

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie a biochemie



**Studium genu *disc overgrown* v imaginálních discích
*Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Vypracoval: David Opavský

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Doležal Ph.D.

České Budějovice, 2009

Opavský D., 2009: Studium genu *dco* v imaginálních discích *Drosophila melanogaster* [The study of *dco* gene in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*]

Anotation: The aim of this bachelor's thesis was to make a *Drosophila* line with a gene set that induces a creation of mitotic clones in wing discs and eye discs. Seven different *Drosophila* stocks from various sources were used in genetic crossing to obtain such line. The mitotic-clone area was composed of either cells that were homozygous for GFP or cells that were homozygous for *dco*³ mutation. The *dco*³ is a recessive lethal mutation leading to death in pupae. By induction of a small number of cells homozygous for *dco*³ it was possible to observe the changes in adult tissues with mutant clones.

Finanční podpora: grant GAČR 301/07/0814

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Poděkování: Rád bych poděkoval Tomášovi Doležalovi za pomoc při sepsování této práce, ale také za odborné vedení a vše co mě naučil. Dále bych chtěl poděkovat všem členům naší laboratoře za pomoc při řešení různých problémů během práce v laboratoři.

V Českých Budějovicích, 6.1.2009

.....
David Opavský

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Charakteristika genu <i>dco</i>	1
1.2 Úloha genu <i>dco</i> během vývoje drozofily.....	1
1.3 Gen <i>dco</i> kóduje homolog lidské CKI δ a ϵ	1
1.4 Casein Kináza.....	2
1.5 Mutace genu <i>discs overgrown</i>	2
1.6 Úloha Kasein kinázy v různých buněčných drahách a procesech.....	3
1.6.1 Wnt/ β -catenin signální dráha.....	3
1.6.1.1 Nové složky, které se účastní Wnt/ β -catenin signalizace.....	4
1.6.2 Hedgehog dráha.....	4
1.6.3 Úloha členů rodiny CKI v Wnt a Hh.....	5
1.6.4 Planární polarita.....	5
1.6.5 Dco/CKI podporuje jak Wg/ β -catenin tak i Fz/PCP signalizaci.....	5
1.6.6 Úloha CKI v nádorových onemocnění.....	6
1.7 Cíl práce.....	7
2. Materiál a metody	8
2.1 Seznam genotypů drozofil.....	8
2.2 Popis manipulace s drozofilou.....	8
2.3 Preparace imaginálních disků a příprava preparátů.....	8
2.4 Složení médií a pufrů.....	8
2.4.1 Složení kultivačního média.....	8
2.4.2 Složení PBS pufru.....	8
3. Výsledky	9
3.1 Ověření fenotypu linie s mutací <i>dco</i> ³	9
3.2 Křížení pro kontrolu funkčnosti Gal4 driveru.....	10
3.3 Tvorba klonů buněk v křídelním disku, které budou homozygotní pro mutaci <i>dco</i> ³	11
3.3.1 Genotypu wd-Gal4, UAS FLP II a FRT 82 <i>dco</i> ³ GFP.....	13
3.3.1.1 První krok křížení.....	13
3.3.1.2 Druhý krok křížení.....	13
3.3.1.3 Třetí krok křížení.....	14
3.3.1.4 Čtvrtý krok křížení.....	15
3.3.1.5 Pátý krok křížení.....	16
3.3.1.6 Šestý krok křížení.....	17
3.3.1.7 Sedmý krok křížení.....	18
3.3.1.8 Osmý krok křížení.....	19
3.3.1.9 Poslední krok křížení.....	20
3.4 Křížení pro kontrolu GMR-Gal4 driveru.....	25
3.5 Tvorba klonů buněk v očním disku, které budou homozygotní v mutaci <i>dco</i> ³	26
4. Diskuze	27
5. Závěr	29
6. Literatura	30

1. Úvod

1.1 Charakteristika genu *dco*

Gen *discs overgrown* izolovaný z *Drosophila melanogaster* kóduje vysoce konzervovaný homolog subrodiny I δ/ϵ Kasein kináz a je identický s genem *double-time* (Kloss et al., 1998). Na rozdíl od hypomorfických alel genu *double-time*, které ovlivňují pouze cirkadiální rytmy (Price et al., 1996), mutantní alely genu *discs overgrown*, ukazují velký efekt na přežívání buněk a kontrolu růstu v imaginálních discích. Analýzy mutantních fenotypů naznačují, že protein genu *Discs overgrown* je rozhodující složkou v mechanismu, který spojuje přežití buněk během proliferace a zastavení růstu v imaginálních discích. Aminokyselinová sekvence a trojrozměrná struktura I δ/ϵ kasein kinázových enzymů je vysoce konzervovaná, což naznačuje, že tyto proteiny možná mají funkci v kontrole růstu buněk a jejich přežití i v jiných organizmech (Zilian et al., 1999).

1.2 Úloha genu *dco* během vývoje drozofily

Vhodného počtu buněk ve vyvíjející se tkáni je dosaženo koordinací buněčného dělení a apoptozy. V drozofile se křídlo vyvíjí z křídelního imaginálního disku během období růstu a proliferace v larválním stádiu za sníženého množství apoptoz, za což je zodpovědný gen *dco*. Exprese *dco* může snižovat apoptickou aktivitu hid (Head involution defective). Ztráta genu *dco* má za následek dramatickou redukci exprese kaspázového inhibitoru DIAP1, která je doprovázena aktivací kaspáz, což má za následek masivní množství apoptoz, a následně fenotypy s malými disky, viditelné v *dco* mutantech. *Dco* reguluje DIAP1 prostřednictvím post-transkripčního mechanismu bez závislosti na hid. (Ryoo et al., 2004; Wang et al., 1999; Yoo et al., 2002). IAP je rodina proteinů, které se váží na kaspázy a inhibují jejich funkci, katalytickou aktivitu nebo schopnost aktivních kaspáz vázat se na substrát (Deveraux a Reed, 1999; Tenev et al., 2005). DIAP1 kódovaný lokusem *thread* a ten je členem této IAP rodiny (Hay, 2000).

1.3 Gen *dco* kóduje homolog lidské CKI δ a ϵ

Analýza genomové a cDNA sekvence ukázala, že transkribovaná část *dco* je složena ze čtyř exonů a tří intronů. Nejdelší ORF (open reading frame) kóduje protein o velikosti 440 aminokyselin z nichž 300 N-koncových má vysoký stupeň proteino-sekvenční shody s katalytickou doménou CKI rodiny. Nejblíže příbuzné izoformy jsou lidská CKI δ a ϵ , které jsou totožné z 86% a z 92% až 91% podobné. Tato vysoká podobnost se vyskytuje i nižší eukaryot jako např. HRR25 v pučících kvasinkách s 78% podobností a odpučelých z 68%,

což potvrzuje, že katalytická doména Dco je vysoce konzervovaná (Xu et al., 1995; Longenecker et al., 1996).

1.4 Casein Kináza

Savčí isoformy kasein kináz fosforylují velké množství různých substrátů mezi něž patří klíčové proteinové regulátory zahrnuté v kontrole buněčné diferenciaci, proliferaci, chromozomální segregaci a cirkadiálních rytmech. Mutace v fosforylačních místech substrátů a stejně tak mutace a deregulace aktivity některých kináz a fosfatáz mohou vést k poruchám a onemocněním během vývoje jako jsou kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní onemocnění, imunodeficience, endokrinní onemocnění a k výskytu rakoviny.

CKI reprezentuje unikátní skupinu superodiny serin/threonin specifických kasein kináz, které se vyskytují ve všech eukaryotických organizmech. Dosud bylo popsáno sedm savčích isoform CKI (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ a ϵ) a jejich různé varianty. Jejich molekulární hmotnost se pohybuje v rozmezí 37kD (CK α 1) až 51kD (CK1 γ 3). Všechny CKI isoformy jsou vysoce konzervovány v jejich kinázové doméně, ale významně se odlišují v délce a primární struktuře jejich N-konce a C-konce nekatalytických domén, v rozmezí 24 až 200 aminokyselin. Jako fosfátový donor užívají CKI isoformy výhradně ATP. Dále bylo popsáno několik forem CKI α , CKI γ , CKI ϵ , které byly dopraveny přidáním inzertu o velikosti 28 až 12 aminokyselin do C-konce nebo katalytické domény. Takto vzniklé varianty slouží k odlišení v jejich kinázové aktivitě, funkci, subbuněčné lokalizaci a biochemických vlastnostech (Knippschild et al., 2004).

1.5 Mutace genu *discs overgrown*

Od té doby, co byl gen *dco* popsán (Jursnich et al., 1990) bylo vytvořeno velké množství nových alel nejrůznějšími mutagenetickými přístupy, tyto mutace se projevují jako „loss of function“, i jako „gain of function“. Většina genotypů, zahrnující alely jiné než *dco*³ a *dco*¹⁴⁴⁷, vykazuje široký stupeň abnormalit začínající naprostou nepřítomností disků až po jedince s disky naprosto normálními. Následek mutací v genu *dco* v imaginálních discích je vidět nejnázorněji na křídelním disku. Alela *dco*³ v homozygotních nebo heteroalelických kombinacích s jinou známou alelou nebo deficiencí prodlužuje larvální období na několik dní. Během této doby disky rostou neustále do velikosti několikrát větší než je u divokého typu, ale většina heteroalelických *dco*³ kombinací umožňuje vývoj do stádia kukly.

Některé fenotypy *dco*³ vykazují částečnou duplikaci nožní struktury připomínající fenotypy produkující nožní diskové klony, které nemohou obdržet Dpp signál. Pro testování klonální autonomie *dco*³ bylo vytvořeno velké množství larválních stádií, avšak žádný efekt na Dpp cílových genech pozorovaný nebyl. Ale na rozdíl od klonů *dco(le88)*, *dco*³ nejenže pokračovaly v růstu a proliferaci, ale také nezastavily svůj růst, když disky dosáhly jejich normální velikosti, ačkoliv velikost jednotlivých buněk ovlivněna není. Tyto výsledky také ukazují, že buňky disků s genem *dco*³ jsou schopné přijímat signál pro růst a přežití. Mimoto z důvodu, že většina okolních larválních tkání neproliferuje po klonální indukci, je patrné, že buňky *dco*³ jsou poškozené ve schopnosti reagovat na signál zastavující růst (Zilian et al., 1999). V imaginálních discích je růst určován spíše buněčným růstem než buněčnou proliferací, protože průběh buněčného cyklu je silně spjat s buněčným růstem (Weigmann et al., 1997; Neufeld et al., 1998). Růst je regulován přímo inzulinovými signály a nepřímo patternálními signály zahrnující Dpp, Wg a Notch (Zecca et al., 1996; Horsfield et al., 1998; Johnson a Edgar et al., 1998). Pro růst disků jsou nezbytné jak růstové signály, tak paternové, jak dokumentuje růstový neúspěch v mutantních klonech pro transdukcii Dpp a Wg signálů (Burke a Blaster, 1996; Orsulic a Peifer, 1996) a malé diskové fenotypy hypomorfických insulin receptor mutantů (Chen et al., 1996). Ačkoliv *dco* hraje důležitou roli v růstu a proliferaci, není to jeho jediná morfogenická funkce v imaginálních discích. Gen *dco* hraje důležitou roli v Hedgehog signalizaci, v Wnt, pomáhá ustanovit planární polaritu, podílí se na fosforylaci proteinu p53 a ještě mnoho dalších při jakémkoliv narušení kteréhokoliv z těchto procesů může vést k tvorbě nádoru.

1.6 Úloha Kasein kinázy v různých buněčných drahách a procesech

1.6.1 Wnt/ β -catenin signální dráha

Nejnámější Wnt dráha je vysoce konzervovaná Wnt/ β -catenin signalizace, která reguluje stabilitu transkripčního kofakturu β -catenin a také na něm závislou genovou transkripci. Narušení Wnt/ β -catenin signalizace je spojeno s mnoha lidskými onemocněními zahrnující nádorová onemocnění, stárnutí a degenerativní onemocnění. Za nepřítomnosti Wnt ligandu, je koncentrace cytoplazmatického β -catenin velmi nízká, protože je fosforylován za účelem na fosforylaci závislé ubiquitinace a následné degradace. β -cateninová fosforylace je prováděna pomocí proteinového komplexu složeného z Casein Kinázy I (CKI) a glykogen syntetázové kinázy 3 (GSK3), jež jsou navázány na komplex držící protein Axin a APC (adenomatous polyposis coli), což je tumor supresorový protein (Logan a Nusse, 2004;

Clevers, 2006). Fosforylovaný β -catenin je postupně rozpoznáván β -Trcp, což je podjednotka E3 ubiquitinové ligázy a poté je ubiquitinován a degradován. Wnt stimulace je zahájena dvěma rozdílnými buněčnými receptory, které se nacházejí na povrchu buněčné membrány. Jeden z těchto receptorů je člen rodiny zatočených proteinů Frizzled (Fz), další je nízkohmotnostní lipoproteinový receptor příbuzný proteinu 6 (LRP6) a blízkce příbuzný LRP5 (He et al., 2004). Wnt může prostřednictvím Dishvelled (v obratlovcích nazývaný Dvl a Dsh v drozofile) připojit buněčný GSK3 inhibitor GBP/Frat do degradačního komplexu a dále navodit formaci Fz-LRP6 komplexu, který odvádí Axin do plazmatické membrány, což má za následek inhibici fosforylaci β -catenin a její následnou degradaci. Akumulace stabilizovaného β -catenin v jádře způsobí spojení s TCF/LEF enhancerovým faktorem, což vede k vytvoření komplexu, který navodí zvýšení exprese cílových Wnt genů (Huang a He, 2008).

