Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Vliv diety na fenotyp signální dráhy přes receptor Notch u *Drosophila melanogaster*

Bakalářská práce

Pavel Steffal

Školitel: RNDr. Alena Krejčí Ph.D.

České Budějovice 2013

Bakalářská práce

Steffal, P; 2013: Vliv diety na fenotyp signální dráhy přes receptor Notch u *Drosophila melanogaster*. (Effect of diet composition on Notch signalling phenotype in Drosophila melanogaster; Bachelor Thesis in Czech) – 30 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The influence of Notch signaling pathway by changes in metabolism has been proposed by several recent studies but it is unclear if changes in diet composition can directly lead to changes in Notch phenotype *in vivo*. The aim of this work is to evaluate phenotypic changes in the activity of Notch pathway in living *Drosophila melanogaster* fed on diets with variable sugar and amino acid content.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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 12.12.2013

Pavel Steffal

Poděkování

Rád bych poděkoval mé vedoucí RNDr. Aleně Krejčí Ph.D. za odborné vedení práce, rady a za vstřícný a přátelský přístup při mých prvních krůčcích v laboratoři. Mé díky také patří Bc. Natálii Bašistové jak za logistickou tak i praktickou pomoc s experimenty. Dále děkuji Mgr. Matěji Horváthovi za konzultace a Mgr. Věře Slaninové za pomoc zejména v admistrativních záležitostech.

OBSAH

1. Úvod…...……..……...……1

1.1. Notch signální dráha……...….....1

1.2. Regulace Notch dráhy……..…….……4

1.3. Cíl bakalářské práce……...6

2. Materiály a metody……7

2.1. Optimalizace…….……...10

3. Výsledky……..……11

3.1. Kvantifikace šířky cévy L5 u N^{55e11} …….....……..12

3.2. Počítání chloupků na thoraxu u N^{55e11} ……15

3.3. Kvantifikace defektu délky L5 cévy na křídlech u H^2 18

3.4. Počátání chloupků na thoraxu u H^2 22

4. Diskuse…….....25

4.1.Budoucí experimenty…….....…...27

5. Závěr…….....28

6. Seznam použité literatury…….……29

1. Úvod

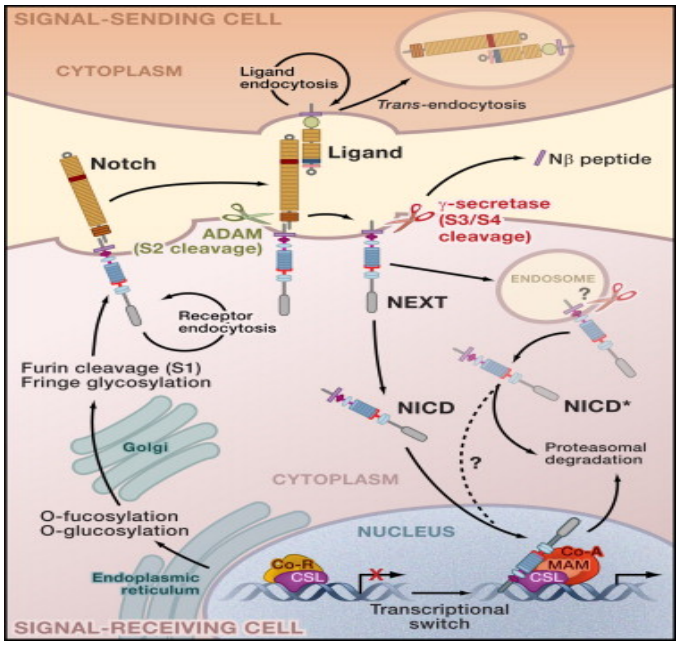
Vznik mnohobuněčnosti před 2.5 miliardami let s sebou přinesl do té doby neznámý problém: jak se v rámci jednoho organizmu "domluvit"? Každá buňka musí dbát nejen na své zájmy, ale také na zájmy mnohobuněčného celku, protože jinak by nešlo o mnohobuněčnost, ale pouze o kooperaci samostatných buněk. Odhaduje se, že právě v této době se začaly vyvíjet mezibuněčné signální dráhy. A nezbytnou podmínkou signalizace je její regulace. Ta může probíhat na všech myslitelných stupních, například na úrovni modifikace proteinů zapojených v signálních kaskádách, regulací transkripce, spojováním s jinými drahami apod. Zatímco základních signálních drah v buňce je relativně málo, obrovského množství tkáňově specifických odpovědí na stejný signál je dosaženo právě díky důmylsným regulačním mechanizmům. Není tedy překvapující, že regulace signalizace hraje klíčovou roli i při různých nemocech a vývojových poruchách. Předmětem mého studia a experimentu je Notch signální dráha a její ovlivnění metabolismem.

1.1. Notch signální dráha

Notch signální dráha je silně konzervovaná a přítomná u všech mnohobuněčných organismů. Ovlivňuje mnoho různých buněčných procesů jako je diferenciace, proliferace či indukce apoptózy. Při její nefunkčnosti, nebo částečném poškození je zodpovědná za mnoho vývojových vad i několika nemocí u dospělého organizmu, včetně rakoviny. Jejími základními komponentami jsou receptor Notch v buněčné membráně signál vysílající buňky a jeho ligand v membráne těsně sousedící buňky na tento signal reagující (obr. 1). U *Drosophila melanogaster* existuje jeden receptor a dva ligandy (Delta a Serrate), u savců jsou receptory čtyři a ligandů dvanáct. Pět z nich je ovšem takzvaně nekanonických, což znamená, že sice aktivují Notch dráhu, ale bez spolupráce s CFB-1 transkripčním faktorem (Su(H)) (Kopan and Ilagan 2009). Narozdíl od jiných signálních drah nevyžaduje Notch dráha žádného tzv. druhého posla. Po aktivaci receptoru se jeho intracelulární doména (N^{ICD}) odštěpí pomocí ADAM/TACE proteázy a γ-sekretetázového komplexu a jde přímo do jádra, kde aktivuje genovou transkripci vazbou na transkripční faktor CSL (CBF1, Su(H), Lag2, podle příslušných orthologů u savců, octomilky a háďátka). CSL se váže na DNA enhancery obsahující konsenzus vazebné místo CGTGGGAA. Zdaleka ne všechna potenciální vazebná místa jsou však za dané situace obsazena. Učebnicový model

předpokládá, že bez přítomnosti Notch signalizace váže CSL korepresory tlumící transkripci cílových genů, zatímco N^{ICD} způsobí vytěsnění těchto korepresorů a naopak spuštění transkripce těchto cílových genů. Ze studií na octomilce ale víme, že mnoho genů váže Supressor of Hairless (Su(H)) až po aktivaci Notch dráhy a ne všechny Notch cílové geny jsou tedy reprimovány pomocí Su(H) (Housden, Fu et al. 2013).

Je překvapující, že tato relativně jednoduchá signální dráha je použita při vývoji téměř každé tkáně a její zapnutí vyvolává naprosto odlišné odpovědi v závoslosti na buněčném kontextu. Například v některých případech aktivace Notch dráhy podporuje proliferaci buněk (Kopan, Nye et al. 1994; Delfini, Hirsinger et al. 2000; Hirsinger, Malapert et al. 2001), jindy zase buněčnou diferenciaci (Robey 1999), nebo určuje buněčnou specifikaci (Gaiano and Fishell 2002).



Obr.1: Schéma aktivace Notch signální dráhy: Notch receptor je protein zakotvený v buněčné membráně, s extracelulární doménou (N^{ECD}) a intracelulární doménou (N^{ICD}).Během přepravy přes endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex protein maturuje. Dochází k posttranlsačním modifikacím (glycosylace a fucosylacena EFG repeticích v N^{ECD}) a také štěpení furin proteázou (S1). Navázání ligandu (Serrate, Delta) aktivuje druhé štěpení (S2), zprostředkované ADAM metaloproteázou. Dále je N^{ICD} štěpena (S3 a S4) γ-sekretázovým komplexem.Tím je N^{ICD} uvolněna z membrány a přepravena do jádra, kde se spojí s CSL a dalšími koaktivátory a spustí transkripci cílových genů. Bez přítonosti N^{ICD} je exprese stejných genů většinou potlačena pomocí CSL komplexu vážícího korepresory (Kopan and Ilagan 2009).

Notch signalizace hraje významnou roli během vývoje organismu, kde se uplatňuje při čtyřech základních procesech. Laterální inhibici, laterální indukci, při definování hraničních oblastí tkání a při buněčné specializaci.

Laterální inhibice je jakýsi kompetiční boj mezi ještě nediferencovanými buňkami epitelia o to, která buňka se specializuje, jaký bude její osud (Gibert and Simpson 2003; Le Borgne and Schweisguth 2003). Můžeme to ukázat na často uváděném příkladu diferenciace neuronů u octomilky. Před diferenciací se jedná o shluk proneurálních buněk exprimujících stejné počty Notch receptorů a ligandů. Tyto buňky také exprimují produkty proneurálních genů Achaete (Ac) a Scute (Sc). Tedy všechny buňky ve shluku mají stejnou možnost stát se neuronem. Postupem času jedna z buněk exprimuje víc ligandů než ostatní, zvítězí v kompetici, a to vede k aktivaci Notch dráhy u okolních buněk a inaktivaci dráhy u ní samotné. U okolních buněk se aktivují geny Enhancer of split komplexu, které zastaví expresi Ac/Sc produktů. Tímto mechanismem se u okolních buněk zastaví neurální diferenciace a stane se z nich nervový epitel, zatímco z buňky uprostřed se stane prekurzor neuronu. U octomilky se takto také vyvíjejí smyslové orgány (chlupy) na thoraxu (štítu) (Castro, Barolo et al. 2005), což byl jeden z markerů, který jsem ve své práci sledoval.

Laterální indukce působí v podobných situacích jako inhibice. Rozdíl je jen v mechanismu blokace u okolních buněk. Kontroluje totiž expresi ligandů Serrate a Jagged pozitivní zpětnou vazbou Notch indukčních signálů u sousedních buněk. Stejně jako u laterální inhibice je opět Notch dráha blokována u vítězné buňky, tentokrát prostřednictvím regulátoru Numb (Zhou, Atkins et al. 2007). Situace je tedy nakonec stejná jako u laterální inhibice: máme shluk buněk z nichž jedna má nízkou Notch aktivitu a ostatní vysokou.

Vznik hraničních oblastí mezi dvěma populacemi buněk může být také řízen Notch signální drahou, jak se to děje například při formování okraje křídla octomilky nebo křídelních cév během larválního vývoje v křídelním disku (Bray 2006). I tento marker jsem hodnotil ve své práci (sledováním fenotypu na křídlech u dospělců).

Notch také řídí buněčnou diferenciaci, například u prekurzorů smyslových orgánů nebou kmenových buněk. Regulace zde probíhá opět prostřednictvím Numb proteinu, který je po asymetrickém dělení buněk nerovnoměrně rozložen (Bray 2006; Zhou, Atkins et al. 2007). To vede k různé aktivitě Notch dráhy mezi dceřinnou a mateřskou buňkou a tím ke specifikaci buněk v různé podtypy.

1.2. Regulace Notch dráhy

Notch signalizace musí být velmi složitě regulována, protože v různých tkáních a kontextech ovlivňuje různé geny. Aktivací Notch dráhy ve svalových buňkách octomilky se zapne 197 genů a v krevnívh buňkách 76 genů, ale genů společných pro obě tkáně je pouze 37 (Krejci, Bernard et al. 2009). Co tedy způsobí naprosto odlišnou buněčnou odpověď na zapnutí stejné signalní dráhy? Doposud bylo popsáno několik mechanizmů, které mají vliv na celkový výsledek signalizace (Borggrefe and Oswald 2009).

