

**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 rețelilor de interacțiuni la care participă această genă/proteină (Figura 1).

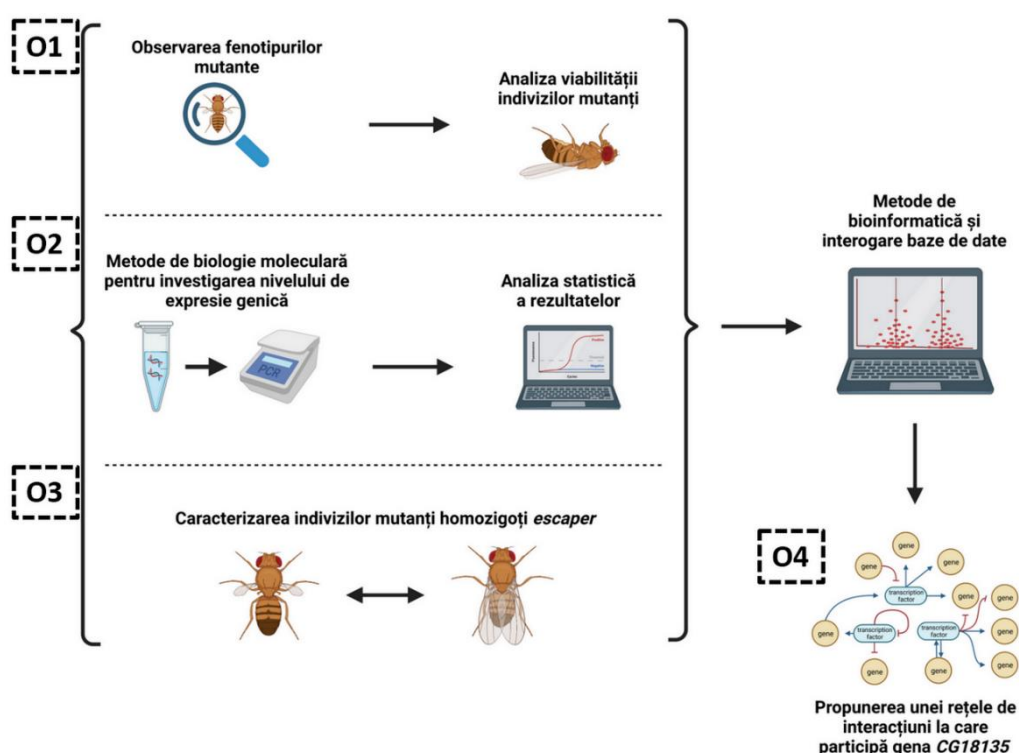


Figura 1. Prezentarea schematică a obiectivelor prezentului proiect de cercetare.

În această etapă de desfășurare a proiectului am realizat diferite experimente pentru a îndeplini/finaliza obiectivele 1, 2 și 3 specificate în propunerea de proiect. A doua etapă a constat în realizarea unor progrese semnificative pentru completarea *Ob1*: Analiza viabilității și caracterizarea fenotipică a indivizilor mutați homozigoți și heterozigoți în diferite etape de dezvoltare, îndeplinirea *Ob2*: Analiza nivelului de expresie genică al genei *CG18135* în indivizii mutați homozigoți și heterozigoți comparativ cu indivizi din linia etalon CantonS și realizarea parțială a *Ob3*: Obținerea și caracterizarea fenotipică a indivizilor adulți de tip escaper, cu genotipul  $CG18135^{P\{lacW\}CG18135}/CG18135^{P\{lacW\}CG18135}$ .

## **Obiectivul 1: Analiza viabilității și caracterizarea fenotipică a indivizilor mutanți homozigoți și heterozigoți în diferite etape de dezvoltare**

### **O1.1 Design experimental**

În a doua etapă de desfășurare a experimentelor am continuat evaluarea viabilității indivizilor mutanți comparativ cu linia control CantonS. Spre deosebire de primul experiment, am utilizat doar linia mutantă  $CG18135^{P\{lacW\}CG18135}/TM3 \text{ Ser GFP}$  notată  $CG18135/GFP$  și în care larvele, pupele și adulții care conțin markerul GFP emit o fluorescență verzuie sub lumina UV.

Similar cu primul experiment, am utilizat cuști embrionare profesionale (FlyStuff) și plăci Petri care conțineau mediu Grape Agar (Genesee Scientific) care are rolul de a facilita depunerea embrionilor. Peste 100 de femele și 100 de masculi au fost menținuți maximum 24 de ore în cuștile de depunere, iar embrionii au fost plasați în plăci cu 24 de godeuri conținând mediu standard, câte 5 embrioni/godeu. În total, am obținut 765 de embrioni din linia mutantă  $CG18135/GFP$ . Dintre acești embrioni, ne așteptăm ca aproximativ 25% să fie homozigoți de interes  $CG18135/CG18135$ , 50% să fie heterozigoți  $CG18135/GFP$  și 25% să fie dublu *balanceri*  $TM3/TM3$ , care mor în stadiul de embrion.

Diferențierea între indivizii care conțin cel puțin o alelă mutantă de interes a fost realizată în baza prezenței sau absenței fluorescenței GFP. Fenotipul GFP a fost evaluat utilizând o lupă UV profesională cuplată cu un stereomicroscop Olympus. Larvele fără fenotip GFP, care au genotipul mutant homozigot  $CG18135/CG18135$  au fost selectate și transferate în plăci cu 48 de godeuri cu mediu standard, câte o larvă/godeu. Dezvoltarea larvară a fost monitorizată constant până în stadiul de pupă târzie sau adult.

