

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



***dco* jako model pro zkoumání rakoviny na octomilce**

Bakalářská práce

Marek Renner

Školitel: Mgr. Tomáš Doležal, Ph.d.

České Budějovice 2012

Renner M, (2012): *dco* jako model pro zkoumání rakoviny na octomilce [*dco* as a model of cancer research on *Drosophila melanogaster*. Bc Thesis, in Czech] - 37 p., Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

Anotation:

The aim of the bachelor thesis is to make an overview of the physiological effects of the gene *dco*, its homologue CKIε and the relationship between them and cancer. In my bachelor thesis I deal with the issues of some signaling pathways, namely Fat/Warts, Akt and Wnt signaling pathways. These are involved in cell proliferation, formation of tissue structures and carcinogenesis and are affected by the gene *dco*. The second part of my bachelor thesis is focused on experiment which attempted to verify influence of *dco*^{le88} on the wing phenotype of *Drosophila melanogaster*.

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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 27. 4. 2012

.....

Marek Renner

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Tomáši Doležalovi, Ph. D. za uvedení do dané problematiky, pomoc při jejím zpracování a za rady a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat všem ostatním členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 1. 1. Octomilka a gen <i>dco</i> | 1 |
| 1. 2. Historie objevu genu <i>dco</i> | 1 |
| 1. 3. Charakteristika genu <i>dco</i> | 1 |
| 1. 4. Úloha genu <i>dco</i> během ontogenetického vývoje u <i>Drosophila melanogaster</i> | 2 |
| 1. 4. 1. Ztráta genu <i>dco</i> a průběh apoptózy | 2 |
| 1. 5. Mutace genu <i>dco</i> a jeho účinky..... | 3 |
| 1. 5. 1. Specificita alely <i>dco</i> ³ | 3 |
| 1. 6. Charakteristika rakoviny prsu a její zkoumání na druhu <i>Drosophila melanogaster</i> | 4 |
| 1. 7. Charakteristika lidských homologů tumor-supresorových genů..... | 4 |
| 1. 8. Vysoký výskyt mutací CKIε ve vztahu ke vzniku karcinomu..... | 5 |
| 2. Úloha CKIε v signálních drahách a procesech | 6 |
| 2. 1. Fat/Warts signální dráha | 6 |
| 2. 1. 1. Fungování Warts signální dráhy u <i>Drosophila melanogaster</i> | 6 |
| 2. 1. 2. Klíčová úloha transkripčního koaktivátoru Yorkie | 7 |
| 2. 1. 3. Transmembránový receptor Fat a úloha <i>dco</i> v regulaci Hippo..... | 8 |
| 2. 2. Akt signální dráha | 9 |
| 2. 2. 1. Úloha CKIε v Akt signální dráze..... | 10 |
| 2. 3. Wnt signální dráha | 11 |
| 2. 3. 1. Fungování kanonické Wnt signální dráhy | 13 |
| 2. 3. 2. Nekanonická Wnt signální dráha..... | 13 |
| 2. 3. 2. 1. Nekanonická Wnt/Ca ²⁺ signální dráha..... | 14 |
| 2. 3. 2. 2. Planar Cell Polarity signální dráha..... | 15 |
| 2. 3. 3. Klíčová úloha proteinu Dishevelled a jeho regulace | 16 |

| | |
|--|----|
| 2. 3. 4. Úloha CKIε v kanonické Wnt signální dráze..... | 16 |
| 2. 3. 5. Úloha CKIε v Planar Cell Polarity signální dráze ... | 17 |
| 2. 3. 6. CKIε jako pozitivní regulátor kanonické a negativní regulátor nekanonické signální dráhy | 17 |
| 3. Praktická část | 18 |
| 3. 1. Úvod do problematiky | 18 |
| 3. 2. Cíl práce | 18 |
| 3. 3. Materiál a metody | 18 |
| 3. 3. 1. Křížení požadované linie pro experimentální měření plochy křídel | 18 |
| 3. 3. 2. Získávání a měření plochy křídel..... | 19 |
| 3. 4. Výsledky práce..... | 24 |
| 3. 4. 1. Statistické vyhodnocení naměřených hodnot..... | 24 |
| 3. 5. Závěr a diskuze | 25 |
| 4. Použitá literatura..... | 25 |

1. Úvod

1.1. Octomilka a gen *dco*

Octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) je dvoukřídlý hmyz, který našel rozsáhlé uplatnění v genetice, molekulární biologii, vývojové biologii a dalších odvětvích vědy jako modelový organismus. Ačkoliv to není na první pohled patrné, octomilka je se svými zhruba 15 000 geny z genetického hlediska velice podobná člověku, který disponuje zhruba 20 000 geny. Často tedy slouží jako modelový organismus pro simulaci a výzkum lidských onemocnění.

Jedinci octomilky dorůstají délky kolem 2,5 – 3 mm a je u nich výrazný pohlavní dimorfismus. Zbarvení bývá obvykle velice variabilní, zejména pak u mutantních jedinců. Vinná muška, jak se jí také někdy říká, žije téměř po celém světě, mimo Antarktidu a s největší diverzitou v tropech.

Gen *dco* (discs overgrown) je gen, který je v genomu octomilky umístěn na třetím chromozómu. Historie objevu tohoto genu je poměrně zajímavá. Tento gen byl dvakrát, nezávisle na sobě, objeven, pojmenován a až po letech se zjistilo, že se nejedná o více genů, ale o jeden jediný gen, který se účastní mnoha procesů.

1.2. Historie objevu genu *dco*

Jak již bylo zmíněno, gen *dco* byl objeven dvakrát. Jednou jako gen *dco* a jednou jako gen *double-time* (Kloss et al., 1998), ovlivňující periodu v cirkadiálních rytmech (Price et al., 1998). Nejprve byl gen *dco* popsán v roce 1990 a lokalizován na pravém raménku třetího chromozomu (Jurnish et al., 1990). Od té doby bylo pomocí různých mutačních postupů uměle vytvořeno mnoho nových alel tohoto genu (Zilian et al., 1999).

1.3. Charakteristika genu *dco*

Gen *dco* (disc overgrown) je konzervovaným ortologem savčího genu CKIe u *Drosophila melanogaster* z rodiny kasein kináz (Kloss et al., 1998) a taktéž je shodný s genem *double-time* (Kloss et al., 1998). Genovými analýzami a pomocí cDNA se zjistilo, že transkribovaná část genu *dco* obsahuje čtyři exony a tři introny (Zilian et al., 1999). Nejdelší čtecí rámeček (open reading frame,

ORF) kóduje 440 aminokyselin, z nichž 300 aminokyselin s N-koncem má velkou podobnost s členy rodiny CKI ϵ a γ (Zilian et al., 1999).

1.4. Úloha genu *dco* během ontogenetického vývoje u *Drosophila melanogaster*

Apoptóza, jinak také řízená buněčná smrt, je proces, který je nepostradatelný pro normální vývoj orgánů v tělech živočichů (Jacobson et al., 1997; Meier et al., 2000) a slouží také jako kontrola kvality nově vznikajících buněk, pomáhá eliminovat abnormality a poškození a je jí zajištěn odpovídající počet buněk v nově vznikající tkáni, v našem případě v imaginálním disku.

Gen *dco* způsobuje, že během larválního vývoje je četnost apoptóz na nízké úrovni a napomáhá tak udržet optimální rovnováhu mezi buněčným dělením a apoptózou, tudíž je nepostradatelným faktorem pro správnou organogenezi.

Spojení mezi buněčnou proliferací, smrtí a správným formováním buněk v tkáních bylo intenzivně studováno na křídelních imaginálních discích modelového organismu *Drosophila melanogaster*

(Edgar, 1999; Serano, O'Farrell, 1997). Během třech larválních instarů prodělávají imaginální křídelní disky rychlé fáze proliferace a růstu s velmi malou četností apoptózy (Milan et al., 1997).

V případě mitotických nulových mutantů genu *dco* dojde ke vzniku fenotypu s malými imaginálními disky, v krajním případě ke ztrátě imaginálních disků, což je pro octomilku letální.

1.4.1. Ztráta genu *dco* a průběh apoptózy

Řízená buněčná smrt, apoptóza, je prováděna pomocí kaspáz. Kaspázy jsou syntetizovány v inaktivní formě – zymogenu, který je dále zpracováván do aktivní formy. Celá mašinerie apoptózy podléhá přísné regulaci. Jedním takovým regulátorem je skupina proteinů IAP (Inhibitor of Apoptosis). Tyto proteiny mohou vázat kaspázy, inhibovat jejich katalytickou aktivitu nebo vázat substrát (Deveraux, Reed, 1999). Studium skupiny proteinů IAP u *Drosophila melanogaster* byl objeven mechanismus jejich účinku a jejich regulace.