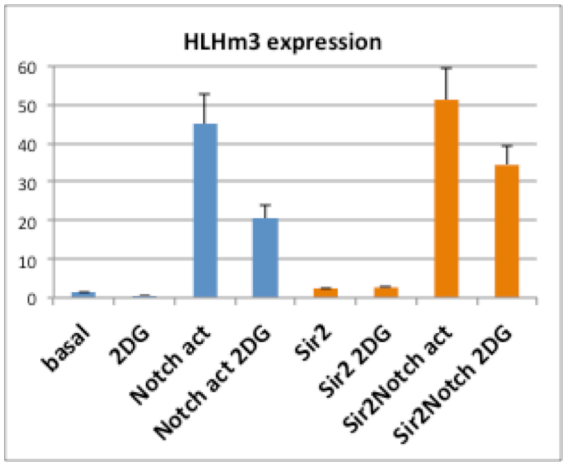
Jedním z faktorů, které mohou ovlivnit kvalitu Notch signalizace a výběr cílových genů, jsou samotné receptory. Ačkoliv u octomilky exisuje jen jeden Notch receptor a tedy jedna Notch intracelulární doména, u savců jsou receptory čtyři, které se liší svým expresním profilem a mírně také svou intracelulární doménou. Ukazuje se, že ačkoliv všechny čtyři N^{ICD} jsou schopné aktivovat transkripci stejným mechanismem, jsou odlišně náchylné k degradaci. Signál z některých N^{ICD} je tedy stabilnější a delší než od jiných N^{ICD} a to může být jedním z důvodů pro jiný repertoár cílových genů (Arnett, Hass et al. 2010). Množství štěpeného receptoru a stabilita N^{ICD} má tedy zásadní vliv na kvalitu a délku signalizace.

Dalším faktorem při výběru Notch cílových genů je složení transkripčních komplexů na jejich enhacerech. Korepresorový komplex rekrutovaný pomocí Su(H) může obsahovat různé partnery, mimo jiné histonové deacetylázy, demetylázy i histonové chaperony. Koaktivační komplex se skládá ze tří klíčových proteinů - CSL, N^{ICD} a MAM (mastermind), které pak společně zapojují histonové acetylázy a další koaktivátory spouštějící transkripci Notch cílových genů. Tento komplex je však na DNA velmi nestabilní. Dochází k rychlé fosforylaci a deacetylaci N^{ICD}, které vedou k její degradaci. Jedna molekula receptoru tak může signalizovat pouze jednou, a to ještě krátce, nedochází k žádné amplifikaci signálu jako u jiných drah. Složení transkripčních komplexů je tkáňově specifické a nabízí další úroveň regulace Notch signalizace. Spolu s rozdílnou obsazeností Su(H) vazebných míst může tedy mít výrazný vliv na druh tkáňově specifické odpovědi na Notch signalizaci.

Další významnou kapitolou v oblasti specificity Notch signalizace je její spolupráce s jinými signálními dráhami a transkpripčními faktory. Notch dráha může spolupracovat například s Wnt, NF-kB nebo TGF-β drahami, a to pozitivně i negativně, na úrovni vzájemné modifikace signálních komponent nebo sdílením stejných cílových genů. Důležitou okolností je také kooperace s transkripčními faktory, které mohou výrazně

ovlivnit výběr Notch responsivních enhancerů. Například transkripční faktor Twist spolupracuje se Su(H) při specifikaci svalových buněk (Bernard, Krejci et al. 2010), nebo Runx transkripční faktory spolupracují se Su(H) při specifikaci krevních buněk (Terriente-Felix, Li et al. 2013).

V poslední době přibývá důkazů, že jedním z faktorů, které mohou zásadně ovlivnit Notch signalizaci, je i úroveň buněčného metabolizmu. Z výsledků naší laboratoře například vyplývá, že buňky pěstované v médiu s 2-deoxyglokózou (inhibující glykolýzu) odpovídají podstatně hůře na aktivaci Notch dráhy než



Obr.2: Sir2 jako metabolický sensor pro Notch dráhu. Normalizovaná exprese Notch cílového genu HLHm3 ve S2N buňkách u octomilky. Kontrolní buňky (modře) a buňky s použitím RNAi proti Sir2 (oranžově). Průměr ze třech opakování. RNAi může částečně zachránit negativní vliv 2-deoxyglukosy (2DG) na aktivaci Notch cílového genu.

kontrolní buňky v médiu s glukózou (obr.2). Vliv metabolismu na Notch signalizaci si všiml také Merdes et al. (Siebourg, Merdes et al. 2012) při svém RNAi screenu genů ovlivňujících Notch signalizaci *in vivo*. Jakým způsobem je však signal o úrovni buněčného metabolizmu transformován do změn v Notch signalizaci? To předpokládá existenci metabolického senzoru, tedy proteinu, který by měnil svou aktivitu v závislosti na buněčném metabolismu a byl zároveň schopný modifikovat výstup Notch dráhy. Jedním z těchto senzorů pro Notch dráhu se zdá být protein Sir2. Dle studií Mullighana a Guaraní (Guarani, Deflorian et al. 2011; Mulligan, Yang et al. 2011) je protein Sirt1 ze skupiny sirtuinů (homolog kvasinkového SIR2 u savců) zodpovědný za deacetylaci a následnou degradaci N^{ICD} i za deacetylaci histonů (H4K16, H1K26) vedoucí ke kondenzaci chromatinu. Podle našich výsledků se tak zřejmě děje především v podmínách snížené glykolýzy (obr.2). Sir2 protein váže NAD^+ a je tedy citlivý na NAD^+:NADH poměr, který se mění v závislosti na typu

buněčného metabolismu. Výsledky z naší laboratoře ale naznačují, že role Sir2 proteinů v Notch signalizaci je rozsáhlejší a tento protein může ovlivňovat Notch dráhu i pozitivně. Dalším způsobem, jakým úroveň metabolismu může ovlivnit signalizaci, jsou posttranslační modifikace signálních molekul. Například acetylace je závislá na dostupnosti acetyl-CoA nebo glykosylace na dostupnosti patřičných cukerných zbytků.

Stejně tak ale existuje několik signálních drah, které přímo regulují buněčný metabolismus. Například inzulinová dráha je stimulována při vysokém obsahu živin v organismu a stimuluje příjem glukozy a její ukládání ve formě glykogenu. Stejně tak buňka monitoruje přítomnost aminokyselin (přes Rag proteiny) a poměr ATP:ADP (přes AMP kinázu) a pomocí TORC1 komplexu reguluje celkovou úroveň translace a metabolismu. Metabolismus je rovněž cílem dalších signálních molekul, mezi než patří i onkogeny (například myc). Rakovinná buňka má metabolismus výrazně odlišný od buňky zdravé (Warburgův efekt) a onkogeny hrají často výraznou úlohu při zajištění této metabolické změny. Propojení buněčné signalizace a metabolismu je tedy oboustrané (Wellen and Thompson 2012).

1.3. Cíl bakalářské práce

Záměrem mé bakalářské práce bylo zjistit, zda budeme moci pozorovat ovlivnění Notch dráhy metabolismem, pokud budeme pěstovat octomilky na dietách s různým poměrem cukrů a kvasinek (zdroj aminokyselin). Zaměřil jsem se na kvantifikaci Notch fenotypu na křídlech a na chlupech thoraxu. Z našich experimentů na tkáňových kulturách stejně tak jako z výsledků publikovaných z jiných laboratoří je jisté, že Notch dráhu je možné ovlivnit úrovní buněčného metabolismu. Zda lze však sledovat fenotypický projev poruchy Notch signalizace *in vivo* přímou manipulací dostupných živin během vývoje organismu, zůstávalo neznámou otázkou.

2. Materiály a metody

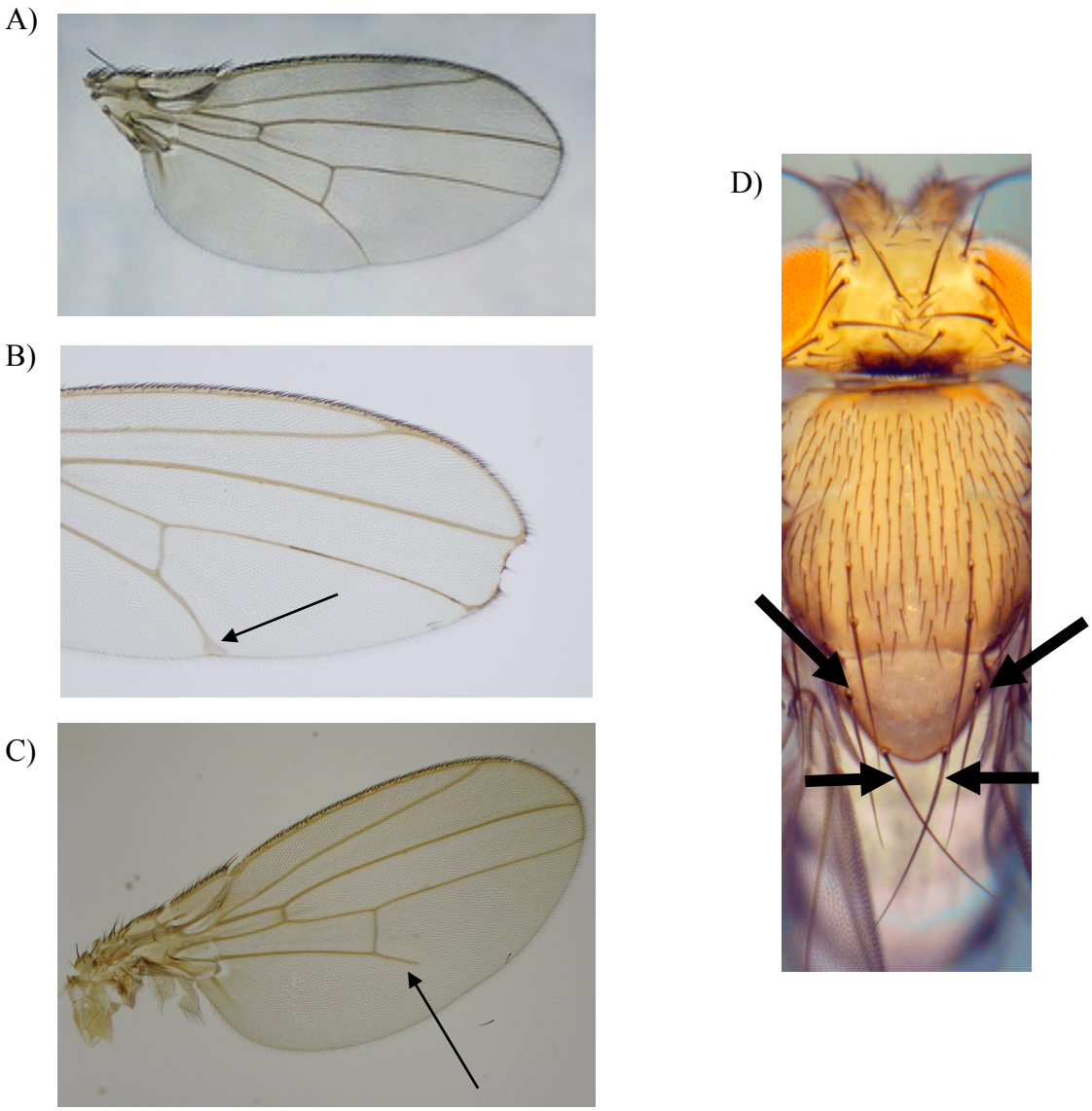
Pro sledování fenotypu Notch dráhy jsem potřeboval alely, jejichž sílu by šlo dobře a přesně kvantifikovat. Použil jsem tedy mouchy nesoucí mutantní alelu pro Notch receptor (N^{55e11}; fenotyp odráží sníženou aktivitu Notch dráhy) nebo pro korepresorový protein Hairless (H^2; vede k derepresi některých genů a tedy připomíná fenotyp zvýšené activity Notch dráhy). Do pokusu jsem je zkřížil s *yw* divokým kmenem a pro analýzu vybíral pouze jedince, u kterých nebyly přítomné žádné balancery.