1.6.1.1 Nové složky, které se účastní Wnt/ β -catenin signalizace

Klíčový krok v Wnt signalizaci zahrnuje fosforylaci. GSK3 a CKI nefosforylují pouze β -catenin, ale také Axin a APC. Nedávno byl identifikována nová konzervovaná složka dex.komplexu, ubiquitinová protein fosfatáza 1 (PP1). PP1 interaguje s Axin a defosforyluje jejne několika CK1 fosforylovaných serinových zbytcích, tato Axinová defosforylace omezuje Axin-GSK3 interakci, což má za následek inhibici β -cateninové fosforylace (Luo et al., 2007).

1.6.2 Hedgehog dráha

Rodina Hedgehog sekretovaných proteinů se podílí na řízení buněčného růstu a tvorbě tkání během vývoje u obratlovců i bezobratlých (Ingham a McMahon, 2001). Hh signalizace sdílí s Wnt signalizací velké množství společných rysů. Regulace transkripčním aktivátorem, v tomto případě Cubitus interruptus (Ci, Gli protein u obratlovců) je rozhodující pro signalizaci (Hoper a Scott, 2005). V nepřítomnosti Hh je Ci-155 částečně degradována, nechávající polovinu N-konce intaktní. Ci-75 je přenesena do jádra, kde potlačuje transkripci některých Hh cílových genů (Blanc et al., 1997; Methot a Basler, 1999). Částečná degradace Ci je podporována fosforylací cytoplazmatickým komplexem, který zahrnuje na mikrotubuly se vážající protein Costal-2 (Cos-2) a seriteronin protein kinázu Fused. A stejně jako v případě degradace β -catenin, fosforylace Ci má za cíl navázání Supernumerary limbs (Slimb), V Drosophile homolog β -Trcp (Dai et al., 2003; Jia et al., 2005), což vede k ubiquitinaci SCF E3 ubiquitin ligázou a částečnou proteolýzu proteozomem. Hh signál je

přenášen sedmkrát membránou protkaným proteinem Smoothed Smo). V nepřítomnosti Hh signalizace transmembránový protein Patched (Ptc) inaktivuje Smo udržováním od buněčného povrchu. Pokud Hh naváže Ptc receptor tato inhibice je přerušena a Smo se akumuluje na buněčném povrchu a interaguje s Co-2, což má za následek inhibici Ci podjednotky na přestavbu na Ci-155 na potenciální transkripční faktor.

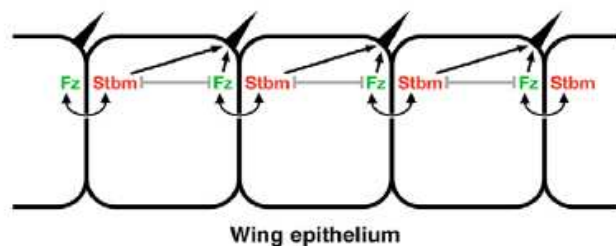
1.6.3 Úloha členů rodiny CKI v Wnt a Hh

Členové CKI rodiny ovlivňují Wnt a Hh signalizaci jak pozitivně, tak negativně spojením nebo fosforylací s různými komponenty obou signálních drah. Cíle pozitivní fosforylace jsou CKI v Wnt jsou Dvl, TCF a LRP6 a v Hh Smo. A v negativní regulaci CKI fosforyluje APC a β -catenin a v Hh Ci, kde fosforylace vede k celkové nebo částečné proteolýze β -catenin a Ci. Vzárustající hlavní otázka je, jak je CKI schopná regulovat tyto dráhy negativně i pozitivně ve stejnou dobu (Price et al., 2008).

1.6.4 Planární polarita

Planární polarita je snadno pozorovatelná ve většině dospělých muších tkání. Na křídlech vyrůstá z vrcholu každé buňky jednoduchý trichom zatímco omatidia v oku nabývají charakteristických uskupení (Eaton a Strutt, 2003). Tři transmembránové proteiny Frizzled, Strabismus a Flamingo jsou potřebné v časném vývoji a jsou jediné komponenty pro mimobuněčné signalizace polarity.

Buňky, které ztratí buď Frizzled nebo Strambismus jsou neschopné přenášet signál, což naznačuje jejich důležitost v komunikaci buňka-buňka. Na rozdíl od cytoplazmatických komponent Dishvelled, Prickle a Diego, které k mezibuněčné komunikaci potřeba nejsou (Strutt a Strutt, 2006).



Obr.č.1 princip vývoje planární polarity v křídle

1.6.5 Dco/CKI podporuje jak Wg/ β -catenin tak i Fz/PCP signalizaci

Propojení Wnt-Frizzled(Fz)/ β -cateninové a Fz/planární buněčné polarit dráhy je nezbytné pro regulaci velké množství vývojových procesů a jsou deregulovány v mnoha lidských chorobách. Obě dráhy požadují členy cytoplazmatických faktorů rodiny Dsh pro

přenos signálu Fz receptorů. Nedávné práce ukazují, že fosforylace Dsh Casein Kinázou I mohou fungovat jako molekulární přepínač, podporující Wnt/ β -catenin zatímco inhibuje Fz/PCP signalizaci (Cong et al., 2004).

1.6.6 Úloha CKI δ v nádorových onemocnění

U savců CKI δ navyšuje své množství při poškození DNA a fosforyluje p53, jež má funkci tumor supresorového proteinu (Knippschild et al., 1997). Tumor supresorový protein p53 je klíčový regulační protein, který předchází proliferaci buněk s poškozenou DNA tím, že zastaví buněčný cyklus nebo navodí apoptózu (Weber et al., 2002). Inaktivace p53 vede k nekontrolovanému buněčnému růstu a k genomové stabilitě, což je pozorováno u zhruba 50% všech lidských nádorových onemocnění. p53 integruje signály různých drah posttranslační modifikaci. K plnění této různorodé funkce jsou potřeba změny v místech fosforylace, což hraje důležitou roli v úpravě odpovědi p53 (Xu, 2003). Změny ve stavu fosforylace fosforylačních míst N-konce p53 buněčném (stresu) ovlivňující transkripční aktivitu a interakce s buněčnými proteiny jako onkoprotein Mdm2. Doteď bylo identifikováno několik kináz, které fosforylují N-konec p53 (Meek, 2002). Zejména CKI δ se zdá mít důležitou roli v regulaci funkce p53 (Knippschild et al., 1997). Existuje úvaha, že při poškození DNA se p53 váže k příslušnému elementu při podpoře CKI δ , což indukuje CKI δ , která postupně fosforyluje p53 stejně jako jiné proteiny, jimž upravuje jejich aktivitu.

1.7 Cíl práce

1. Ověřit fenotyp linie s mutací *dco*³
2. Vytvořit pomocí GAL4-UAS systému klony buněk v křídelním disku, které budou homozygotní pro mutaci *dco*³
3. Vytvořit pomocí GAL4-UAS systému klony buněk v očním disku, které budou homozygotní pro mutaci *dco*³

2 Materiál a metody

2.1 Seznam genotypů drozofil

Genotyp	zdroj
yw; xa/Cyo Act>GFP;TM3 Ser	Hoana Marcu
w; Sco/Cyo; adgf-a[karel]/TM6B	Tomáš Doležal
y1 w*; P{w+mC=UAS-FLP1.D}JD1	Bloomington #4539
w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}459.2	<u>Bloomington #5818</u>
y w ; FRT82 dco[3] / TM6B, Tb	<u>Markus Noll</u>
w*; P{w+mC=GAL4-ninaE.GMR}12	<u>Peter Vilmos</u>
yw; P{w+mW.hs=UAS-GFP}	Hoana Marcu

Genotyp **w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}459.2** je dále označen jako **wd-Gal4** a genotyp **w*; P{w+mC=GAL4-ninaE.GMR}12** jako **GMR-Gal4**.

2.2 Popis manipulace s drozofilou

Drozofila se v laboratorních podmínkách uchovává v kultivační nádobce, která je zhruba z jedné pětiny naplněna kultivačním médiem, které slouží k výživě drozofily a také jako vhodné prostředí, kam samičky drozofily kladou vajíčka. Tyto nakladená vajíčka přecházejí po několika dnech do stádia larvy, která se za několik dnů pohybuje v médiu a vyživuje se jím dokud nedosáhne stádia 3.instaru, pak se přesune na stěnu, kde se zakuklý a podstupuje metamorfózu.

2.3 Preparace imaginálních disků a příprava preparátů:

Larvy, které dosáhly stádia 3.instaru jsou odebrány z kultivační nádoby a vloženy na mikroskopické sklíčko, k nim se přidá několik kapek pufru PBS, který snižuje degradaci tkání. A poté už následuje samotné vypreparování disků.

2.4 Složení médií a pufrů

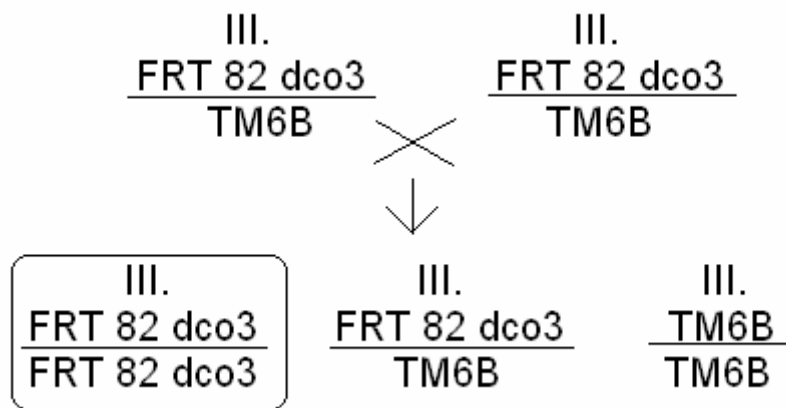
2.4.1 Složení potravy pro pěstování drozofil: 120g kukuřičné mouky do 1,2l vody, 15 g Bactoagar, 75g cukru, 60g instantní kvasnice, 25ml metyl paraben (konzervant)

2.4.2 Složení 1 litru PBS pufru: V 800ml destilované vody je rozpuštěno 8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄, dále pomocí HCl doupravit pH na 7,4 a dále doplní destilovanou vodou na objem 1000ml.

