

Studiul genei *CG18135* de la *Drosophila melanogaster* prin utilizarea unor metode avansate de Analiză Genetică, Genomică și Bioinformatică - AOSR-TEAMS II EDIȚIA 2023-2024, Nr. 1 -  
DOMENIUL ȘTIINȚE BIOLOGICE

Scopul acestui proiect este adnotarea funcțională a genei *CG18135* de la *Drosophila melanogaster* și detalierea rețelelor de interacțiuni la care participă această genă/proteină (Figura 1).

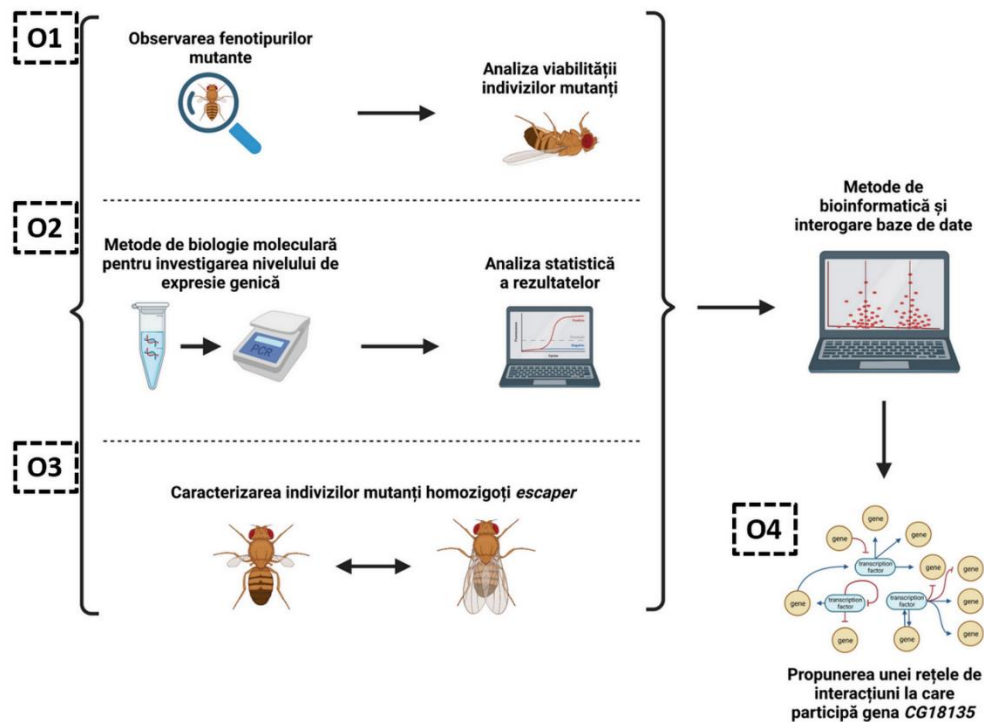


Figura 1. Prezentarea schematică a obiectivelor prezentului proiect de cercetare.

În această primă etapă de desfășurare a proiectului am realizat diferite experimente pentru a îndeplini obiectivele 1 și 2 specificate în propunerea de proiect. Mai precis, am făcut progrese consistente în ceea ce privește *Ob1*: Analiza viabilității și caracterizarea fenotipică a indivizilor mutați homozigoți și heterozigoți în diferite etape de dezvoltare, și am abordat o serie de proceduri de biologie moleculară necesare pentru îndeplinirea *Ob2*: Analiza nivelului de expresie genică al genei *CG18135* în indivizii mutați homozigoți și heterozigoți comparativ cu indivizi din linia etalon CantonS.

Pentru îndeplinirea *Ob1*, am lucrat cu o serie de linii specifice, disponibile anterior în cadrul laboratorului:

- linia etalon/de referință CantonS;

- două linii care conțin un cromozom 3 cu alela mutanta  $CG18135^{P(lacW)CG18135}$  ( $CG18135$ ), iar celălalt cromozom 3 este de tip *balancer*, fie  $TM3Ser\ GFP$  (GFP), fie  $TM6Tb\ Hu\ e$  ( $Tb$ ); caracteristic acestora este că determină letalitatea indivizilor homozigoți pentru cromozomii *balancer* (indivizii GFP/GFP și  $Tb/Tb$  mor în stadii de dezvoltare embrionare timpurii).