Navařil jsem jídla s různými nutričními hodnotami (tab.I). Jednalo se o čtyři typy jídla s rozdíným množstvím kvasinek a cukrů a páté jídlo připravené podle publikace Merdes et al. (Siebourg et al. 2012). Zde autoři pozorovali vliv metabolismu na Notch reporter v křídelních discích larev po RNAi genů pro glykolýzu (Siebourg et al. 2012) a my jsme chtěli vidět, jestli by se Notch fenotyp výrazně odlišoval od ostatních diet. V tomto by ale bylo obtížné měnit metabolické poměry, protože je mnohem komplexnější a obsahuje ne přesně definované komponenty jako sladový extrakt. Metabolické poměry octomilek především na prvních čtyřech jídlech by se ale měly lišit. Například mouchy na dietách s vysokým obsahem cukru by měy získávat energii především přes glykolýzu, zatímco mouchy s vysokou hladinou kvasinek a tedy aminokyselin by měly mít aktivní spíše Krebsův cyklus. Rozdílů v metabolismu je ale více, například mouchy s nízkou hladinou kvasinek nebo cukrů by měly mít zároveň málo aktivní mTOR dráhu. Změny metabolismu ale *in vivo* sledovat nelze a nevíme tedy zcela s jistotou, co se na jednotlivých dietách přesně děje.

Na jídla jsem nasadil dospělce v poměru 6 samiček a 4 samce, celkově 8 vialek pro každé jídlo. Nejprve po pěti dnech, pak dvakrát po třech dnech jsem všechny octomilky přesunul do nově navařených diet a všechny jsem udržoval v inkubátoru o konstantní teplotě 25°C. Potomky jsem po vylíhnutí vytřídil a uložil do etanolu. Poté jsem vyrobil preparáty křídel, vyfotografoval je pod mikroskopem s patřičným rozlišením a kvantifikoval typické fenotypové markery pro jednotlivé mutace.

Pro kvantifikaci notch fenotypu jsem počítal chlupy na štítě, u N^{55e11} mutace jsem také kvantifikoval šířku delty u cévy L5 (počítáním chlupů, tedy počtu buněk, tvořících okraj delty, viz obr. 3B) a u H^2 dospělců jsem pomocí ImageJ64 softwaru měřil vzdálenost cévy L5 od jejího konce do okraje křídlav poměru k celkové délce

cévy (tedy velikost cévy, která se díky mutaci v H^2 nevyvinula, obr. 4C). Zajímalo mě, zda tyto tři parametry odrážející aktivitu Notch dráhy v dospělcích, budou rozdílné v závislosti na množství a poměru živin v médiu, ve kterém se vyvíjely larvy.



Obr. 3: Fenotypové markery pro N^{55e11}(B) a H^2 (C) mutace. Obr. A) znázorňuje normální fenotyp, B) mutace N^{55e11} znamená heterozygotní absenci receptoru Notch. Notch dráha je mnohem méně aktivována a to ovlivňuje diferenciaci buněk. V důsledku toho cévy L2, L3, L4 a L5 na svém konci tvoří deltu a L5 je celkově tlustší. Na toraxu se vyvine více chlupů (obr. D). C) mutace H^2 znamená absenci Hairless korepresoru v Notch represním komplexu. To vede k částečné derepresi (tedy aktivaci) genů i bez aktivní Notch dráhy. Fenotyp na křídle je manifestovaný kratší L5 cévou a na thoraxu se vyvine méně chlupů.

Experimenty jsem provedl celkem tři. První experiment zahrnoval pět diet, druhý a třetí diet šest. Výsledky prvního experiment naznačovaly, že právě obsah kvasinek (tedy hlavně aminokyselin) má vliv na Notch fentyp. Do druhého a třetího experimentu jsem tedy zahrnul i diety, kde jsem kvasinky nahradil přesně daným složením všech dvaceti aminokyselin, podle publikace Lindy Partrige et al. (Grandison, Piper et al. 2009), která studovala plodnost a délku života octomilek v závislosti na hladině živin. Toto složení by mělo přesně odrážet poměr aminokyselin přítomných v kvasinkách. Připravil jsem 100x koncentrovaný zásobní roztok, který jsem přidával do středně chladného media (37°C) (tab.2). Přidáním aminokyselin do diet jsem doufal v navrácení aktivity Notch dráhy na úroveň diety s vysokým obsahem kvasinek.

Tab. I: Složení jídla použitého pro první experiment. Příprava diety zahrnovala 30 minut vaření vody a agaru (Agar Agar Serva, CAS [9002-18-0]) při teplotě 90°C, poté přidání kvasnic (Instantní práškové droždí, výrobce: Lesafre), kukuřičné mouky (kukuřičná mouka hladká, výrobce: Kukuřičný mlýn Mrzkovice, distributor: prodejna zdravé výživy Harmonia) a cukru (Korunní cukr Krystal, výrobce: cukrovar v Hrušovanech nad Jevišovkou) a vaření dalších 40 minut ve speciálním hrnci. Na konci vaření by do jídel přidán Nipagin (25ml/l). Diety 3 a 4 byly nalévány při teplotě 37°C do chladnějších vialek kvůli sedimentaci živin (kvasnic) na dno vialek.

1	160 g yeast; 160 g sugar (6 g agar; 80 g corn meal; 1 l water) (y+; s+)
2	160 g yeast; 20 g sugar (6 g agar; 80 g corn meal; 1 l water) (y+; s-)
3	20 g yeast; 160 g sugar (6 g agar; 80 g corn meal; 1 l water) (y-; s+)
4	20 g yeast; 20 g sugar (6 g agar; 80 g corn meal; 1 l water) (y-; s-)
5 “Merdes”	18 g yeast; 8 g agar; 10 g soya meal; 22 g beet sirup; 80 g cornmeal; 80 g malt extract; 1 l water (Merdes – M (y+-; s+))

Tab. II: Složení jídla použitého pro druhý a třetí experiment. Příprava diety zahrnovala 30 minut vaření vody a agaru Amresco (Agar Bacteriological [J637] při teplotě 90°C, poté přidání kvasnic (Instantní práškové droždí, výrobce: Lesafre), kukuřičné mouky (kukuřičná mouka hladká, výrobce: Kukuřičný mlýn Mrzkovice, distributor: prodejna zdravé výživy Harmonia) a cukru (Korunní cukr Krystal, výrobce: cukrovar v Hrušovanech nad Jevišovkou) a vaření dalších 40 minut ve speciálním hrnci. Na konci vaření by do jídel přidán Nipagin (25ml/l). Diety 3,4,5 a 6 byly nalévány při teplotě 37°C do chladnějších vialek kvůli sedimentaci živin (kvasnic a aminokyselin) na dno vialek.

1	160 g yeast; 160 g sugar (1 l water; 6 g agar)(y+; s+; AA-)
2	160 g yeast; 20 g sugar (1 l water; 6 g agar) (y+; s-; AA-)
3	20 g yeast; 160 g sugar (1 l water; 6 g agar) (y-; s+; AA-)
4	20 g yeast; 20 g sugar (1 l water; 6 g agar) (y-; s-; AA-)
5	20 g yeast; 160 g sugar (0,9 l water; 6 g agar; 100 ml AA) (y-; s+; AA+)
6	20 g yeast; 20 g sugar (0,9 l water,6g agar; 100 ml AA) (y-; s-; AA+)

Tab III: Složení 100x koncentrovaného roztoku aminokyselin pro diety v tabulce 2, v gramech na 10 ml mili-Q vody:

L-arginine	0.43g	L-alanine	0.4g
L-histidine	0.21g	L-asparagine	0.27g
L-isoleucine	0.34g	L-aspartate	0.27g
L-leucine	0.48g	L-cysteine3	0.01g
L-lysine	0.52g	L-glutamate	0.42g
L-methionine	0.1g	L-glutamine	0.42g
L-phenylalanine	0.26g	glycine	0.34g
L-threonine	0.37g	L-proline	0.2g
L-tryptophan	0.09g	L-serine	0.29g
L-valine	0.4g	L-tyrosine	0.12g

2.1. Optimalizace

Druhému a třetímu experimentu předcházela optimalizace metody především kvůli změně dodavatele agaru. Agar od dodavatele Serva se přestal vyrábět (Agar Agar Serva, CAS [9002-18-0]) a musel jsem najít jiný agar, jenž by byl pro mé pokusy vhodný. Zkoušel jsem vařit agar od různých výrobců při různých teplotách, v různých koncentracích, různě dlouhou dobu, ve speciálním hrnci, v mikrovlné troubě, na elektromagnetické plotýnce apod. Výsledky byly často značně problematické. Jídlo

bylo buď zdrclé, nebo naopak vyloučilo vodu, nedrželo pohromadě a rozpadalo se následkem čehož se mouchy topily. Při zvýšení koncentrace agaru zas byla vysokonutriční jídla příliš tuhá a larvy se jím nemohly prokousat. Teprve výrobek Amresco (Agar Bacteriological [J637], Bacteriological grade) konečně přinesl očekávaný výsledek ve smyslu konzistence medií.

Dalším krokem v optimalizaci diet byly poměry mezi kvasinkami a cukrem, abychom co nejvíce odlišili metabolické parametry mezi jednotlivými jídly. Cílem bylo nalézt co nejmenší možné hladiny živin, kdy octomilky ještě přežijí a množí se. Zkoušel jsem dávat například 200g kvasnic / 0g, 10g, 15g cukru na 1l vody a obráceně, aby byl rozdíl mezi množstvím kvasinek a cukrů co největší. Nicméně se ukázalo, že úmrtnost larev v nízkonutričních dietách (při obsahu cukru 15g nebo obsahu kvasinek 15g) byla příliš vysoká a rozhodl jsem se tedy pro poměry uvedené výše v tabulce č.2.

Dalším problémem, který bylo nutné řešit, byla sedimentace živin u nízkonutričních diet v receptech bez použití kukuřičné mouky, která zahušťovala medium a diety v prvním experiment nesedimetovaly. Při nalití těchto diet do horkých vialek (podle obvyklého postupu), byly kvasnice a cukr po vychladnutí jen na dně vialky a většinu prostoru zabíral v podstatě pouze agar, jehož výživná hodnota je téměř nulová. Takto připravené diety by neposkytly správné výsledky. Řešením se ukázalo nalévání jídla do chladných vialek při teplotě diet 37°C. Protože jsem do některých diet používal aminokyseliny, musel jsem tyto diety nalévat také chladnější, abych aminokyseliny vysokým teplem nezničil.

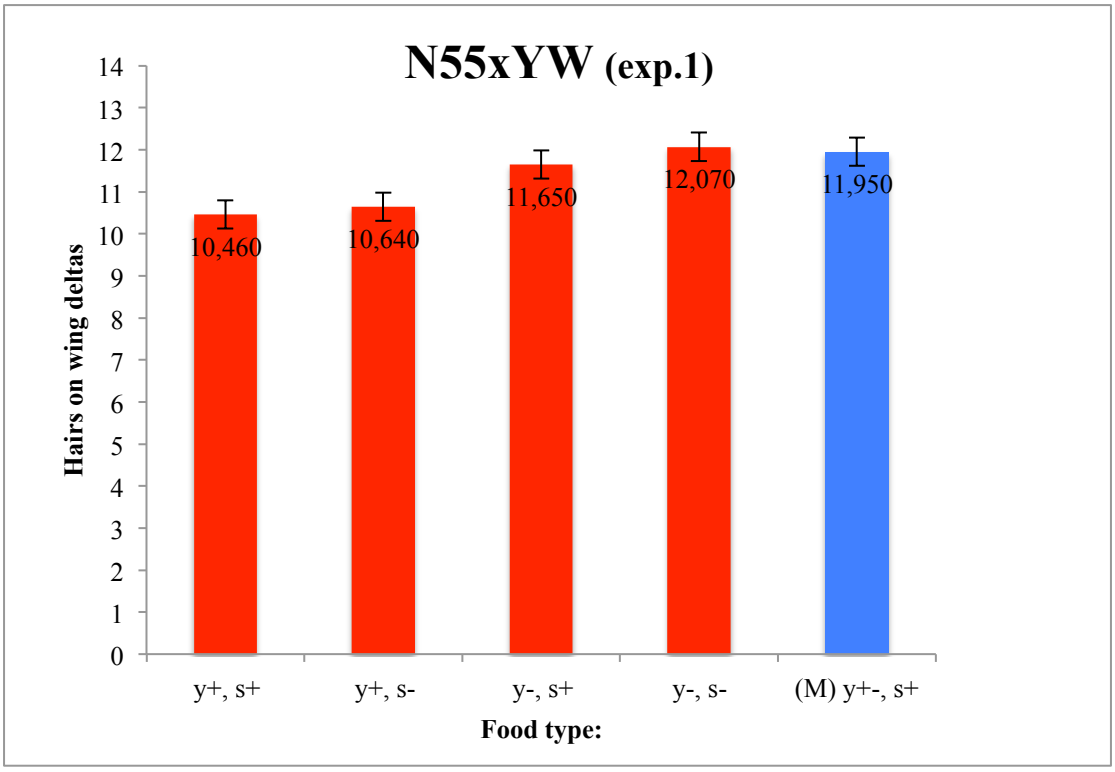
3. Výsledky

Jako hlavní markery při vyhodnocování výsledků experimentů jsem používal počty chlupů v deltách cév L5 na křídlech u octomilek s mutací N^{55e11} a délku cévy L5 u octomilek s mutací H^{2}. Jako doplňkový marker jsem počítal chlupy na thoraxu. V případě markeru v deltách L5 jsem očekával zvýšení počtu chlupů u nízkonutričních jídel a v případě délky cév L5 jsem naopak očekával její prodloužení (tedy zmenšení mezery). Oba trendy vzájemně se projevily pouze u prvního experimentu. Druhý experiment byl poznamenán problémy s optimalizací metody popsané výše a ve třetím experimentu se trend projevil jen v deltách, ale ne už u cév. Při použití aminokyselin jsem očekával návrat fenotypu k hodnotám u

vysokonutričních diet, což se neprojevilo ani u jednoho z experimentů, kde jsem aminokyseliny použil. Pro snazší přehlednost budu uvádět výsledky dle použitých mutací.