### **O1.2 Rezultatele evaluării viabilității**

Pornind de la numărul total de embrioni depuși, putem estima numărul de embrioni cu genotip dublu *balancer* neviabili, care au fost aproximativ 191 ( $765 \times 25\% = 191,25$ ). Ținând cont că în experimentul din etapa anterior a o fost observată o mortalitate intrinsecă de  $\approx 6\%$ , am estimat că vor muri suplimentar aproximativ 34 de embrioni, astfel rezultând un număr de 540 embrioni viabili.

În cadrul acestui experiment am evaluat fenotipul GFP în stadiul de larvă de stadiul 2 (L2) sau 3 (L3) și am observat un număr de 231 larve mutante heterozigote cu fenotip GFP și 104 larve homozigote mutante, însumând 335 de larve viabile ( $\approx 62\%$ ). Astfel, am observat

cu aproximativ 38% mai puține larve decât era așteptat teoretic, ceea ce sugerează o mortalitate crescută a mutantilor în stadiul de larvă timpurie. Totuși, acest rezultat nu exclude complet un anumit nivel de letalitate în stadiile târzii de dezvoltare embrionară. Rezumând, considerăm că stadiul de dezvoltare larvă timpurie (eventual cu o contribuție adusă de o letalitate embrionară târzie) poate fi considerat un moment major (**primul prag de letalitate**) pentru manifestarea letalității genotipului mutant homozigot *CG18135/CG18135*.

Din totalul larvelor vabile, am selectat larvele non-GFP, care au fost plasate individual în plăci cu 48 de godeuri și au fost monitorizate timp de mai multe zile. Din cele 104 larve selectate, 89 au continuat dezvoltarea în stadiul de pupă și 15 au murit în stadii larvare avansate (L2-L3). Majoritatea indivizilor homozigoți nu au completat stadiul de dezvoltare pupală, care se încheie cu eclozarea individului adult (imago). Totuși, am recuperat cu succes 7 indivizi adulți, care fie au reușit singuri să ecozeze, fie au fost extrași manual de către noi, ei reprezentând 7,865% din totalul pupelor observate. Aceste rezultate indică faptul că stadiul de pupă este **cel de al doilea prag de mortalitate semnificativă** a indivizilor mutanți homozigoți *CG18135/CG18135*. Datele corespunzătoare sunt sumarizate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Rezultatele experimentului de viabilitate obținute prin monitorizarea larvelor, pupelor și adulților mutanți homozigoți.

Categorie	Număr indivizi	Procent
Larve inițiale	104	-
Letalitate larvară târzie	15	14,423%
Dezvoltare pupală completă	89	85,577%
Letalitate în stadiul de pupă	82	92,213%
Letalitate în stadiul de imago 1-2 zile	7	7,865%

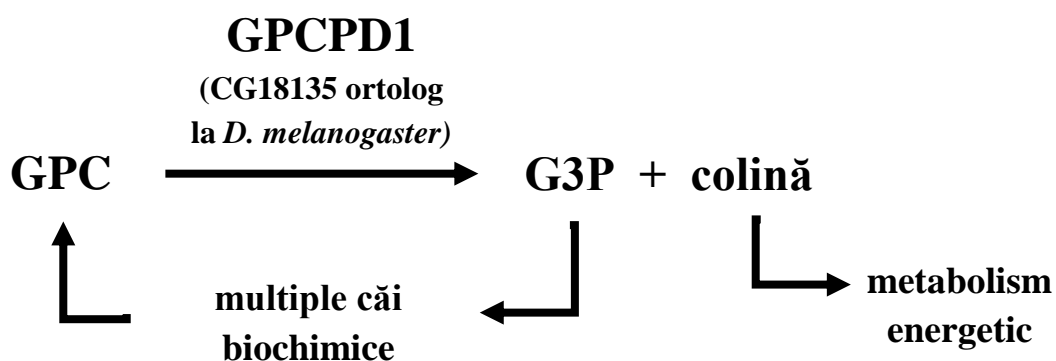
### O1.3 Interpretarea rezultatelor de viabilitate

Funcțional, proteina CG18135 este implicată în legarea filamentelor de miozină în țesuturile musculare și în diviziunea celulară (Liu și colab., 2008). Este de așteptat ca necesitatea pentru proteina CG18135 să crească odată cu creșterea în dimensiune a larvelor din stadiul L1 în stadiul L3, și, respectiv, odată cu dezvoltarea pupelor, întrucât la nivelul acestora se realizează reorganizări tisulare care implică apoptoză și diviziune celulară intensă. Lipsa proteinei CG18135 poate avea drept consecință dereglarea acestor procese și poate explica letalitatea crescută în stadiile de larvă și pupă.

În plus, odată cu înaintarea în stadiile de dezvoltare, se dezvoltă structurile neuronale ale indivizilor, precum organul Bolwig, asociat cu o creștere a expresiei genice *CG18135* (Fisher și colab., 2012), iar proteina CG18135 a fost identificată în membranele fosfolipidice de la nivelul capului adulților *D. melanogaster* (Aradska și colab., 2015).