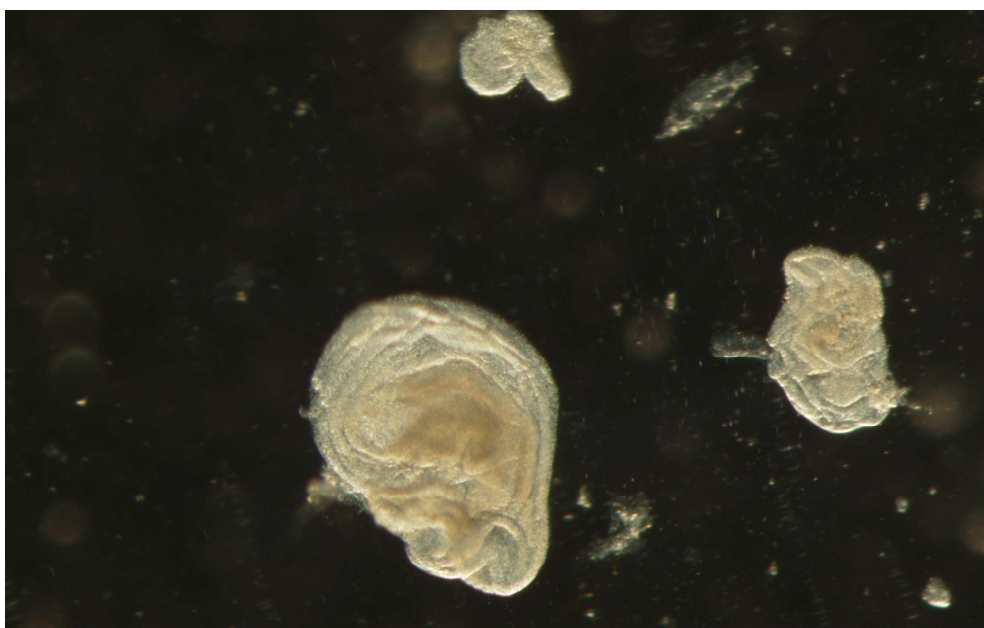
3 Výsledky

3.1 Ověření fenotypu linie s mutací *dco*³

Nejdříve bylo nezbytné otestovat linie drozofily, jejichž genom měl mít na třetím chromozomu lokalizovanou mutaci *dco*³ a jako svůj homolog balancerový chromozom TM6B. Toto ověření jsem provedl prostřednictvím genetického křížení, při němž jsem zkřížil jedince linie s genotypem *dco*³ / TM6B s jedinci z stejné linie. Larvy z tohoto křížení byly dvojího druhu, ty s genotypem *dco*³ / *dco*³ (tj. homozygotní mutant pro *dco*³ mutaci), a s genotypem *dco*³ / TM6B, které díky přítomnosti balanceru TM6B vykazovaly v larválním stádiu vytváří zkrácený tvar larvy (TM6B nese dominantní marker Tubby). Z larev, které měly marker Tubby jsem vypreparoval křídelní disky. Zároveň jsem vypreparoval křídelní imaginální disky z divokého typu, jež sloužily k vizuálnímu porovnání velikosti a tvaru studovaných disků. Porovnání disků jsem zdokumentoval i fotograficky (viz.níže)



Obr.č. 2 Schéma křížení s cílem získat drozofilu s homozygotní sestavou FRT 82 *dco*³.



Obr.č.3
Napravo se nachází imaginální křídelní disk z drozofily divokého typu, nalevo se nachází křídelní disk drozofily s genotypem *FRT 82 dco*³ / *FRT 82 dco*³.

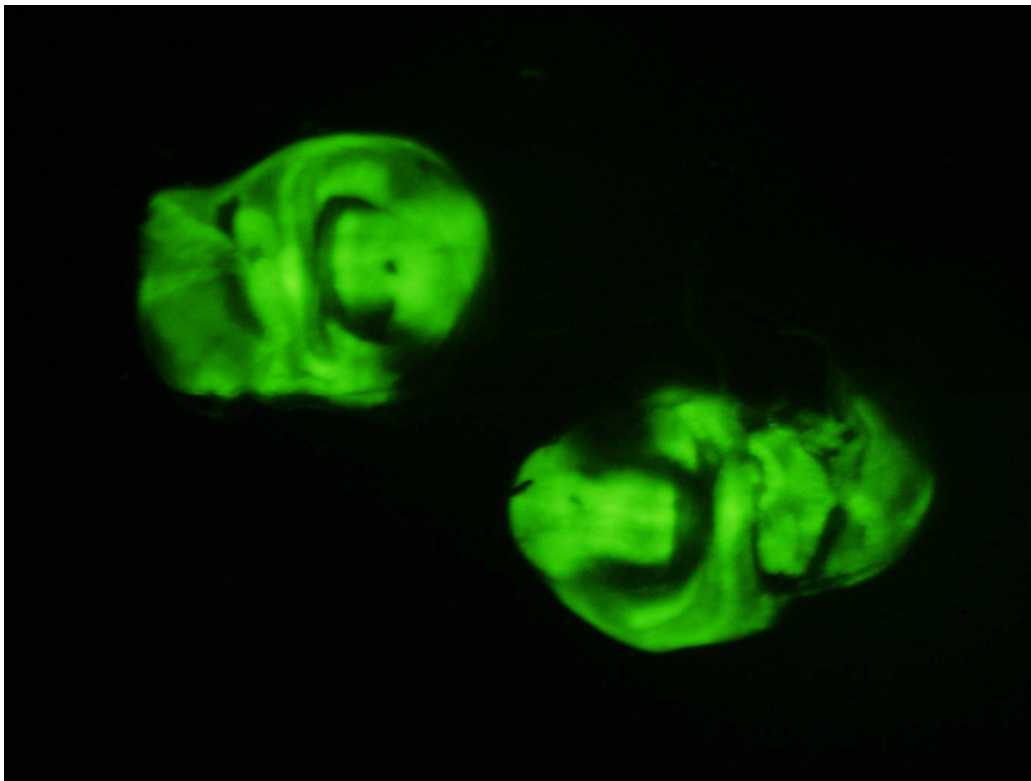
3.2 Křížení pro kontrolu funkčnosti Gal4 driveru.

Toto křížení mělo za cíl vyzkoušet funkčnost Gal4 driveru. Byla křížena drozofila s genotypem wd-Gal4/wd-Gal4 s drozofilou, která měla genotyp UAS-GFP/UAS-GFP.

$$\begin{array}{ccc} \frac{\text{wd-Gal4}}{\text{wd-Gal4}} & \times & \frac{\text{UAS-GFP}}{\text{UAS-GFP}} \\ & \downarrow & \\ \frac{\text{wd-Gal4}}{\text{UAS-GFP}} & & \end{array}$$

Obr.č.4 Schéma křížení s cílem získání drozofily s genotypem, který umožní kontrolu funkčnosti wd-Gal4 driveru.

Z tohoto křížení vznikali pouze jedinci s genotypem wdGal4/UASGFP. Během jejich larválních z nich byly vypreparovány křídelní disky a byla funkčnost Gal4 byla potvrzena.



Obr.č.5 Zde jsou vidět křídelní imaginární disky pod GFP mikroskopem díky tomu, že se v nich exprimuje GFP protein.

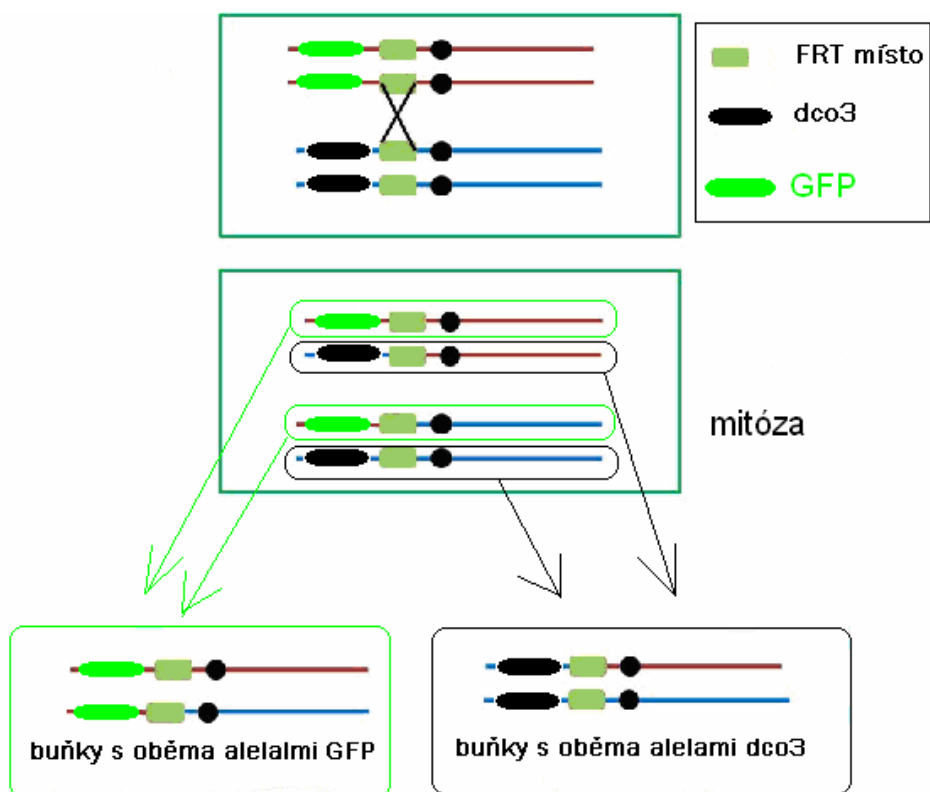
3.3 Tvorba klonů buněk v křídelním disku, které budou homozygotní pro mutaci *dco*³

Pro tvorbu klonů v křídelních buňkách bylo potřeba vytvořit *Drosophilu*, jež bude mít ve svém genomu konstituci těchto genů *wd-Gal4*, *UAS FLP II* a *FRT 82 dco*³, *FRT 82 GFP*.

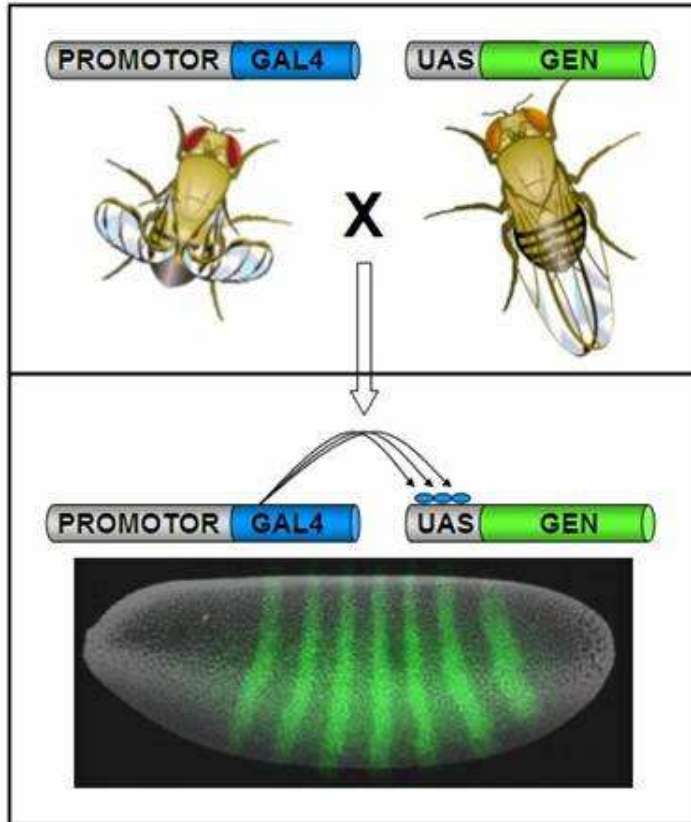
Konstrukt *wd-GAL-4* obsahuje promotor, který je totožný s promotorem genů, které se aktivují pouze v křídle. Proto k jeho expresi dojde pouze v buňkách diferencujících se na křídlo. V těchto buňkách vznikají jeho proteinové produkty, které se váží na *UAS* sekvenci, a tím navodí expresi genu, jež se nachází za ním (princip *UAS-Gal4* systému obr.č.7).

Gen, který se nacházel *UAS* sekvencí byl *FLP II*. Ten vytváří protein flipázu, která katalyzuje rekombinaci dvou úseků v genomu, které jsou označeny *FRT* místem. V tomto případě byla jedním *FRT* místem označena mutace *dco*³ a druhým *FRT* místem byl označen gen kódující protein *GFP*.

Výsledkem této genové spolupráce je, že v buňkách, které se diferencují jako křídelní bude docházet k rekombinaci v místech, kde se nachází gen kódující *GFP* a mutace *dco*³. Po této rekombinaci budou mitózou vznikat buňky, které budou mít ve svém genomu gen *GFP* homozygotně a buňky, které budou mít mutaci *dco*³ homozygotně, ale také buňky ve kterých k rekombinaci nedošlo a bude v nich zachována původní skladba genů.