Indivizii de *D. melanogaster* care conțin cromozomul *balancer* GFP emit o fluorescență verzuie atunci când sunt stimulați cu lumina UV, iar aceasta este vizibilă începând cu stadiile embrionare târzii și până inclusiv în stadiul de adult. Acest *marker* genetic este oarecum dificil de vizualizat corect în stadiul de pupă, din cauza cuticulei acesteia, însă cromozomul TM6 conține *markerul* genetic  $Tb$ , care este foarte ușor de vizualizat în acest stadiu. Pupele care conțin  $Tb$  sunt în mod evident mai îndesate și scurte decât cele care sunt non- $Tb$ . Drept urmare, am ales să lucrăm cu acești doi cromozomi *balancer* pentru că sunt complementari în ceea ce privește identificarea indivizilor purtători, dar și pentru că astfel am putut evalua dacă genotipurile determinate de GFP și  $Tb$  influențează dezvoltarea normală.

De remarcat că în descendența celor trei linii apar indivizi cu genotipuri distincte și proprietăți fenotipice particulare, dintre care doar unele sunt compatibile cu viața.

Astfel, în descendența CantonS, toți indivizii sunt normali, cu fenotipuri non-GFP și non- $Tb$ , iar ei ar trebui să aibă o dezvoltare normală, adică orice embrion să își continue dezvoltarea și să parcurgă stadiile de larvă, pupă, iar apoi să eclozeze adulții. În descendența  $CG18135/GFP$  pot trăi dincolo de stadiile timpurii ale dezvoltării embrionare doar indivizii  $CG18135/GFP$  și cei  $CG18135/CG18135$ ; indivizii din prima categorie emit o fluorescență verzuie în toate stadiile de dezvoltare, pe când indivizii homozigoți pentru alela mutanta  $CG18135$  emit în stadiile de embrion târziu și larvă un tip specific de autofluorescență albăstruie atunci când sunt iluminați UV (Figura 2). În descendența  $CG18135/Tb$  pot depăși stadiile timpurii ale dezvoltării embrionare doar indivizii  $CG18135/Tb$  și cei  $CG18135/CG18135$ ; pupele indivizilor din prima categorie vor fi mai scurte în mod vizibil comparativ cu cele ale celor homozigoți pentru alela  $CG18135$  (Figura 2).

Ținând cont că este dificil să selectezi genotipuri particulare în stadiile de dezvoltare foarte timpurii (embrion), iar încercarea de a monitoriza dezvoltarea unor anumiți indivizi este cvasi imposibilă în condiții de aglomerare, am decis o abordare originală. Planul a fost să stimulăm ponta femelelor din cele trei linii, urmând ca embrionii să fie selectați individual, randomic, și ulterior plasați în spații unice, unde poate fi urmărită dezvoltarea lor cu mare precizie. În condițiile unei selecții inițiale complet aleatorie, este de așteptat ca 25% dintre descendenții liniilor mutante să aibă genotipul  $CG18135/CG18135$ , 50% să conțină alela mutanta în condiție heterozigotă și 25% să moară încă în stadiul de embrion (Figura 2).

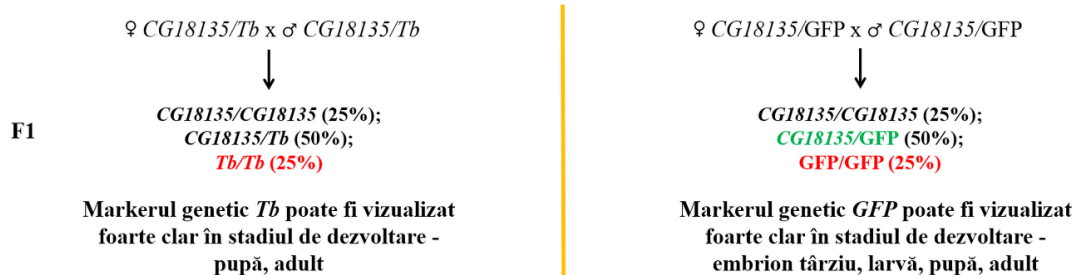


Figura 2. Descendența liniilor mutante. Cu roșu au fost indicate genotipurile care determină letalitate embrionară. Cu verde sunt indicați indivizii care au fluorescență GFP verzuie. În paranteze sunt indicate procentele corespunzătoare fiecărei categorii de descendenți.