Atât țesutul neuronal, muscular și reproducător, cât și diviziunea celulară *per se*, sunt asociate cu intensificarea transportului vezicular intercelular, la nivelul membranei plasmatică, sau intracelular, la nivelul reticulului endoplasmatic. Omologul proteinei CG18135 la eucariote superioare, GPCPD1, facilitează degradarea GPC, care este un constituent esențial al membranelor plasmatică, în G3P și colină (Steward și colab., 2012). GPC reprezintă materia primă a glicerofosfolipidelor (Eibl, 1980; Ventura și colab., 2022), iar colina contribuie la producția *de novo* a PtdCho și PtdEtn prin participarea în calea Kennedy (Steward și colab., 2012; Gibellini și Smith, 2010). Proporțiile dintre diferitele glicerofosfolipide influențează componența membranelor sau a veziculelor și, în consecință, procesele biochimice celulare (Van Meer și colab., 2008). De asemenea, colina este o componentă esențială în metabolismul energetic, prin participarea în ciclul Krebs (Steward și colab., 2012), iar G3P participă în metabolismul energetic al celulelor eucariote, fiind sintetizată din glucoza obținută din hrana ingerată (Li și colab., 2019; Nguyen și colab., 2019).

În acest context, afectarea nivelului normal al proteinei CG18135 poate avea trei consecințe biochimice majore: 1. dereglarea funcționării normale a membranei plasmatică și a transportului vezicular inter- și intracelular din cauza reducerii/lipsei catabolismului GPC; 2. citotoxicitatea cauzată de raportul crescut GPC/G3P și acumularea de GPC intracelular; 3. afectarea metabolismului energetic prin reducerea reciclării colinei și G3P din GPC sau prin dereglarea *feedback*-ului negativ între GPC și G3P, ilustrat în Schema 1.



Schema 1: Schema căii biochimice a catabolismului GPC catalizată de proteina GPCPD1 (umană) sau CG18135 (*D. melanogaster*).

## Obiectivul 2: Analiza nivelului de expresie genică al genei CG18135 în indivizii mutanți homozigoți și heterozigoți comparativ cu indivizi din linia etalon CantonS

### O2.1 Linii utilizate și *design* experimental

Acest experiment a fost realizat utilizând indivizi heterozigoți de *D. melanogaster* din linia de interes  $CG18135^{P\{lacW\}}/TM6$  și indivizi din linia standard CantonS, care au constituit grupul control al experimentului.

Pentru a evalua nivelul de expresie al genei *CG18135* în cele două linii *D. melanogaster*, au fost folosiți indivizi de vârstă similară, adulți de aproximativ 50 de ore.

Au fost utilizate câte 3 replici biologice pentru fiecare categorie de indivizi, fiind selectate 3 grupuri de femele (♀) și 3 grupuri de masculi (♂) pentru fiecare linie considerată, fiecare grup conținând 20 de indivizi.

### O2.2 Extracție ARN și evaluarea concentrației

Extracția ARN din fiecare replică biologică a fost realizată în prima etapă a proiectului și descrisă în raportul științific corespunzător. Concentrația și puritatea de ARN total extras din corpul indivizilor *D. melanogaster* a fost măsurată folosind spectofotometrul nanoVue Plus Spectrophotometer. Pentru calibrarea aparatului am folosit apa ultrapură, iar pentru măsurarea concentrației ARN s-a utilizat o cantitate de 2 μL din produsul de extracție. Concentrațiile (ng/μL) și rapoartele A260/280 și A260/230 obținute în urma citirii spectrofotometrice sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2: Concentrațiile și puritățile de ARN total obținute în urma extracției ARN.

Linii <i>D. melanogaster</i>	Replică biologică	Concentrație ARN (ng/μL)	Raport A260/280	Raport A260/230
$CG18135^{P\{lacW\}}/TM6$	♀1	354	2,151	2,585
	♀2	378	1,866	1,314
	♀3	148	2,145	1,237
	♂1	130	2,131	1,347
	♂2	225	1,714	0,841
	♂3	207	1,701	1,002
CantonS	♀1	321	1,876	1,347
	♀2	327	1,821	1,364
	♀3	195	2,127	2,353
	♂1	226	1,738	1,024
	♂2	127	2,128	1,771
	♂3	122	2,155	2,061

### O2.3 Conversia ARN în ADNc

Conversia ARN în ADN complementar (ADNc) a fost realizată folosind instrumente sterile descrise anterior și aparatul PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Incubările necesare au fost efectuate folosind aparatul PCR GeneAmp.

ARN-ul total extras din corpul indivizilor care formează replicile biologice a fost convertit în ADN complementar (ADNc) combinând reactivi din două *kit-uri*: SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) și Reverse Transcription System (Promega). Pentru această reacție a fost respectat protocolul companiei Invitrogen. Acest *kit* conține enzima SuperScript II RT, First-Strand *Buffer* și DTT (Diclor-Difenil-Triclorețan), iar din *kit-ul* companiei Promega a fost utilizat mix dNTP, primeri (*random primers*) și apă ultrapură. Concentrațiile și volumele acestor reactivi sunt prezentate în Tabelul 3. De asemenea, protocolul *kit-ului* sugerează utilizarea a 1000 ng ARN total, iar volumul de ARN utilizat ( $\mu\text{L}$ ) a fost ajustat în funcție de concentrația ARN măsurată cu aparatul nanoVue Plus Spectrophotometer (General Electric).