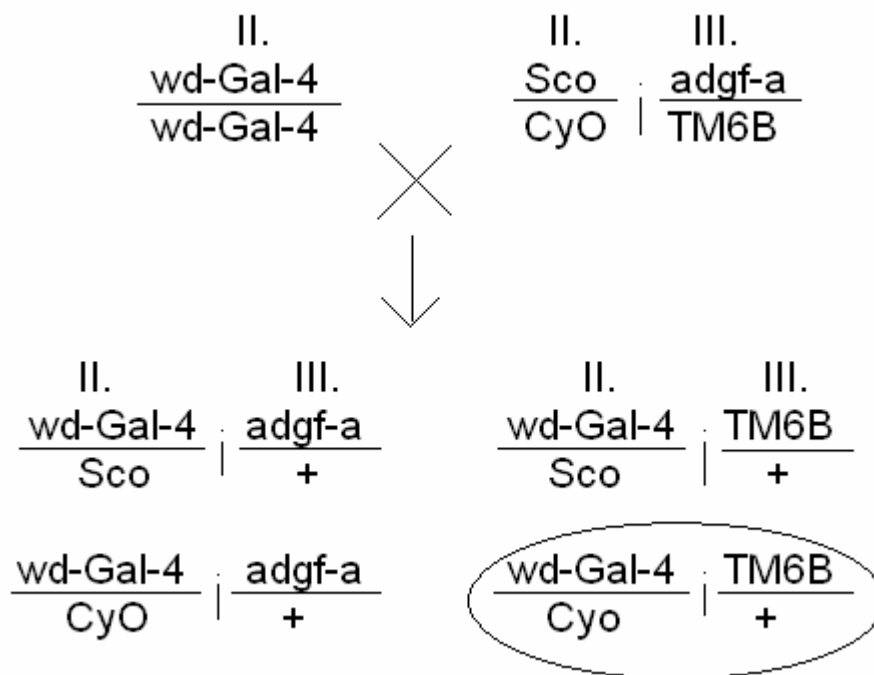
Obr.č.6 V tmavě zelených ramečcích se nachází mateřská buňka, ve které dochází k rekombinaci úseků označených *FRT* sekvencí a následně k mitóze.



Obr.č.7 Zde je vidět fungování UAS-Gal4 systému. Promotorová sekvence je stejná jako u genů tkáně ve které chceme, aby došlo k aktivaci UAS systému. V této tkáni se díky promotoru specifického pro danou tkáň transkribuje Gal4 konstrukt a z něj vzniklý protein funguje jako transkripční faktor pro UAS sekvenci, která navodí expresi genu, který se nachází za ním.

3.3.1 Genotypu wd-Gal4, UAS FLP II a FRT 82 *dco*³ GFP bylo dosaženo následujícím křížením

3.3.1.1 První krok křížení byl prováděn mezi dvěma liniemi - první z nich byla homozygotní pro druhý chromozom nesoucí konstrukt wd-Gal-4, který exprimuje Gal4 driver pouze v křídelním disku. Druhá linie měla na druhém chromozomu dominantní marker *Sco*, který způsobuje nepřítomnost chloupků na zadním okraji thoraxu a balancer *CyO*, který vytváří na drozofile typické zahnutí křídel. Na třetím chromozomu má tato linie recesivně letální mutaci *adgf-a* a balancerový chromozom TM6B.



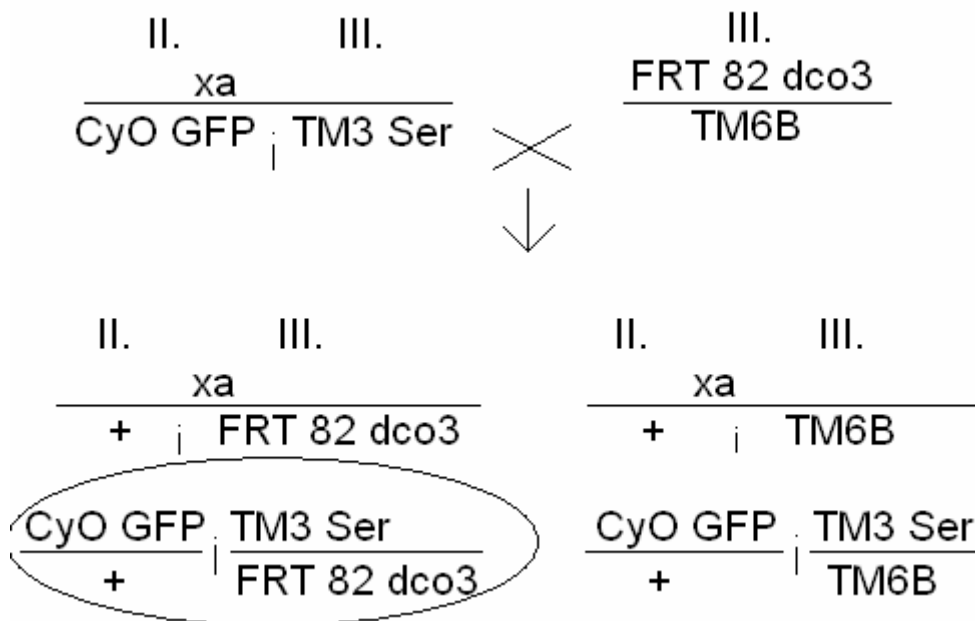
Obr.8 Schéma křížení č.1, které má za cíl získat drozofilu s genotypem wd/Gal4 a +/TM6B

Výsledkem tohoto křížení byli potomci se čtyřmi různými genotypy. Já jsem vybíral ten, který ve svém fenotypu vykazoval známky přítomnosti dominantních markerů balancerových chromozomů *CyO* a TM6B Tubby.

3.3.1.2 Druhý krok křížení

byl prováděn mezi dvěma liniemi. První linie obsahovala ve svém genotypu spojený druhý a třetí chromozom, značený dominantním markerem *Xa*, což má za následek to, že při mitotické nebo meiotické segregaci se tyto dva chromozomy se budou vždy nacházet ve stejné dceřinné buňce. Jejich homologní chromozomy jsou druhý balancerový chromozom *CyO* GFP a třetí balancerový chromozom TM3 Ser, jež se ve fenotypu projevuje vykrojením části křídla. Druhá linie má na třetím chromozomu mutaci *dco*³ spolu s FRT sekvencí v chromozomální oblasti 82, jež slouží

jako rozeznávací sekvence pro enzym Flipáza a jako svůj homolog má balancerový chromozom TM6B.

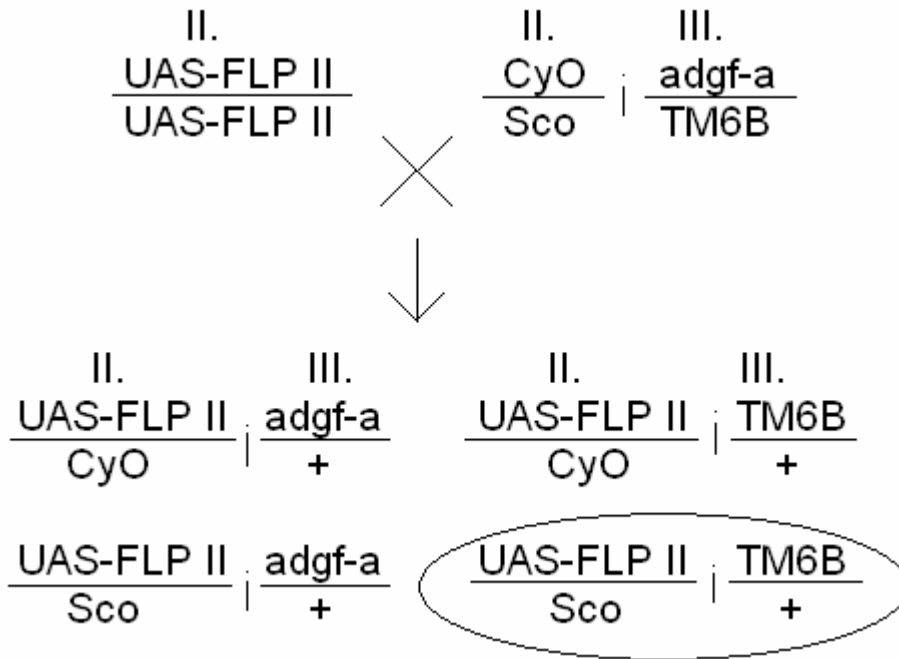


Obr.č.9 Schéma křížení č.2, které mělo za cíl získat drozofilu s genotypem CyO GFP a TM3 Ser/ FRT 82 *dco*³

Potomci tohoto křížení mohou mít čtyři různé genotypy, z nichž jsem vybíral ty, které měly ve fenotypu viditelný balancer CyO a TM3 Ser. Potomci, kteří měli genotyp TM3 Ser/ TM6B se vůbec neobjevili nebo jen zřídka, neboť přítomnost třech balancerů způsobuje velmi nízkou vitalitu a zbývající měli markery pro balancer Xa, jež je vykrojení části křídel z vnější strany.

3.3.1.3 Třetí krok křížení byl prováděn mezi dvěma liniemi.

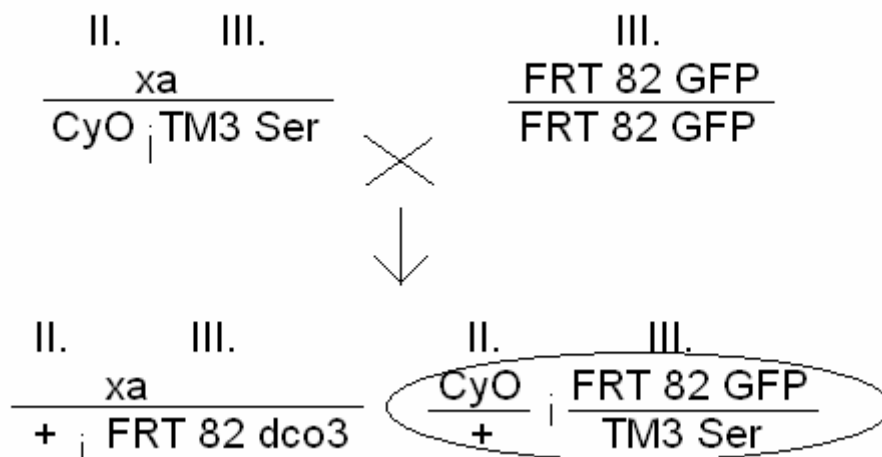
Ta první měla na druhém chromozomu gen kodující enzym flipázu a před ním UAS sekvenci. Toto genové uskupení se nacházelo v homozygotním stavu, takže každý jejich potomek měl ve svém genotypu UAS-FLP II. Druhá linie nesla na druhém chromozomu marker Sco a jeho balancer byl CyO. Na třetím chromozomu mutaci *adgf-a* jako homologní chromozom balancer TM6B.



Obr.č.10 Schéma 3.křížení s cílem získat drozofilu s genotypem UAS-FLP II/Sco a TM6B

Zde vznikaly čtyři fenotypy, z nichž jsem vybíral ten, jež vykazoval známky přítomnosti balanceru TM6B a markeru Sco.

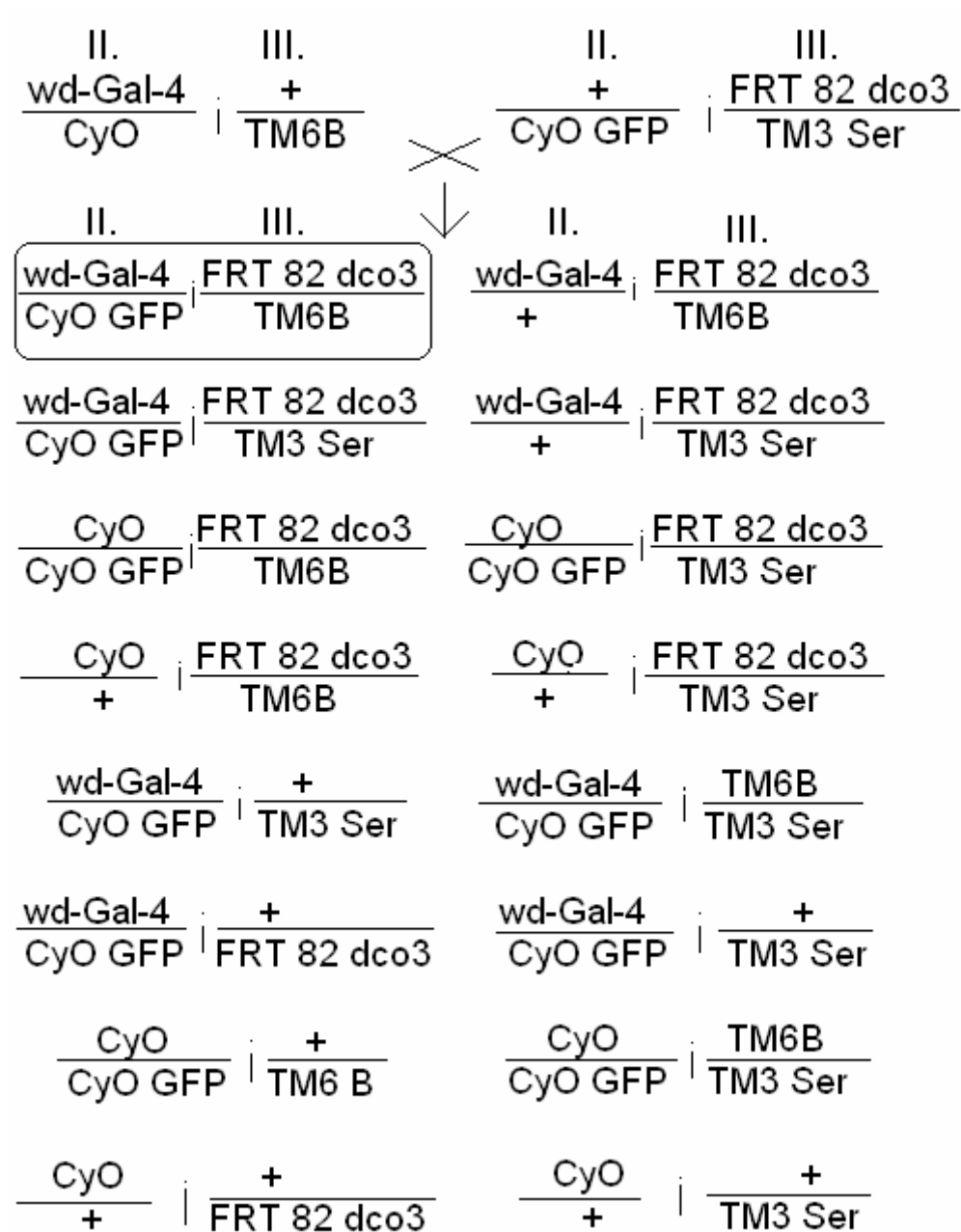
3.3.1.4 Čtvrtý krok křížení byl proveden mezi dvěma liniemi. První obsahovala gen pro GFP, který byl označen FRT sekvencí, jež slouží pro rozeznání enzymem Flipázou. Druhá linie byla s balancerovým chromozomem Xa, který spojuje druhý a třetí do jednoho. A jeho homology byly na druhém chromozomu balancer CyO a na třetím TM3 Ser.