Inhibitor apoptózy DIAP1, člen skupiny IAP, může být vázán a inhibován genovými produkty genů Hid (Head involution defective), Grim a Rpr (Reaper) (Guan et al., 2007). Jestliže tedy dojde k inhibici některého člena skupiny IAP

některým z proapoptických faktorů (Hid, Grim atd.), dojde k inhibici kaspáz a ani nedojde k zablokování apoptózy.

Gen *dco*, který, jak bylo zmíněno výše, mimo jiné udržuje nízkou frekvenci apoptóz, při své ztrátě vyvolá masivní pokles inhibitoru apoptózy DIAP1 a tudíž i aktivaci kaspázy (Guan et al., 2007).

1.5. Mutace genu *dco* a jejich účinky

Od objevení genu *dco* v roce 1990 byly pomocí mutagenních procesů uměle vytvořeny nové alely tohoto genu, u kterých bylo posléze testováno, jaký mají účinek na výše zmíněnou problematiku, v homozygotním i heterozygotním stavu (Zilian et al., 1999). Tyto mutantní alely se projevují jako „loss of function“ nebo „gain of function“. Všechny tyto nové alely byly vytvořeny pomocí EMS indukci alel (*dco*², *dco*¹⁸, *dco*^{le88}), vkládáním P-elementů (*dco*^{P103}, *dco*^{P538}, *dco*^{P915}, *dco*^{P1396}), excizí P-elementů (*dco*ⁱ³⁻¹⁹³) nebo pomocí paprsků X (*dco*^{PGX8}). Tyto testy ukázaly, že různé genotypy, zahrnující různé alely, vykazují různý stupeň a rozsah abnormality, od úplné ztráty imaginálních disků až po normální disky (Zilian et al., 1999). Všechny výše zmíněné uměle vytvořené mutace genu *dco* v homozygotní konstituci vytvářely formy bez disků (discless) nebo formy s velmi malými disky (small discs), které způsobovaly letalitu u embryí, larev nebo kukel. Ovšem jedna heteroalelická kombinace produkovala normální imaginální disky. Tyto unikátní vlastnosti měla heterokombinace *dco*^{P103}/*dco*². Jedincům s touto kombinací se podařilo dosáhnout stádia dospělce. Těmto dospělcům ovšem byly lokalizovány výrůstky na anténách a na distálních segmentech končetin.

1.5.1. Specificita mutantní alely *dco*³

Alela genu *dco* *dco*³ je neobvyklá tím, že v heterozygotní konstituci (oproti nulové alele) prodlužuje larvální stádium až o několik dní. Takto prodloužené larvální stádium se vyznačuje neustálým růstem imaginálních disků, tudíž na konci larválního období mají jedinci s alelou *dco*³ větší imaginální disky než jedinci se standardně dlouhou dobou larválního vývoje. Imaginální disky u těchto jedinců si udržely svoji epiteliální strukturu, proto zde hovoříme o hyperplastickém přerůstání imaginálních disků, spíše než o neoplastickém přerůstání.

Heterozygotní konstituce genu *dco*³ s jinou známou alelou umožní vývoj do stádia kukly nebo dospělého. Homozygotní jedinci nejsou schopni přežít do pozdějších stádií vývoje.

Pro heterozygotní jedince je typický zvětšený tarsální segment, zvětšené ptilinum na hlavě a často chybějící oči.

1.6. Charakteristika rakoviny prsu a její zkoumání na druhu *Drosophila melanogaster*

Rakovina prsu je jedno z nejčastějších zhoubných onemocnění u žen. Navzdory významnému zlepšení v rané diagnostice tohoto onemocnění i efektivnější léčbě, čtvrtina pacientek na toto onemocnění umírá (Fuja et al., 2004).

Pochopení molekulární podstaty tohoto onemocnění nám pomáhá ve vývoji nových léčebných postupů na molekulární bázi. V poslední době zaznamenala věda pokrok v identifikaci tumor-supresorových genů, které jsou dědičné. Jedná se o tumor-supresorové geny BRCA1 a BRCA2, i když 95 % případů rakoviny není dědičných (Fuja et al., 2004).

Vývoj karcinomu prsu probíhá v několika etapách. Začíná epiteliální hyperplazií, poté následuje fáze karcinomu a nakonec se karcinom stává invazivním.

K identifikaci genů, které se zúčastňují regulace buněčné proliferace a tumorogeneze, byl použit modelový organismus *Drosophila melanogaster*.

Genetickými studiemi byly objeveny tumor-supresorové geny, jejichž recesivní mutace vedly k hyperplastickému přerůstání larválních imaginálních disků i ostatních tkání (Bryant et al., 1990).

Histologickými vyšetřeními bylo potvrzeno, že lidské homology těchto tumor-supresorových genů (*CSNK1ε*, *DLG1*, *EDD/hHYD*) se exprimují v lidské rakovinové tkáni.

1.7. Charakteristika lidských homologů tumor-supresorových genů

CSNK1ε kóduje kasein kinázu ε (CKIε), serin-threoninovou kinázu, jejíž nadměrná exprese mimo jiné ovlivňuje Wnt signalizaci tím, že pravděpodobně pomáhá vytvářet stabilizační komplex v buňce, který zabrání tomu, aby byl β-catenin, klíčová molekula ve Wnt signální dráze, degradován ubiquitinací. Tato problematika CKIε ve vztahu k Wnt signalizaci bude rozebrána dále.

DLG1 (disc large 1) kóduje *hDlg*, který je členem proteinové rodiny Guanylate kináza. Je homologem genu *Drosophily melanogaster* TSG *dlg*, jehož mutací a ztrátou funkčnosti dochází k přerůstání imaginálních disků a mozku v larválním stádiu. Guanylate kináza je obvykle lokalizovaná na membránovém cytoskeletu a obsahuje několik domén. Hraje roli v intracelulární signální transdukci. Imunochemické lokalizační experimenty ukázaly, že *hDlg* je lokalizován podél bazolaterálních povrchů epiteliálních buněk střeva.

PDZ2, doména genového produktu *hDlg*, se váže na mitotickou kinázu TOPK/PBK a *hDlg* tedy interaguje s ostatními tumor supresory, zejména s PTEN a APC.

EDD/hHYD/DD5 kóduje progestinem indukovaný protein patřící do rodiny proteinů HECT. *EDD* je homologem genu *hyd* (hyperplastic discs) u *Drosophily melanogaster*, jehož ztráta způsobuje přerůstání imaginálních disků.

1.8. Vysoký výskyt mutací genu CK1ε ve vztahu ke vzniku karcinomu

Vysoký výskyt somatických mutací, který byl objeven v genu *CSNK1* (*CK1ε*), společně se skutečností, že gen *CK1ε* aktivuje Wnt signalizaci, může znamenat, že tyto dva faktory přispívají ke vzniku rakoviny (Fuja et al., 2004). Sekvenováním vzorků rakoviny bylo odhaleno, že kasein kináza 1 epsilon je mutována, respektive její N-terminální oblast. Tato mutace se objevovala s 15% četností. Sekvenováním bylo odhaleno 19 nesynonymních mutací v genu *CK1ε*. Některé mutace byly nacházeny opakovaně. Jednalo se o mutace L39Q (zjištěna celkem pětkrát) a S101R (zjištěna celkem dvakrát) (Fuja et al., 2004). Tato pozorování nastínila možnost, že tyto mutace mohou ovlivňovat funkci *CK1ε* a že mohou hrát klíčovou roli při mikroevoluci karcinomu a přispívat k jeho progresi. Nejčastěji vyskytující se mutace, L39Q, byla u pacientů s rakovinou nacházena samostatně nebo v kombinaci s mutací S101R (Fuja et al., 2004).

2. Role CK1ε v signálních drahách a procesech

2.1. Fat/Warts signální dráha

Fat/Warts signální dráha, známá také jako Hippo signální dráha, kontroluje velikost orgánů pomocí regulace buněčného dělení a apoptózy. Nesprávné fungování dráhy způsobí dramatické přerůstání tkáně v imaginálních discích (Madhuri Kango-Singh, Amit Singh, 2009). Mnoho kináz zahrnutých do této signální dráhy funguje jako tumor supresory. Jedná se o kinázy Warts (Wts), Hippo (Hpo), Salvador (Sav) a Mob (Mats). Transkripční koaktivátor Yorkie (Yki) u *Drosophily* i jeho lidský homolog byly identifikovány jako onkogeny (Harvey et al., 2003; Jia et al., 2003; Justice et al., 1995; Kango-Singh et al., 2002; Lai et al., 2005; Pantalacci et al., 2003; Tapon et al., 2002; Udan et al., 2003; Wu et al., 2003; Xu et al., 1995).