3.1. Kvantifikace šířky cévy L5 u N^{55e11}

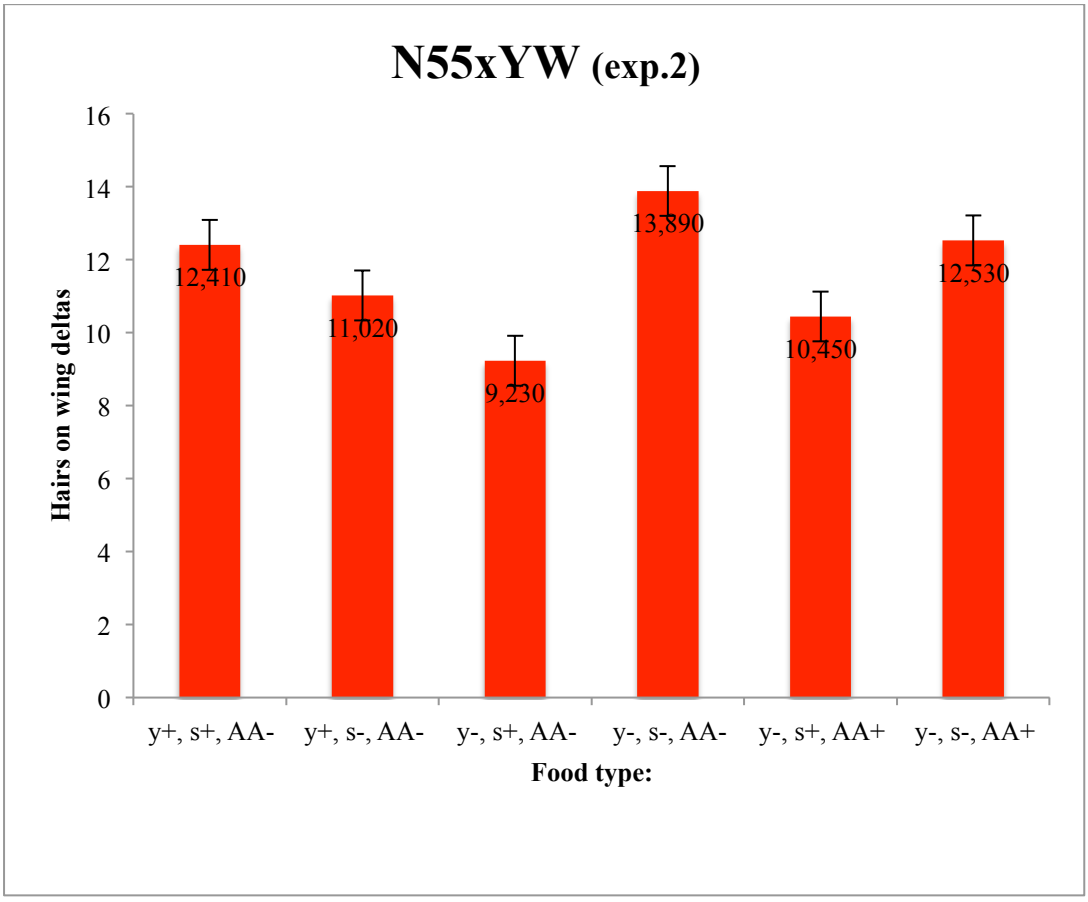
Při kvantifikaci šířky cévy L5 na křídlech octomilek s mutací N^{55e11} se projevil trend k širším deltám a tedy zhoršení Notch mutantního fenptypu octomilek pěstovaných na jídlech s nízkým obsahem kvasinek, a to u prvního a třetího pokusu (obr. 4, 6 a tab. IV, VI). Druhý pokus tyto výsledky nepotrvdil (obr. 5 a tab. V), ale to lze mimo jiné vysvětlit malým počtem much dostupných k analýze. Z třetího pokusu je patrné, že přidání aminokyselin nezvrátilo trend zhoršeného fenotypu a nevrátilo ho na nižší hodnoty jako u jídel obsahující cukr. Možná vysvětlení nastíním v diskusi.



Obr. 4: N55e11, první experiment. Šířka delty L4 na křídlech u octomilky s mutací N^{55e11}. Je patrné zhoršení fenotypu u diet s nízkým obsahem kvasnic.

Tab. IV: Počty křídel analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná šířka L4 delty u mutantů N^{55e11}, první experiment.

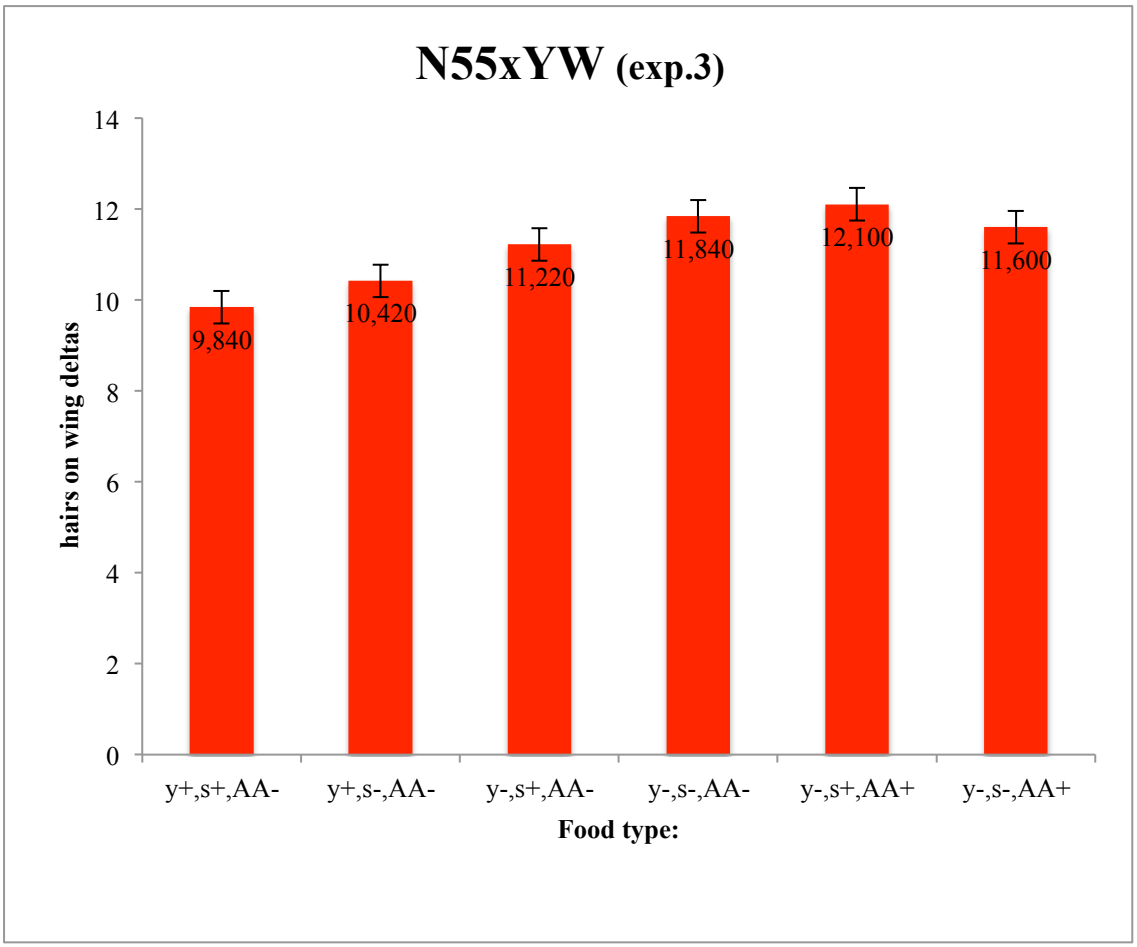
exp.1	Food type	**average**	Flyes no:
(N55xYW)	y+, s+	**10,46**	89
	y+, s-	**10,64**	72
	y-, s+	**11,65**	43
	y-, s-	**12,07**	67
	y+-, s+ MERDES	**11,95**	68



Obr. 5: N^{55e11}, druhý experiment. Šířka delty L5 na křídlech u octomilky s mutací N^{55e11}. Zde se nepodařilo potvrdit trend zjištěný u prvního experimentu.

Tab. V: Počty křídel analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná šířka L5 delty u mutantů N^{55e11}, druhý experiment.

exp.2	Food type	**average**	Flyes no:
(N55xYW)	y+, s+, AA-	**12,41**	28
	y+, s-, AA-	**11,02**	29
	y-, s+, AA-	**9,23**	29
	y-, s-, AA-	**13,89**	17
	y-, s+, AA+	**10,45**	28
	y-, s-, AA+	**12,53**	16



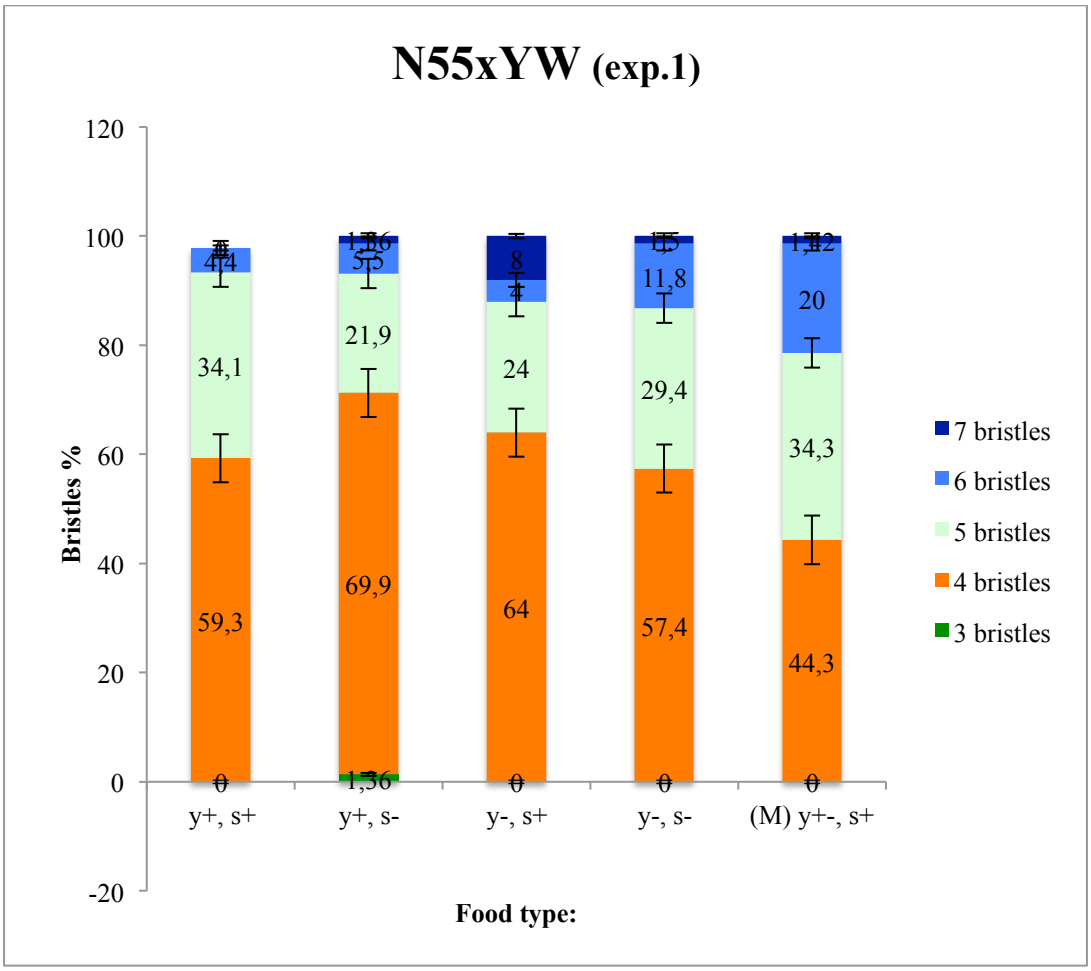
Obr. 6: N^{55e11}, třetí experiment. Šířka delty L4 na křídlech u octomilky s mutací N^{55e11}. Je patrné zhoršení fenotypu u diet s nízkým obsahem kvasnic, ten ale není navrácen na původní hodnotu přídáním aminokyselin.

