v tabulce 2, včetně kontrolní linie. Každý experiment zahrnoval i technickou kontrolu, která se skládala z potomků křížení mezi neuronální Gal4 linií *elav-Gal4* (FBtp0000743; *w-*; *GMR-wIR-3/2-25/1*; *elav-Gal4*, UAS-Dicer2-6; stock 9068) a UAS-RNAi linií proti genu *Nfl* (stock 6155), respektive linií kontrolní, která má stejné genetické pozadí jako testované linie, ale neobsahuje žádnou mutaci, či UAS inzerci (stock 2055). Jelikož RNAi knockdownu tohoto genu vede k deficitu v light-off jump habituaci (Fenckova et al., 2019), sloužil pro mě jako technická kontrola správnosti testování.

Genotyp stocku 9462: *w**; *2xGMR-wIR-3/2-25/1*; *srp-Gal4* a genotyp stocku 9068: *w-*; *GMR-wIR-3/2-25/1*; *elav-Gal4*, *UAS-Dicer2-6* se čtou následovně: každý chromozom je rozdělen středníkem.

- *w** a *w-*: mutace genu *white*, které způsobí bílé zbarvení očí
- *GMR-wIR*: : RNAi proti genu *white* exprimovaná pod *GMR* promotorem, tento promotor je specifický pro oči octomilky
- *srp-Gal4*: *srp* je promotor kódující transkripční faktor *Gal4* specifický pro tukové těleso a hemocyty.
- *elav-Gal4*: promotor *elav* pro regulaci exprese *Gal4* faktoru. Cílem je nervový systém embrya i larvy. Bílkovinný promotor *elav* (embryonální letální abnormální vize) způsobí embryonální a larvální letalitu.
- *UAS-Dicer2*: *UAS* sekvence řídící expresi *Dicer2*, který napomáhá RNAi

Křížením jsem dokázala vytvořit octomilky, vhodné pro testování. Linie samců i panen byly předem již vytvořené od VDRC (Vienna Drosophila Resource Centre) nebo publikovány jinými laboratoři (9252, 9260).

Lidský gen	Gen octomilky	Kód testů – 1., 2., 3. den	Interní číslo linie panen (Stock)	Genotyp linií	Interní číslo linie samců (Stock)
- (kontrola)	- (kontrola)	1zsm, 16zsm, 31zsm	9462	<i>w1118</i>	2055
- (kontrola)	- (kontrola)	2zsm, 17zsm, 32zsm	9462	<i>w1118</i>	2055
<i>EHMT1</i>	<i>G9a</i>	3zsm, 18zsm, 33zsm	9462	<i>w1118</i> ; ; <i>vdrc 25474</i>	1670
<i>NFI</i>	<i>Nfl</i>	4zsm, 19zsm, 34zsm	9462	<i>w1118</i> ; ; <i>vdrc35877/Sb,Tb</i>	6155
<i>KRAS&HRAS</i>	<i>Ras85D</i>	5zsm, 20zsm, 35zsm	9462	<i>w1118</i> ; <i>UAS-Ras1-R68Q</i> ;	9252
<i>PTPN11</i>	<i>csw</i>	6zsm, 21zsm, 36zsm	9462	<i>P{w[+mC]=UAS-csw.WT}CIM, w1118</i>	9260
<i>MTRR</i>	<i>CG14882</i>	7zsm, 22zsm, 37zsm	9462	<i>w1118</i> ; <i>P{GD8474}v38838</i>	9405
<i>GK</i>	<i>Gyk</i>	8zsm, 23zsm, 38zsm	9462	<i>w1118 P{GD9566}v52478</i>	9419
<i>GALE</i>	<i>Gale</i>	9zsm, 24zsm, 39zsm	9462	<i>w1118</i> ; <i>P{GD7464}v47408</i>	9421
<i>CBS</i>	<i>Cbs</i>	10zsm, 25zsm, 40zsm	9462	<i>w1118 P{GD9407}v32946</i>	9424
<i>EIF2AK3</i>	<i>PEK</i>	11zsm, 26zsm, 41zsm	9462	<i>w1118</i> ; <i>P{GD5584}v16427</i>	9429
<i>ALG1</i>	<i>CG18012</i>	12zsm, 27zsm, 42zsm	9462	<i>w1118</i> ; <i>P{GD9500}v20580</i>	9431
<i>HSD17B10</i>	<i>scu</i>	13zsm, 28zsm, 43zsm	9462	<i>w1118</i> ; <i>P{GD1528}v37083</i>	9435
- (kontrola)	- (kontrola)	14zsm, 29zsm, 44zsm	9068	<i>w1118</i>	2055

<i>Nf1</i>	<i>Nf1</i>	15zsm, 30zsm, 45zsm	9068	<i>w1118; ;vdr35877/Sb,Tb</i>	6155
------------	------------	------------------------	------	-------------------------------	------

Tabulka 2 – první dva sloupce: lidské geny a jejich ortogeny octomilky; třetí sloupec zleva: kódy/názvy testů ze tří dnů; čtvrtý a šestý zleva: číselné kódy stocků; pátý sloupec zleva; genotypy zkřížených stocků (každý chromozom je dělen středníkem)

Stock panen (9462) nese Gal4 faktor a stock samců nese UAS sekvenci (viz. kap. 6.1.2). Potomci křížení mezi těmito stocky mají expresi RNAi, která znemožňuje expresi zkoumaného genu anebo způsobí jeho overexpresi (v případě *Ras85D* a *csw*).