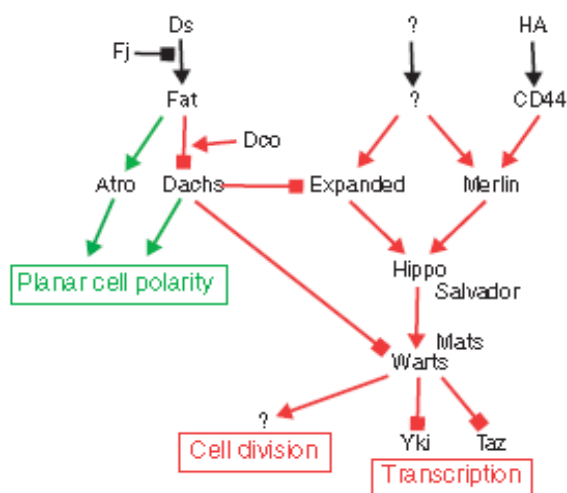
V případě poškození výše zmíněných tumor supresorů může dojít k přerůstáním tkáně. To umožnilo, pomocí mutantů, identifikaci přirozených funkcí těchto členů signální dráhy. Nejdůležitější funkce je omezování růstu během vývoje tkáně imaginálních disků u *Drosophila melanogaster*, což se jeví jako funkční princip Wart signalizace (Reddy, Irvine, 2008). Ovšem není zcela známo, jak tyto geny ovlivňují ostatní projevy buňky. V této oblasti je prováděn intenzivní výzkum.

2.1.1. Fungování Warts signální dráhy u *Drosophila melanogaster*

Genetickými a biochemickými studiemi byly geny Warts (Wts), Hippo (Hpo), Salvador (Sav) a Mats-as-tumor suppressor (Mats) umístěny do pomyslného středu Warts signální dráhy. Dále byla objevena řada aspektů, které posilují vzájemné interakce mezi nimi.

Hippo a Warts jsou serin-threoninové kinázy a jejich aktivita je regulována fosforylací a spojením s geny Sav a Mats. Studium Mst, savčího homologu Hpo, se zjistilo, že tuto kinázu lze aktivovat intermolekulární fosforylací (Glantching et al., 2002; Lee, Yonehara, 2002). Aktivovaná kináza Hpo následně fosforyluje Wts, Sav a Mats (Wei et al., 2007). Aby byla kináza Wts aktivována, je zapotřebí kinázy Mats, která slouží jako kofaktor (Lai et al., 2005) a její fosforylace napomáhá vazbě kináz Wts – Mats

(Wei et al., 2007). Aktivovaná kináza Wts inhibuje transkripční koaktivátor Yorkie (Yki), který je klíčovým regulátorem transkripce a růstu buněk (Huang et al., 2005). Pro úplnost dodávám schéma této signální dráhy na obrázku č.1.



Obr. č. 1 Schéma signální dráhy Fat-Warts (převzato z Reddy, Irvine, 2008)

2.1.2. Klíčová úloha transkripčního koaktivátoru Yorkie

Transkripční koaktivátor Yorkie je klíčovou součástí celé Hippo signalizace. Je inhibován cytoplazmatickou sekvestrací Hippo signální dráhy (Bandura, Edgar, 2008). Koaktivátor Yki podporuje růst tkáně, ale, není-li pod kontrolou, může být nežádoucí.

Nedávno prováděné studie identifikovaly DNA vázající protein Scalloped (Sd), který se jeví být partnerem Yki (Goulev et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2008). Jak již bylo zmíněno, kináza Wts po své vlastní fosforylaci může pokračovat ve fosforylaci Yki a tím ho inaktivovat. Takto inaktivované Yki neumožní DNA vázajícímu proteinu Sd vázat DNA. Jestliže ovšem nedojde k inaktivaci transkripčního koaktivátoru Yki, vytvoří se komplex Yki-Sd, který vede k expresi několika genů, které podporují svými produkty orgánový růst. Těmito produkty mohou být cyklin E nebo inhibitor apoptózy DIAP1 (Bandura, Edgar, 2008).

2.1.3. Transmembránový receptor Fat a úloha *dco* v regulaci Hippo

Transmembránový receptor Fat reguluje růst tkáně pomocí Hippo signalizace. Tuto regulaci provádí fosforylovaný Fat aktivací Hippo kinázy pomocí proteinu Expanded (Ex). Podle genetických studií nemůže receptor Fat aktivovat Hippo kinázu sám o sobě. Je k tomu zapotřebí velkého cadherinu jako ligandu. Tímto ligandem je transmembránový ligand Dachshous (Cho et al., 2006). Dalším možným členem kaskády ovlivňující proliferaci a apoptózu by mohl být podle některých výzkumů Dco. Genetické testy umístili *dco* do Fat signální dráhy (Cho et al., 2006). Nejdříve se předpokládalo, že Ds nebo Fat budou potencionálními substráty fosforylace Dco, pozdější studie však Ds vyloučily jako substrát, protože Dco nebylo schopno Ds fosforylovat. Dalším důkazem pak byla uměle navozená nadměrná exprese proteinu Dco in vivo pomocí systému UAS-Gal4. Takto zvýšené množství produktu genu *dco* vedlo k zvýšení fosforylace Fat (Feng, Irvine, 2009). Jestliže fosforylace receptoru Fat pomocí Dco skutečně probíhá, pak by alela *dco*³ měla mít opačný efekt, protože způsobuje neschopnost buňky Fat signalizace (Feng, Irvine, 2009).

Tato alela genu *dco* v sobě ukrývá dvě bodové mutace, které vedou k masivnímu přerůstání tkáně v imaginálních discích. Dále tato mutace zvyšuje hladinu inhibitoru apoptózy DIAP1 a prodlužuje larvální stádium. Naopak, ztráta genu *dco* vede k redukovanému růstu a snížení hladiny DIAP1 (Sopko et al., 2009).

V úvodu tohoto odstavce byla zmíněna důležitost ligandu Dachshous na Fat receptor. K zjištění vztahu mezi fosforylací receptoru Fat podporovanou ligandem Ds a fosforylací závislou na Dco byla pomocí analytické metody Western blot posuzována mobilita proteinů. Z výsledků vyplývá, že Dco ovlivňuje fosforylací, kterou zprostředkovává Ds, a že *dco*³ snižuje hladinu fosforylace Fat (Feng, Irvine, 2009). Fosforylace receptoru Fat je tedy zcela zásadní proces pro celou signální kaskádu, který ovlivňuje celý sled následujících reakcí.

Fuja a kolektiv publikovali v roce 2004 článek, ve kterém prezentovali objev několika mutací objevených v lidské rakovinové tkáni. Jak již bylo uvedeno, jednalo se o mutace L39Q a S101R. Doktor Tomáš Doležal se ve své práci zaměřil na ověření funkčních změn těchto mutací. Zaváděl mutace do genů *dco*,

kteře byly regulovány sousedními genomickými sekvencemi, čímž byla zajištěna přirozená exprese mutantních *dco* forem. Doktor Doležal zkoumal, zda má *dco*^{L39Q} vliv na Fat/Warts signální dráhu. Mutantní jedinci *dco*^{L39Q} mají mimo jiné podobný fenotyp jako mutanti Fat/Warts signální kaskády (Cho et al., 2006; Doležal et al., 2010). Jejich fenotypy se podobají nápadně zvětšenými imaginálními disky (Justice et al., 1995; Bennett, Harvey, 2006). Výsledky dále ukázaly, že mutanti *dco*^{L39Q} v heteroalelické konstituci měli výrazně zvětšená křídla, podobně jako mutantní jedinci ve Fat/Warts signální kaskádě, oproti wild-type jedincům. Tyto výsledky však ještě nenaznačují spojitost *dco*^{L39Q} s Fat/Warts signalizací.

2.2. Akt signální dráha

Akt signální dráha je velice důležitá při vývoji organismu a vzniku rakoviny. Jedná se o signální dráhu proteinové kinázy B/Akt, která je nezbytná v různých vývojových procesech, zejména pak v metabolismu buněk, syntéze proteinů, kontrole buněčného cyklu, včetně inhibice apoptózy (Nicholson, Anderson, 2002). Tato dráha je intenzivně studována ve vztahu k rakovině, protože její nadměrná exprese byla mimo jiné spojena s maligní transformací tkáně, ale také s rezistencí vůči chemoterapii (Kim et al., 2005).