Pașii parcurși în conversia ARN în ADNc:

1. Pipetare primeri (*random primers*), mix dNTP, RNA extras și apă ultrapură în tub Eppendorf 1,5 mL steril
2. Incubare 5 minute la  $65^{\circ}\text{C}$  și răcire rapidă pe gheață, urmată de centrifugare scurtă
3. Adăugare 5X First-Strand *Buffer* și DTT
4. Vortexare scurtă și incubare 2 minute la  $25^{\circ}\text{C}$  (temperatura camerei)
5. Adăugare enzimă SuperScript II RT și mixare prin pipetare
6. Incubare 10 minute la  $25^{\circ}\text{C}$  (temperatura camerei)
7. Incubare 50 minute la  $42^{\circ}\text{C}$
8. Inactivarea reacției prin incubare 15 minute la  $70^{\circ}\text{C}$ .

Tabelul 3: Concentrațiile și volumele reactivilor utilizați pentru reacția de conversie ARN total în ADNc utilizând *kit-urile* SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) și Reverse Transcription System (Promega).

Reactiv	Concentrație inițială	Volum utilizat/reacție ( $\mu\text{L}$ )
First-Strand Buffer	5X	4
DTT	0,1 mM	2
SuperScript II RT	200 U/ $\mu\text{L}$	1
mix dNTP	10 mM	1
<i>random primers</i>	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1

## O2.4 Reacția qRT-PCR

Pentru evaluarea nivelului de expresie a genei *CG18135* în femelele și masculii mutați și control (CantonS), a fost realizată o amplificare qRT-PCR utilizând *kit*-ul SYBR Green ROX qPCR *Mastermix* (Qiagen) și aparatul 7500 RealTime PCR System (Applied Biosystems).

ADN complementar din fiecare replică biologică (simbolizate *CG18135* ♀1, ♀2, ♀3; ♂1, ♂2, ♂3 și CantonS ♀1, ♀2, ♀3; ♂1, ♂2, ♂3) a fost amplificat în triplicat, acestea reprezentând replicile tehnice ale reacției qRT-PCR. De asemenea, pentru a calibra nivelul de expresie al genei *CG18135*, a fost considerată endogena *RpL32* (*Ribosomal protein L32*), genă ribozomală structurală și ubicuitară în întregul organism. Astfel, pentru fiecare replică biologică s-a lucrat în triplicat tehnic, fiecare cu câte două seturi de reacții PCR, constând în amplificări specifice genei *CG18135* și genei *RpL32*, însumând 72 de reacții distincte. În plus, au fost folosite câte 3 controale negative (CN), fără ADN complementar, pentru setul *CG18135* și 3 pentru setul *RpL32*.

*Design*-ul primerilor specifici genei *CG18135* a fost realizat în cadrul Laboratorului *Drosophila*, iar secvența primerilor endogenei *RpL32* a fost preluată din literatură. Primerii specifici genei *CG18135* au fost furnizați de compania Integrated DNA Technologies, iar primerii specifici genei *RpL32* de compania Eurogentec. Primerii liofilizați au fost diluați inițial la concentrația de 100 μM, ulterior fiind diluați la 10 μM. Secvențele primerilor corespunzători genelor *CG18135* și *RpL32*, utilizați pentru evaluarea nivelului de expresie genică în acest experiment sunt prezentate în Tabelul 4.

Tabelul 4: Secvențele primerilor utilizați pentru evaluarea nivelului de expresie genică și caracteristici ale acestora.

Genă	Orientare	Secvența	Masa moleculară (g/mol)	Temperatura de topire (°C)	Procent CG
<i>CG18135</i>	F	5' ATCTTTCACATCACGCTGCC 3'	5987	55,7	50
	R	5' GACATAGGGAAGCCTCAGCC 3'	6136	57,5	60
<i>RpL32</i>	F	5' CGGCTTCAAGGGACAGTATC 3'	6102	62	55
	R	5' GACAATCTCCTTGCGCTTCT 3'	6019	60	50

În fiecare godeu al unei reacții qRT-PCR au fost introduse 20 ng ADNc, într-un volum final de 20 μL. Colectarea datelor de fluorescență a fost realizată la finalul fiecărei

etape de elongare, acestea fiind ponderate cu nivelul emisiei fluorescente a fluorocromului pasiv ROX.

Protocolul de pregătire al reacției qRT-PCR este prezentat în continuare, iar componentele unei reacții qRT-PCR și programul de amplificare utilizat sunt prezentate în Tabelul 5 și respectiv Tabelul 6.

Pașii parcurși în pregătirea reacției qRT-PCR:

1. Diluția soluției ADNc până la concentrația de 10 ng/μL
2. Diluția soluțiilor de primeri până la concentrația 10 μM
3. Dezghețare soluție *Mastermix* și centrifugare scurtă
4. Pipetare a 4 *Mastermix*-uri, unul pentru fiecare set de probe:
  - gena *CG18135* în mutații
  - gena *CG18135* în control CantonS
  - gena *RpL32* în mutații
  - gena *RpL32* în control CantonS
5. Pipetare *Mastermix* în godeuri
6. Pipetare ADNc în godeurile corespunzătoare
7. Sigilarea plăcii qRT-PCR cu folia protectoare

Tabelul 5: Componentele unei reacții qRT-PCR și volumele corespunzătoare calculate în conformitate cu *kit*-ul SYBR Green ROX qPCR *Mastermix* (Qiagen).

Reactiv	Concentrația inițială	Volum per probă (μL)
ADNc	10 ng/μL	2
primer <i>Forward</i>	10 μM	0.32
primer <i>Reverse</i>	10 μM	0.32
<i>Mastermix</i>	1X	10
apă ultrapură	-	7,36

Tabelul 6: Programul de amplificare qRT-PCR utilizat pentru evaluarea nivelului de expresie.