Výjimkou je stock panen 9421 kde samice nesou RNAi.

Na každé křížení jsem použila tři vialky, které jsem označila kódy (číslo *n*)zsm (např. 1zsm). Po dvou dnech, kdy octomilky nakladly dostatečné množství oplodněných vajíček, jsem je přesypala do nových vialek a tyto označila novým kódem (např. 16zsm) a po dalších dvou dnech zase do nových vialek (např. 31zsm) (viz. tabulka 2). Octomilky, které se vylíhly z těchto vialek, byly potomky stejného křížení, ale byly testovány samostatně v tři po sobě jdoucí dny. Do každé vialky bylo vloženo zhruba 5 panen a od 5-10 samců. Tímto způsobem jsem získala dostatečnou diverzitu v potomstvu křížených octomilek. Kontrolní octomilky byly také testovány každý den, společně s indukovanými RNAi octomilkami. Dohromady jsem předpokládala s testováním celkem 1080 potomků/octomilek ze 45 křížení. Vialky se zkříženými octomilkami a jejich potomky jsem uchovávala v inkubátoru s teplotou 25°C, vlhkostí 60% a fotoperiodou (12 h světlo:12 h tma)

5.4 Testování octomilek pomocí light-off jump habituace

K testování jsem použila přístroj Zantiks MWP. Zantiks MWP funguje na způsob opakovaného zhasínání světla v různých intervalech. Tato metoda testování se nazývá „light-off“, neboli „zhasnutí světla“. Octomilky reagují na toto zhasnutí výskokem (jump). Testovací program má tři hlavní fáze, které jsou odděleny 90 s intervalem. Před první fází mají octomilky pět minut na adaptaci v novém prostředí (přístroj Zantiks MWP, rozsvícené světlo). Po adaptaci se spustí první fáze, puls. Desetkrát za sebou se světlo zhasne po dobu 15 ms s intervalem 5 sekund mezi stimuly. Fáze Puls slouží k určení efektivnosti skokové odpovědi octomilek. Podle ní se dá určit a nastavit např. nejvhodnější intenzitu světla. Počítá se, kolikrát v průměru octomilky reagovaly na 10 stimulů. Tato fáze je první v pořadí testování, proto aby nebyly octomilky ovlivněny ostatními fázemi. Druhá fáze se nazývá Habituaace. Tato fáze testuje habituaci octomilek, jinak řečeno fáze habituace je hlavní test. Světlo je vypnuté stokrát za sebou

s intervalem 1 sekundy. Octomilky by na začátku měly reagovat skokovou odpovědí. Kontrolní octomilky bez deficitu by se měly přizpůsobit a přestat skákat. Na rozdíl od kontrol, octomilky s deficitem v habituaci by měly reagovat na stimuly déle (viz. obrázek 1).

Poslední fáze, Únava, je jistá kontrola pro habituaci. Zde se zhasne světlo padesátkrát s 5 sekundami mezi každým stimulem. Tento interval nezpůsobuje habituaci. Octomilky s deficitem, i ty bez deficitu by se neměly stimulům přizpůsobit. Pokud ano, je možné, že jejich (příliš dobrá) habituace je do určité míry způsobená únavou. Jedná se tedy o kontrolu především pro ty manipulace, které vedou k rychlé habituaci, nikoliv pro manipulace, které způsobují deficit v habituaci (pomalejší habituaci) (*Přístroj Zantiks MWP*, n.d.).

Pro testování byly octomilky přeneseny do speciálních destiček. Jedna destička obsahuje 24 kruhových lomůrek a do každé se umístí jedna octomilka. Pro testování byli použiti pouze samci. Samice, pokud jsou oplozené, nereagují na light-off stimulus. Pro knockdown genu *Gale* jsem musela použít neoplozené samice, panny, protože exprese RNAi se pouze objevuje u samic. Je vyzkoumáno, že oplozené samice nereagují na stimuly, proto je nutné použít neoplozené. Jako kontrolu jsem též použila panny z kontrolního křížení (9462x2055; testy 2zsm, 17zsm, 32zsm; tabulka 2). Aby nenastaly potíže s přesunem octomilek z vialky na destičku, uspala jsem je kráče na ledu. Led jsem použila proto, že vystavení CO₂ 24 hodin před testem by mohlo ovlivnit jejich chování a fyziologii. Uspané octomilky jsem přenesla do komůrek pomocí aspirátoru (viz. obrázek 5). Mezi uspaním a testováním jsem čekala 30 minut, aby octomilky byly plně zotavené z ledové anestezie. Před testováním jsem nastavila vnitřní teplotu přístroje Zantiks MWP na 25 °C pomocí ovládací konzole na počítači. Jak už bylo uvedeno, 25 °C je ideální teplota pro octomilky (viz. kap. 5.1).