În acest context, am utilizat cuști embrionare specifice (FlyStuff) și plăcuțe Petri compatibile (Figura 3A), în care am turnat mediu pe bază de suc de struguri (FlyStuff), dezvoltat special pentru a stimula pona. O parte dintre embrioni au fost colectați după aproximativ 4 ore de la introducerea femelelor (însoțite de masculi) în cuști de depunere. Deoarece femelele mutante nu au depus embrioni conform așteptărilor, am decis să montăm o plăcuță nouă și să le lăsăm să depună embrioni peste noapte, ceea ce însă a condus la creșterea diferențelor de vârstă dintre embrioni. Pentru această etapă nu am considerat vital acest aspect. Colectarea de pe mediile de depunere și plasarea ulterioară a embrionilor în cele 24 de godeuri cu mediu standard ale fiecărei plăci de cultură (Figura 3B) a fost realizată cu pensete profesionale sau pensule foarte fine. Plăcile de cultura au fost menținute la o temperatură de 21-22°C și au fost citite/evaluate utilizând stereomicroscopie binoculară Olympus (Figura 3C) la intervale de timp cuprinse între 4 și 6 zile, până când indivizii mutanți homoziгоți au atins stadiul de dezvoltare larvă 2 (L2) sau L2-3. În această etapă, din descendența *CG18135/GFP* am colectat o serie de larve non-GFP pe care le-am plasat individual într-o plăcuță nouă și le-am monitorizat dezvoltarea până la moartea acestora.

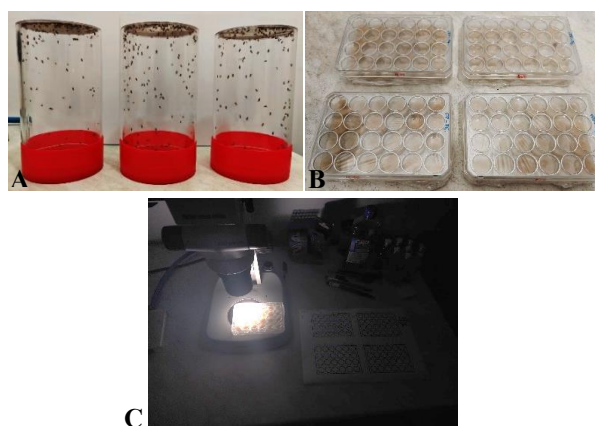


Figura 3. Elemente critice în *design*-ul experimental conceput pentru monitorizarea dezvoltării indivizilor considerați: cuștile de colectare (3A), plăcutele cu mediu de cultură (3B) și monitorizarea dezvoltării (3C).

Sumarizând, în cadrul acestui experiment din prima etapă a proiectului, am colectat individual 117, 176 și 236 de embrioni descendenți ai liniilor CantonS, *CG18135/Tb* și *CG18135/GFP*, respectiv. Ulterior, am notat modul în care s-au dezvoltat indivizii din fiecare godeu și am indicat, în cazurile în care a fost posibil, indivizii GFP (Figura 4). În Figura 4, categoria *Urme dezvoltare larvara* se referă la situațiile în care am putut evidenția într-un anumit godeu prezența unei cămăși embrionare sau urme ale năpârlirilor care au loc în timpul dezvoltării larvare (trecherile din L1 în L2 și L2 în L3), însă nu am putut vedea efectiv larva. Astfel de situații au fost posibile deoarece, în ciuda faptului că placuțele de mediu au fost acoperite cu o folie de plastic, uneori aceasta a fost ocolită de către larve, care au migrat în godeuri alăturate sau în spațiile dintre godeuri. Aceste urme au fost cuantificate drept larve, fără a putea fi atribuite unei categorii sau alta. Intenționăm ca pentru experimentele ulterioare să securizăm mai bine godeurile ocupate.