Etapa	Temperatură (°C)	Timp	Număr de cicluri
Denaturare inițială	95	10 min	1
Denaturare	95	30 s	40
Legare primeri	57	30 s	
Elongare	72	32 s	
Elongare finală	72	15 s	1
Răcire	4	1 min	1



## O2.5 Analiza statistică a datelor de qRT-PCR

Datele Ct (*cycle threshold*) colectate în timpul reacțiilor de amplificare qRT-PCR au fost exportate din software-ul aparatului qRT-PCR și analizate utilizând aplicația de bioinformatică qDATA dezvoltată în cadrul Laboratorului *Drosophila* (Ionascu și colab., 2023) și disponibilă pe platforma GitHub (<https://github.com/A-Ionascu/qDATA>). Aplicația qDATA folosește metoda Livak (Livak și Schmittgen, 2001) pentru calcularea valorilor *Fold Change* (FC) și pentru analiza statistică a seturilor de date  $2^{-\Delta Ct}$ .

## O2.6 Evaluarea nivelului de expresie genică

Evaluarea nivelului relativ de expresie genică a fost realizată utilizând amplificări qRT-PCR pentru gena de interes *CG18135* și endogena *RpL32* în toate replicile biologice ale indivizilor din liniile *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* și CantonS. Valorile FC pentru cele patru grupuri analizate reprezintă evaluarea nivelului de expresie genică a genei de interes *CG18135* în grupul de interes relativ la grupul control, ajustată cu nivelul expresiei genice a endogenei *RpL32*. Analiza datelor a avut ca scop evaluarea nivelului de expresie relativ al genei *CG18135* în patru situații distincte, prezentate în detaliu în secțiunile următoare:

- ♂ *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* față de ♂ CantonS;
- ♀ *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* față de ♀ CantonS;
- ♂ *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* față de ♀ *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6*;
- ♂ CantonS față de ♀ CantonS.

Valorile  $2^{-\Delta Ct}$  au fost calculate în baza diferenței între valorile Ct ale genei de interes și valorile Ct ale endogenei specifice pentru replicile tehnice ale unei replici biologice. Software-ul qDATA a indicat faptul că nu toate distribuțiile valorilor  $2^{-\Delta Ct}$  sunt normale (Gaussiene). Astfel, pentru analiza statistică au fost utilizate testele Welch t-test și Exact Wilcoxon rank sum test. Aceste rezultate sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Rezultatele testelor statistice asupra valorilor  $2^{-\Delta Ct}$  calculate pentru fiecare grup experimental. Datele au fost obținute în aplicația qDATA.

Comparație	Welch two sample t-test		Exact Wilcoxon rank sum test	
	t statistic	valoare p	W statistic	valoare p
♀ mutante vs ♀ control	-0.826	0.415	294	0.228
♂ mutanți vs ♂ control	6.648	$2.34 \times 10^{-8}$	654	$5.396 \times 10^{-8}$
♂ control vs ♀ control	9.138	$1.4 \times 10^{-10}$	715	$5.218 \times 10^{-13}$
♂ mutanți vs ♀ mutante	15.584	$3.202 \times 10^{-16}$	729	$1.027 \times 10^{-15}$

Testele statistice au avut ca scop compararea valorilor  $2^{-\Delta Ct}$  corespunzătoare celor patru grupuri studiate, în fiecare dintre situațiile discutate anterior. Cu excepția comparației între valorile  $2^{-\Delta Ct}$  corespunzătoare femelelor din linia mutantă față de femelele din linia control, toate comparațiile au arătat semnificație statistică (Tabelul 6). În mod interesant, cele mai semnificative diferențe au fost observate între grupurile de masculi și femele, atât din linia  $CG18135^{P(lacW)}/TM6$ , cât și CantonS.

Aplicând formula Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) pentru calcularea nivelului de expresie relativ (Livak și Schmittgen, 2001), s-a observat că gena  $CG18135$  a fost supraexprimată de 1,85 ori în masculii  $CG18135^{P(lacW)}/TM6$ , comparativ cu masculii CantonS. Totodată, în urma comparării nivelului de expresie al genei  $CG18135$  s-a observat o creștere a nivelului de expresie între masculii CantonS față de femele CantonS (FC = 2,724) și între masculii  $CG18135^{P(lacW)}/TM6$  față de femelele  $CG18135^{P(lacW)}/TM6$  (FC = 4,927). Aceste rezultate indică faptul că gena  $CG18135$  este constitutiv supraexprimată în masculi față de femele, în ambele categorii de indivizi utilizați în acest studiu. Rezultatele calculelor necesare pentru evaluarea expresiei genice relative sunt prezentate în Figura 2.