Akt signální dráha může být aktivována, jestliže je buňka vystavena mnohým druhům stimulů. Těmito stimuly mohou být růstové faktory, inhibitory fosfatázy, hormony nebo i buněčný stres (Nahta et al., 2006).

Serin-threoninová kináza Akt svojí signalizací stimuluje několik drah a podporuje tak zachování buněk, které by jinak podlely apoptóze, fosforylací vhodných substrátů. Jedná se například o substráty Bad, kaspáza-9, IKK α , YAP atd. (Nicholson, Anderson, 2000).

K počáteční aktivaci této signální dráhy je zapotřebí fosfoinositidové dependentní kinázy (PDK1), která fosforyluje Threonin 308. Celkové aktivace je ovšem dosaženo fosforylací Serinu 473. V opačném případě je defosforylace hlavním nástrojem inhibice této signální dráhy. K dosažení defosforylace B/Akt proteinové kinázy je třeba jedné ze dvou fosfatáz. Tyto dvě fosfatázy se nazývají PTEN a PP2A. Podle některých zdrojů byla ztráta nebo jiné poškození fosfatázy PTEN defosforylující fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3K) zdokumentována až v 50 % případů rakoviny

(Engelman et al., 2006). Fosfatáza PP2A se ukázala jako inhibitor Akt signální dráhy, který dokáže tuto dráhu inaktivovat defosforylací obou aktivačních míst na proteinu (Millward et al., 1996).

2.2.1. Úloha CK1ε v Akt signální dráze

Při výzkumu leukémie byla studiem CK1ε objevena potenciální možnost pozitivní regulace PTEN, což představovalo výhodu při působení genotoxického stresu (Okamura et al., 2006). Tato možnost byla zvažována na základě pozorování vzorků rakoviny, ve kterých byly nacházeny bodové mutace v genu pro CK1ε u více než 10 % pacientů trpících rakovinou (Fuja et al., 2004). Ztráta funkce PTEN byla spojena jak s onemocněním leukémií, tak i s tumorogenezí u savců.

Vědecký tým Petera Bryanta se zaměřil na objasnění problému, zda gen CK1ε hraje nějakou roli při tumorogenezi. Jejich zkoumání vedlo k poznatku, že regulace Akt signální dráhy probíhá pomocí CK1ε a že probíhá různými způsoby (Modak et al., 2008).

Modak et al. využívali k pokusům buňky MCF-7. Tyto buňky byly izolovány v roce 1970 od šedesáti devítileté pacientky trpící karcinomem prsu. Těmto buňkám, které nebyly schopny tvořit endogenní CK1ε, byly pomocí transfekce zavedeny konstrukty kódující buď wild-type CK1ε nebo „*kinase-dead mutant*“ (DN) – buňky, které neměly funkční CK1ε. CK1ε byly posléze inkubovány v insulinu po dobu 60 minut za účelem aktivace Akt signální dráhy. Účinek těchto konstruktů byl nejprve měřen mírou fosforylace Serinu 473, který, jak je zmíněno výše, je nezbytný pro aktivaci signální dráhy. Tyto buňky pak byly porovnávány s buňkami, které nebyly vybaveny příslušnými konstrukty a nebyly inkubovány v insulinu. Exprese funkčního CK1ε vedla k o mnoho většímu počtu fosforylací na Serinech 473 než u buněk DN a buněk bez konstruktů CK1ε. Protože fosforylace Serinu 473 na Akt je klíčem pro úplnou aktivaci kinázy, byla snaha dokázat, že CK1ε indukuje plnou aktivaci Akt dráhy. Byla tedy uměle navozena fosforylace na Serinu 9 proteinové kinázy GSK3β a tím byl inhibován její vliv na potlačení kontroly buněčného cyklu (Kim et al., 2005). Buňky ošetřené inhibitorem proteinové kinázy CK1ε IC 261 měly potlačenou fosforylaci GSK3β i v přítomnosti insulinu.

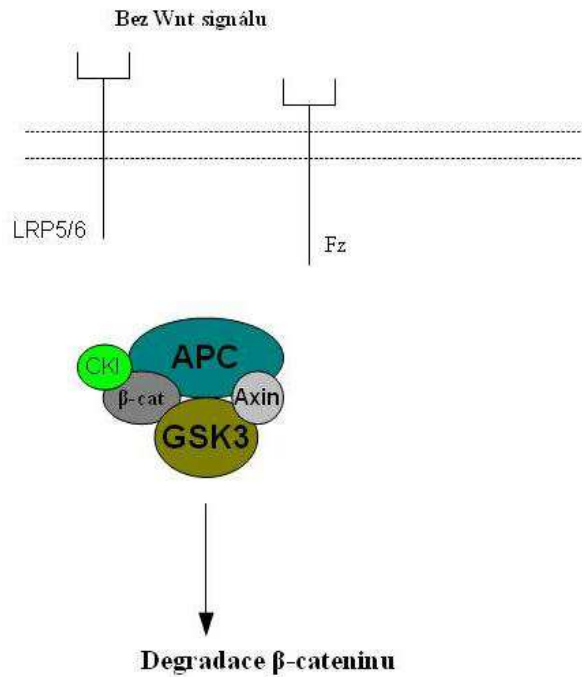
Christina Modak dospěla k závěru, že exprese CK1ε vede k aktivaci Akt signální dráhy.

Protože u linie buněk MCF-7 nedochází k expresi CKIε, Modak et al. se pokoušeli zjistit, zda Akt signalizace, zprostředkovaná CKIε, probíhá i u jiných rakovinových buněčných linií. K experimentu byla vybrána buněčná linie Hs578T. Tato linie má, podobně jako MCF-7, normální hladinu PTEN. Obdobně jako u linie MCF-7 byla uměle navozena exprese genu CKIε a pomocí epidermálního růstového faktoru aktivována Akt signální dráha. Pomocí inhibitoru IC 261 se pokoušeli zjistit, zda omezením CKIε dojde ke snížení aktivace Akt signální dráhy. Takto ošetřené, v inzulínu inkubované buňky vykazovaly výrazný pokles fosforylace Akt, podobně jako buňky neinkubované v inzulínu. Toto zjištění jen potvrdilo, že CKIε je zodpovědné za plnou aktivaci Akt signální dráhy (Modak et al., 2008).

2.3. Wnt signální dráha

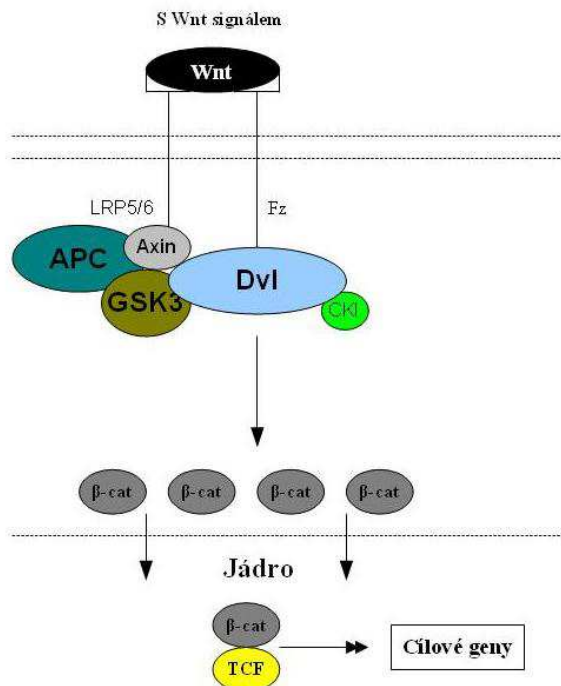
Wnt signální dráha je síť proteinů, jejíž role je dobře známa v embryogenezi a také při vzniku rakoviny, tedy mutace Wnt genů nebo součástí Wnt signální dráhy vede k vývojovým poruchám.

Vstup do Wnt dráhy zajišťuje receptor Frizzled (Fz), na který se váže Wnt protein jako ligand. Prostřednictvím několika cytoplazmatických komponentů je signál přenesen buď na β -catenin, v takovém případě se jedná o tzv. kanonickou Wnt signální dráhu, nebo na jiné typy sloučenin, které nevyužívají β -catenin, v takovém případě hovoříme o nekanonické Wnt signální dráze. V případě kanonické dráhy vstupuje β -catenin do jádra a vytváří komplex s TCF proteiny, čímž aktivuje transkripci Wnt genů.