Tab. VI: Počty křídel analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná šířka L4 delty u mutantů N^{55e11}, třetí experiment.

exp.3	Food type	**average**	Flyes no:
(N55xYW)	y+,s+,AA-	9,84	90
	y+,s-,AA-	10,42	90
	y-,s+,AA-	11,22	90
	y-,s-,AA-	11,84	90
	y-,s+,AA+	12,1	90
	y-,s-,AA+	11,6	90

3.2. Počítání chloupků na thoraxu u N^{55e11}

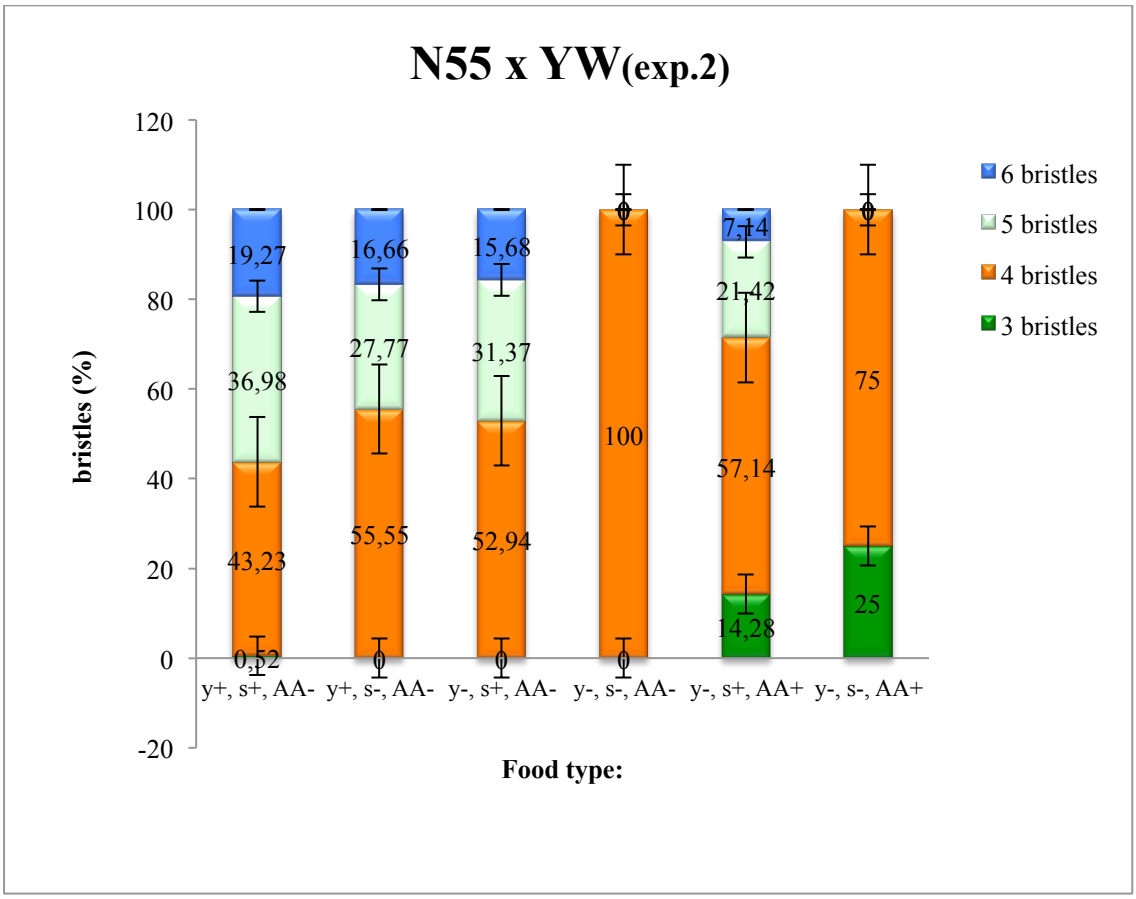
Pro octomilky s mutací N^{55e11} se při počítání chloupků na thoraxu při prvním experimentu dá vysledovat trend nárůstu počtu chloupků na jídlech s nízkým obsahem kvasinek (obr. 7 a tab. VII), tedy mírný nárůst pěti, šesti a sedmi-chlupých octomilek oproti jídlům s vyšším obsahem kvasinek. To by bylo v souladu s výsledky měření fenotypu delt na cévě L5x. Počty počítaných jedinců však byly malé a experiment bylo nutné zopakovat. Jak jsem ale vysvětlil výše, v dalších experimentech jsem mimo jiné musel použít jiný agar a nepodařilo se mi trendy z prvního experimentu potvrdit (obr. 8, 9 a tab. VIII, IX).



Obr. 7: N^{55e11}, první experiment. Procentní zastoupení počtu chloupků na thoraxu u různých diet. U nízkonutričních diet je patrný nárůst pěti, šesti, sedmi-chlupých octomilek oproti poklesu čtyř-chlupých.

Tab. VII: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a počty chloupků na thorax u N^{55e11} fenotypu při prvním experimentu.

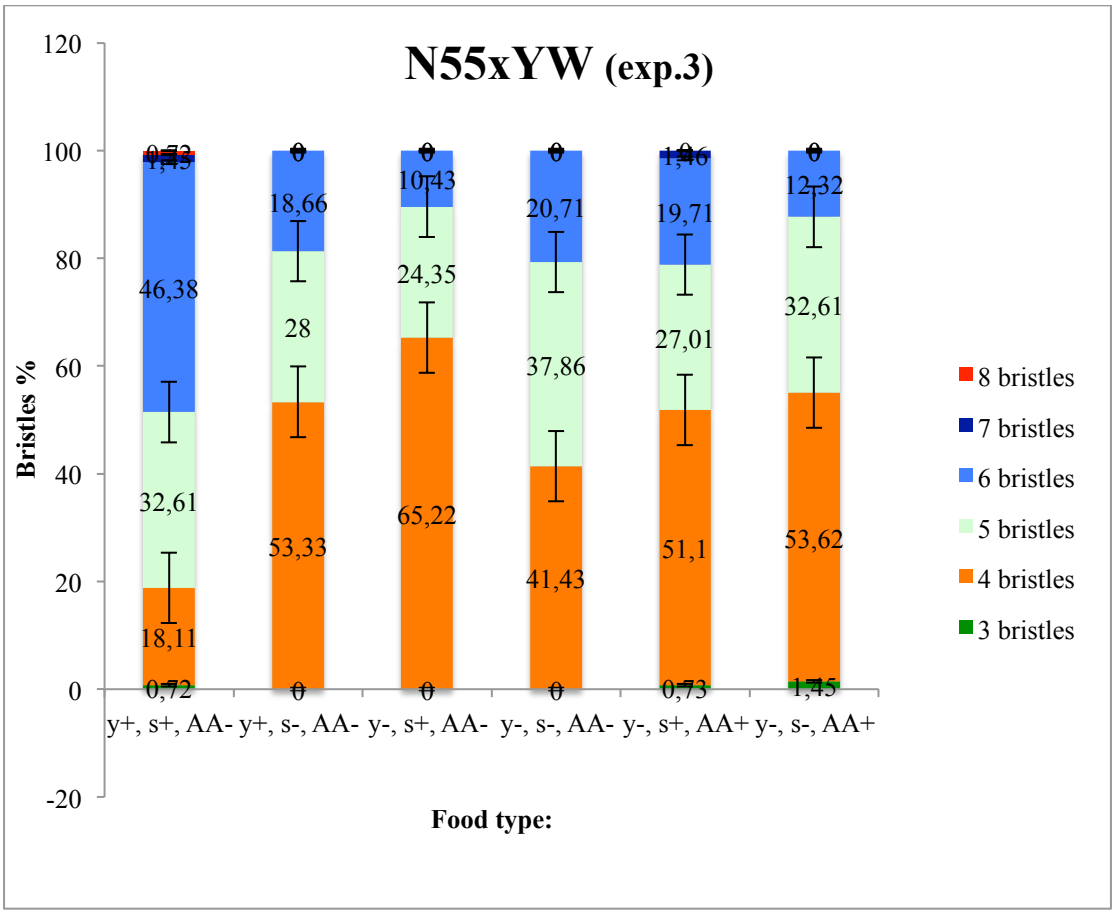
exp.1	y+, s+	y+, s-	y-, s+	y-, s-	y+-, s+
3 bristles	0	1	0	0	0
4 bristles	54	51	16	39	31
5 bristles	31	16	6	20	24
6 bristles	4	4	1	8	14
7 bristles	2	1	2	1	1



Obr. 8: N^{55e11}, druhý experiment. Procentní zastoupení počtu chloupků na thoraxu u různých diet.

Tab. VIII: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a počty chloupků na thorax u N^{55e11} fenotypu při druhém experimentu.

exp.2	y+, s+, AA-	y+, s-, AA-	y-, s+, AA-	y-, s-, AA-	y-, s+, AA+	y-, s-, AA+
3 bristles	1	0	0	0	10	2
4 bristles	83	10	27	9	40	6
5 bristles	71	5	16	0	15	0
6 bristles	37	3	8	0	5	0



Obr. 9: N^{55e11}, třetí experiment. Procentní zastoupení počtu chloupků na thoraxu u různých diet.