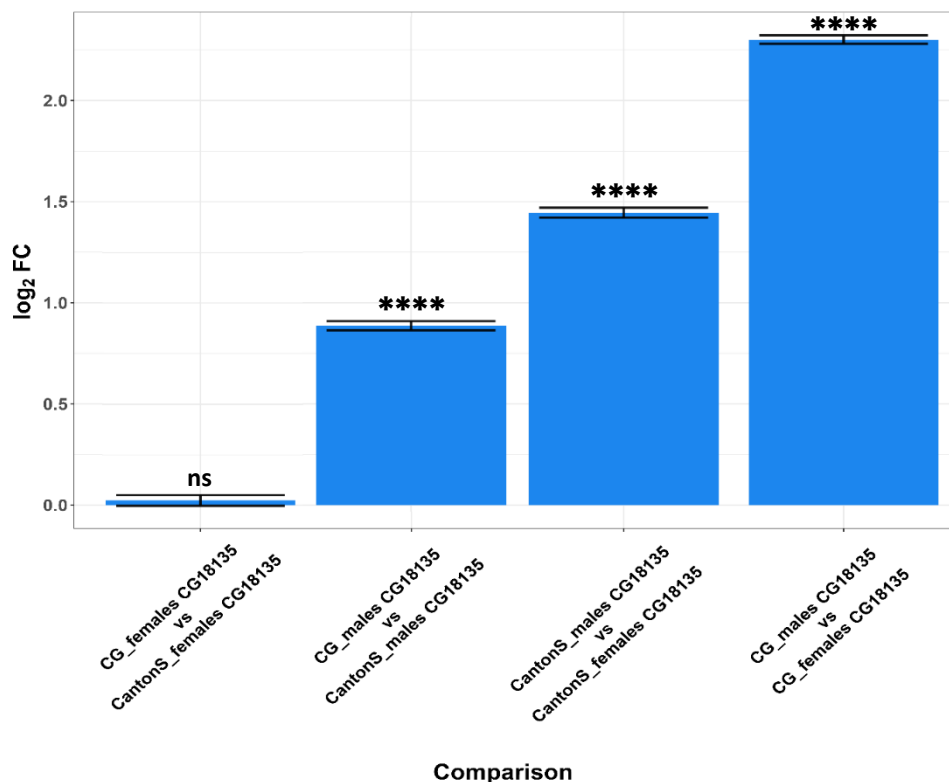


Figura 2. Analiza nivelului relativ de expresie al genei  $CG18135$  între grupurile experimentale utilizate. Graficul ilustrează valorile  $\log_2 FC$  și intervalul de eroare exprimat ca  $\pm$  eroarea standard. Semnificația statistică ilustrează valoarea p obținută din testele statistice efectuate asupra valorilor  $2^{-\Delta Ct}$  (ns > 0,05; \*\*\*\* < 0,001). Grafic exportat din aplicația qDATA.

## O2.7 Interpretarea rezultatelor de expresie genică

Nivelul de expresie genică similar în cazul femelelor din linia *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* și femelelor din linia CantonS sugerează că prezența unei singure alele normal funcționale a genei *CG18135* este suficientă pentru exercitarea funcției proteinei *CG18135* și pentru dezvoltarea normală a indivizilor. Pe de altă parte, masculii din linia mutantă prezintă o creștere a nivelului de expresie de 1,85 ori față de masculii din linia control, deși prezintă o singură alelă normal funcțională a genei *CG18135*.

Aparatul reproducător masculin este asociat cu diviziune celulară intensă și diferențiere celulară rapidă începând cu stadiile embrionare (Whitworth *și colab.*, 2012) și în procesul de spermatogeneză la adulți (Fabian *și Brill*, 2012). Atât diviziunea celulară, prin creșterea membranei celulare, cât și diferențierea celulară, dependentă de comunicare inter- și intracelulară sub forma transportului vezicular, sunt strâns legate de disponibilitatea glicofosfolipidelor caracteristice membranelor plasmactice sau veziculelor intracelulare. Astfel, implicarea proteinei *CG18135* în catabolismul glicerofosfolipidelor (Gaudet *și colab.*, 2011) poate susține rolul acestei proteine în reproducere (Fisher *și colab.*, 2012; Findlay *și colab.*, 2008), în dezvoltarea aparatului reproducător masculin și în spermatogeneză.

De asemenea, lichidul seminal conține numeroase proteine cu rol în reproducere și embriogeneză (McCullough *și colab.*, 2022), printre care este posibil să fie și proteina *CG18135*, care a fost identificată în lichidul seminal la momentul împerecherii (Findlay *și colab.*, 2008) și este posibil să susțină dezvoltarea embrionară timpurie. Această observație ar putea explica, măcar parțial, supraexpresia genei *CG18135* în masculii CantonS față de femelele CantonS, rezultat consecvent cu experimentele de transcriptomică din literatură (Casas-Villa *și colab.*, 2017; Brown *și colab.*, 2014).

Revenind la diferența nivelului de expresie între masculii din linia *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* și cei din linia CantonS, este posibil ca în ambele cazuri proteina *CG18135* să fie implicată în dezvoltarea sistemului reproducător și în spermatogeneză. Din punct de vedere biochimic, proteina *CG18135* echilibrează raportul GPC/G3P (Steward *și colab.*, 2012), iar în lipsa acestei proteine, GPC este acumulat intracelular deregând raportul GPC/G3P. Căile biochimice implicate în detectarea și echilibrarea raportului GPC/G3P nu au fost încă discutate în literatură, fiind posibil ca gena *CG18135* să fie diferențial exprimată cu participarea unui factor de transcripție activat în urma creșterii raportului GPC/G3P. În acest experiment, lipsa a două alele producătoare de transcripți normali în masculii *CG18135<sup>P{lacW}</sup>/TM6* este corelată cu supraexpresia genei *CG18135*, sugerând o posibilă încercare de suplinare a necesarului proteic prin supraexpresie.

Nivelul de expresie genică de 4,927 ori mai mare în masculii din linia mutantă față de femele din linia mutantă poate fi cauzat de un cumul de factori, atât datorită diferențelor de expresie natural manifestate între masculi și femele, cât și nivelul crescut de expresie în masculii mutați.

Acest experiment a condus către trei observații principale: 1. gena *CG18135* are caracter haplosuficient în indivizii *D. melanogaster*; 2. nivelul de expresie genică pentru gena *CG18135* este crescut în masculi față de femele, consecvent cu literatura de specialitate; 3. nivelul de expresie genică pentru gena *CG18135* este crescut în masculii mutați heterozigoți în comparație cu masculii CantonS.