		<b>CantonS</b>	<b><i>CG18135/Tb</i></b>	<b><i>CG18135/GFP</i></b>
Total embrioni		<b>117</b>	<b>176</b>	<b>236</b>
Embrioni nedezvoltați	non-GFP	<b>7</b>	<b>69</b>	<b>54</b>
	GFP			<b>33</b>
Larve văzute	non-GFP	<b>106</b>	<b>72</b>	<b>40</b>
	GFP			<b>71</b>
Urme dezvoltare larvară		<b>4</b>	<b>35</b>	<b>38</b>
Total larve		<b>110</b>	<b>107</b>	<b>149</b>

Figura 4. Datele observate referitoare la dezvoltarea indivizilor plasați individual în godeurile plăcilor de cultură, din stadiul embrionar până în stadiul L2 și/sau L2-3.

Pentru a putea interpreta din punct de vedere statistic datele obținute pentru descendențele liniilor mutante, am generat un tabel de date similar celui prezentat în Figura 4, în care am completat numărul așteptat de indivizi din fiecare categorie dacă embrionii ar fi fost întradevăr selectați randomic și mutația/cromozomii *balancer* nu ar determina fenotipuri severe/letale în stadiile de dezvoltare embrionară și larvară. A trebuit să ținem cont de rata de mortalitate „de referință”, observată pentru indivizii CantonS și să o aplicăm pentru descendenții liniilor mutante (Figura 5).

		<b>CantonS</b>	<b><i>CG18135/Tb</i></b>	<b><i>CG18135/GFP</i></b>
Total embrioni		<b>117</b>	<b>176</b>	<b>236</b>
Embrioni nedezvoltați	non-GFP	<b>0</b>	<b>52</b>	<b>62</b>
	GFP			<b>8</b>
Larve	non-GFP	<b>117</b>	<b>124</b>	<b>110</b>
	GFP			<b>56</b>

Figura 5. Date așteptate, dacă embrionii sunt selectați randomic și viabilitatea nu este afectată de alela mutantă *CG18135* sau de cromozomii *balancer*.

Natura datelor colectate în această etapă a impus aplicarea testului de contingență Chi-pătrat pentru a evalua semnificația statistică a diferențelor dintre valorile observate și cele așteptate. Reprezentarea grafică a celor două categorii de date și analiza statistică (Figura 6) au fost realizate cu aplicația de specialitate, GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com>).