Jádro

Obr. č. 2 Kanonická Wnt signální kaskáda bez přítomnosti ligandu Wnt (převzato z Komiya, Habas, 2008, upraveno)



Obr. č. 3 Kanonická signální kaskáda s Wnt ligandem (převzato z Komiya, Habas, 2008, upraveno)

2.3.1. Fungování kanonické Wnt signální dráhy

K aktivaci Wnt signální dráhy dochází navázáním Wnt ligandu na receptor Fz a koreceptor LRP5 (Zeng et al., 2008). Navázaný ligand umožní fosforylaci koreceptoru, čímž je umožněno navázání Aktinu na zmíněný koreceptor (Tamai et al., 2004). Receptor Fz pak aktivuje protein Dishevelled (Dvl) (Wong et al., 2003), což umožní fosforylaci koreceptoru. Protein Dvl je další klíčovou molekulou při této signalizaci. Při navázání aktinu na Dvl se zablokuje degradační komplex, čímž se znemožní přenos fosfátové skupiny na β -catenin (Kishida et al., 1999). To způsobí hromadění β -catenin v cytoplazmě a při určitém množství se začne přesouvat do jádra, kde způsobí aktivaci transkripce a tím i expresi genů, jedná se například o geny *c-myc* nebo gen kódující cyklin D1.

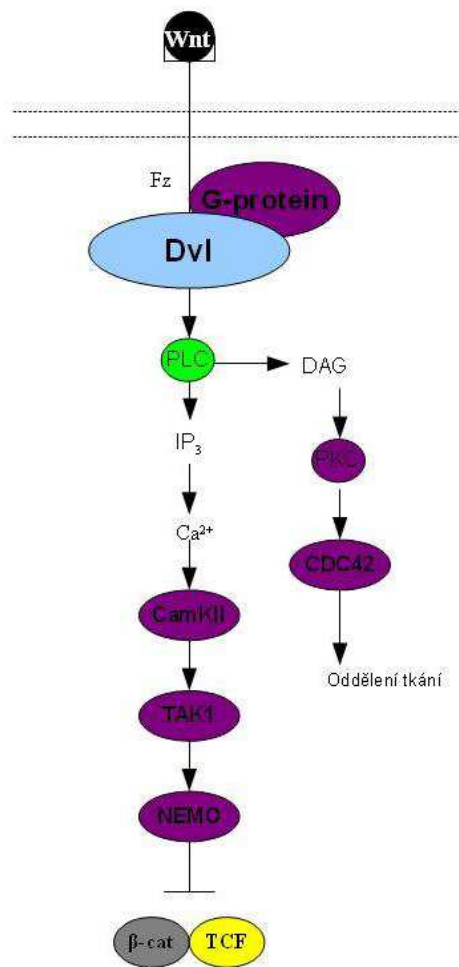
V případě, že se na receptor Fz nenaváže ligand, dojde k vytvoření degradačního komplexu v cytoplazmě. Degradační komplex způsobí fosforylaci β -catenin a tím zajistí jeho degradaci (Zeng et al., 1997). Fosforylovaný protein Dvl je pomyslným jádrem degradačního komplexu, na který se napojují další komponenty: Adenomatous Poliposis Coli (APC), Glycogen Synthase Kinase (GSK-3 β) a CK1 (Yost et al., 1996). GSK-3 β fosforyluje β -catenin. Fosforylace β -catenin slouží k jeho označení pro ubikvitinaci a následnou degradaci proteazomem.

2.3.2. Nekanonická Wnt signální dráha

Nekanonických signálních kaskád bylo v posledních několika letech objeveno několik typů. Vyznačují se přenosem signálu nezávislým na β -catenin. Obdobně jako u kanonické Wnt signální dráhy začíná přenos signálu navázáním ligandu na Wnt receptor. Takovýmto receptorem může být, podobně jako v případě kanonické dráhy, receptor Fz nebo další (ROR, RYK). Nejtypičtější ligandem je pak Wnt5a. Přenos signálu pomocí nekanonické signální dráhy je od kanonické dráhy odlišný ve dvou důležitých aspektech. Jednak se liší cílovými geny, jednak se přenosu účastní odlišné proteiny.

2.3.2.1. Nekanonická Wnt/Ca²⁺ signální dráha

Aktivace této signální dráhy standardně probíhá navázáním Wnt ligandu na receptor, jehož výsledkem je změna koncentrace Ca²⁺ iontů v cytoplazmě. Vzniklý komplex Wnt/Fz interaguje s dimerem G-proteinu (Slusarski et al., 1997). Jeho α -podjednotka aktivuje fosfolipázu C, která umožní tvorbu inositoltrifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG). Poté dojde k uvolnění Ca²⁺ iontů z endoplazmatického retikula do cytoplazmy. Wnt signál tedy zvýší koncentraci Ca²⁺ iontů v cytoplazmě, čímž jsou aktivovány proteinkináza C a kalmodulin dependentní kináza II (Kühl et al., 2000). Proteinkináza C aktivovaná Ca²⁺ ionty reguluje diferenciaci tkání pomocí GTPázy CDC42 (Winklbauer et al., 2001).



Obr. č. 4 Nekanonická Wnt/Ca²⁺ signální kaskáda
(převzato z Komiya, Habas, 2008, upraveno)

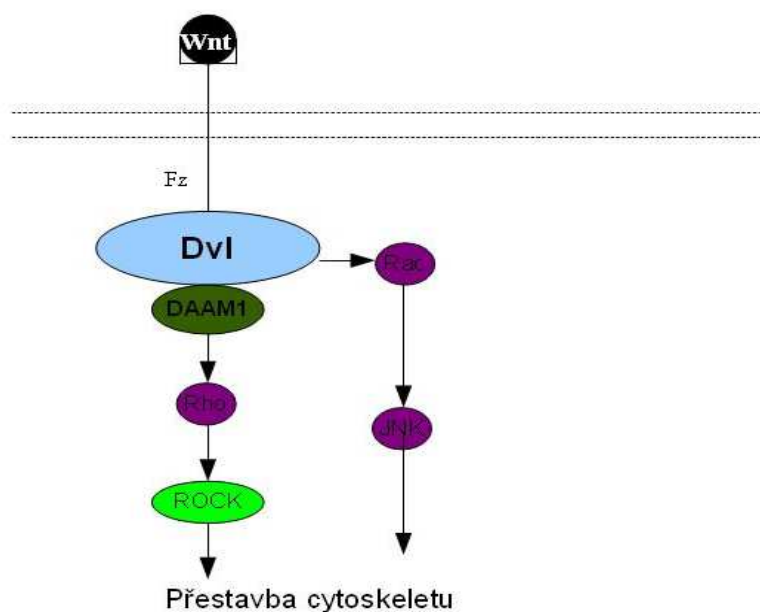
2.3.2.2. Planar Cell Polarity signální dráha (Wnt/PCP)

Objev Wnt/PCP signální kaskády vedl k poznatku, že se tato dráha uplatňuje v určování orientace chloupků na křídlech a vývoji omatidií.

Pro přenos signálu je u této nekanonické signální dráhy opět klíčový receptor Fz, ze kterého se signál přenáší na protein Dvl. Protein Dvl má dvě domény. Jedná se o domény DEP a PDZ domény. Tyto domény hrají důležitou roli při aktivaci dvou paralelních drah, které zahrnují GTPázy Rho a Rac (Axelrod et al., 1998).

GTPázu Rho aktivuje protein DAAM1 tím, že vytvoří komplex s Dvl (Habas et al., 2001). Aktivovaná kináza Rho dále působí na ROCK a myosin (Marlow et al., 2002) což vede ke změnám ve stavbě cytoskeletu.

Další signalizace probíhající přes DEP doménu proteinu Dvl, stimuluje GTPázu Rac. Aktivace této signální dráhy není závislá na DAAM1 proteinu (Habas et al., 2003).



Obr. č. 5 Nekanonická Planar Cell Polarity signální kaskáda (převzato z Komiy, Habas, 2008, upraveno)

2.3.3. Klíčová úloha proteinu Dishevelled a jeho regulace

Protein Dishevelled hraje důležitou úlohu jak v kanonické signální dráze, tak i v nekanonických signálních drahách. V kanonické signální dráze se uplatňuje jako přenašeč signálu z receptoru na β -catenin degradační komplex. Další jeho

významnou úlohou je funkce „přepínače“, podle některých prací je tento protein zodpovědný za pozitivní regulaci kanonické signální dráhy a zároveň také za inhibici nekanonické dráhy - PCP signální dráhy. Tato jeho klíčová aktivita je pravděpodobně umožněna jeho fosforylací kasein kinázou Iε (CKIε).