Obr.č.11 Schéma 4.křížení s cílem získat drozofilu s genotypem CyO a FTR 82 GFP/TM3 Ser

Zde vznikaly pouze dva genotypy a já jsem vybíral ten, který měl ve fenotypu viditelný balancerový chromozom CyO a TM3 Ser.

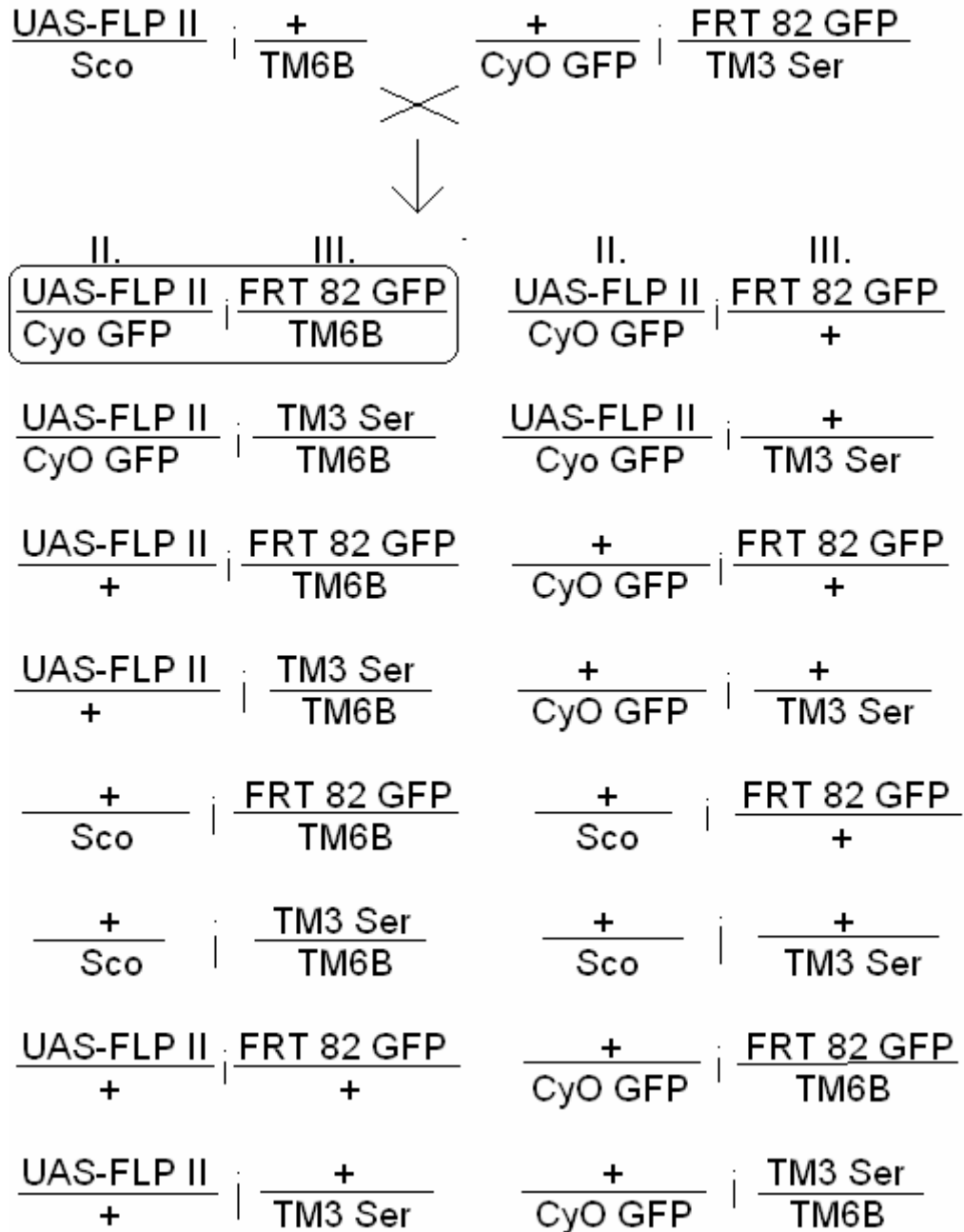
3.3.1.5 Pátý krok křížení byl prováděn mezi dvěma liniemi. První z nich byli potomci z křížení č.1, kteří měli genotyp *wd-Gal-4/CyO*; *+ / TM6B*. Druzí byli potomci z křížení č.2, kteří měli genotyp *+ / CyO*; *FRT 82*.



Obr.č.12 Schéma 5.křížení, které mělo za cíl získat drozofilu s genotypem *wd-Gal4/CyO GFP* a *FRT 82 dco³*

V tomto křížení vznikalo několik různých genotypů, já jsem vybíral mouchy, které měly genotyp *wd-Gal/ CyO* a *FRT 82 dco³ / TM6B*. Poznal jsem je podle markeru *Hu*, který se projevuje zvýšeným počtem chloupků za okem a zahnutých křídel typických pro marker *CyO*.

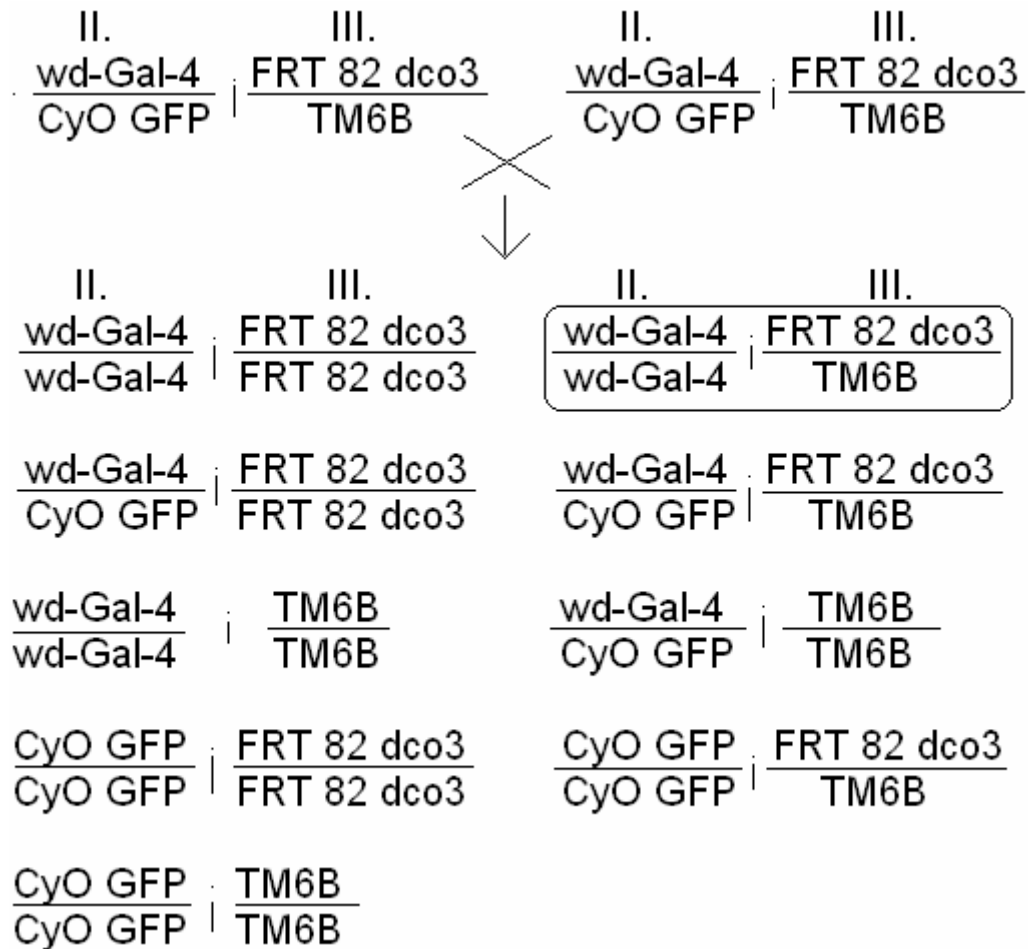
3.3.1.6 Šestý krok křížení byl prováděn mezi linií, která byla získána během 3.křížení a která měla genotyp UAS-FLP II / Sco; +/ TM6B a mezi linií získanou z křížení č.4, která měla genotyp +/ CyO-GFP; FRT 82 GFP/ TM3 Ser.



Obr.č.13 Schéma křížení č.6 s cílem získat drozofilu s genotypem UAS FLP II/CyO a FRT 82 GFP/TM6B

Během tohoto křížení vznikalo několik různých potomků, vybírány byly ty s genotypem UAS-FLP II/ CyO GFP; FRT 82 GFP/ TM6B.

3.3.1.7 Sedmý krok křížení měl za cíl vyselektovat jedince s genotypem wd-Gal4/wd-Gal4 a FRT 82 dco3/TM6B. Křížení byli potomci pátého křížení mezi sebou, takže to byly mouchy s genotypem wd-Gal-4/ CyO GFP; FRT 82 dco3/ TM6B s mouchami se stejným genotypem.

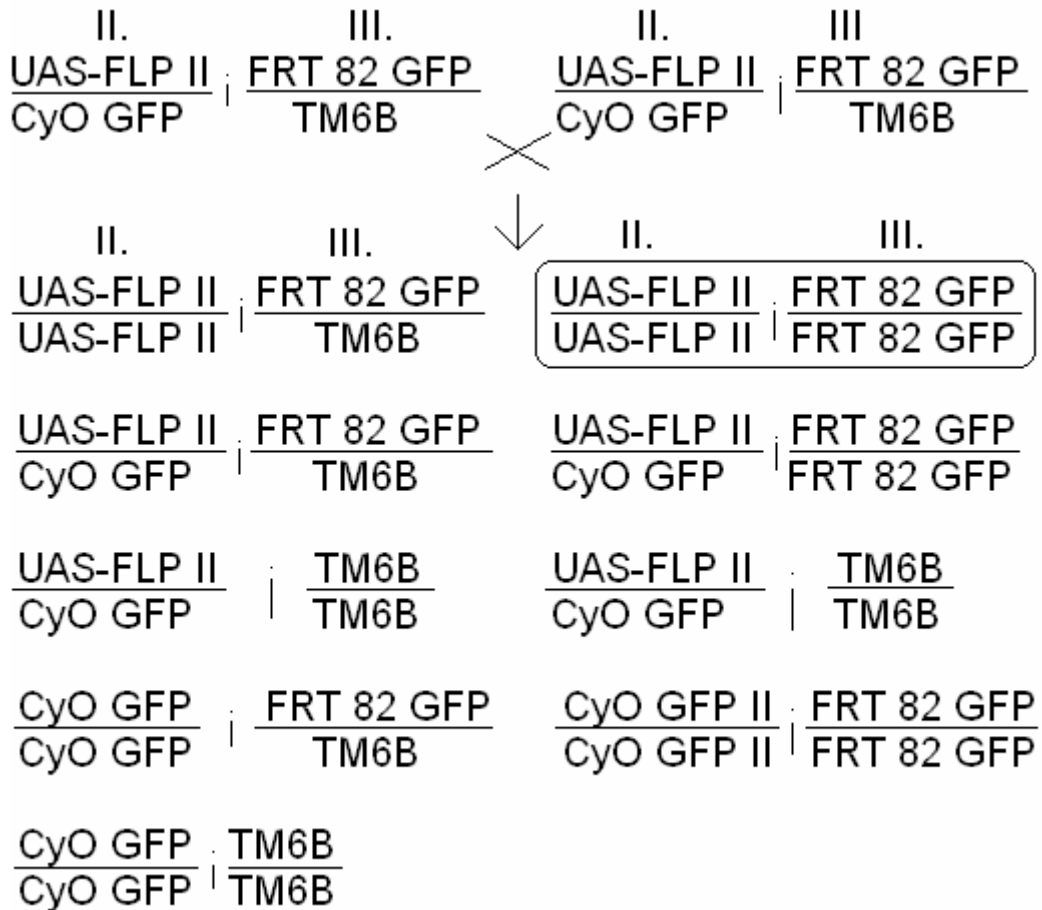


Obr.č.14 Schéma křížení č.7 s cílem vyselektovat drozofilu s genotypem wd-Gal4/wd-Gal4 a FRT 82 dco3

V tomto křížení vznikalo několik různých genotypů. Byly vybírány ty mouchy, které nesly znaky pouze přítomnosti balanceru TM6B, který se nacházel v cílové mouše tohoto křížení.