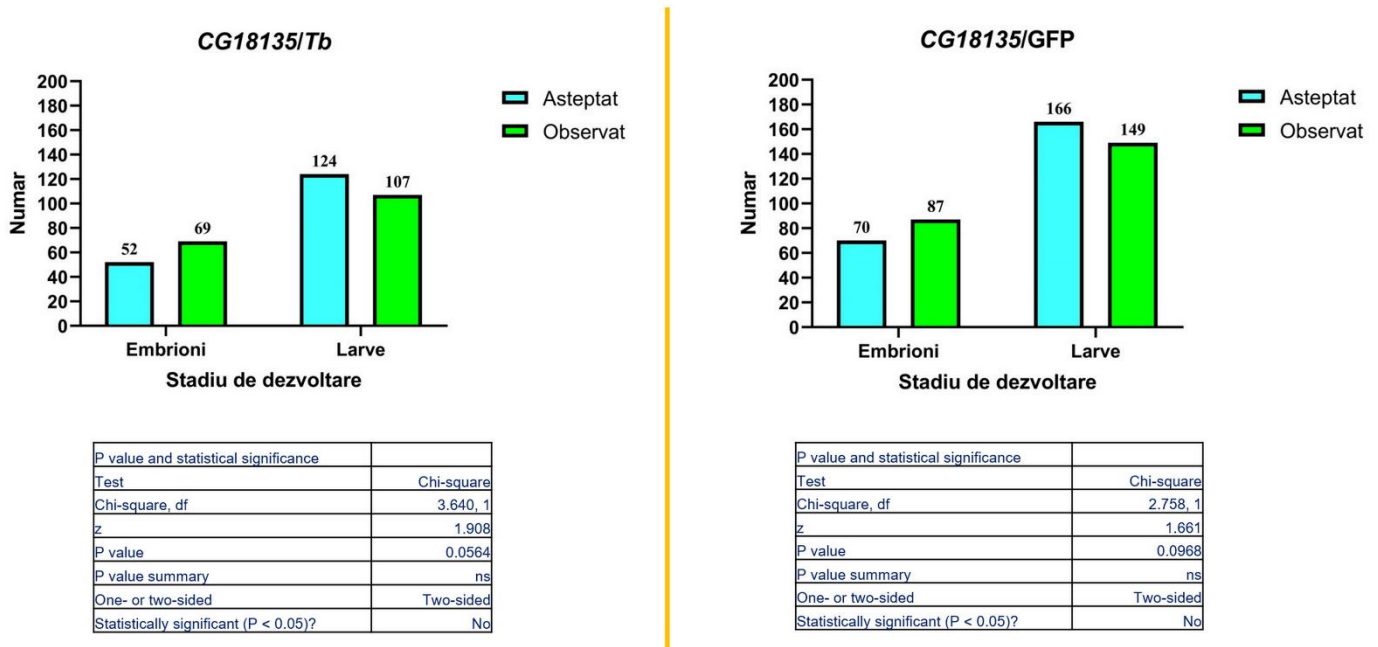


Figura 6. Compararea datelor observate și a celor așteptate referitoare la dezvoltarea și viabilitatea indivizilor din descendențele celor două linii mutante considerate, *CG18135/Tb* și *CG18135/GFP*. Aplicarea testului Chi-pătrat a indicat că diferențele dintre datele observate și cele așteptate nu sunt semnificative statistic.

Analiza statistică a indicat că datele observate pentru numărul de embrioni nedezvoltați/morți și numărul de larve active după aproximativ 10 zile de observații nu diferă în mod semnificativ de ceea ce am fi așteptat pentru un grup de indivizi selectați randomic dacă dezvoltarea embrionară și cea larvare se desfășoară normal ( $P = 0,0564$  în cazul testării descendenței *CG18135/Tb*;  $P = 0,0968$  în cazul testării descendenței *CG18135/GFP*). Totuși, nivelul de mortalitate embrionară a fost mai mare în datele observate comparativ cu cele așteptate, fenomen care probabil a influențat numărul de larve active în mediu.

Evaluarea acestor rezultate ne-a permis să formulăm o serie de concluzii referitoare la corelațiile dintre stadiile de dezvoltare și instalarea letalității:

1. Rata de mortalitate embrionară este mai crescută decât ne-am fi așteptat; este foarte plauzibil ca acest fenomen să fie mai frecvent pentru embrionii care au genotipurile *CG18135/Tb* și *CG18135/GFP*;

2. În ciuda acestei mortalități excesive, care se reflectă și în numărul de larve care s-au dezvoltat, diferențele dintre datele așteptate și cele observate nu sunt semnificative din punct de vedere statistic;
3. Designul experimental implementat de echipa noastră ne-a permis monitorizarea relativ strictă a indivizilor inițiali și astfel am putut obține date care pot fi interpretate statistic, dar care indică și fenomene biologice pe care nu le cunoșteam anterior (susținând concluzia 1);
4. Aceste rezultate ne indică faptul că **cel mai probabil, stadiile de dezvoltare embrionară și, respectiv, stadiile timpurii de dezvoltare larvară NU sunt critice pentru manifestarea fenotipului de letalitate caracteristic genotipului mutant *CG18135/CG18135*.**