Podle některých zdrojů se CKIε váže přímo na doménu PDZ proteinu Dvl a na C-terminální oblast Axinu (Rubinfeld et al., 2001), ovšem jiné zdroje uvádějí, že se CKIε váže přímo na DEP doménu proteinu Dvl a nepřímo na Axin (Kishida et al., 2001). Navzdory usilovnému zkoumání není zcela jasné, jak se CKIε váže a jak ovlivňuje Wnt signalizaci. Nadměrná exprese CKIε zvyšuje fosforylací různých komponent Wnt signální dráhy. Jedná se například o Dvl, Axin, APC. Nelze tedy jednoznačně vyvodit závěr fyziologického účinku při této signalizaci (Cong et al., 2004).

2.3.4. Úloha CKIε v kanonické Wnt signální dráze

Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, úloha CKIε ve Wnt signalizaci ještě není zcela jasná. V roce 1999 identifikovali vědci CKIε jako pozitivní regulátor kanonické Wnt signální dráhy. Nadměrná exprese této kasein kinázy vyvolala u embryí modelového organismu *Xenopus laevis*, které byly předtím ozářeny dávkou UV záření, transkripci cílových genů a umožnila jim tak přežít (Peters et al., 1999). Navíc bylo prokázáno fyziologické propojení CKIε, proteinu Dvl a Axinu. Později bylo zjištěno, že kinázová doména CKIε se váže na PDZ podjednotku proteinu Dvl (Peters et al., 1999). Po zveřejnění tohoto objevu následovala další tvrzení, podepřená silnými důkazy, že podjednotka PDZ proteinu Dvl není jediným místem vazby CKIε. Například se ukázalo, že CKIε se váže přímo na C-terminální část Axinu (Mckay et al., 2001). Dalšími místy, kde byly prokázány vazby CKIε, byla doména DEP proteinu Dvl a vazba s Axinem skrze doposud neidentifikovaný protein (Kishida et al., 2001).

2.3.5. Úloha CKIε v Planar Cell Polarity signální dráze

V předchozím odstavci bylo uvedeno, že CKIε byla identifikována jako pozitivní regulátor Wnt signální dráhy. Protein Dvl je klíčovou komponentou nejen při transdukcii Wg signálu, ale také při aktivitě Planar Cell Polarity signální dráhy, respektive při zprostředkování DFz1 aktivity. Při nadměrné expresi CKIε tedy dochází k aktivaci Wnt signální dráhy. Druhým efektem této

nadměrné exprese je negativní ovlivňování PCP signální dráhy. Pro potvrzení nebo vyvrácení tohoto předpokladu bylo vytvořeno osm transgenních linií *Drosophily* pomocí UAS/GAL-4 systému (Cong et al., 2004). Bylo zjištěno, že aktivace Wg signálu ve vyvíjejícím se křídle vede k ektopickým okrajovým chloupkům uvnitř křídla a ztráta funkce nebo nadměrná exprese DFz1 narušuje jejich polaritu (Axelrod et al., 1998). Pomocí driveru C765-Gal4, který se exprimoval v celém křídle, byly pozorovány ektopické chloupky uvnitř křídla, podobně jako u Wg signální aktivace. Nadměrná exprese CKIε tedy vedla k defektům polarity (Cong et al., 2004).

2.3.6. CKIε jako pozitivní regulátor kanonické a negativní regulátor nekanonické signální dráhy

Vítězslav Bryja se ve své práci zabýval výše zmíněnými vlivy CKIε na kanonické i nekanonické signální dráhy a také několika mutacemi genu CKIε. Tyto mutace byly nalezeny u pacientek s rakovinou prsu. Jednalo se o mutace: L39Q – nejčastěji se vyskytující mutace; L39Q v kombinaci s S101R ; L39Q v kombinaci s L49Q a N78T.

Výsledky jeho práce ukazují, že všechny tři mutantní alely mohou své produkty navázat na protein Dvl, ovšem nedokážou ho fosforylovat, čímž dochází k „loss of function“ v kanonické Wnt/β-catenin signální dráze (Bryja et al., 2010). Dále na základě svých výsledků potvrdil, že při fosforylaci proteinu Dvl pomocí CKIε dochází k inhibici nekanonické signální dráhy (Cong et al., 2004; Bryja et al., 2008). CKIε se tedy jeví, jak již bylo zmíněno, jako „přepínač“, který směřuje signál od nekanonické signální kaskády ke kanonické Wnt/β-catenin signalizaci (Bryja et al., 2010).

3. Praktická část

3. 1. Úvod do problematiky

V praktické části své bakalářské práce, která se týká pouze části mé bakalářské práce, jsem se zabýval nulovou mutací *dco*^{le88}. Jak bylo zmíněno v odstavci 1. 5., jedná se o alelu uměle vytvořenou. Tato alela genu *dco* se chová recesivně a je v homozygotní konstituci letální. V transheterozygotní konstituci přežívají jedinci nesoucí ve svém genotypu tuto alelu do dospělců.

Nuloví mutanti nemají funkční gen *dco* a tudíž u nich dochází během larválního vývoje k velkému počtu apoptóz a hynou. Když ovšem tato nulová mutace bude v heterozygotní konstituci oproti standardní alele, nebude mít tato mutantní alela efekt letality. *Dco* fosforylací receptoru *Fat* zřejmě částečně inhibuje *Fat/Warts* dráhu (Doležal et al. 2010). Aktivní *Fat/Warts* dráha potlačuje růst, proto jsme se rozhodli otestovat, zda odebrání jedné alely *Dco* a tudíž snížení exprese *Dco*, bude méně inhibovat *Fat/Warts* dráhu, což by se mohlo projevit zmenšením například křídel dospělé. Ve svém experimentu jsem se tedy pokusil otestovat, zda alela *dco^{le88}* ovlivní velikost křídel u dospělých jedinců.

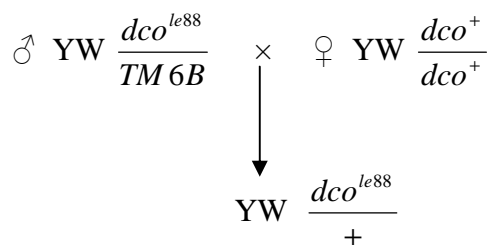
3. 2. Cíl práce

- vykříždit požadovaný genotyp
- získat křídla jedinců tohoto genotypu
- změřit plochu křídel mutantních jedinců a porovnat ji s velikostí plochy wild-type jedinců

3. 3. Materiál a metody

3. 3. 1. Křížení požadované linie pro experimentální měření plochy křídel

Pro měření plochy křídel mutantních jedinců bylo potřeba vykříždit linii s genotypem nesoucí alelu *dco^{le88}* nad normální alelou genu *dco*. Tito jedinci byli kříženi podle následujícího schématu (Obr. 6).



Obr. č. 6 Příprava mutantní linie pro měření

Jako výchozí linie byli použiti samčí jedinci stoku číslo 1012 s alelou *dco*^{le88} nad balancerem TM6B. Tito samci byli kříženi se samicemi YW s oběma standardními *dco* alelami. Výsledek tohoto křížení pak byl YW s alelou *dco*^{le88} nad standardní alelou *dco*.

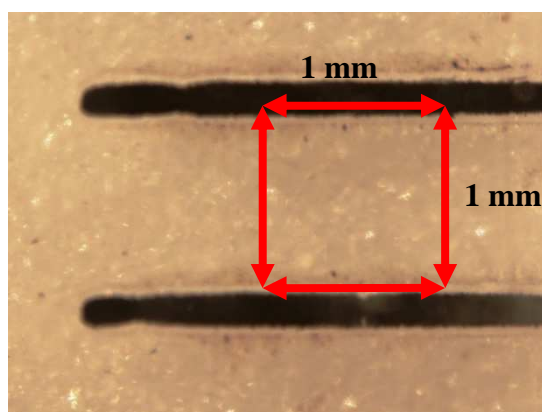
3. 3. 2. Získávání a měření křídel

Křídla byla z jedinců získávána, po jejich přenesení na destičku, ze které vzlínal oxid uhličitý, pomocí preparačních pinzet. Při preparaci křídel byla použita binolupa Olympus SZX10 s kamerou Olympus DP10. Získaná neporušená křídla byla vyfotografována při konstantním zvětšení. Rozměry fotografií byly 4080 x 3072 pixelů. Pro pozdější převedení velikosti plochy křídel v pixelech bylo vyfotografováno měřidlo s 1 mm (Obr. 8) se stejným zvětšením jako křídla. Později byl pomocí počítačového programu GIMP stanoven počet pixelů na 1 mm².