Obrázek 5 – aspirátor

6 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky testování jsem zpracovala podle pokynů mé konzultantky následovně: (1) viditelné fenotypy (viz. kap 7.1) – především letalita a částečná letalita, (2) rozdělení podle skokové odpovědi (viz. kap. 7.2) – v případě, že ze 72 testovaných octomilek (3 dny X 24 octomilek)

skákalo na začátku testu (fáze Habituce) <50 % tj. méně než 36 octomilek, habituační odpověď nebylo možné posuzovat. Toto kritérium bylo stanoveno podle Fenckova et al. 2019. Zhoršená odpověď na stimuly by mohla maskovat potenciální defekt v adaptaci na jejich opakování a znemožňuje tedy udělat závěr o habituaci. Tyto octomilky se nazývají „non performers“ neboli „neskokani“. (3) habituační odpověď octomilek (viz. kap. 9.3), u které na začátku testu (fáze Habituce) octomilky skákaly ≥ 50 %.

S pomocí programu HAB_PII, vytvořeného mojí konzultantkou (Fenckova et al. 2019), jsem mohla posuzovat skokovou a habituační odpověď octomilek. Tento program zpracoval data z testovacího přístroje Zantiks MWP. Program HAB_PII Octomilky byly považovány za „habituované“ v případě, že neskákaly v pěti po sobě jdoucích pokusech při zhasnutí světla (kritérium neskákání). Habituační byla kvantifikována jako počet pokusů potřebných k dosažení kritéria neskákání (pokusy ke kritériu, anglicky Trials To Criterion (TTC)). Data byla zpracována podle průměrného TTC a jsou uvedena včetně \pm SEM (The standard error of the mean neboli Standardní chyba průměru). Podíl mezi TTC octomilek s genetickou manipulací a TTC kontrolních octomilek určuje habituaci. Je-li větší než 1, je habituace pomalejší, tedy defektivní. Je-li menší než 1, je habituace rychlejší, tedy předčasná. Poslední kritériem je p-hodnota (p-value). Pokud je menší než 0,05, je rozdíl v TTC statisticky průkazný. Pro lepší orientaci budu názvy testů (trojice testů stejného genu) nazývat podle genů octomilek.

6.1 Pozitivní kontrola

Pozitivní kontrola funguje jako kontrolní test (již nastíněno v kap. 6.3.1), který by měl mít deficit v habituaci (viz. obr. 1). Takto je možné kontrolovat, zda nejsou octomilky, které nereagují optimálně na stimuly, ovlivněné vnějším prostředím (nevhodné podmínky v inkubátoru, nevhodná intenzita světla v přístroji). V mém případě se pozitivní kontrolou stal knockdown genu *Nfl* s jiným stockem panen (9068). Pozitivní kontrola mi ukázala, že vnější podmínky by měly být vhodné pro všechny testované octomilky.

Pozitivní kontrola má deficit v habituaci (pozitivní kontrola: $81,0 \pm 6,0$, kontrola pozitivní kontroly: $24,0 \pm 6,11$, p-value pozitivní kontroly 2,220) a její skoková odpověď je větší než 50 % (1. den – 100 %; 2. den – 100 %; 3. den – 100 %). Takto jsem se mohla vždy před testováním ostatních genů ujistit, zda jsou octomilky v plném pořádku.

6.2 Viditelné fenotypy

Manipulace s některými PI/PAS ortogeny v imunometabolických tkáních vedly k viditelným fenotypům. Takto jsem zjistila, které geny jsou důležité pro vitalitu octomilky. Tři nejvíce patrné fenotypy se vyskytly u genů *Ras85D*, *Cbs*, *CG18012*.

(1) Overexprese *Ras85D* způsobila letalitu. Tato letalita byla viditelná již ve vývoji larev (viz. příloha 1). Již od začátku bylo vidět, že larvy se nevyvíjely, byly tmavé a bylo jich velice málo. Potomky tohoto křížení jsem proto nemohla testovat.

(2) Knockdown genu *Cbs*, způsobil částečnou larvální letalitu (viz. příloha 2). Z důvodu částečné letality jsem neměla dostatek octomilek pro tři individuální testy (10zsm, 25zsm, 40zsm). Test jsem tedy provedla pouze 1. den testování, a to tedy test 10zsm. Mohla jsem tedy testovat pouze 24 octomilek.

(3) Při knockdownu genu *CG18012* se u potomků začaly objevovat tzv. melanotické tumory. Tyto tumory se samovolně v těle octomilky nevyskytují. Jejich výskyt je reakce na přítomnost cizorodých těles či patogenů v těle octomilky. Imunitní systém nahromadí látky, které zakonzervují patogen a vytvoří tak malý tumor v těle (viz. příloha 3 a 4)(Minakhina & Steward, 2006). Na vzorku 53 octomilek jsem zjistila, že 1/2 samic (15 samic ze 30) a 1/7 samců (3 samci z 20) má tento fenotyp.