Deși am considerat că scopul experimentului din această etapă a fost atins, am continuat să monitorizăm dezvoltarea indivizilor din plăcuțele de cultură. În descendența liniei *CG18135/GFP* am observat un nivel relativ scăzut de mortalitate în stadii de dezvoltare larvară târzii (L2-3 și L3), pentru ambele categorii de indivizi. În aceeași descendență, dintr-un total de 40 larve non-GFP (indivizi homozigoți mutați *CG18135/CG18135*), cel puțin 25 au avansat în stadiul de pupă (aproximativ 63%). Dintre aceste larve, am putut să colectăm un număr de 14 larve non-GFP pe care le-am plasat într-o plăcuță de cultură nouă, o larva/godeu. În aceeași placă de cultură au fost adăugate și cinci pupe non-*Tb* selectate din descendența *CG18135/Tb*. Dezvoltarea acestora a fost monitorizată zilnic timp de trei zile, după care a fost făcută o nouă evaluare după alte 9 zile. La această ultimă evaluare, toate larvele non-GFP și non-*Tb* erau în stadiul de pupă. În timpul dezvoltării pupale au loc diferite metamorfoze a căror finalitate este construirea corpului adult, care, odată încheiat acest stadiu, va ecloza. Când corpul adultului este dezvoltat aproape complet, se pot vedea prin cuticula pupei structuri morfologice precum aripile pliate și ochii. Dintre cele 14 pupe non-GFP, 13 erau moarte; opt dintre cele moarte au ajuns în stadii de dezvoltare pupală pre-eclozare, cu ochii formați complet (Figura 7). Am îndepărtat cuticula pupală în dreptul capului pentru a observa dezvoltarea avansată a structurilor capului; ochii unora dintre indivizi aveau un fenotip de culoare diferită de cea caracteristică pentru pariți sau pentru indivizii care conțin doar o copie a alelei mutante *CG18135*. Este necesar să specificăm faptul că alela *CG18135* este caracterizată prin prezența unui transpozon artificial de tip  $P\{\text{lacW}\}$  în unul dintre intronii genei *CG18135*. Acești transpozoni conțin un *marker* de culoare, alela *mini[w<sup>+</sup>]*, care într-un *background* genetic *w*, precum este cel al celor două linii mutante, aduce în general o contribuție de culoare, care poate varia de la galben deschis până la portocaliu intens. Mai mult, dacă sunt prezente mai multe copii ale acestei alele, din punct de vedere fenotipic se manifestă un efect de doză și colorarea ochilor va fi mai intensă decât cea dată de o singură copie. În cazul alelei mutante *CG18135*, culoarea determinată de prezența transpozonului este portocaliu pal, care ar trebui să fie mai intensă în cazul indivizilor homozigoți *CG18135/CG18135*.



Figura 7. Pupe în stadii finale de dezvoltare în interiorul cărora indivizii s-au dezvoltat aproape complet, ceea ce este evident la nivelul capului și al ochilor. Toți acești indivizi erau morți și cuticula pupală era intactă.

Spre surprinderea noastră, una dintre pupele non-GFP care au ajuns în stadii avansate de dezvoltare avea cuticula îndepărtată în dreptul capului adultului, iar acesta încă era în viață, dar incapabil să eclozeze complet. În această situație, am îndepărtat manual cuticula pupală și astfel am putut să observăm mult mai bine fenotipul culoare ochi, care nu doar că era mai estompat decât ar fi fost de așteptat pentru un individ *CG18135/CG18135* cu două alele *mini[w<sup>+</sup>]*, dar avea și o zonă centrală aproape complet decolorată (Figura 8A). Acest fenotip alterat este foarte evident prin comparație cu indivizii parentali (*CG18135/GFP*), care au o colorație intensă dată de prezența suplimentară a constructului GFP, dar și comparativ cu indivizi *CG18135/Tb*, care au doar o alelă *mini[w<sup>+</sup>]* (Figura 8B).

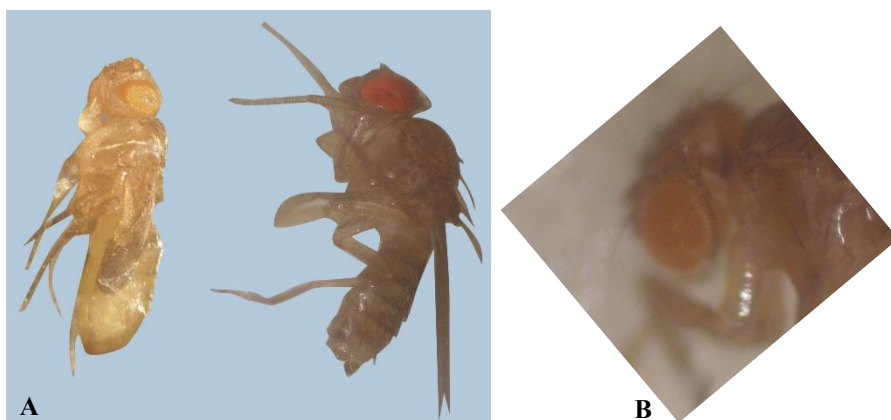


Figura 8. În 8A, este evidențiat în partea stângă mutantul extras manual alături de un individ de tip parental. În 8B este indicată culoarea specifică a ochilor determinată de prezența unei singure copii a alelei mutante *CG18135*.