În perspectivă, vom urmări obținerea unor indivizi homozigoți mutați viabili, *escaperi* adulți, precum cei observați anterior în cadrul laboratorului, cu scopul de a analiza în amănunt caracteristicile fenotipice ale acestora și nivelul de expresie genică al genei *CG18135*.

### **O3 Obținerea și caracterizarea fenotipică a indivizilor adulți de tip *escaper*, cu genotipul $CG18135^{P\{lacW\}CG18135}/CG18135^{P\{lacW\}CG18135}$**

În cadrul experimentului de evaluare a viabilității indivizilor mutați din linia *CG18135/GFP* am identificat și analizat fenotipic 7 adulți homozigoți *escaper*. Acești indivizi conțin două alele inserționale  $CG18135^{P\{lacW\}CG18135}$  în perechea 3 de cromozomi. Linia *CG18135/GFP* conține în *background*-ul genetic mutația  $w^-$  asociată cu fenotipul culoare albă a ochilor, dar acest fenotip nu a fost observat în adulții homozigoți *escaperi* pentru că inserția transpozonului  $P\{lacW\}$  în gena *CG18135* introduce alela  $miniw^+$  asociată cu o culoare galben-portocalie a ochilor. Acest fenotip anticipat a fost confirmat în cei 7 adulți *escaperi* viabili sub forma unui halou de culoare roșie sau portocalie și este exemplificat în Figura 3.

Majoritatea indivizilor mutați homozigoți au prezentat dificultate la eclozare și durata de viață scăzută. Deși indivizii reușeau să desfacă puparium-ul (Figura 3A), aceștia aveau dificultăți de a ecloza complet și deseori erau blocați în puparium (exemplificare în Figura 3B). În cadrul experimentului am extras manual câțiva indivizi mutați homozigoți pentru a identifica alte fenotipuri de interes și a evalua durata de viață. Niciun individ adult *escaper* eclozat nu a supraviețuit mai mult de 48 de ore și nu au depășit faza de imago. Fără intervenții suplimentare, unii indivizi au murit în încercarea de a ecloza.

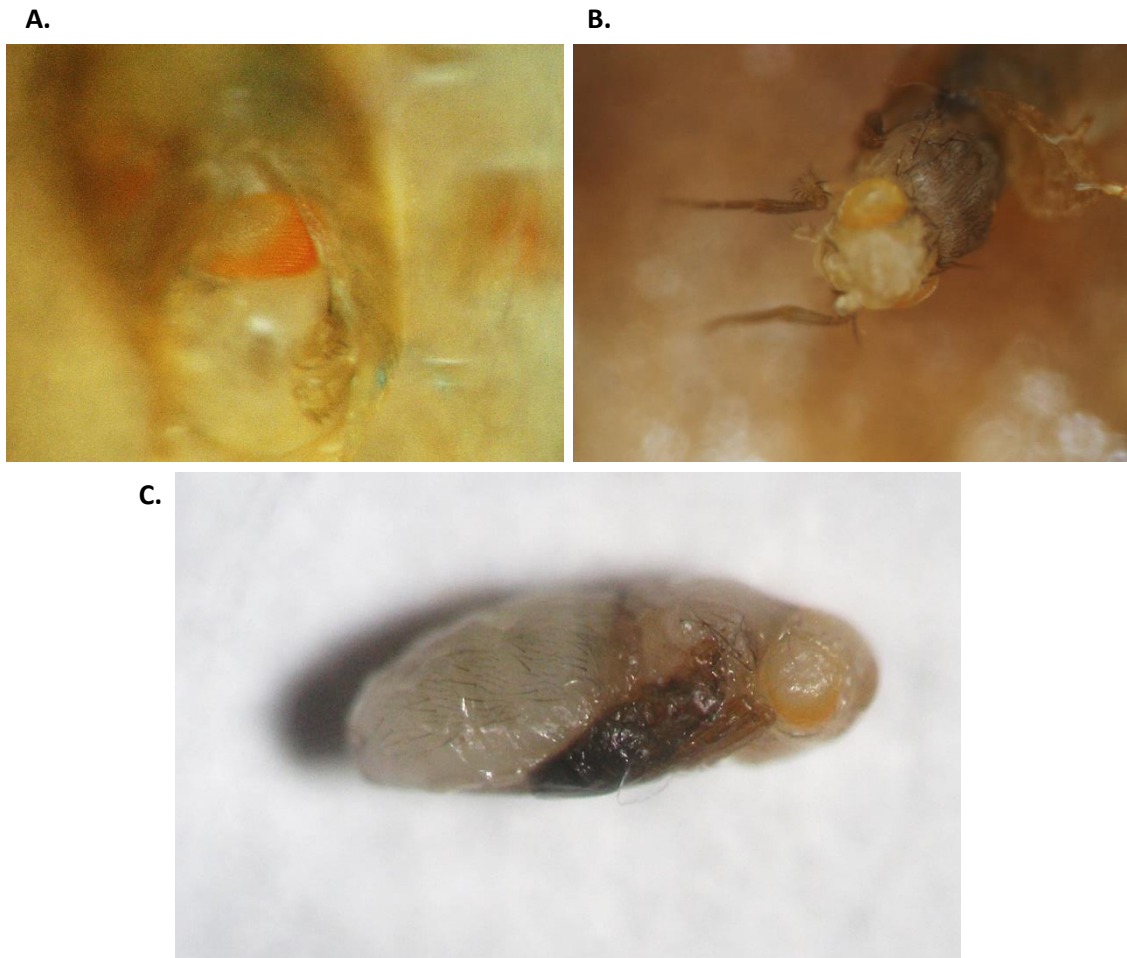


Figura 3. Exemple de adulți homozigoți *escaperi* identificați în cadrul experimentelor de viabilitate din această etapă a studiului.

