

**Obor: 04. Biologie**

**Název práce:**

**Dynamika exprese mRNA Sak, Polo kinázy 4, během růstu a zrání prasečího oocyty**

**Autor:**

**Milan Blaha**

**Ročník studia:** druhý  
**Škola:** Havlíčkovo gymnázium Havlíčkův Brod, Štáflova 2063, Havlíčkův Brod 580 01  
**Kraj:** Vysočina  
**Konzultant:** Prof. MVDr. Jan Motlík, DrSc.  
**Místo zpracování:** Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, Rumburská 89, Liběchov 277 21

**Čestně prohlašuji, že jsem všechny své informační zdroje použité v této práci uvedl v seznamu použité literatury.**

## Obsah:

1	Seznam použitých zkratk
2	Abstrakt
3	Poděkování
4	Úvod
4.1	Polo kinázy
4.1.1	Plk1
4.1.2.	Plk2
4.1.3	Plk3
4.1.4	Plk4
4.2	Růst a zrání oocytů
4.3	Cíle práce
5	Metodika
5.1	Izolace totální RNA, RT-PCR, PCR-amplifikace Sak-a cDNA
4.2	Inzerce amplikonu do plazmid. vektoru, transfekce a vlastní sekvenování cDNA
5.3	Real-Time RT-PCR primery
5.4	Sestavení sad oocytů a kultivační podmínky
5.5	Real-Time RT-PCR kvantifikace mRNA
5.5.1	Vytvoření standardní křivky
5.5.2	Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA referenčních genů - primery
6	Výsledky
6.1	Výsledky sekvenace a fylogenetická analýza sekvence
6.2	Dynamika exprese mRNA prasečí Plk4
6.3	Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA prasečí Plk4
6.3.3	Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA referenčních genů
6.3.3.1	Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi $\beta$ -aktinu
6.3.3.2	Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi histonu 2A
7	Diskuse
8	Literatura