*Letalita (viz. příloha 1) versus viabilita (viz. příloha 5)

6.3 Skoková odpověď

Skoková odpověď se hodnotí podle počtu octomilek, které reagují minimálně jednou na prvních pět stimulů (vypnutí světla). Z celkového počtu (24 pro jeden test) jich musí skočit minimálně 50 %. Rozdělují se tak na „performers“ – vykazující dostatečnou skokovou odpověď a „non performers“ – nevykazující dostatečnou skokovou odpověď. U těch není možné posuzovat habituaci.

Podle těchto kritérií jsem posuzovala všechny výsledky z testů a rozřadila octomilky na „performers“ a „non performers“. „Performers“ jsem mohla po tomto rozdělení dále posuzovat.

Bohužel, ve většině případů byla skoková odpověď nedostatečná (<50 %) Geny, které byly asociovány s tímto fenotypem jsou *CG14882*, *Gyk*, *CG18012*, *Cbs* a *G9a*.

Octomilky s knockdownem genu *CG14882* měly na začátku testu skokovou odpověď 48,6 %, knockdownem genu *Gyk* 36,1 %, s knockdownem *CG18012* 38,9 % (společně s výskytem melanotických tumorů) (viz. Kapitola 6.2) a s knockdownem *Cbs* 33,3 %. Zde se vyskytla i částečná letalita (viz. kap. 6.2)). Testovalo se pouze 24 octomilek, ovšem pouze 8 octomilek reagovalo. (8) U knockdown *G9a* byla počáteční skoková odpověď 44,4 %.

6.4 Habituační

Habituační bylo možné zhodnotit pouze u manipulací, které vykazovaly dostatečnou skokovou odpověď, tedy u „performers“. Týkalo se to těchto genů: *PEK*, *csw*, *Gale* a *Nf1*. Lze identifikovat tři různé fenotypy.

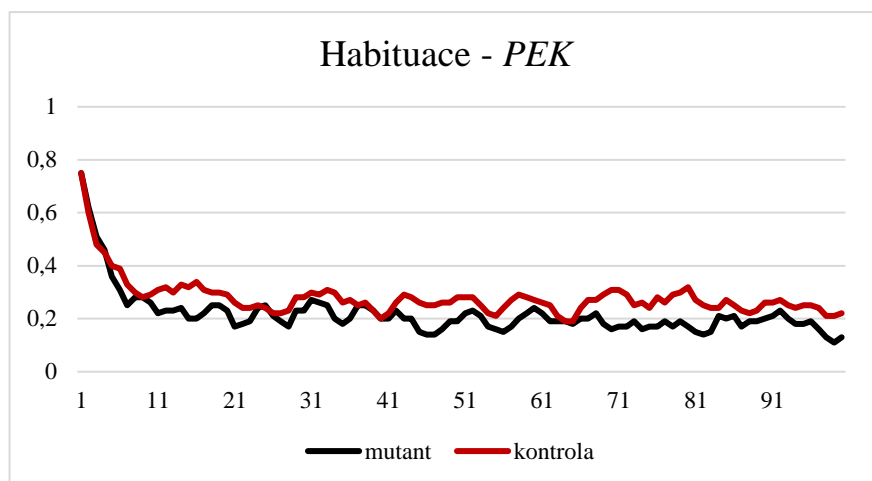
(A) TTC je signifikantně vyšší. V tomto případě mají octomilky deficit v habituaci a jejich schopnost a učení se přizpůsobit opakovaným stimulům je snížena. (B) TTC není signifikantně odlišné od TTC kontrolních octomilek. Octomilky mají tedy schopnost habituace stejnou nebo podobnou jako kontrola a jsou bez deficitu. Zároveň je i křivka Únavy (viz. kap. 5.4) podobná jako u kontrol a TTC v únavového testu není signifikantně odlišné. (C) Předčasná habituace. To znamená, že se testované octomilky dokážou přizpůsobit lépe a rychleji potlačí skokovou odpověď na opakované stimuly. V tomto případě se ještě kontroluje test Únava. (D) V případě, že křivka Únavy připomíná křivku habituace (viz. obr. 4) (časem se blíží k nule – je přítomno zakřivení), je předčasná habituace pravděpodobně způsobená únavou. Jedná se tedy o fenotyp zvýšené únavy, což značí rychlejší vyčerpání, narozdíl od zhoršené skokové odpovědi (viz. kapitola 7.3)

A. Deficit v habituaci

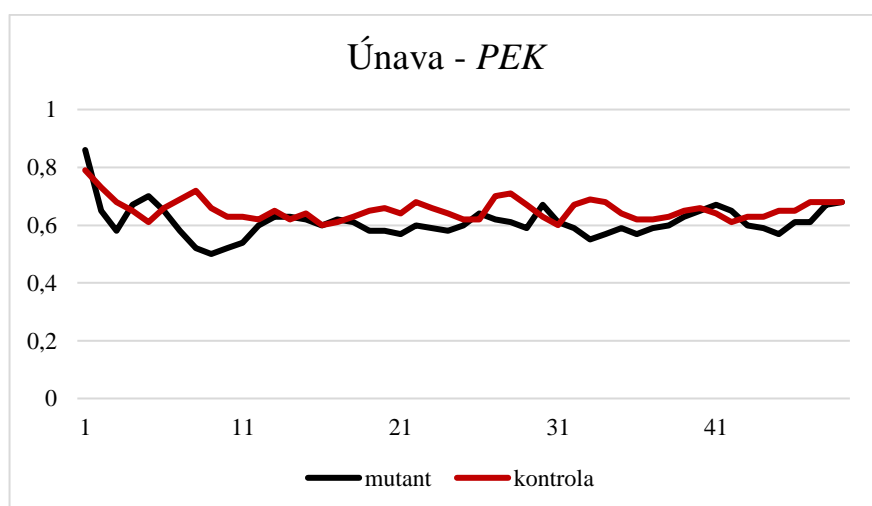
Předpokládala jsem, že knockdownem genů způsobím zhoršení habituace. Tento předpoklad se nepotvrdil. Žádná s manipulací nevedla k deficitu v habituaci.