3.3.1.8 Osmý krok křížení

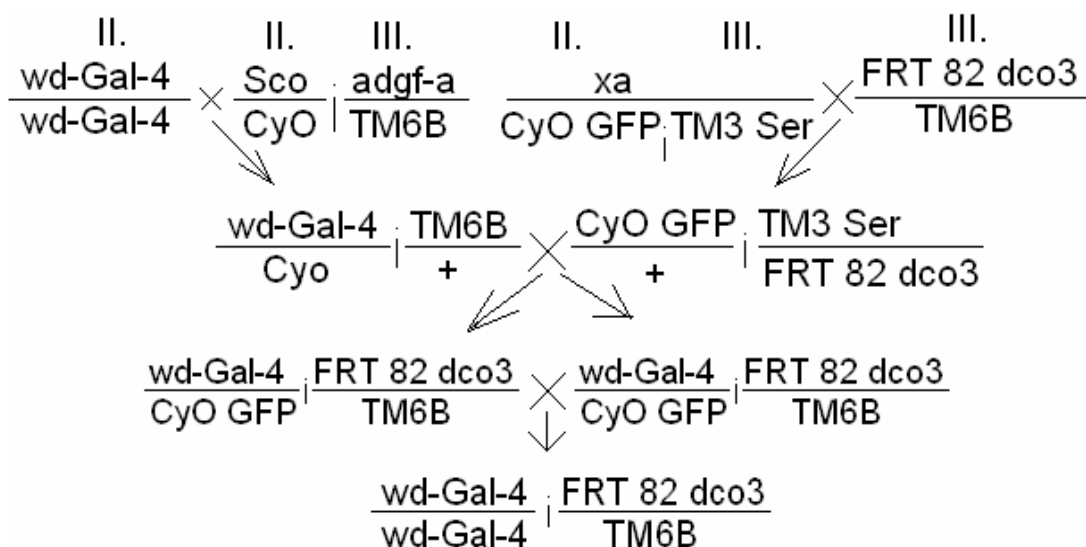
Tento krok byl prováděn s cílem vyselektování jedinců s genotypem UAS FLP II/ UAS FLP II a FRT 82 GFP/FRT 82 GFP Křížení byli potomci z šestého křížení mezi sebou, jejichž genotyp je UAS-FLP II/ CyO GFP a FRT 82 GFP/ TM6B.



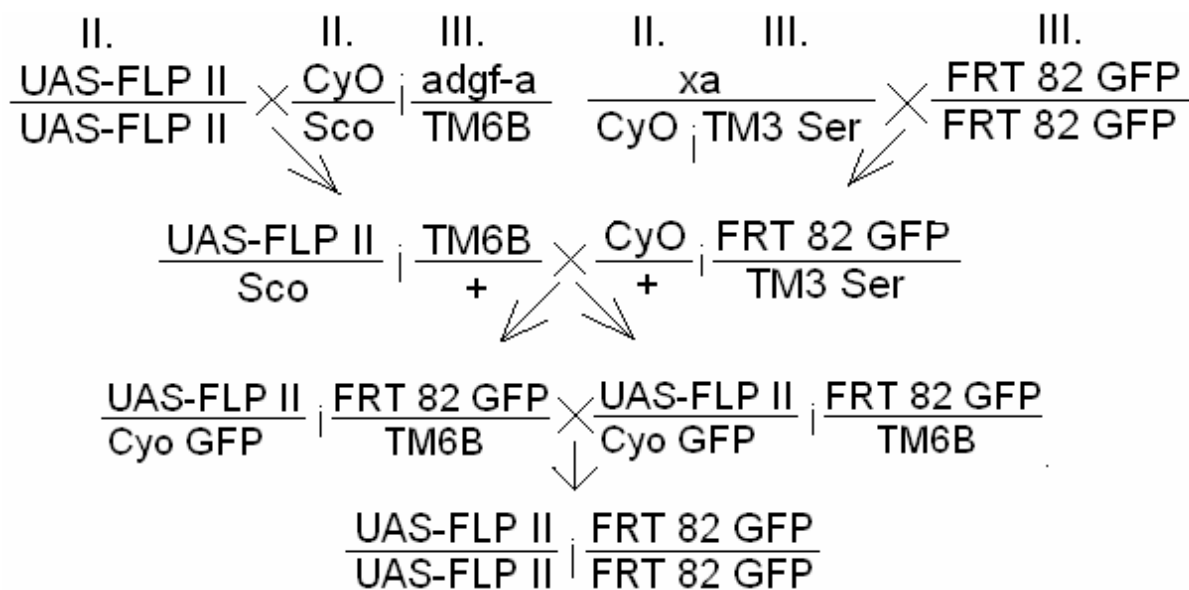
Obr.č.15 Schéma křížení č.8, které mělo cíl vyselektovat drozofilu s genotypem UAS-FLP II/ UAS FLP II a FRT 82 GFP/FRT 82 GFP

Vytvářelo se zde několik různých genotypů ze kterých byly vybírány mouchy, které měly wild-type fenotyp, protože odpovídal genotypu UAS-FLP II/ UAS FLP II; FRT 82 GFP/ FRT 82 GFP.

Přehled vybraných genotypů a jejich křížení



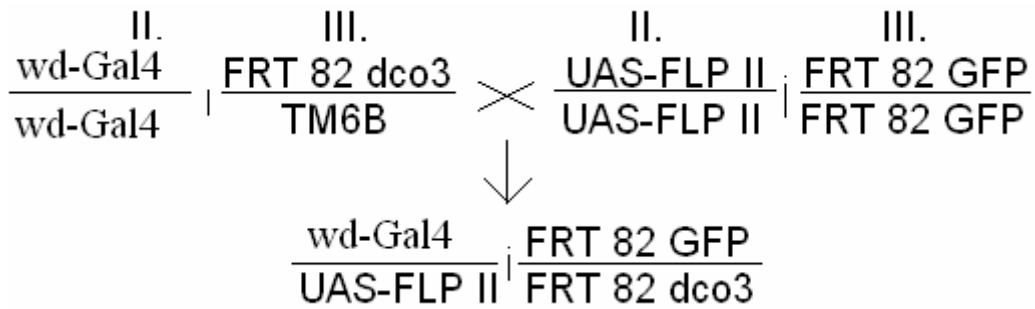
Obr.č.16 Souhrn vybraných a křížených drozofil popsanych na obr.č.8,9,12 a 14.



Obr.č.17 Souhrn vybraných a křížených drozofil popsanych na obr.č.10,11,13,15.

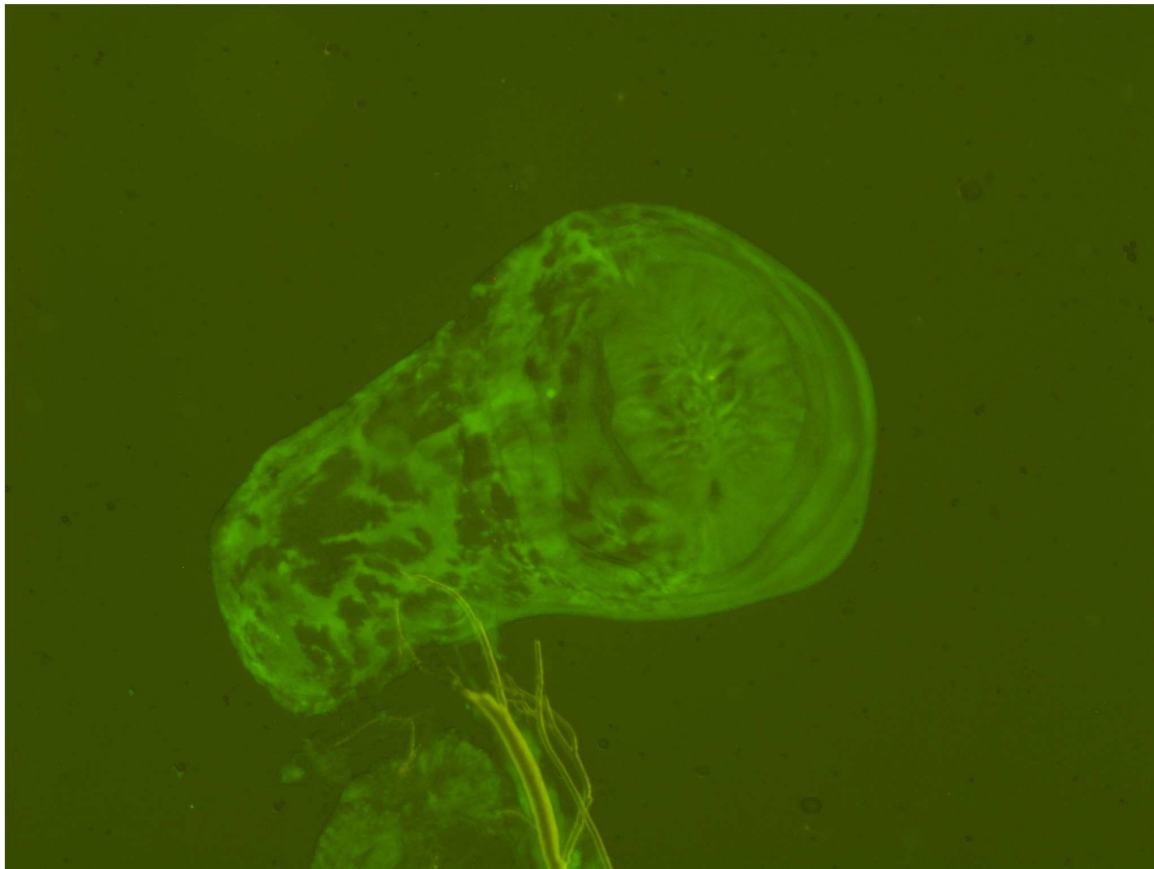
3.3.1.9 Poslední krok křížení

Zde byla křížena moucha, která byla získána ze sedmého křížení s genotypem wd-Gal4/wd-Gal4 a FRT 82 *dco*³/TM6B s mouchou z osmého křížení s genotypem UAS-FLP II/UAS-FLP II a FRT 82 GFP/FRT 82 GFP.