## 1 Seznam použitých zkratek

199 M	název kultivačního média, ve kterém se kultivovaly oocyty.
APC	„ <i>anaphase-promoting complex</i> “ nazývaný též „ <i>cyklosome</i> “ – v podstatě mnohahodjednotkový komplex ubiquitinační ligázy E3 nezbytné k degradaci cyklinu B společně s ostatními ubiquitinačními enzymy E1 („ <i>ubiquitin-activating enzyme</i> “) a E2 („ <i>ubiquitin-conjugating enzyme</i> “). E3 hraje klíčovou úlohu v rozpoznání cyklinu B, skrze „ <i>destruction-box</i> “ - sekvenci devíti aminokyselin na N-termelech molekul mitotických cyklinů A a B, jako substrátu pro ligaci ubiquitinů označujících cyklin k rychlé degradaci v proteozomu. APC je fosforylačně aktivován MPF v anafázi, kdy je aktivita MPF nejvyšší, takže je i nejvyšší pravděpodobnost aktivace E3. APC degraduje anafázní inhibitory bránící segregaci sesterských chromatid a iniciuje degradaci cyklinu B, čímž rapidně klesá i aktivita MPF, a tak buňka spěje k cytokinezi, telofázi a terminaci dělení. APC se rovněž podílí na modifikaci některých komponent vřeténka a aktivátorů APC.
AV ČR	Akademie věd České republiky
Bmx	tyrosin kináza z rodiny Tec
Btk	tyrosin kináza z rodiny Tec
c-mos	gen pro MOS
CAK	„ <i>Cdk1-activating kinase</i> “ – komplex cyklinu H a Cdk7
Cdc2	„ <i>cell division cycle 2</i> “ – jiné označení Cdk1
Cdc5	člen rodiny Polo identifikovaný v kvasinkách
Cdc25A	fosfatáza pozitivně ovlivňující aktivitu Cdk4 a Cdk6.
Cdc25C	fosfatáza pozitivně ovlivňující aktivitu Cdk1
Cdk	„ <i>cyclin-dependent kinases</i> “ – na cyklinech závislé kinázy
Cdk1	cyklin-dependentní kináza, která jako MPF indukuje mitózu.
Cdk4	cyklin-dependentní kináza důležitá v G1/S přechodu (společně s Cdk6) interagující s cyklinem D
Cdk6	cyklin-dependentní kináza důležitá v G1/S přechodu (společně s Cdk4) interagující s cyklinem D
Cdk7	cyklin-dependentní kináza 7 interagující s cyklinem H a aktivující Cdk1
cDNA	„ <i>complementary DNA</i> “ – DNA vzniklá reverzní transkripcí mRNA.
c-Fos	transkripční faktor z rodiny Fos, jehož aktivita je indukována Tec.
c-Jun	člen rodiny Jun
CIP	„ <i>Cdk1 inhibitors proteins</i> “ – inhibitory aktivity všech Cdk (patří sem p21, p27, p57)
CSF	cytostatický faktor
dsDNA	dvouvláknitá DNA
C <sub>T</sub>	„ <i>threshold cycle</i> “ cyklus Real-Time RT-PCR, ve kterém fluorescence překročí uživatelem zafixovaný práh.
D45α	označení buněk, ve kterých došlo k buněčné amplifikaci cDNA inzertu.
DNA	„ <i>deoxyribonucleic acid</i> “ – kyselina deoxyribonukleová
dNTP	volné deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty
DrSc.	zkratka akademického titulu doktor věd
E1	„ <i>ubiquitin-activating enzyme</i> “
E2	„ <i>ubiquitin-conjugating enzyme</i> “
E3	„ <i>ubiquitin-ligating enzyme</i> “
E2F	transkripční faktor nutný pro S fázi
Emt	též Itk či Tsk, člen rodiny tyrosin kináz Tec
FCS	„ <i>fetal calf serum</i> “
FG	„ <i>fully grown</i> “ - oocyty, které plně dorostly (prase: průměr 120 μm).
FGF	„ <i>fibroblast growth factor</i> “

Fnk	„ <i>FGF - inducible kinase</i> “, též Plk3 a Prk
Fos	rodina transkripčních faktorů indukovaných PTK, do které patří i c-Fos, podléjící se na transkripci genů nutných pro G1/S přechod a S fázi. Patří sem c-Fos, Fos-B, Fra-1 a Fra-2.
Fra-1	člen rodiny Fos
Fra-2	člen rodiny Fos
FSH	follitropin, hormon stimulující folikuly.
G-proteiny	heterodimerické proteiny, které zprostředkovávají vazbu mezi receptory na povrchu buněk a jinými molekulami podílejícími se na přenosu stimulů z vnějšího prostředí do jádra.
G1	fáze představující největší část buněčného cyklu (kromě buněk, které ztratily schopnost se dělit, ty jsou stále v G0), buňka je diploidní a probíhá intenzivní transkripce. Na počátku G1 dochází k degradaci molekul spojených s mitózou, na konci se buňka připravuje na začátek S fáze a replikaci DNA.
G1/S	restrikční uzel, R-point, START point kvasinek, důležitý kontrolní bod buněčného cyklu, po jehož překonání ustává vliv růstových faktorů a stimulů regulátorů z vnějšího prostředí. V buňce probíhá řada dějů, které v optimálním případě vedou k replikaci DNA.
G2	fáze buněčného cyklu navazující na S fázi, kontrola replikované DNA a příprava na mitózu.
G2/M	kontrolní bod, ve kterém se aktivuje MPF, překonáním nastává mitóza.
GDF9	oocytární parakrinní růstový faktor z rodiny TGF- $\beta$ indukující proliferaci granulózních buněk.
GFP	světélkující protein medúzy <i>Aequorea victoria</i>
GV	„ <i>germinal vesicle</i> “ - zárodečný váček (= jádro oocyty), obsahují její plně dorostlé oocyty transkripčně aktivní se 4C, bez kultivace, tedy ve stádiu, ve kterém se vyskytují v ovariu.
GVBD	„ <i>germinal vesicle breakdown</i> “ – rozpad zárodečného váčku (způsobený především aktivitou MPF)
Ing.	zkratka akademického titulu inženýr
Itk	též Emt či Tsk, člen rodiny tyrosin kináz Tec
IU	„ <i>international unit</i> “ – jednotka
Jun	rodina transkripčních faktorů pozitivně ovlivňující Fos. Do rodiny Jun patří c-Jun, JunB, and JunD .
JunB	člen rodiny Jun
JunD	člen rodiny Jun
kbp	tisíc páru bazí
LB	inokulační médium
LH	luteinizační hormon, stimuluje ovulaci a reinciaci meiózy.
M7528	číslo média 199 M od firmy Sigma Aldrich
M	mitóza
M13rev	primer dodávaný s TA Cloning Kitem společně s T7-primerem
M-I	metafáze I
M-II	metafáze II
MAPK	„ <i>mitogen-activated protein kinase</i> “
Mgr.	zkratka akademického titulu magistr
MOS	kináza nadřazená MAPK, součást CSF
MPF	„ <i>mitosis (případně maturation) promoting factor</i> “, jež je v podstatě komplex Cdk1+cyklin B.
mRNA	mediátorová („ <i>messenger</i> “) RNA
mSak-aLo	název spodního primeru amplifikujícího prasečí Sak (navrženo na myši sekvenci)