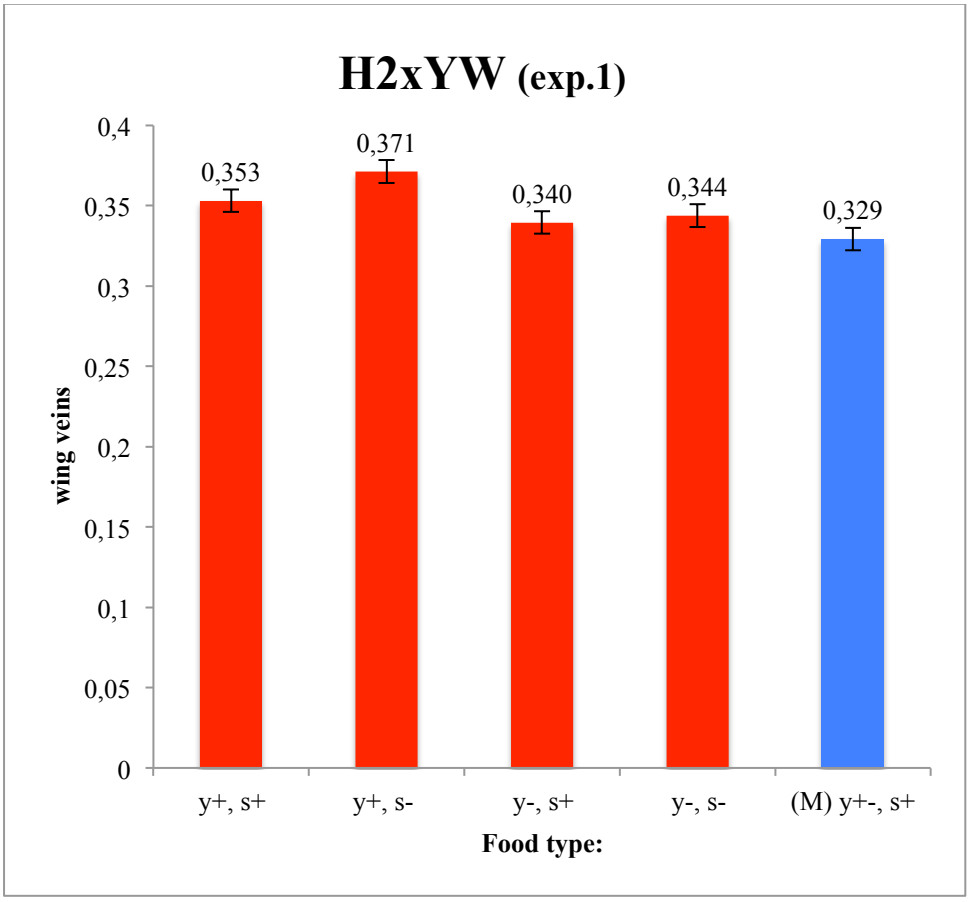
Tab. IX: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a počty chloupků na thorax u N^{55e11} fenotypu při třetím experimentu.

exp.3	y+, s+, AA-	y+, s-, AA-	y-, s+, AA-	y-, s-, AA-	y-, s+, AA+	y-, s-, AA+
3 bristles	1	0	0	0	1	2
4 bristles	25	80	75	58	70	74
5 bristles	45	42	28	53	37	45
6 bristles	64	28	12	29	27	17
7 bristles	2	0	0	0	2	0
8 bristles	1	0	0	0	0	0

3.3. Kvantifikace defektu délky L5 cévy v křídlech H^2

Na křídlech octomilek s mutací H^2 jsem měřil poměr délky nevyvinuté části L5 cévy k délce celé cévy, de facto jsem tedy stanovoval velikost chybějící L5 cévy. Čím více cévy bude chybět, tím došlo k výraznější derepresi Notch genů. V prvním experimentu se zdálo, že na jídlech s nízkým obsahem kvasinek je H^2 fenotyp

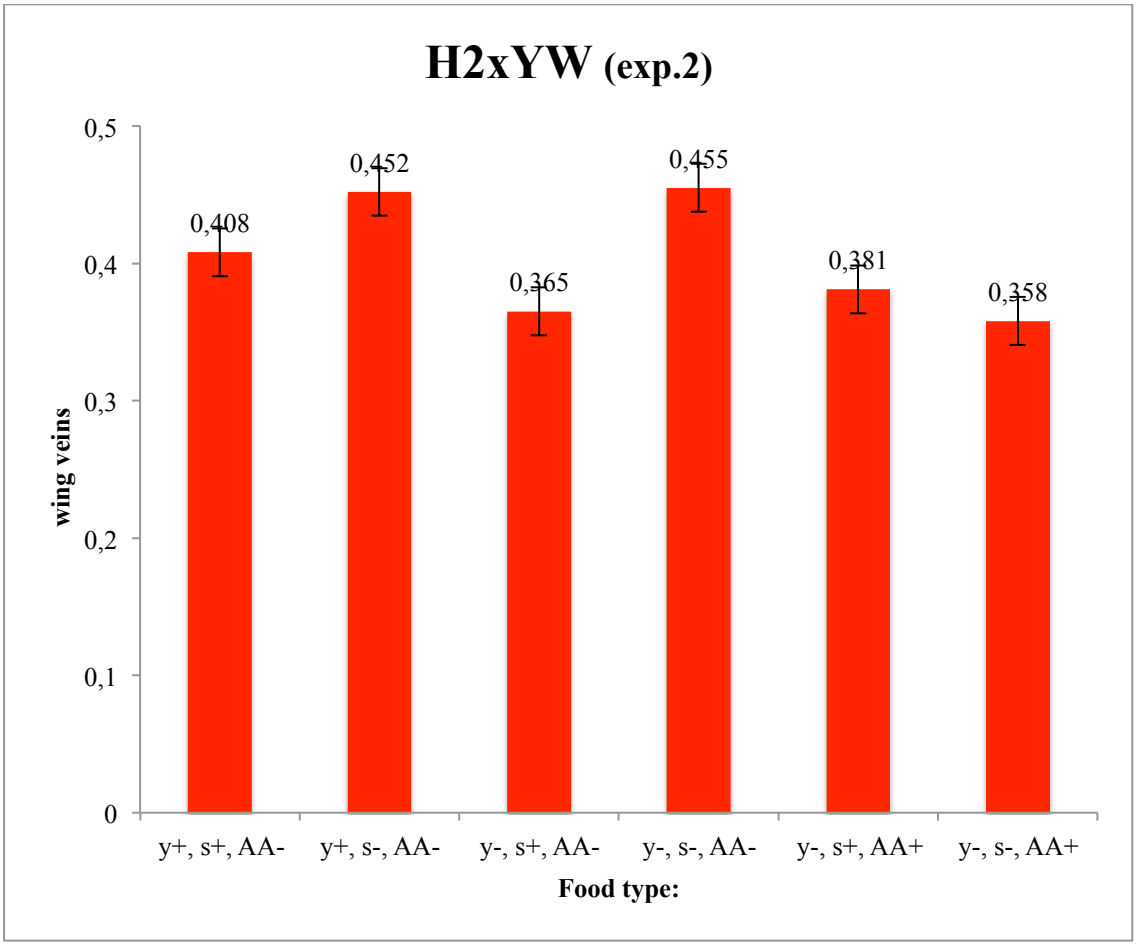
mírnější, tedy nechybí tolik L5 cévy (obr. 10 a tab. X). To by bylo přesně v souladu se zhoršením fenotypu u N^{55e11} mutace na stejných jídlech. Bohužel se mi ale tento trend nepodařilo potvrdit u žádného z dalších dvou opakování pokusu (obr. 11, 12 a tab. XI, XII). Při třetím experimentu jsem ještě zkusil nasadit cross H2 xYW recipročně, tedy obrátit samce a samice (obr. 13 a tab. XIII). Chtěl jsem vědět jestli se něco nemůže změnit kvůli pohlaví jednotlivých fenotypů. Jak se ukázalo, vliv tam není.



Obr. 10: Velikost chybějící cévy L5 při různých dietách u H^2 fenotypu, první experiment.

Tab. X: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná velikost chybějící cévy L5 u mutantů H^2, první experiment.

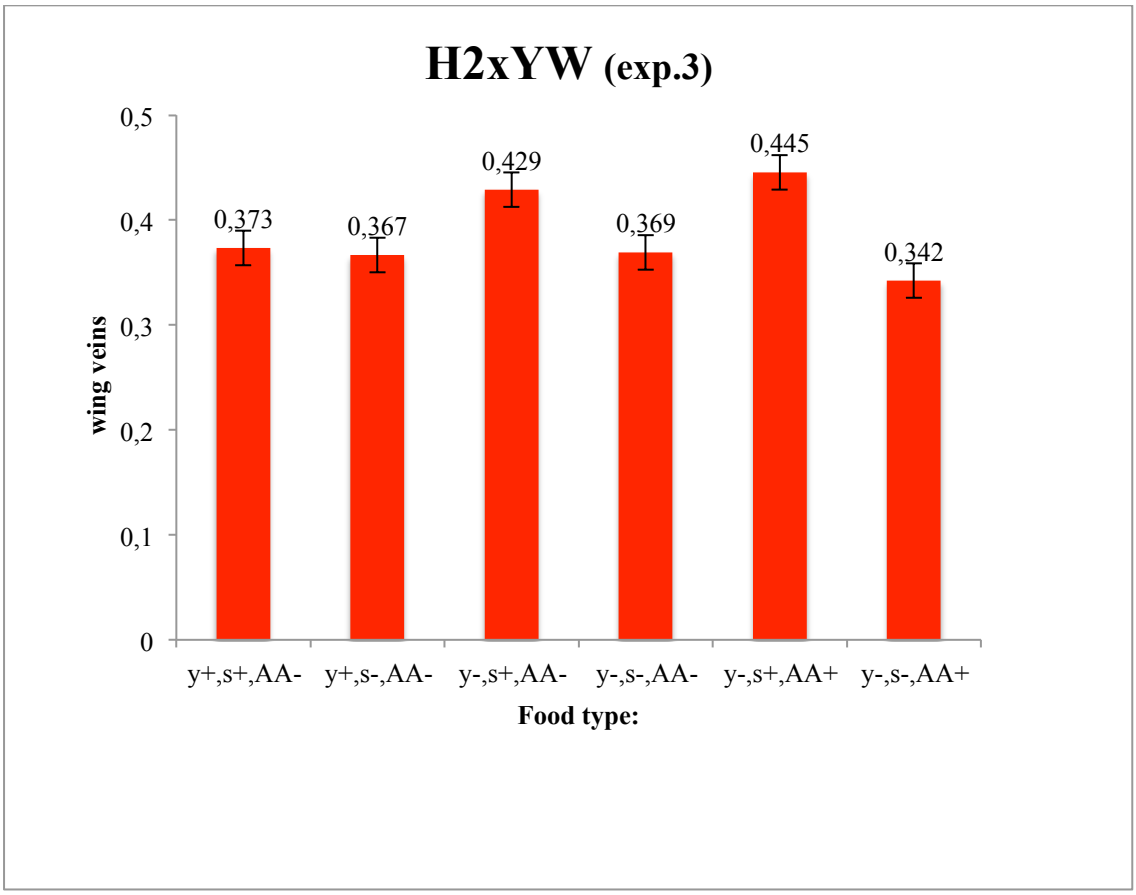
exp.1	Food type	**average**	Flyes no:
(H2xYW)	y+, s+	0,353136483	56
	y+, s-	0,371265591	58
	y-, s+	0,339576207	56
	y-, s-	0,343850861	57
	(M) y+-, s+	0,32932843	59



Obr. 11: Velikost chybějící cévy L5 při různých dietách u H^2 fenotypu, druhý experiment.

Tab. XI: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná velikost chybějící cévy L5 u mutantů H^2, druhý experiment.

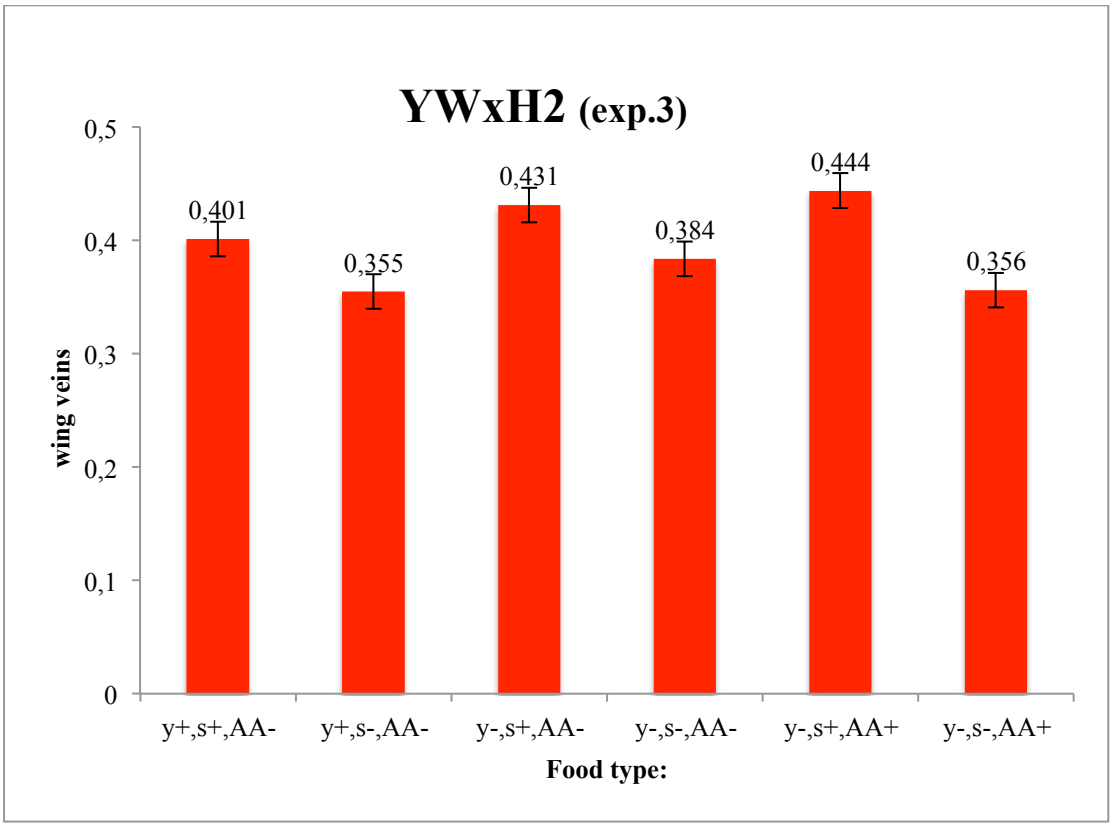
exp.2	Food type	**average**	Flyes no:
(H2xYW)	y+, s+, AA-	0,408	27
	y+, s-, AA-	0,452	28
	y-, s+, AA-	0,365	30
	y-, s-, AA-	0,455	23
	y-, s+, AA+	0,381	29
	y-, s-, AA+	0,358	29



Obr. 12: Velikost chybějící cévy L5 při různých dietách u H^2 fenotypu, třetí experiment. Křížení nasazeno se samičkami H^2 a samečky yw.