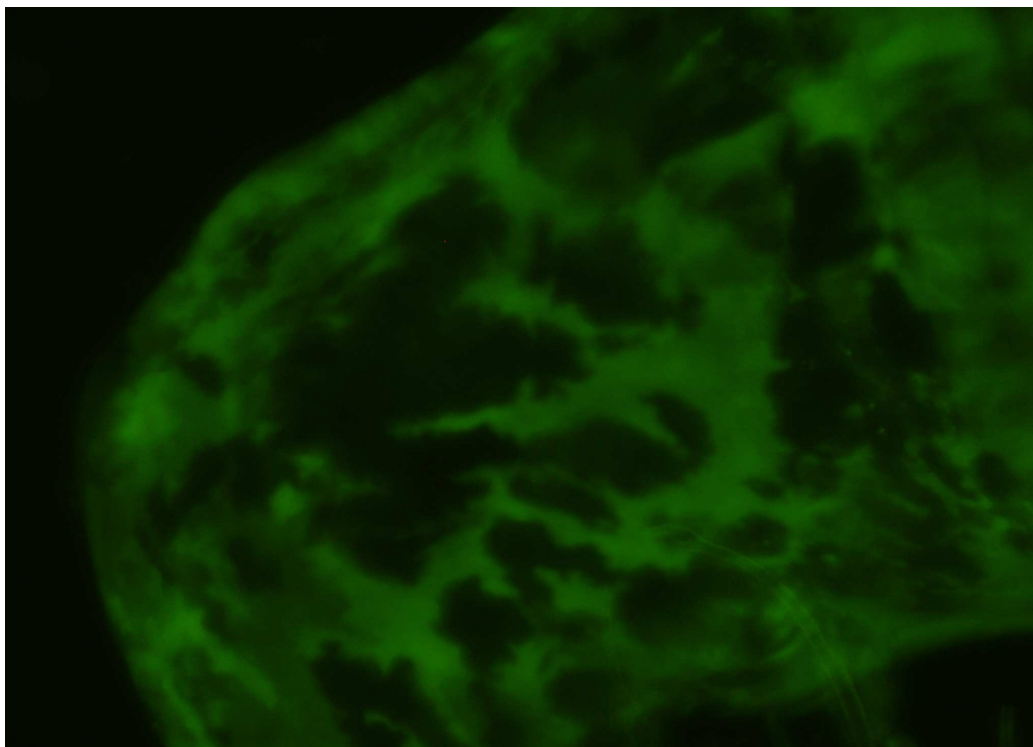


Obr.č.18 Schéma křížení, které má za cíl získat drozofilu s genotypem wd-Gal4/UAS-FLP II a FRT 82 GFP/FRT 82 *dco*³

Zde vznikaly pouze mouchy dvou různých genotypů, tu, u které se neprojevil dominantní marker Tubby balanceru TM6B a tudíž nesla jak FRT GFP, tak FRT *dco*³ jsem použil pro další experimentální zkoumání. Na podložním sklíčku jsem z nich vypreparoval křídelní disky a vzhledem k tomu, že jsem k vizualizaci klonů použil GFP protein, tak jsem disky pozoroval pod světlem o vlnové délce 480nm, při kterém se GFP protein stává zeleně fluoreskujícím.



Obr.č.19 viditelná černá a zelená místa znázorňují oblasti kde došlo k tvorbě klonů. Černá místa znázorňují buňky jež mají mutaci *dco*³ homozygotně, naopak místa výrazně zelená znázorňují ty buňky, které mají gen GFP homozygotně.



Obr.č.20 Viditelná černá a zelená místa znázorňují oblasti kde došlo k tvorbě klonů. Černá místa znázorňují buňky jež mají mutaci *dco*³ homozygotně, naopak místa výrazně zelená znázorňují ty buňky, které mají gen GFP homozygotně. Na této fotografii jsou také viditelné oblasti tmavě zelená, to jsou buňky ve kterých k rekombinaci nedošlo.

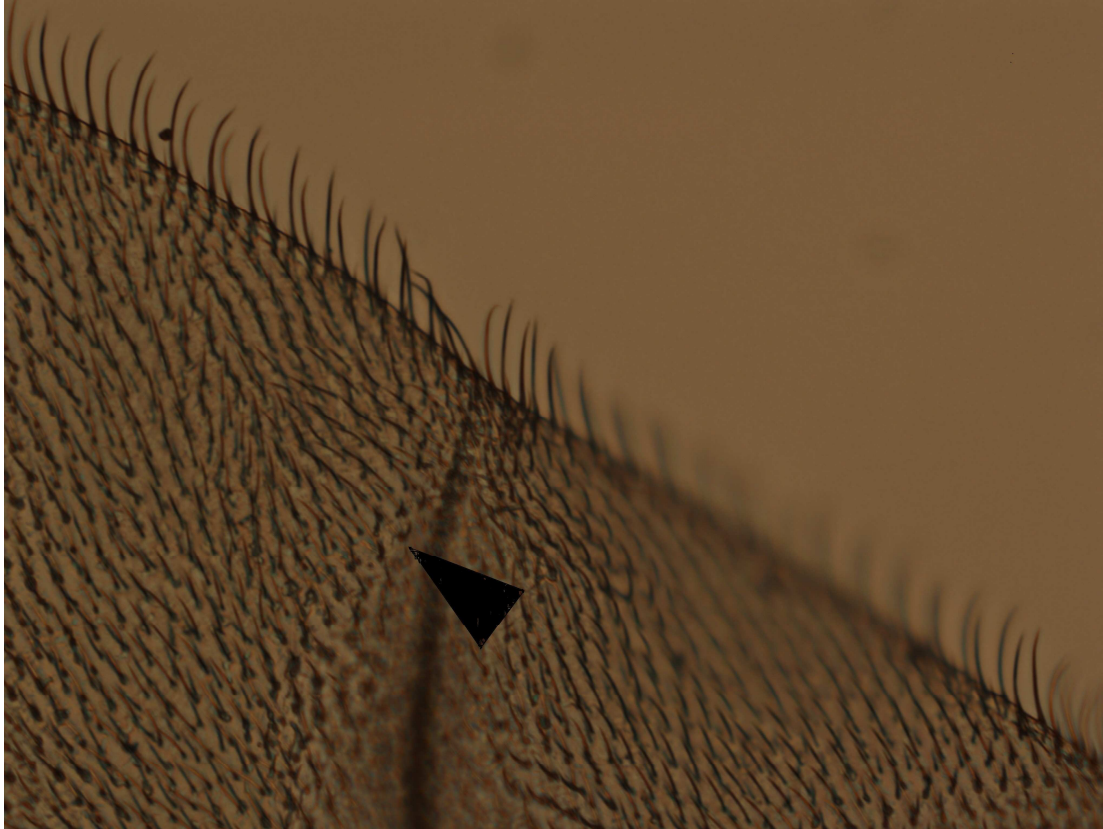
Fenotypové projevy jsou patrné i na křídlech dospělců.



Obr.č.21 Křídlo z divokého typu drozofily



Obr.č.22 Znázorňuje křídlo z mutanta, který má v křídle buňky homozygotní pro mutaci *dco*³ a homozygotní pro gen GFP. V porovnání s křídlem z divkého typu má poškozenou cévku pvs(spojující dvě podélné cévky).



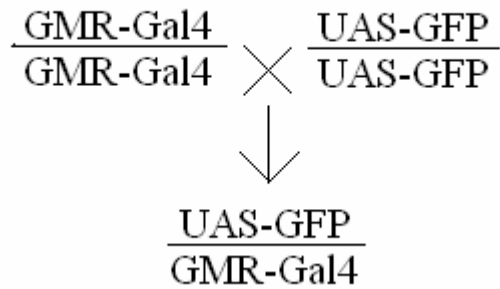
Obr.č.23 V oblasti, ke které směřuje šipka, je vidět poškozená planární polarita



Obr.č.24 Lze vidět poškození směru orientace chloupků planární polarity.

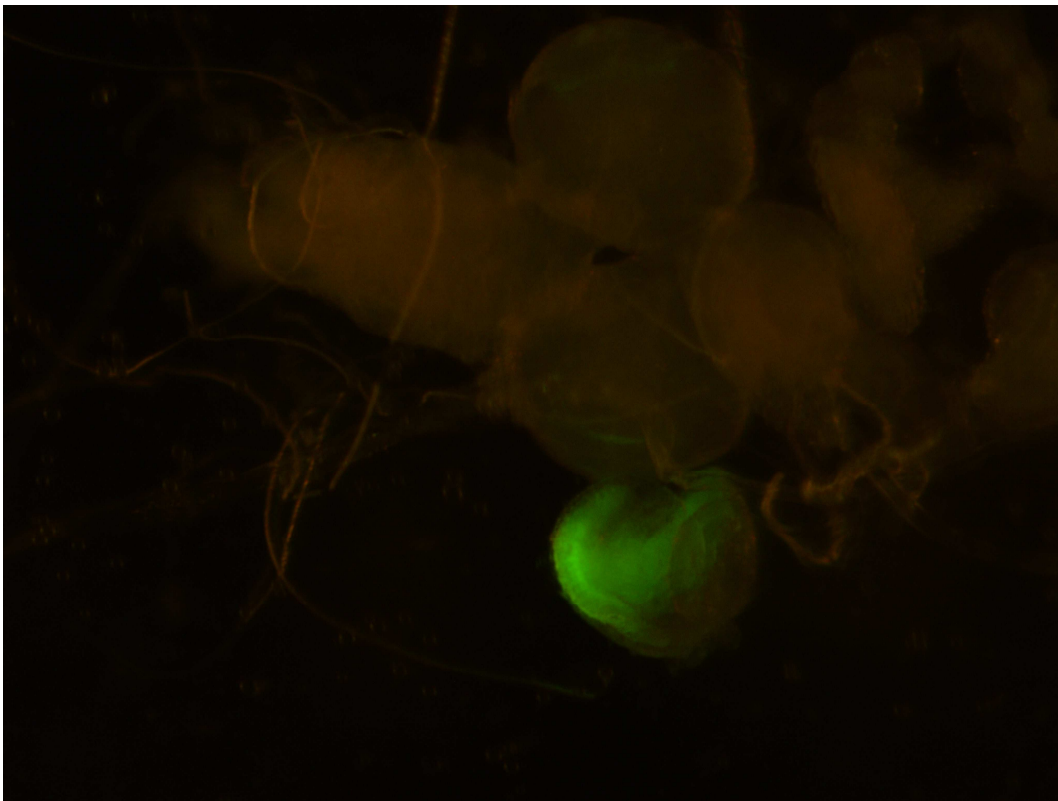
3.4 Křížení pro kontrolu GMR-Gal4 driveru.

Toto křížení mělo za cíl vyzkoušet funkčnost GMR-Gal4 driveru. Byla křížena drozofila s genotypem GMR-Gal4/GMR-Gal4 s drozofilou s genotypem UAS-GFP/UAS-GFP.



Obr.č.25 Schéma křížení s cílem získat drozofilu s genotypem, který umožňoval kontrolu funkčnosti GMR-Gal4 driveru.

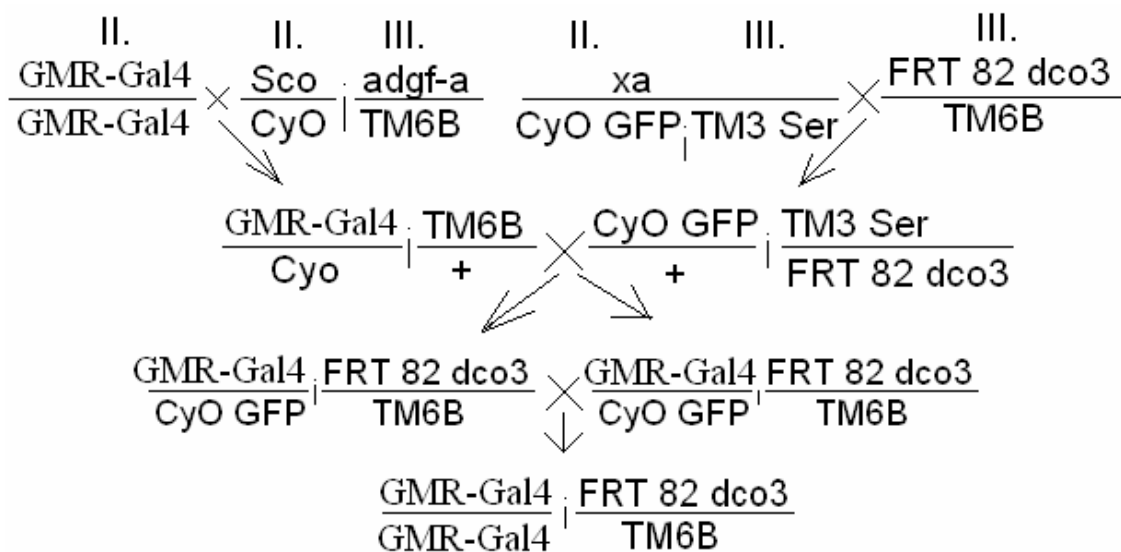
V tomto křížení vznikali pouze jedinci s genotypem UAS-GFP/GMR-Gal4.