U vypreparovaných a vyfotografovaných křídel byla stanovována plocha v pixelech pomocí nástroje polygonálního výběru programu GIMP. Způsob měření je zobrazen na obrázku číslo 7. Tlustá černá čára označuje hranici výběru plochy. Naměřené výsledky jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. I – VIII). Při prvním měření byl počet pixelů na 1mm² 1175020. Při druhém měření 1739556. Tyto dvě hodnoty jsou rozdílné, protože první a druhé měření bylo prováděno nezávisle na sobě, v jinou dobu, a tudíž zvětšení, při kterých byla křídla fotografována, bylo rozdílné.



Obr. č. 7 Princip měření plochy křídla



Obr. č. 8 Vyfotografované měřidlo se stejným zvětšením jako fotografie křídel

Tab. I: Výsledky prvního měření mutantní linie samic

| samice YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ pixely | samice YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ mm ² |
|--|---|
| 3185847 | 2,711312999 |
| 3049067 | 2,594906470 |
| 2847697 | 2,423530663 |
| 3085996 | 2,626334871 |
| 3175518 | 2,702522510 |
| 3071917 | 2,614352947 |
| 3116809 | 2,652558254 |
| 3044690 | 2,591181427 |
| 3159469 | 2,688864019 |
| 3196210 | 2,720132423 |
| 3165470 | 2,693971166 |
| 3120241 | 2,655479056 |
| 2939849 | 2,501956562 |
| 3042243 | 2,589098909 |
| 3064113 | 2,607711358 |
| 2727614 | 2,321334105 |
| 3150209 | 2,680983302 |
| 2862535 | 2,436158533 |
| 3157149 | 2,686889585 |
| 3153895 | 2,684120270 |
| 3006775 | 2,558913891 |
| 3171873 | 2,699420435 |
| 3018825 | 2,569169035 |
| 3348622 | 2,849842556 |
| 2942974 | 2,504616092 |
| 3004715 | 2,557160729 |
| 3160194 | 2,689481030 |

Tab. II: Výsledky druhého měření mutantní linie samic

| samice YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ pixely | samice YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ mm ² |
|--|---|
| 4625011 | 2,658730734 |
| 4667649 | 2,683241586 |
| 4560478 | 2,621633336 |
| 4453153 | 2,559936559 |
| 4439318 | 2,55198338 |
| 4265800 | 2,452234938 |
| 4347481 | 2,499190023 |
| 4312565 | 2,479118235 |
| 4533520 | 2,606136278 |
| 4479881 | 2,575301399 |

Tab. III: Výsledky prvního měření mutantní linie samců

| samci YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ pixely | samci YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ mm ² |
|---|--|
| 2582669 | 2,19798 |
| 2571490 | 2,18846 |
| 2562905 | 2,18116 |
| 2355414 | 2,00457 |
| 2488743 | 2,11804 |
| 2279187 | 1,93970 |

Tab. IV: Výsledky druhého měření mutantní linie samců

| samci YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ pixely | samci YW $\frac{dco^{le88}}{+}$ mm ² |
|---|--|
| 3758227 | 2,160451862 |
| 3435932 | 1,975177574 |
| 3383807 | 1,945213031 |
| 3676236 | 2,113318571 |
| 3535802 | 2,032588776 |
| 3435852 | 1,975131585 |
| 3560207 | 2,046618218 |
| 3508016 | 2,016615734 |
| 3688436 | 2,120331855 |
| 3458840 | 1,988346452 |

Tab. V: Výsledky prvního měření samic se standardním genotypem

| samice YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ pixely | samice YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ mm ² |
|---|--|
| 2964511 | 2,522945141 |
| 2991058 | 2,545537948 |
| 3110530 | 2,647214515 |
| 2810567 | 2,391931201 |
| 2920697 | 2,485657265 |
| 2689348 | 2,288767851 |
| 2985463 | 2,540776327 |
| 2995731 | 2,549514902 |
| 2731327 | 2,324494051 |
| 2798785 | 2,381904138 |

Tab. VI: Výsledky druhého měření samic se standardním genotypem

| samice YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ pixely | samice YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ mm ² |
|---|--|
| 4129386 | 2,373816077 |
| 4182966 | 2,40461704 |
| 3987938 | 2,292503374 |
| 3722422 | 2,139869024 |
| 4443076 | 2,554143701 |

Tab. VII: Výsledky prvního měření samců se standardním genotypem

| samci YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ pixely | samci YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ mm ² |
|--|---|
| 2390280 | 2,034246 |
| 2209429 | 1,880333 |
| 2815282 | 2,395944 |
| 3161572 | 2,690654 |
| 2416809 | 2,056824 |
| 2964433 | 2,522879 |
| 3045639 | 2,591989 |
| 2184049 | 1,858733 |
| 2342179 | 1,993310 |

Tab. VIII: Výsledky druhého měření samců se standardním genotypem

| samci YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ pixely | samci YW $\frac{dco^+}{dco^+}$ mm ² |
|--|---|
| 3058002 | 1,75792099 |
| 3286453 | 1,88924818 |
| 3447567 | 1,98186606 |
| 3055505 | 1,75648556 |
| 3118381 | 1,79263042 |
| 3036052 | 1,74530282 |
| 3058002 | 1,75792099 |

3. 4. Výsledky práce

3. 4. 1. Statistické vyhodnocení naměřených hodnot

Při statistickém zpracování jsem položil nulovou hypotézu, která říká: „Alela dco^{le88} v heterozygotní konstituci neovlivňuje velikost křídel.“

Tab. IX: Statistické vyhodnocení obou měření mutantní linie samic

| | |
|----------------------------|-------------|
| Aritmetický průměr | 2,60268945 |
| Průměrná odchylka | 0,0799962 |
| Směrodatná odchylka | 0,103165278 |

Tab. X: Statistické vyhodnocení měření mutantní linie samců

| | |
|----------------------------|-------------|
| Aritmetický průměr | 2,062731479 |
| Průměrná odchylka | 0,080077742 |
| Směrodatná odchylka | 0,090593536 |

Tab. XI: Statistické vyhodnocení samičích křídel s normálním genotypem

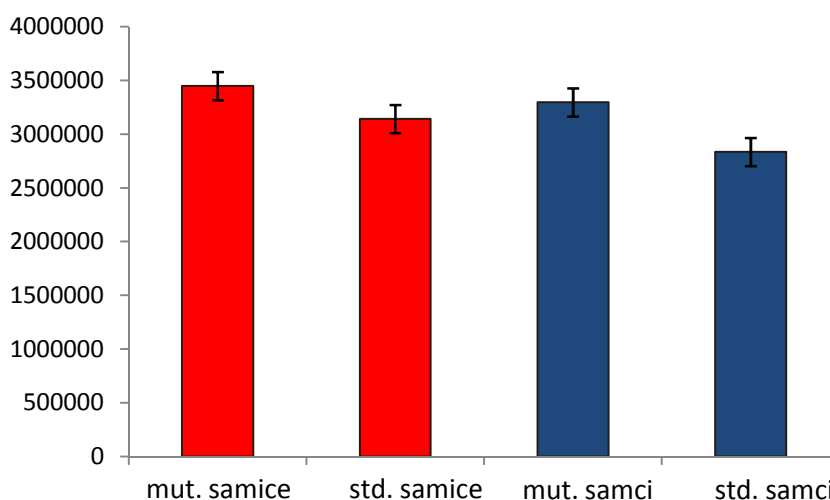
| | |
|----------------------------|-------------|
| Aritmetický průměr | 2,429579504 |
| Průměrná odchylka | 0,135212692 |
| Směrodatná odchylka | 0,111831103 |

Tab. XII: Statistické vyhodnocení samčích křídel s normálním genotypem

| | |
|----------------------------|-------------|
| Aritmetický průměr | 2,044142939 |
| Průměrná odchylka | 0,254696913 |
| Směrodatná odchylka | 0,322711934 |

Tab. XIII: Tabulka vypočítaných hodnot Studentova t-testu

| | |
|-----------------------|----------|
| Samice P value | 0,130602 |
| Samci P value | 0,121448 |



Obr. č. 9 Grafické znázornění velikosti křídel v pixelech podle genotypu a pohlaví

3. 5. Závěr a diskuze

Alela dco^{le88} je nulová mutantní alela, která je v homozygotní konstituci letální. Způsobuje, že během larválního vývoje *Drosophily* není inhibována apoptóza a tudíž nemohou vzniknout imaginální disky. V případě heterozygotní konstituce jedinec přežívá.