Tab. XII: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná velikost chybějící cévy L5 u mutantů H^2, třetí experiment.

exp.3	Food type	**average**	Flyes no:
(H2xYW)	y+,s+,AA-	0,3734198	89
	y+,s-,AA-	0,36652382	89
	y-,s+,AA-	0,42903939	88
	y-,s-,AA-	0,36918435	88
	y-,s+,AA+	0,4454938	89
	y-,s-,AA+	0,3424066	87



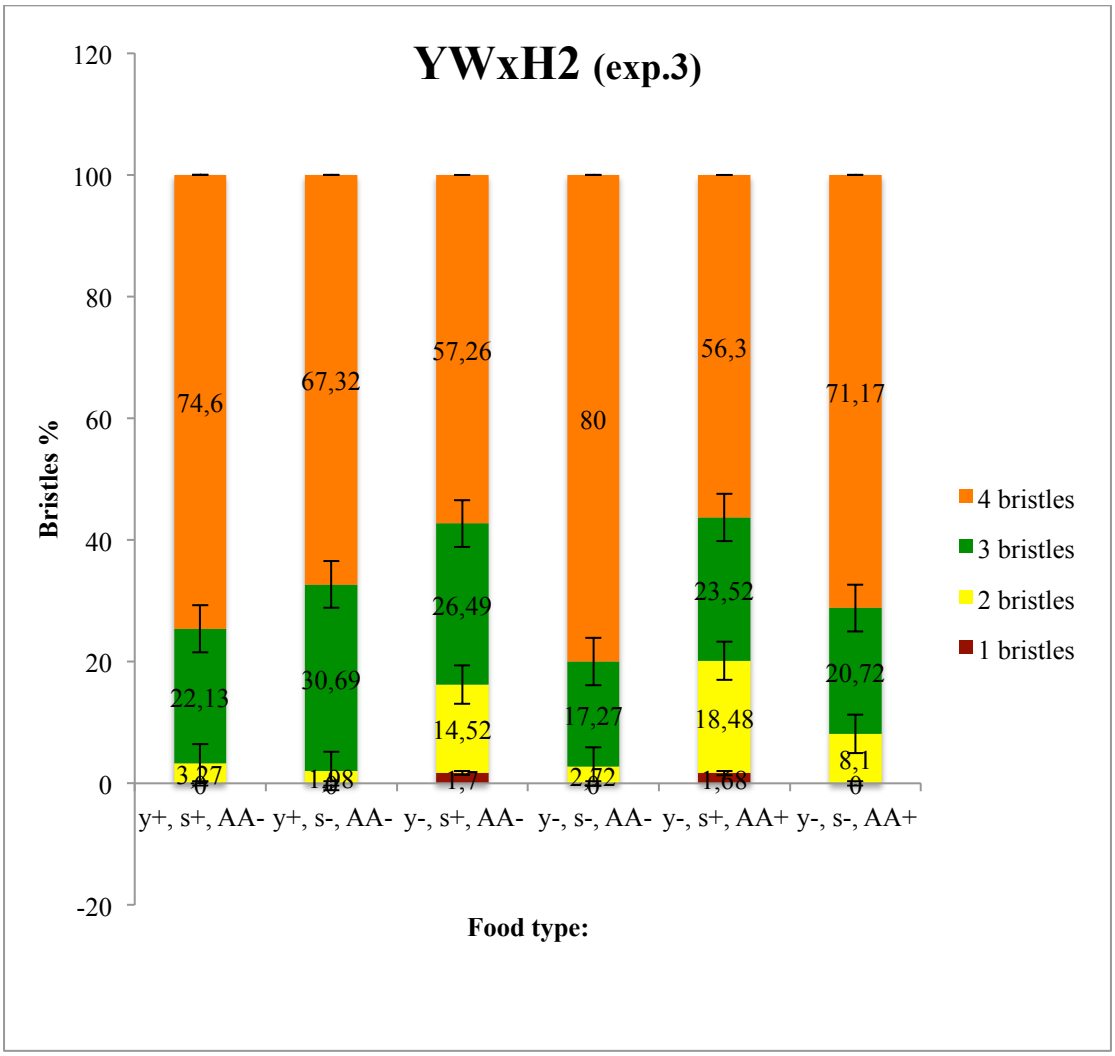
Obr. 13: Velikost chybějící cévy L5 při různých dietách u H^2 fenotypu, třetí experiment. Křížení nasazeno se semečky H^2 a samičkami yw.

Tab. XIII: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a průměrná velikost chybějící cévy L5 u mutantů H^2, třetí experiment.

exp.3	Food type	**average**	Flyes no:
(YWxH2)	y+,s+,AA-	0,40110996	88
	y+,s-,AA-	0,35460308	88
	y-,s+,AA-	0,43105394	85
	y-,s-,AA-	0,38351055	84
	y-,s+,AA+	0,44378526	87
	y-,s-,AA+	0,35608025	81

3.4. Počátání chloupků na thoraxu u H^2

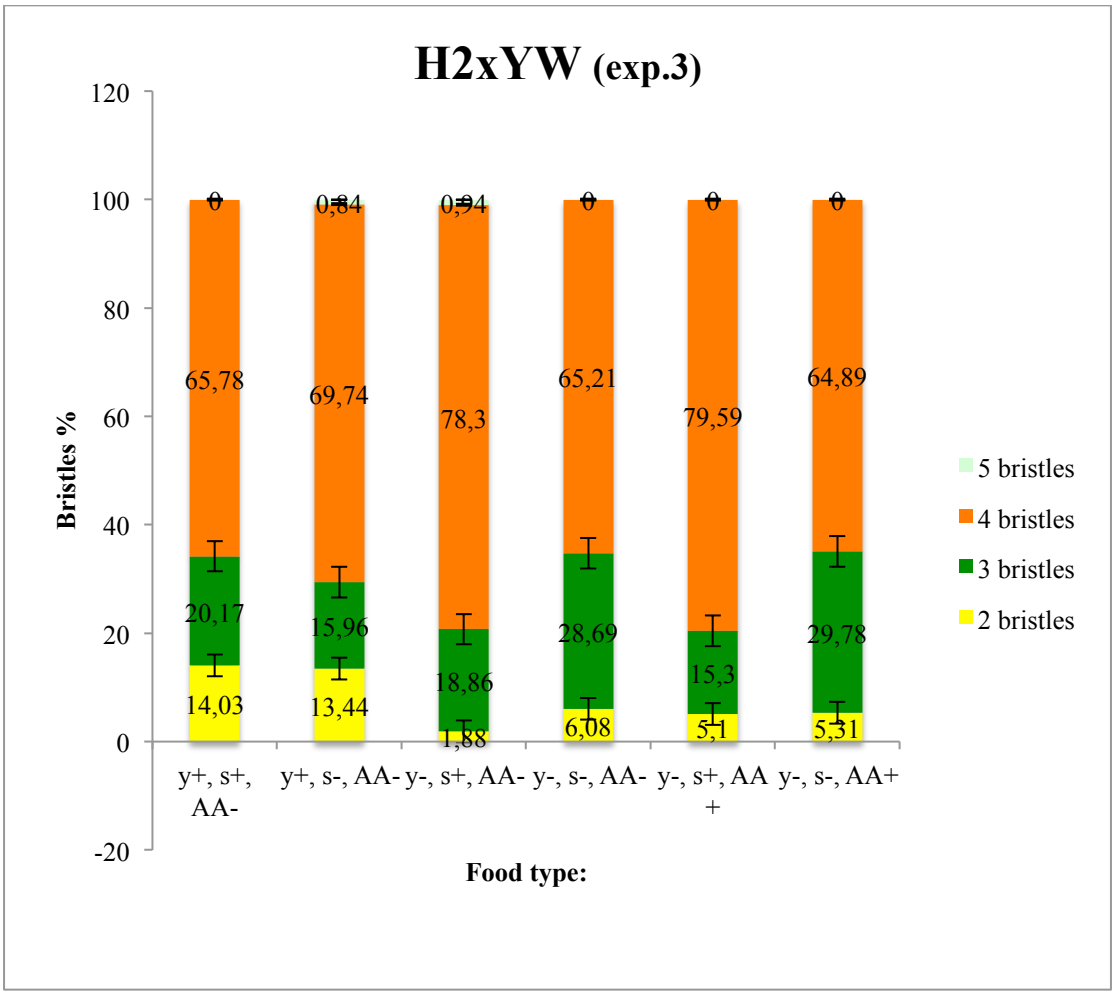
Na octomilkách s mutací H^2jsem při prvním a druhém experimentu chloupky na thoraxu nepočítal. Výsledek třetího experimentu je uveden na obrázku 14 a s recipročním křížením na obrázku 15 (obr. 14 , 15 a tab. XIV, XV).



Obr. 14: Procentní zastoupení počtu chloupků na thoraxu u H^2 na různých dietách, třetí experiment.

Tab. XIV: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a počty chloupků na thorax u H^2 na různých dietách, třetí experiment.

exp.3 (ywxH2)	y+, s+, AA-	y+, s-, AA-	y-, s+, AA-	y-, s-, AA-	y-, s+, AA+	y-, s-, AA+
1 bristles	0	0	2	0	2	0
2 bristles	4	2	17	3	22	9
3 bristles	27	31	31	19	28	23
4 bristles	91	68	67	88	67	79



Obr. 15: Procentní zastoupení počtu chloupků na thoraxu u H^2 na různých dietách, třetí experiment.

Tab. XV: Počty octomilek analyzovaných pro konkrétní diety a počty chloupků na thorax u H^2 na různých dietách, třetí experiment.

exp. 3 (H2xyw)	y+, s+, AA-	y+, s-, AA-	y-, s+, AA-	y-, s-, AA-	y-, s+, AA+	y-, s-, AA+
2 bristles	16	16	2	7	5	5
3 bristles	23	19	20	33	15	28
4 bristles	75	83	83	75	78	61
5 bristles	0	1	1	0	0	0

4. Diskuse

Ačkoliv roli Notch signální dráhy při ontogenezi organismu se věnuje výzkum mnoha vědeckých skupin už po desítky let, ovlivnění této dráhy metabolismem bylo popsáno teprve nedávno a mechanismus této regulace není jasný. Merdes a kol. snížil expresi genů pro glykolýzu pomocí RNAi v křídelních discích octomilky a pozoroval zvýšenou aktivitu Notch reporteru (Siebourg et al. 2012). Guarani a kol. (Guarani et al. 2011) a Muligan a kol. (Mulligan et al. 2011) pak u savců popsali Sir2 protein jakožto negativní regulátor Notch dráhy, který je složkou represního komplexu a podílí se na inaktivaci N^{ICD}. Sir2 protein je deacetyláza histonů a dalších proteinů, která ke své funkci potřebuje vázat NAD+ jako substrát. Může tedy zároveň působit jako metabolický senzor, neboli protein spojující úroveň buněčného metabolismu s regulací transkripce a signalizace. Regulace některých cílových genů Notch dráhy metabolismem minimálně v některých tkáních je tedy nesporná, ale zda se celková úroveň metabolismu na úrovni organizmu může odrazit na kvalitě Notch signalizace během vývoje, zůstává otázkou, na kterou jsem se pokoušel odpovědět v mé bakalářské práci.