Deoarece individul mutant extras din pupă era încă viu, l-am pus la păstrare în soluție DNA/RNA Shield (Zymo Research), care permite conservarea moleculelor de ARN prezente în țesuturi. Toate pupele non-*Tb* conțineau indivizi morți, aproape complet dezvoltăți.

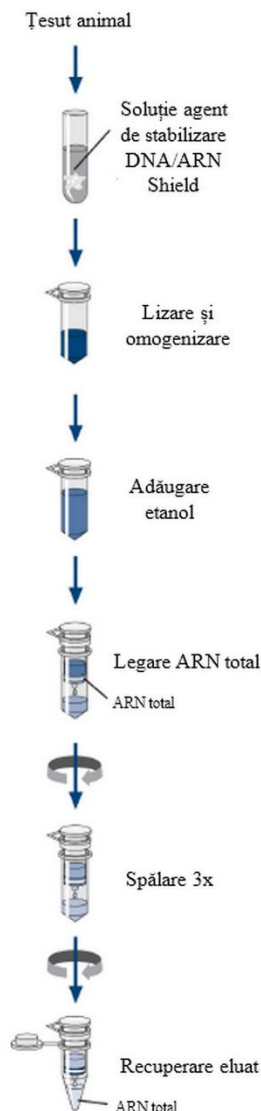
În condițiile în care am observat practic că obținerea unor indivizi mutați *CG18135/CG18135* în diferite stadii de dezvoltare, inclusiv cel de adult, va fi dificilă, ne-am decis ca pentru început să realizăm experimentele de qRT-PCR utilizând indivizi heterozigoți mutați, femele și masculi, deoarece colectarea acestora este ușoară și analiza lor poate fi foarte informativă.

Astfel, am colectat câte trei replici biologice formate din câte 20 de indivizi *CG18135/Tb*, distinct pentru femele și masculi. Menținerea integrității și concentrației de ARN în celulele indivizilor selectați a fost realizată conform protocolului recomandat de producătorii *kit*-ului DNA/RNA Shield. Indivizii din fiecare replică biologică au fost mutați în tuburi Eppendorf de 1,5 mL și peste aceștia a fost adăugat un volum de 10  $\mu$ L soluție DNA/RNA Shield /1 mg țesut. Considerând că masa unei femele *D. melanogaster* este de aproximativ 1,4 mg și masa unui mascul este de aproximativ 1 mg (Karan și colab., 1998; Ashburner și colab., 2005), au fost adăugați 250  $\mu$ L și respectiv 210  $\mu$ L soluție DNA/RNA Shield în tuburile Eppendorf corespunzătoare femelelor și masculilor. Indivizii au fost zdrobiți ușor, pentru ca soluția să intre în contact direct cu cât mai multe celule/țesuturi.

Extracția ARN din întregul organism al indivizilor stocați în soluția DNA/RNA Shield a fost realizată în mediu steril folosind hota PCR BioAir Aura Mini (EuroClone Division), tuburi Eppendorf 1,5 mL, vârfuri sterile, pipete Eppendorf Research Plus (PhysioCare Concept), centrifuga Eppendorf MiniSpin și vortex BioVortex V1 (BioSan).

Procedura de extracție a fost efectuată folosind *kit*-ul RNeasy Mini Kit (Qiagen). Anterior extracției, au fost adăugați 44 mL etanol absolut în recipientul cu *buffer* RPE și 10  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol (Promega) pentru fiecare 1 mL *buffer* RLT. De asemenea, pentru diluarea etanolului absolut la etanol 70% și recuperarea ARN total, a fost folosită apă ultrapură (Jena Bioscience). Pașii parcurși în conformitate cu protocolul *kit*-ului sunt prezentați în Figura 9.