Ve své práci jsem se zaměřil na ověření, zda heteroalelická konstituce alel, v mém případě dco^{le88} nad +, způsobí vznik menších křídelních imaginálních disků a křídel.

Při ověřování nulové hypotézy jsem použil párový t-test. Hodnoty P-value pro obě pohlaví jsou uvedené v tabulce XIII. Vypočítaná hodnota P-value pro samice mi neumožnila zamítnout nulovou hypotézu na 5% hladině významnosti, tudíž ze statistického hlediska alela dco^{le88} neovlivňuje velikost křídla. Hodnota P-value pro samce mi nedovolila zamítnout nulovou hypotézu, tudíž ani u samců nemohu tvrdit, že dco^{le88} ovlivňuje velikost křídel.

Jsem si vědom, že v mé práci je nízký počet měření, zejména některých statistických souborů, což otevírá prostor pro další zkoumání v této oblasti.

4. Seznam literatury

Axelrod, J. D., Miller, J. R., Shulman, J. M., Moon, R. T., Perrimon, N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wntless signaling pathways. *Genes & Development*, 12, 2610–2622.

Bandura, J. L., Edgar, B. a. (2008). Yorkie and Scalloped: partners in growth activation. *Developmental cell*, 14, 315-316.

Brumby, A. M., Richardson, H. E. (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nature reviews. Cancer*, 5, 626-639.

Bryant, P. J., Schmidt, O. (1990). The genetic control of the cell proliferation in *Drosophila* imaginal discs. *Journal of cell science*, 13, 169-189.

Bryja, V., Schambony, A., Cajanek, L., Dominguez, I., Arenas, E., Schulte, G. 2008. Beta-arrestin and casein kinase 1/2 define distinct branches of non-canonical WNT signaling pathways. *EMBO*, 9, 1244 – 1250.

Cong, F., Schweizer, L., Varmus, H. 2004. Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled. *Molecular Cell Biology*, 24, 2000 – 2011.

Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, 13, 239-252.

Doležal, T., Kučerová, K., Neuhold, J., Bryant, P. J. (2010). Casein kinase I epsilon somatic mutations found in breast cancer cause overgrowth in *Drosophila*. *The International journal of developmental biology*, 54, 1419-1424.

Edgar, B. A.. (1999). From small flies come big discoveries about size control. *Nature Cell Biology*, 1, E191-E193

Engelman, J., Luo, J., Cantley, L., C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7, 606-618.

Feng, Y., Irvine, K. D. (2009). Processing and phosphorylation of the Fat receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 11989-11994.

Foldynová-Trantírková, S., Sekyrová, P., Tmejová, K., Brumovská, E., Bernatík, O., Blankenfeldt, W., Krejčí, P., Bryja, V. et al. (2010). Breast cancer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration. *Breast cancer research: BCR*, 12, R30.

Fuja, T. J., Lin, F., Osann, K. E., Bryant, P. J. (2004). Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. *Cancer research*, 64, 942-951.

Glantschnig, H., Rodan, G. A., Reszka, A. A. (2002). Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 42987-42996.

Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzales-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Current Biology*, 18, 435-441.

Guan, J., Li, H., Rogulja, A., Axelrod, J. D., & Cadigan, K. M. (2007). The *Drosophila* casein kinase Iepsilon/delta Discs overgrown promotes cell survival via activation of DIAP1 expression. *Developmental biology*, 303, 16-28.

Habas, R., Kato, Y., He, X. (2001). Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. *Cell*. 107, 843–854.

Habas, R., Dawid, I. B., He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & Development*, 17, 295–309.

Harvey, K. F., Pflieger, C. M., Hariharan, I. K. (2003). The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, 114, 457-467.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., & Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell*, 122(3), 421-434.

Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R., Irvine, K.D. (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nature Genetics*, 38, 1142-1150.

Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.

Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R., Jiang, J. (2003). The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes & Development*, 17, 2514-2519.

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

Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M., Bryant, P. J. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, 9, 534-546.

Kango-Singh, M., & Singh, A. (2009). Regulation of organ size: insights from the *Drosophila* Hippo signaling pathway. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 238, 1627-1637.

Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Verstreken, P., Hiesinger, P. R., Bellen, H. J., Halder, G. (2002). Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development*, 129, 5719-5730.

Kim, D., Dan, H., C., Park, S., Yang, L., Liu, Q., Kaneko, S., Ning, J., He, L., Yang, H., Sun, M., Nicosia, S., V., Cheng, J., Q. (2005). AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Frontiers in Bioscience*, 10, 975-987.

Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M., Kikuchi, A. (1999). DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Molecular Cell Biology* 19, 4414-4422.

Kishida, M., Hino, S., Michiue, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Fukui, A., Asashima, M., Kikuchi, A. (2001). Synergic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 33147-33155.

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

Komiya, Y., Habas, R., (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4, 68-75.

Kühl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C., Moon, R. T. 2000. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in xenopus. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 12701-12711.

Lai, Z. C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L. L., Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, 120, 675-685.

Lee, K. K., Yonehara, S. (2002). Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST). *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 12351-12358.

Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A. M., McMahon, A., Sussman, D.J., Wu, D. (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 129-134.

Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Current Biology*, 12, 876–884.

McKay, R., M., Peters, J., M., Graff, J., M. (2001). The casein kinase I family in Wnt signaling. *Developmental Biology*, 235, 388-396.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.

Milan, M., Campuzano, S., Garcia-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5691-5696.

Millward, T., A., Zolnierowics, S., Hemmings, B., A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 186-191.

Modak, C., Bryant, P. (2008). Casein Kinase I epsilon positively regulates the Akt pathway in breast cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 368, 801-807.

Nahta, R., Yu, D., Hung, M., Hortobagyi, G., N., Esteva, F., J. Mechanism of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature clinical Practise Oncology*, 3, 269-279.

Okamura, A., Iwata, N., Tamekane, A., Yakushijin, K., Nishikawa, S., Hamaguchi, M., Fukui, C., et al. (2006). Casein kinase Iepsilon down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells. *Life sciences* 78, 1624-1129.

Pantalacci, S., Tapon, N., Leopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nature Cell Biology*, 5, 921-927.

Peters, J., M., McKay, R., M., McKay, J., P., Graff, J., M. (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature*, 401, 345-350.

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

Reddy, B. V. V. G., Irvine, K. D. (2008). The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development (Cambridge, England)*, 135, 2827-2838.

Rubinfeldt, B., Tice, D., A., Polakis, P. (2001). Axin-dependent phosphorylation of the adenomatus polyposis coli protein mediated by casein kinase Iε. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 39037-39045.

Serrano, N., O'Farrell, P. H. (1997). Limb morphogenesis: connections between patterning and growth. *Current Biology*, 7, R186-R195.

Slusarski, D. C., Corces, V. G., Moon, R. T. 1997. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature*, 390, 410-413.

Sopko, R., Silva, E., Clayton, L., Gardano, L., Barrios-Rodiles, M., Wrana, J., Varelas, X., et al. (2009). Phosphorylation of the tumor suppressor fat is regulated by its ligand Dachshaus and the kinase discs overgrown. *Current biology*, 19, 1112-1127.

Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell*. 13, 149–156.

Tapon, N., Harvey, K., Bell, D., Wahrer, D., Schiripo, T., Haber, D., Hariharan, I. (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, 110, 467.

Udan, R. S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature Cell Biology*, 5, 914-920.

- Wei, X., Shimizu, T., Lai, Z., C. (2007). Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO Journal*, 26, 1772-1781.
- Winklbauer, R., Medina, A., Swain, R. K., Steinbeisser, H. 2001. Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature*, 413, 856–860.
- Wong, H. C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H. J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D. L., Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Molecular Cell*. 12, 1251–1260.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., Pan, D. (2003). Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*, 114, 445-456
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., Pan, D. (2008). TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth regulatory pathway. *Developmental Cell*, 14, 388-398.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A., Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetics mosaic: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 121, 1053-1063.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D., Moon, R. T. (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Development*, 10, 1443–1454.
- Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T. J., Perry, W. L., Lee, J. J., Tilghman, S. M., Gumbiner, B. M., Costantini, F. (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell*, 90, 181–192.

Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., Wynshaw-Boris, A., Hsieh, J., He, X. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via Frizzled, Dishevelled and Axin functions. *Development*, 135, 367–375.

Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Developmental Cell*, 14, 377-387.

Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., et al. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & development*, 22(14), 1962-71.

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 (Cambridge, England)*, 126, 5409-5420.

Internetové zdroje:

www.flybase.org

<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>