B. Žádný deficit v habituaci

Knockdown genu *PEK* měl velice podobnou habituační odpověď jako kontrola (viz. obrázek 6) (hodnota TTC byla $14,9 \pm 5,0$ a hodnota TTC kontroly $23,8 \pm 4,3$, hodnota p-value 0,631). Jeho počáteční skoková odpověď byla 80,6 % a kontrolní test Únavy měl křivku stejnou jako křivka kontrolních octomilek (viz. obrázek 7). Knockdown tohoto genu tedy nemá vliv na habituaci ani výrazně neovlivňuje skokovou odpověď.



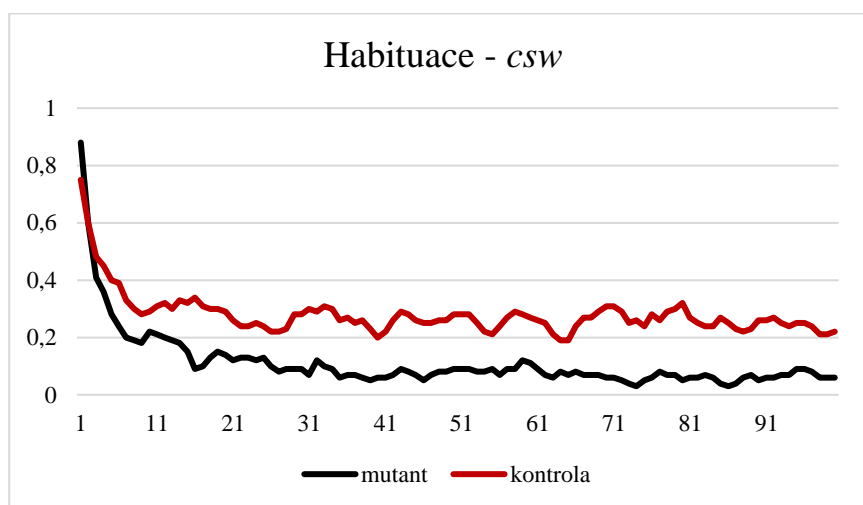
Obrázek 6 – graf Habituace u mutantů s genem *PEK* – knockdown s kontrolními octomilkami; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi



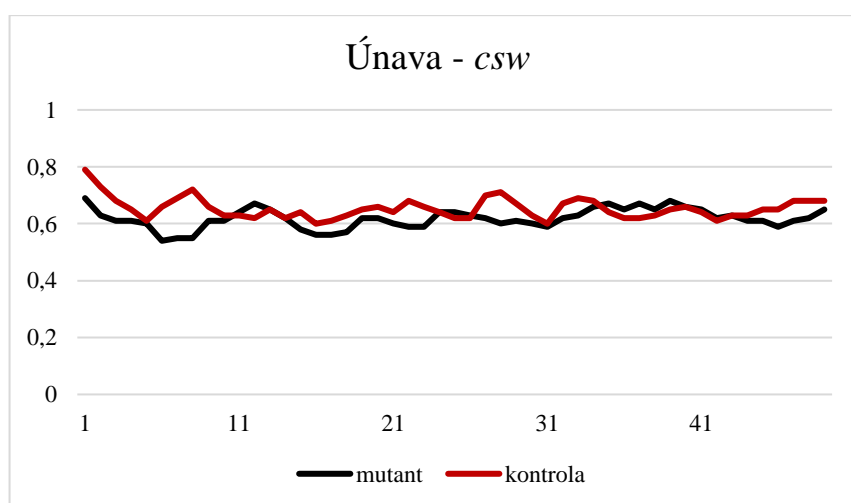
Obrázek 7 – graf Únavy u mutantů s genem *PEK* – knockdown s kontrolními octomilkami; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi

C. Předčasná habituace

Octomilky s overexpresí genu *csw* měly rychlejší habituační odpověď než kontrolní octomilky. Rychleji se přizpůsobili „light-off“ stimulům a dříve na ně přestali reagovat (přestali skákat) (viz. obrázek 8). Skoková odpověď byla 66,4 % (48 octomilek z 72). V test Únavy, který fungovala jako kontrola testu Habituace, měly skokovou odpověď 81,9 %. Při testu Únavy octomilky nepřestali skákat a jejich skoková křivka kopírovala křivku kontroly (viz. obrázek 9). Hodnota TTC mutantů byla $8,6 \pm 1,6$ a hodnota TTC kontroly byla $23,6 \pm 4,3$ a p-value byla 0,003.