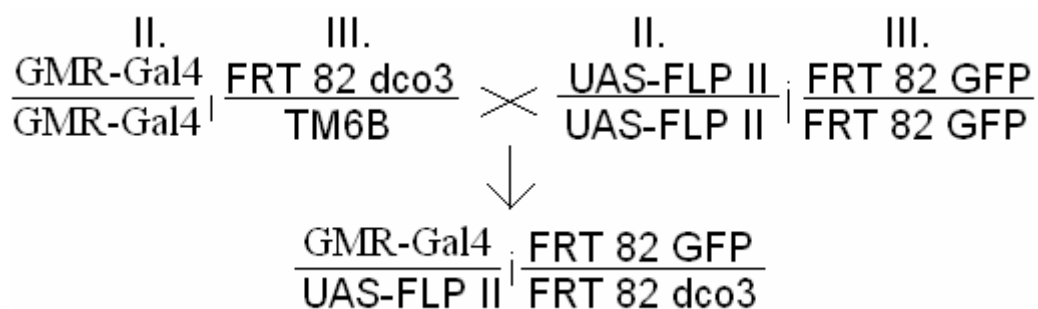
Obr.č.26 Zde je vidět zeleně svítící oční disk, v němž se exprimuje GFP protein a potvrzuje tím funkčnost GMR-Gal4.

3.5 Tvorba klonů buněk v očním disku, které budou homozygotní pro mutaci *dco*³

Pro vytvoření drozofily, která by měla mít mitotické klony homozygotní pro mutaci *dco*³ v oku, bylo třeba vytvořit mouchu s genotypem *GMR-Gal4*, *UAS FLP II* a *FRT 82 dco*³, *FRT 82 GFP*. K vytvoření drozofily s tímto genotypem byla použita soustava křížení obdobná jako při křížení za účelem tvorby mouchy, která měla mitotické klony v křídle. Pouze s rozdílem, že místo výchozí drozofily s genotypem *wd-Gal4/wd-Gal4* byla použita moucha s genotypem *GMR-Gal4/GMR-Gal4*.



Obr.č.27 Schéma znázorňující soustavu křížení, kterou byla získána drozofila s genotypem *GMR-Gal4/GMR-Gal4* a *FRT 82 dco*³ /*TM6B*.



Obr.č.28 Schéma křížení, které mělo za cíl vzniknou drozofily s genotypem *GMR-Gal4/UAS-FLP II* a *FRT 82 GFP/FRT 82 dco*³.

Zde vznikaly pouze mouchy dvou různých genotypů, tu, u které se neprojevil dominantní marker Tubby balanceru *TM6B* a tudíž nesla jak *FRT GFP*, tak *FRT dco*³, jsem vybíral, vypreparoval z nich oční disky a pozoroval pod světlem vlnové délky 480nm. Avšak žádné známky přítomnosti mitotických klonů jsem nezjistil a to ani ve fenotypu dospělců.

4. Diskuze

Cílem mojí bakalářské práce bylo studium mutace *dco*³. Tato mutace je recesivně letální. Testování této vlastnosti bylo prvním krokem mé práce. Vzájemným křížením linie drozofil, která obsahovala mutaci *dco*³ heterozygotně jsem získal jedince, kteří měli mutaci *dco*³ homozygotně ve všech buňkách svého těla. Tito jedinci přežili všechny larvální stádia (instary), avšak během metamorfózy došlo k jejich zániku. Z několika těchto jedinců s homozygotní sestavou mutace *dco*³ jsem během larválního vývoje vypreparoval křídelní imaginální disky. Jejich velikost byla několikrát větší než velikost disků z drozofil divokého typu, které jsem vypreparoval kvůli vizuálnímu porovnání velikosti disků. Zvětšená velikost potvrzuje, přítomnost mutace *dco*³ v získané linii, protože tato mutace je skutečně recesivně letální a také projevuje nádorové vlastnosti, kdy selhává schopnost genu *dco* zastavit růst v době správné velikosti disků a přepnout proliferaci na diferenciaci.

Další úkol spočíval v tvorbě mitotických klonů v křídelním disku. Moucha s těmito mitotickými klony byla výsledkem křížení šesti různých linií, které jsem mezi sebou křížil a následně také několik generací jejich potomků. Díky těmto klonům jsem dosáhl toho, že jsem mohl pozorovat tkáň v živém dospělci drozofily, kde byly shluky buněk nesoucí mutaci *dco*³ homozygotně. Což by jinak nebylo možné vzhledem k letálitě mutace *dco*³. Indukcí tvorby somatických klonů pomocí Gal4/UAS a FLT/FRT systémů se v křídelním disku nacházely buňky, které měly homozygotně buď gen pro GFP nebo homozygotně *dco*³ mutaci. Imaginální disky křídel, kde se nacházely výše zmíněné klony jsem vypreparoval a pozoroval pod GFP mikroskopem, kde oblastí křídla, ve kterých se nacházely buňky, které obsahovaly geny pro GFP, byly rozeznatelné podle zelené fluorescence. Naopak oblasti křídelního disku, kde se nacházely buňky, ve kterých byla homozygotně mutace *dco*³ nesvítily. Tímto jsem potvrdil, že k tvorbě mitotických klonů skutečně došlo. Následně jsem pod mikroskopem pozoroval křídla dospělců, kteří v nich měli utvořené mitotické klony. V porovnání s křídly drozofil divokého typu tyto křídla měly určité viditelné změny. První z nich byla změna uspořádání cévek, které prolínají celé křídlo. Nejčastěji došlo k poškození cévky označené jako pvc, která slouží jako spojovací cévka mezi dvěma podélnými cévkami. Nejpravděpodobnější důvod je, že proteinový produkt genu *dco*, který hraje významnou roli ve velkém množství signálních drah, tak svojí poškozenou formou zapříčiní deregulaci cílových genů, které se podílejí na tvorbě struktury křídla. Jde hlavně o dráhy Wnt a Hh, které jsou spojeny s ustanovováním gradientu BMP, jež je rozhodující při tvorbě struktury cévek

křídla a jeho narušení může vyvolat uvedené změny ve struktuře cévek, které se nacházejí v místě, kde jsou buňky homozygotní pro *dco*³.

Další změna, kterou jsem zde pozoroval byla narušená planární polarita v několika místech křídla. To si lze vysvětlit tím, že gen *dco* se podílí na důležité roli Wnt dráhy, která je spojena s ustanovením receptoru Fz, jež interaguje se sousední buňkou a dává jí signál, v jakém místě na buňce má vyrůst trichom a zároveň na přesném místě vytváří i ona Fz receptor a tak dává signál zase další vedlejší buňce tak dochází k řetězovému přenosu této informace a ustanovuje se tak planární polarita. A v případě narušení ustanovení Fz receptoru dochází k poškození planární polarity, jako v případě much, které jsem zkoumal.

Poslední úkol, který jsem prováděl byl obdobný s předchozím, pouze s rozdílem, že jsem se pokoušel vytvořit mitotické klony v oku a ne v křídle. Avšak při pozorování vypreparovaných disků jsem zjistil, že mitotické klony se v disku nevytvořili ani v disky, tak ani nebyly patrné žádné změny v očích dospělců. Testoval jsem funkčnost GMR-Gal4 driveru ve výsledné linii a ta byla v pořádku. Jelikož linie nesoucí FLP a FRT/GFP fungovala s wd-Gal4 a stejná linie byla použita i pro GMR-Gal4, došlo tedy pravděpodobně k nějaké změně na chromozomu III, když při křížení s GMR-Gal4 vypadl chromozom nesoucí FRT spolu s *dco*³. Toto bude nutné ověřit a případně znovu vykřížit.

5 Závěr

Provedl jsem tři soustavy křížení, jejichž prostřednictvím jsem zjišťoval vliv homozygotní sestavy mutace *dco*³ na příslušnou tkáň mouchy *Drosophila melanogaster*. Nejdříve jsem zkoumal jednice, kteří měli mutaci *dco*³ homozygotně ve všech buňkách svého těla, což způsobilo nekontrolovanou proliferaci imaginálních disků a smrt ve stádiu kukly. Mouchy, které měly homozygotní sestavou mutace *dco*³ pouze v určité skupině buněk, vykazovaly pouze specifické odchylky v daném místě, které byly viditelné jak během larválního stádia v imaginálních discích, tak u dospělců. Tyto odchylky se v křídle projeví jako poškození cévek v křídle a narušení planární polarity.

6 Literatura

Burke, R. and Basler, K. (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. *Development* **122**, 2261-2269.

Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2000–2011.

Deveraux, Q.L., Reed, J.C., 1999. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239–252.

Dai, P., Akimaru, H., and Ishii, S. 2003. A hedgehog-responsive region in the *Drosophila* wing disc is defined by debra-mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Dev. Cell* **4**: 917–928.

Jia, J., Zhang, L., Zhang, Q., Tong, C., Wang, B., Hou, F., Amanai, K., and Jiang, J. 2005. Phosphorylation by double-time/CKI₁ and CKI₂ targets Cubitus interruptus for Slimb/₁-TRCP-mediated proteolytic processing. *Dev. Cell* **9**: 819–830.

Jurnsich, V. A., Fraser, S. E., Held, L. I., Jr., Ryerse, J. and Bryant, P. J. (1990). Defective gap-junctional communication associated with imaginal disc overgrowth and degeneration caused by mutations of the *dco* gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 140, 413-429.

Hay, B.A., 2000. Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 7, 1045–1056.

He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/₁-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* **131**: 1663–1677.

Hooper, J.E. and Scott, M.P. 2005. Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**: 306–317.

Horsfield, J., Penton, A., Secombe, J., Hoffman, F. M. and Richardson, H. (1998). *decapentaplegic* is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development. *Development* **125**, 5069-5078.

Huang, He and He, X, (2008) *Current Opinion in Cell Biology*, 20:119–125

Chen, C., Jack, J. and Garofalo, R. S. (1996). The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* **137**, 846-856.

Ingham, P.W. and McMahon, A.P. 2001. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes & Dev.* **15**: 3059–3087.

Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). Wingless and Notch regulate cellcycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**, 82-84.

Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S. and Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell* 94, 97-107.

Knippschild U, Milne DM, Campbell LE, DeMaggio AJ, Christenson E, Hoekstra MF, Meek DW: p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* 1997;15:1727–1736.

Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lufhler, J., Stfter, M. (2004). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling* 17, 675–689

Logan, C.Y. and Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 781–810.

Longenecker, K. L., Roach, P. J. and Hurley, T. D. (1996). Threedimensional structure of mammalian casein kinase I: Molecular basis for phosphate recognition. *J. Mol. Biol.* 257, 618-631.

Luo W, Peterson A, Garcia BA, Coombs G, Kofahl B, Heinrich R, Shabanowitz J, Hunt DF, Yost HJ, Virshup DM (2007) Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the betacatenin degradation complex. *EMBO J* 2007, 26:1511-1521.

Methot, N. and Basler, K. 1999. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Cell* 96: 819–831.

Meek DW: p53 Induction: phosphorylation sites cooperate in regulating. *Cancer Biol Ther* 2002;1:284–286.

Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F. A., Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93, 1183-1193.

Orsulic, S. and Peifer, M. (1996). An in vivo structure-function study of Armadillo, the β -Catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for Wingless signaling. *J. Cell Biol.* 134, 1283-1300.

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B. and Young, M. W. (1998). *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83-95.

Ryoo, H.D., Gorenc, T., Steller, H., 2004. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the wingless signaling pathways. *Dev. Cell* 7, 491–501.

Helen Strutt, and David Strutt., 2006. Planar Polarity Is Positively Regulated by Casein Kinase I3 in *Drosophila* *Current Biology* 16, 1329–1336,

Tenev, T., Zachariou, A., Wilson, R., Ditzel, M., Meier, P., 2005. IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.* 7, 70–77.

Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Muller, H.A.J., Hay, B.A., 1999. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* 98, 453–463.

Weber KJ, Wenz F: p53, apoptosis and radiosensitivity
– experimental and clinical data. *Onkologie*
2002;25:136–141.

Weigmann, K., Cohen, S. M. and Lehner, C. F. (1997). Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* 124, 3555-3563.

Xu, R.-M., Carmel, G., Sweet, R. M., Kuret, J. and Cheng, X. (1995). Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *EMBO J.* 14, 1015-1023.

Xu Y: Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* 2003;10: 400–403.

Yoo, S.J., Huh, J.R., Muro, I., Yu, H., Wang, L.J., Wang, S.L., Feldman, R.M.R., Clem, R.J., Muller, H.A.J., Hay, B.A., 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.* 4, 416–424.

Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* 87, 833-844.

Zilian, O., Frei, E., Burke, R., Brentrup, D., Gutjahr, T., Bryant, P.J., Noll, M., 1999. double-time is identical to discs overgrown, which is required for cell survival, proliferation and growth arrest in *Drosophila* imaginal discs. *Development* 126, 5409–5420.