V prvé řadě bylo nutné vybrat způsob, jak změnit metabolismus organizmu, abychom dosáhli co největších rozdílu v typu metabolismu a jeho rychlosti. Stejný problém řešili autoři publikací, kteří zkoumali například délku života a plodnost octomilek na různých dietách (Grandison et al. 2009), a proto jsme zvolili jídla podobná těm užitých v těchto experimentech. Jaké metabolické změny se ale přesně dějí v jednotlivých tkáních na různých jídlech, zůstává i tak neznámou. Neexistují totiž reportery schopné měřit rychlost glykolýzy či respirace *in vivo*. Nicméně jsme předpokládali, že na jídlech s vysokým obsahem glukózy a kvasinek (které jsou především zdrojem aminokyselin) bude celkový metabolismus nejrychlejší a na jídlech chudých na obě živiny pak metabolismus pomalý. Jídla s vysokým obsahem cukru a nízkým obsahem kvasinek by měly podpořit vysokou úroveň glykolýzy, na jídlech s vysokým obsahem kvasinek a nízkým obsahem cukrů by glykolýza měla být relativně nízká. Z práce Banerjee a col. je navíc patrné, že méně kvasinek v jídle znamená více aktivity Sir2, což by měl být předpokládaný senzor ovlivňující kvalitu Notch signalizace (Banerjee et al. 2012). Čtyři typy diet, které jsme uvařili, by tedy měly vyvolat různé úrovně metabolismu u larev, které se jimi živily.

Důležitým faktorem, na který jsem dával pozor, byl vysoký počet larev na zkumavku. Pokud by larev bylo příliš mnoho, mohly by přiliš brzo sežrat dané jídlo a déle by už docházelo ke kompetici o zdroje. I tak jsem pozoroval, že ačkoliv nakladených vajíček bylo na všech jídlech vpodstatě stejně, na chudých jídlech (s nízkým obsahem kvasnic, ale i jen s nízkým cukrem) se vylíhlo mnohem méně dospělců než na jídle bohatém na cukry i kvasinky. Larvám na těchto jídlech také trvalo daleko déle, než se zakuklily (o pět až sedm dní). To svědčí o tom, že naše jídla byla dobře připravena a snad tedy opravdu měnila úroveň metabolismu larev. Zajímavé bylo pozorování poměrně vysoké úmrtnosti larev na jídlech s malým obsahem cukru a to ve všech třech experimentech. Zpočátku byly vialky plné larev, ale ty zhruba ve třetím instaru umíraly. Celkově se do stadia kukly nedostala tak třetina larev. Narozdíl od úmrtnosti na chudých jídlech, kde larvy vymíraly spíše v ranných stadiích, larvy na dietě s málo kvasnicemi a hodně cukru umíraly těsně před zakuklením Zdá se, že larvám nevyhovuje tento poměr živin.

Provedl jsem celkem tři experimenty. U prvního z nich se výsledky jevily jako nejnadějnější. Pozoroval jsem zhoršení N^{55e11} fenotypu na jídlech chudých na kvasinky a k tomu komplementární zlepšení fenotypu u H^2 alely. Množství kvasinek čili aminokyselin se tedy jevilo kritické pro správné fungování Notch dráhy *in vivo*. Rozhodli jsme se tedy experiment zopakovat a ještě doplnit o jídla bez kvasinek, ale s dodanými aminokyselinami, které by podle předpokladů měly vrátit fenotypy na původní úroveň.

Ve druhém experimentu jsem ale musel použít jiný agar a jídla neměla vhodnou konzistenci, takže počet vyvinutých dospělcu byl velmi malý a rozdíly ve fenotypech šlo při tak malých počtech jen těžko vysledovat. Podnikl jsem optimalizaci vaření jídel a třetí experiment jsem provedl s kvalitním jídlem a velkým počtem vialek, abych měl zajišteno velké množství dospělců i na chudých jídlech. Přesto se ale slibné výsledky z prvního experimentu nepodařilo zcela zopakovat. U N^{55e11} fenotypu se sice objevil podobný trend, ale H^2 fenotyp zůstal beze změn.

Důvodů, proč moje výslekdy nejsou kozistentní, může být celá řada. Především je třeba si uvědomit, že pozorované rozdíly z prvního experimentu jsou velmi malé. Organizmus má zřejmě regulační mechanizmy, které jsou schopné na nerovnováhy metabolismu reagovat a určitým způsobem jeho dopady tlumit. Ačkoliv odpověď Notch cílových genů na zpomalení glykolýzy v buněčné kultuře je výrazně nižší (viz experimenty s deoxyglukózou, obr. 2), při snaze změnit metabolismus

celého organizmu vliv na Notch signalizaci zdá velmi malý. Možná proto se mi tuto nepatrnou změnu podařilo zachytit v prvním experimentu, ale pak už ne. Svou roli zde možná sehrál typ agaru, který jsem musel u druhého a třetího experimentu změnit a který už není možné koupit. Jídla, která jsme použili, stejně jako autoři několika dalších publikací, obsahují kromě agaru, kvasinek a cukru i kukuřičnou mouku. Nešlo vyloučit, že extrémy metabolismu by byly větší a náš fenotyp výraznější, pokud bychom vynechali kukuřičnou mouku a jídla vařili jen z cukru, kvasinek a agaru. Ve druhém a třetím experimentu jsme to tedy vyzkoušeli, ale jak se z výsledků zdá, kukuřičná mouka žádnou velkou roli nehraje.

V optimistickém závěru bychom mohli tvrdit, že alespoň co se týká kvantifikace šířky L5 delty u N55 alely se nám podařilo dokázat, že při pěstování larev na jídlech bez kvasinek je tento fenotyp výraznější. Rozdíly jsou ale i tak malé a měly by být doprovázené změnami ostatních fenotypových znaků a alel. Problém je především ve špatné reprodukcibilitě experimentů způsobené snahou zachytit velmi malé změny. Ačkoliv na úrovni jednotlivých buněk nebo tkání *in vitro* lze změnu Notch signalizace v závislosti na úrovni metabolismu pozorovat, na úrovni organizmu zdá se fungují mechanizmy, které metabolické změny anebo alespoň jejich dopady mírní. Může to být schopnost zastoupení jiných proteinů z rodiny sirtuinů, nebo jiné deacetylázy, či jiné senzory o jejichž existenci zatím ani nemusíme vědět. Navíc narozdíl od buněčných kultur, kde je prostředí přímo a přesně kontrolované a tyto kultury sestávají pouze z jednoho typu buněk, takto přesnou kontrolu u celého organismu nelze zajistit.

4.1. Budoucí experimenty

I přes částečný neúspěch vidím v mých pokusech stále ještě potenciál pro konečný pozitivní výsledek. Výše popsané tři provedené experimenty ukázaly, jakou cestou by bylo možné se dále ubírat a jak nejlépe využít nasbíraných zkušeností. Myslím, že by bylo vhodné pokusit se zopakovat první experiment s dietami obsahujícími kukuřičnou mouku, protože druhý a třetí experiment ji neobsahoval (kvůli snaze o extrémní rozdíly mezi dietami) a možná je právě toto faktor, který má na výsledný fenotyp vliv. Koneckonců je to jediný experiment s pozitivním výsledkem jak na aktivačním, tak na represorním komplexu. V současné době se tímto experimentem zabývám, do termínu odevzdání této práce však výsledky známy

ještě nebudou. Pokud však ani tento experiment nepřinese kýžené výsledky, budeme muset konstatovat, že vliv diet na Notch fenotyp *in vivo* je skutečně minimání.

5. Závěr

Ačkoliv se výsledky prvního opakování experimentu zdály velice pozitivní, nepodařilo se mi přesvědčivě dokázat, že manipulace množstvím živin má dopad na funkci Notch dráhy *in vivo*. Fyziologická úloha metabolických změn v Notch signalizaci se zdá tedy být minimální. Nicméně na projektu stále pracuji a doufám, že poslední experiment z časových důvodů nezahrnutý do této práce možná přinese příznivější zprávy.

6 . Seznam použité literatury

Arnett, K. L., M. Hass, et al. (2010). "Structural and mechanistic insights into cooperative assembly of dimeric Notch transcription complexes." Nature Structural & Molecular Biology**17**(11): 1312-U1269.

Banerjee, K.K. et al. (2012). "Report dSir2 in the Adult Fat Body, but Not in Muscles, Regulates Life Span in a Diet-Dependent Manner." *CellReports*, 2(6), pp.1485–1491. Available at: http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(12)00394-4 [Accessed November 13, 2013].

Bernard, F., A. Krejci, et al. (2010). "Specificity of Notch pathway activation: Twist controls the transcriptional output in adult muscle progenitors." Development**137**(16): 2633-2642.

Borggrefe, T. and F. Oswald (2009). "The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes." Cellular and Molecular Life Sciences**66**(10): 1631-1646.

Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nature Reviews Molecular Cell Biology**7**(9): 678-689.

Castro, B., S. Barolo, et al. (2005). "Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless." Development**132**(15): 3333-3344.

Delfini, M. C., E. Hirsinger, et al. (2000). "Delta 1-activated Notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis." Development**127**(23): 5213-5224.

Gaiano, N. and G. Fishell (2002). "The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates." Annual Review of Neuroscience**25**: 471-490.

Gibert, J. M. and P. Simpson (2003). "Evolution of cis-regulation of the proneural genes." International Journal of Developmental Biology**47**(7-8): 643-651.

Grandison, R. C., M. D. W. Piper, et al. (2009). "Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in Drosophila." Nature**462**(7276): 1061-1064.

Grandison, R. C., M. D. W. Piper, et al. (2009). "Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in Drosophila." Nature**462**(7276): 1061-U1121.

Guarani, V., G. Deflorian, et al. (2011). "Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase." Nature**473**(7346): 234-238.

Hirsinger, E., P. Malapert, et al. (2001). "Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation." Development**128**(1): 107-116.

Housden, B. E., A. Q. Fu, et al. (2013). "Transcriptional Dynamics Elicited by a Short Pulse of Notch Activation Involves Feed-Forward Regulation by E(spl)/Hes Genes." Plos Genetics**9**(1): 14.

Kopan, R. and M. X. G. Ilagan (2009). "The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism." Cell**137**(2): 216-233.

Kopan, R., J. S. Nye, et al. (1994). "THE INTRACELLULAR DOMAIN OF MOUSE NOTCH - A CONSTITUTIVELY ACTIVATED REPRESSOR OF MYOGENESIS DIRECTED AT THE BASIC HELIX-LOOP-HELIX REGION OF MYOD." Development**120**(9): 2385-2396.

Krejci, A., F. Bernard, et al. (2009). "Direct Response to Notch Activation: Signaling Crosstalk and Incoherent Logic." Science Signaling**2**(55): ra1-ra1.

Le Borgne, R. and F. Schweisguth (2003). "Unequal segregation of neuralized biases notch activation during asymmetric cell division." Developmental Cell**5**(1): 139-148.

Mulligan, P., F. Yang, et al. (2011). "A SIRT1-LSD1 Corepressor Complex Regulates Notch Target Gene Expression and Development." Molecular Cell**42**(5): 689-699.

Robey, E. (1999). "Regulation of T cell fate by Notch." Annual Review of Immunology**17**: 283-295.

Siebourg, J., G. Merdes, et al. (2012). "Stability of gene rankings from RNAi screens." Bioinformatics**28**(12): 1612-1618.

Terriente-Felix, A., J. H. Li, et al. (2013). "Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme." Development**140**(4): 926-937.

Wellen, K. E. and C. B. Thompson (2012). "A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling." Nature Reviews Molecular Cell Biology.

Zhou, Y., J. B. Atkins, et al. (2007). "The mammalian golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis." Cell**129**(1): 163-178.