Obrázek 8 – grafy Habituace u mutantů s genem *csw* – overexprese s kontrolními octomilkami; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi

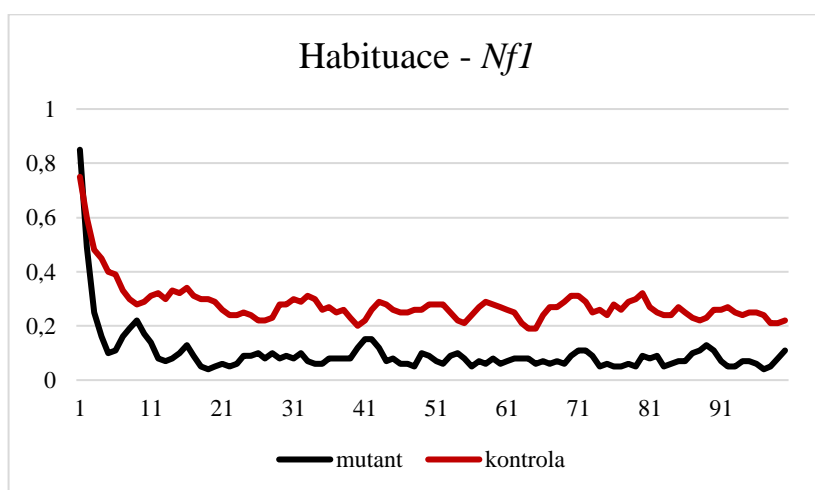


Obrázek 9 – grafu Únavy u mutantů s genem *csw* – overexprese s kontrolními octomilkami; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi

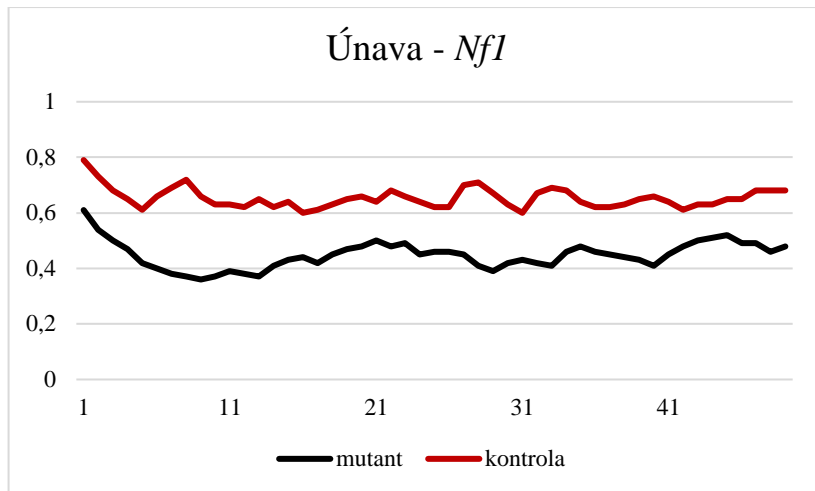
Overexprese genu *cws* tedy zlepšila habituaci. Octomilka bez tohoto genu má lepší habituaci. Nicméně, je možné, že i zde byla zvýšená únava, která není zachytitelná zde použitým testem únavy.

D. Zvýšená únava

Knockdown genů *Gale*, *Nf1* a *scu* byl spojen s fenotypem zvýšené únavy. Při testování knockdownu genu *Gale* jsem mohla použít data z prvního dne (24 octomilek). Při 2. a 3. testovacím dnu jsem zapoměla otestovat kontroly k tomuto genu (17zsm, 32zsm; viz. tabulka 1), proto jsem nemohla použít data testů genu *Gale* z 2. a 3. dne. Ten způsobuje větší zakřivení křivky Habituace. Také způsobuje zakřivení křivky grafu Únava. Hodnota TTC mutantů byla $5,7 \pm 1,6$ a hodnota TTC kontroly $45,3 \pm 9,8$, p-value $<0,001$. Knockdown *Nf1* měl skokovou odpověď 50 % z 72 octomilek. Test Habituace naznačoval u testovaných octomilek rychlejší habituaci (viz. obrázek 10), ovšem test Únava nakonec ukázal, že i tak měly octomilky fenotyp únavy (viz. obrázek 11). Hodnota TTC mutantů byla $5,6 \pm 2,1$ a hodnota TTC kontrol byla $23,6 \pm 4,3$ s p-value 6,179 Knockdown genu *scu* způsobil skokovou odpověď 52,8 % ze 72 octomilek, ale test únava měl také zakřivenou křivku (křivka vypadala jako křivka Habituace). Hodnota TTC mutantů *scu* byla $13,3 \pm 4,2$ a hodnota TTC kontroly $23,6 \pm 4,3$ a p-value 0,1783.