În indivizii extrași manual din puparium au fost observate două fenotipuri de interes, și anume mișcări sacadate și lipsa de activitate. Adulții *escaper* nu se deplasau corespunzător și erau mai inactivi decât adulții control, iar singurele mișcări ale acestora erau ocazionale și neorganizate, asemănătoare unor spasme musculare. Aceste două fenotipuri sunt în mod particular interesante, considerând faptul că funcțiile genei *CG18135* la *D. melanogaster* pot fi corelate cu legarea fasciculelor de miozină prin interacțiunea *Myo10A* și cu metabolismul energetic. Natura mișcărilor adulților *escaperi* și lipsa de activitate ar putea fi explicate, după investigații suplimentare, cu aceste procese biochimice complexe.

În plus, este important de menționat faptul că, în timp ce alte inserții de transpozoni în gena *CG18135* la *D. melanogaster* au fost identificate și inventariate în baze de date, inserția *CG18135<sup>P{lacW}CG18135</sup>* este prima alelă asociată cu un fenotip particulară în indivizii homozigoți.

## Cheltuieli/achiziții

Referitor la cheltuieli realizate din finanțarea AOSR, acestea au constat în următoarele:

- minifrigider probe (aproximativ 600 RON);
- memorie externă pentru stocare date (aproximativ 900 RON);
- kit-uri qRT-PCR (aproximativ 2000 RON).

Restul finanțării a fost depozitată în cont bancar și o vom utiliza pentru achitarea taxelor de publicare pentru articolele publicate în cadrul acestui proiect de cercetare.

## Bibliografie

1. Aradska, J., Bulat, T., Sialana, F. J., Birner-Gruenberger, R., Erich, B., & Lubec, G., 2015. Gel-free mass spectrometry analysis of *Drosophila melanogaster* heads. *Proteomics*, 3356-3360;
2. Brown, J. B., Boley, N., Eisman, R., May, G. E., Stoiber, M. H., Duff, M. O., ... & Celniker, S. E., 2014. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome. *Nature*, 512(7515), 393-399;
3. Casas-Vila, N., Bluhm, A., Sayols, S., Dinges, N., Dejung, M., Altenhein, T., ... & Butter, F., 2017. The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*. *Genome research*, 27(7), 1273-1285;
4. Eibl, H., 1980. Synthesis of glycerophospholipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 405-429;
5. Fabian, L., & Brill, J. A., 2012. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages. *Spermatogenesis*, 2(3), 197-212;
6. Findlay, G. D., Yi, X., MacCoss, M. J., & Swanson, W. J., 2008. Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. *PLoS biology*, 6(7), e178;
7. Fisher, B., Weiszmann, R., Frise, E., Hammonds, A., Tomancak, P., Beaton, A., Berman, B., Quan, E., Shu, S., Lewis, S., Rubin, G., Barale, C., Laguertas, E., Quinn, J., Ghosh, A., Hartenstein, V., Ashburner, M., Celniker, S., 2012. BDGP insitu homepage;
8. Gibellini, F., & Smith, T. K., 2010. The Kennedy pathway—de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB life*, 62(6), 414-428;
9. Ionascu, A., Ecovoiu, A.A., Chifiriuc, M.C., Ratiu, A.C. qDATA - an R application implementing a practical framework for analyzing quantitative Real-Time PCR data. In Press.
10. Li, H., Rai, M., Buddika, K., Sterrett, M. C., Luhur, A., Mahmoudzadeh, N. H., ... & Tennessen, J. M., 2019. Lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase cooperatively regulate growth and carbohydrate metabolism during *Drosophila melanogaster* larval development. *Development*, 146(17), dev175315;
11. Liu, R., Woolner, S., Johndrow, J. E., Metzger, D., Flores, A., & Parkhurst, S. M., 2008. Sisyphus, the *Drosophila* myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos;
12. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408;

13. McCullough, E. L., Whittington, E., Singh, A., Pitnick, S., Wolfner, M. F., & Dorus, S., 2022. The life history of *Drosophila* sperm involves molecular continuity between male and female reproductive tracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(11), e2119899119;
14. Nguyen, J. H., Chung, J. D., Lynch, G. S., & Ryall, J. G., 2019. The microenvironment is a critical regulator of muscle stem cell activation and proliferation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 254;
15. Stewart, J. D., Marchan, R., Lesjak, M. S., Lambert, J., Hergenroeder, R., Ellis, J. K., ... & Hengstler, J. G., 2012. Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8155-8160;
16. Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Molecular cell biology*, 9(2), 112-124;
17. Ventura, R., Martínez-Ruiz, I., & Hernández-Alvarez, M. I., 2022. Phospholipid Membrane Transport and Associated Diseases. *Biomedicines*, 10(5), 1201;
18. Whitworth, C., Jimenez, E., & Van Doren, M., 2012. Development of sexual dimorphism in the *Drosophila* testis. *Spermatogenesis*, 2(3), 129-136;

5 decembrie 2023

Lector dr. Attila Cristian Rațiu



Drd. Adrian Ionașcu