#### Pașii parcurși în extracția ARN:

1. Zdrobire țesuturi animale stocate în soluția DNA/RNA Shield
2. Adăugare 600  $\mu\text{L}$  *buffer* RLT (cu  $\beta$ -mercaptoetanol)
3. Centrifugare 3 minute la 13000 rpm
4. Îndepărtare supernatant într-un tub Eppendorf 1,5 mL curat
5. Adăugare un volum egal de 70% etanol și mixare prin pipetare
6. Transfer 700  $\mu\text{L}$  în colonița furnizată în *kit*
7. Centrifugare 15s la 10,000 rpm, apoi îndepărtare lichid
8. Repetare pași 6 și 7
9. Adăugare 700  $\mu\text{L}$  *buffer* RW1
10. Centrifugare 15s la 10000 rpm, apoi îndepărtare lichid
11. Repetare pași 9 și 10
12. Adăugare 500  $\mu\text{L}$  *buffer* RPE
13. Centrifugare 15s la 10000 rpm, apoi îndepărtare lichid
14. Repetare pas 12
15. Centrifugare 2 minute la 10000 rpm, apoi îndepărtare lichid
16. Transfer coloniță în tubul colector furnizat în *kit*
17. Adăugare 50 ng apă ultrapură în mijlocul membranei coloniței
18. Centrifugare 1 minut la 10000 rpm
19. Îndepărtare coloniță.

Figura 9. Pașii parcurși în extracția ARN utilizând *kit*-ul de extracție RNeasy Protect Mini, Qiagen. Adaptare după protocolul *kit*-ului (RNeasy Mini Handbook).

În plus, ne-am hotărât ca tot în această etapă să realizăm *design*-ul primerilor pe care îi vom utiliza pentru a investiga nivelul de expresie al genei *CG18135* în indivizii mutanți.

În experimentele de qRT-PCR am convenit să utilizăm pentru normalizare endogenă *RpL32*, frecvent utilizată în astfel de studii la *D. melanogaster*. Secvențele primerilor pe care îi vom utiliza în primele etape ale experimentelor pentru evaluarea nivelului relativ al expresiei genice pentru *CG18135* sunt prezentate în Figura 10. În cazul primerilor specifici genei *CG18135*, designul a fost realizat utilizând aplicația Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Pentru endogenă *RpL32*, primerii au fost preluați din literatura de specialitate (Fiumera și colab., 2005).

Gena	Orientare	Secvența	Masă moleculară (g/mol)	Temperatura de topire (°C)	Procent CG
CG18135	F	5' ATCTTTCAGATCAGGCTGCC 3'	5987	55,8	50
	R	5' GACATAGGGAAGCCTCAGCC 3'	6136	57,5	60
RpL32	F	5' CGGCTTCAAGGGACAGTATC 3'	6102	62	55
	R	5' GACAATCTCCTTGCGCTTCT 3'	6019	60	50

Figura 10. Secvențele primerilor utilizați pentru evaluarea nivelului de expresie genică și caracteristici ale acestora.

În etapa următoare estimăm că vom finaliza activitățile corespunzătoare *Ob1* și *Ob2*. Ca și plan alternativ, în cazul în care nu vom reuși să obținem adulți homozigoți mutanți *CG18135/CG18135* eclozați natural, ne propunem să îi monitorizăm până în etapele finale ale dezvoltării pupale și să îndepărtăm manual cuticula cât încă sunt vii, astfel încât să îi putem utiliza în experimente de qRT-PCR.

#### Bibliografie selectivă:

1. Karan, D.; Morin, J. P.; Moreteau, B.; David, J. R., 1998. Body size and developmental temperature in *Drosophila melanogaster*: analysis of body weight reaction norm, *Journal of thermal biology*, 23(5), p301-309.
2. Ashburner, M.; Golic, K.G.; Scott, H., 2005. *Drosophila*: A Laboratory Handbook. Second Edition By Michael Ashburner, *Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press*, ISBN: 0-87969-706-7. 2005, p164-165.
3. Fiumera, A.C.; Dumont, B.L; Clark, A.G., 2005. Sperm competitive ability in *Drosophila melanogaster* associated with variation in male reproductive proteins, *Genetics*, 169, 243-257.

28 iulie 2023

Lector dr. Attila Cristian Rațiu

Drd. Adrian Ionașcu