Obrázek 10 – graf Habituace u mutantů s genem *Nf1* – knockdown s kontrolními octomilkami; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi



Obrázek 11 – graf Únavy u mutantů s genem *Nf1* – knockdown s kontrolními octomilkami; osa x reprezentuje počet opakovaných stimulů za sebou a osa y reprezentuje sílu odpovědi

7 ZÁVĚR A DISKUZE

Primárně jsem předpokládala, že deaktivací genů se zvýší habituační odpověď. Bohužel, u většiny testovaných genů se habituační odpověď nedala posuzovat (nedostatečná skoková odpověď, letalita, fenotyp únavy). To naznačuje, že funkce těchto genů v tukové a imunitní tkáni je důležité k zdravému životu octomilky.

Z výsledků genů *CG14882*, *Gyk*, *CG18012*, *Cbs* a *G9a* vyvozují, že tyto geny mají jistě nějaký vliv na skokovou odpověď nebo předpoklady k rychlejší únavě. Tyto výsledky nebyly dostatečné na posouzení habituační odpovědi.

Je zajímavé, že při knockdownu genu *CG18012* se v mém případě fenotyp ukazoval více u samic než u samců, protože UAS/Gal4 systém funguje lépe u samců. Měl by u nich vést k efektivnějšímu knockdownu a jakýkoliv fenotyp by tedy měl být pozorovatelný spíše u nich.

Vzhledem k tomu, že většina octomilek neskákala dostatečně, nezískala jsem dostatečný počet dat k hlubšímu zkoumání. Tento fakt ovšem neznamená, že není možné zkoumat tyto geny dále. Lidské geny mohou mít podobný vliv na jedince s PAS a PI. Příkladem jsou geny *Ras85D*, *Cbs* spojeny s fenotypem letality. Jedinci s PAS a PI by mohli mít zhoršený zdravotní stav nebo zvýšenou mortalitu.

Příkladem je gen *Cbs*. Lidský ortogen *CBS* se podílí na kódování proteinu cystathionin beta-syntázy (CBS). Deficit tohoto genu způsobuje u člověka dědičnou metabolickou poruchu homocystinurii. S homocystinurií jsou spojené další poruchy, např. porucha očí (šedý zákal), cév (srážlivost krve, vznik trombocytů), ale také poruchy nervového systému (opožděný vývoj).

Z mé práce vyplývá, že i jemný zásah do genové exprese dokáže ovlivnit životaschopnost, pohyblivost a fyzickou vytrvalost octomilky. Změna exprese genů v imunometabolické tkáni dokáže působit na celé tělo octomilky.

8 ZDROJE

8.1 Použitá literatura a citace v textu

- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 55). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Blok LER, Boon M, van Reijmersdal B, Höffler KD, Fenckova M, & Schenck A. (2022). Genetics, molecular control and clinical relevance of habituation learning . *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2). <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Dobešová Jana. (2009). *Pervazivní vývojové poruchy: Autismus v teorii a praxi* [Bakalářská práce]. Masarykova univerzita.
- doc. MUDr. Ošlejšková Hana, Ph. D. (2010). Neurovývojové poruchy a jejich důsledky v dospělém věku . *Neurologie pro Praxi* , 368.
- Faridi, F., & Khosrowabadi, R. (2017). Behavioral, cognitive and neural markers of asperger syndrome. In *Basic and Clinical Neuroscience* (Vol. 8, Issue 5). <https://doi.org/10.18869/NIRP.BCN.8.5.349>
- Fenckova, M., Blok, L. E. R., Asztalos, L., Goodman, D. P., Cizek, P., Singgih, E. L., Glennon, J. C., IntHout, J., Zweier, C., Eichler, E. E., von Reyn, C. R., Bernier, R. A., Asztalos, Z., & Schenck, A. (2019). Habituation Learning Is a Widely Affected Mechanism in Drosophila Models of Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*, 86(4). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.029>
- Gorina, A. S., Kolesnichenko, L. S., & Mikhnovich, V. I. (2011). Catecholamines and their metabolites in children with asperger and kanner syndromes. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 57(5). <https://doi.org/10.18097/pbmc20115705562>
- Gregor Tomáš. (2013). *Mikro-RNA interference adenosinového receptoru u modelového organismu Drosophila melanogaster* [Bakalářská práce]. Jihočeská univerzita .
- Hagerman, P. J., & Hagerman, R. (2021). Fragile X syndrome. *Current Biology*, 31(6). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.043>
- Hill AP, Zuckerman KE, & Fombonne E. (2015). Obesity and Autism. *Pediatrics*.
- Hodges, H., Fealko, C., & Soares, N. (2020). Autism spectrum disorder: Definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. In *Translational Pediatrics* (Vol. 9). <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09>
- Holá Marta. (2017). *Lidská inteligence* [Bakalářská práce]. Univerzita Hradec Králové. *Kritéria IQ* . (n.d.). <https://www.Iq-Tester.Cz/o-Inteligenci/Urovne-Hodnot-Iq.Html> .
- Lee Keun, Cascella Marco, & Marwaha Raman. (2022). Intellectual Disability . *StatPearls*.
- Margolis, S. S., Sell, G. L., Zbinden, M. A., & Bird, L. M. (2015). Angelman Syndrome. In *Neurotherapeutics* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0361-y>
- Markstein Michele. (2018). *Drosophila Workers Unite!: A Laboratory Manual for Working with Drosophila* . University of Mass.
- Martens, G., & van Loo, K. (2009). Genetic and Environmental Factors in Complex Neurodevelopmental Disorders. *Current Genomics*, 8(7). <https://doi.org/10.2174/138920207783591717>
- MCHAT. (n.d.). <https://Mchatscreen.Com>.
- Mehndiratta, M. M., Mehndiratta, P., & Pande, R. (2014). Poliomyelitis: Historical Facts, Epidemiology, and Current Challenges in Eradication. *The Neurohospitalist*, 4(4). <https://doi.org/10.1177/1941874414533352>

Minakhina, S., & Steward, R. (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: Pathways and phenotypes. *Genetics*, 174(1). <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061978>

Přístroj Zantiks MWP . (n.d.). <https://Zantiks.Com/Model-Organisms/Drosophila>.

Prokop A. (n.d.). *A rough guide to Drosophila mating schemes*. 6.2.

Schmid Susane, Wilson Donald A., & Rankin Catharine H. (2015). Habituation mechanism and their importance for cognitive function. *Frontiers in Integrative Neuroscience*.

Simpson, N., Mizen, L., & Cooper, S. A. (2020). Intellectual disabilities. In *Medicine (United Kingdom)* (Vol. 48, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.08.010>

Štros Jiří. (2013). *Reportéry genové exprese u Drosophila melanogaster* [Bakalářská práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Tomanová Kateřina. (2007). *Drosophila jako experimentální model ve fyziologickém výzkumu*. [Bakalářská práce]. Masarykova univerzita.

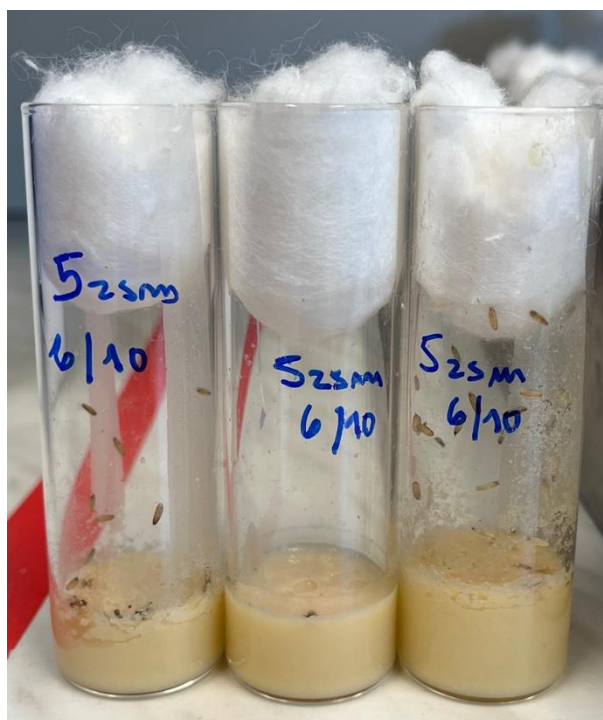
Určení syndromů a defektů . (n.d.). <https://Sysnnd.Dbmr.Unibe.Ch/>.

8.2 Použité obrázky

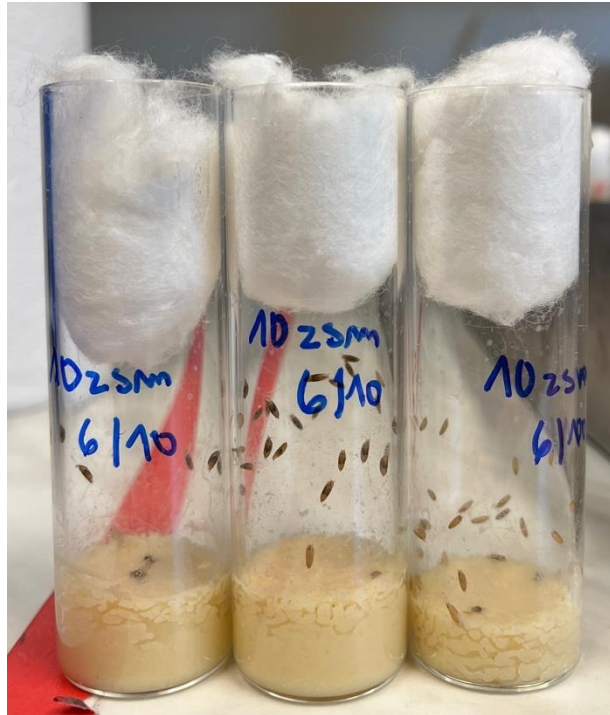
Obrázek 2 – <https://www.nbcnews.com/id/wbna39971264>

Obrázek 3 – <https://geneseesci.com/shop-online/product-details/59-122BC/flystuff-59-122bc-benchtop-flowbuddy-complete-with-standard-flypad-1-system-unit>

Obrázek 4 – <https://www.medplus.cz/endo-aspirator/>



Příloha 1 – vialka octomilek s overexpresí genu *Ras85D* – larvální letalita



Příloha 2 – vialka octomilek s knockdownem genu *Cbs* – částečná larvální letalita





Příloha 3 a 4 – melanotické tumory na octomilkách při knockdownu genu *CG18012*



Příloha 5 – vitalita