mSak-aUp	název horního primeru amplifikujícího prasečí Sak (navrženo na myši sekvenci)
MuLV	reverzní transkriptáza z Moloneyho myšního leukemického viru
MVDr.	zkratka akademického titulu doktor veterinárního lékařství
Myt1	kináza inhibičně fosforylující MPF
oligo-dT	„očka“ nutná pro navázání reverzní transkriptázy na templát a reverzní transkripci
p53	tumor supresorový protein, transkripční faktor pro inhibitory Cdk.
p21	člen rodiny CIP, takže je schopen inhibovat aktivitu všech cyklin-dependentních kináz stejně jako p21, p57, transkripce indukována p53.
p27	člen rodiny inhibitorů CIP, stejně jako p21, p57.
p57	člen rodiny inhibitorů CIP, stejně jako p21, p27.
pb	polo-box - sekvence charakteristická pro Plk
pb1	polo-box 1
pb2	polo-box 2
PBS	fosfátový pufr
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “
PEST	3 sekvence na C-terminu Plk4, jejich význam je spojen s Tec a PTK. Obecně jsou tyto sekvence spojovány s G1/S kontrolním bodem a cykliny kontrolujícími jeho překonání.
PEST1	první PEST sekvence
PEST2	druhá PEST sekvence
PEST3	třetí PEST sekvence
PGC	„ <i>primordial germinal cells</i> “ - primordiální zárodečné buňky, jež vznikají v oblasti extraembryonálního mesodermu a během embryogeneze migrují, přičemž intenzivně proliferují, na místo vzniku budoucích gonád.
Ph.D.	zkratka titulu doktor filozofie
Plk	„ <i>Polo-like kinase</i> “
Plk1	„ <i>Polo-like kinase 1</i> “, savčí analog kinázy Polo
Plk2	„ <i>Polo-like kinase 2</i> “, též Snk
Plk3	„ <i>Polo-like kinase 3</i> “, též Fnk a Prk
Plk4	„ <i>Polo-like kinase 4</i> “, též Sak, Stk18
Plc1	Polo kináza 1 <i>Caenorhabditis elegans</i>
Plc2	Polo kináza 2 <i>Caenorhabditis elegans</i>
Plc3	Polo kináza 3 <i>Caenorhabditis elegans</i>
Plo1	Polo kináza <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Plx1	Polo kináza 1 <i>Xenopus laevis</i>
Plx2	Polo kináza 2 <i>Xenopus laevis</i>
Plx3	Polo kináza 3 <i>Xenopus laevis</i>
Polo	první protein rodiny Polo kináz (Plk) identifikovaný na konci 80. let minulého století u mutace octomilky <i>polo</i> , u mutantů vykazujících morfologické aberace v mitóze i meióze, chybou segregaci chromozomů, poruchy mikrotubulárního aparátu dělicího vřeténka a cytokineze.
Prof.	zkratka pedagogického titulu profesor
PTK	„ <i>protein-tyrosine kinase</i> “, skupina kináz fosforylujících různé proteiny na tyrosinu, čímž mění jejich aktivitu, a ovlivňující expresi genů, a tak přenášejí podměty z vnějšího prostředí do jádra. Bylo identifikováno několik rodin těchto kináz, patří sem i Tec rodina zahrnující Tec, Btk, Itk (též Emt či Tsk), Bmx, a Txk (Rlk).
Prk	„ <i>Polo-related kinase</i> “, též Fnk a Plk3
Rb	„ <i>Retinoblastom protein</i> “, jehož hyperfosforylace je nutná k vyřešení restriktivního uzlu a iniciaci S fáze, neboť jeho hypofosforylovaná forma váže E2F transkripční faktor nutný pro expresi genů spojených s S fází. Rb je fosforylován kinázami Cdk6 a Cdk4 (obě reguluje cyklin D).

RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “ - ribonukleová kyselina
RNase	enzymy štěpící RNA, RNázy
RNDr.	zkratka akademického titulu doktor přírodních věd
Rlk	člen rodiny Tec tyrosin kináz nazývaný též Txk
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
RT1Lo	spodní RT1 primer pro Real-Time RT-PCR kvantifikaci
RT1Up	horní RT1 primer pro Real-Time RT-PCR kvantifikaci
RT2Lo	spodní RT2 primer pro Real-Time RT-PCR kvantifikaci
RT2Up	horní RT2 primer pro Real-Time RT-PCR kvantifikaci
S	S fáze buněčného cyklu
Sak	„ <i>Snk/Fnk-akin kinase</i> “, též Plk4 či Stk18
Sak-a	izoforma A Plk4
Sak-b	izoforma B Plk4
Snk	„ <i>serum inducible kinase</i> “, Plk2
SOČ	Středoškolská odborná činnost
SYBR Green	látka vážící se do dsDNA, fluorescenční reportér pro Real-Time RT-PCR
Stk18	„ <i>serin-threonin kinase 18</i> “, též Plk4 a Sak
T7-primer	primer dodávaný s TA Cloning Kitem společně s M13rev
TaE	elektroforetický pufr
Taq	termostabilní DNA-polymeráza pro PCR
TaqMan	speciálně konstruovaný fluorescenční reportér pro Real-Time PCR
Tec	tyrosin kináza, zároveň rodina PTK, do které patří Tec, Btk, Itk (též Emt či Tsk), Bmx, a Txk (Rlk).
TGF- $\beta$	rodina růstových faktorů, do které patří i GDF9.
UV	ultrafialové záření
Tsk	člen rodiny Tec tyrosin kináz nazývaný též Emt či Itk.
Txk	člen rodiny Tec tyrosin kináz nazývaný též Rlk.
UŽFG	Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR
Wee1	kináza inhibičně fosforylující MPF

Dále byly užity normalizované jednopísmenné a trojpísmenné zkratky proteogenních aminokyselin a jednopísmenné normalizované zkratky bazí nukleových kyselin.

## 2 Abstrakt

Polo kinázy (Plk) představují velice důležitou skupinu regulátorů mitózy, meiózy i buněčné diferenciace, jenž je charakterizována dvěma vysoce konzervativními sekvencemi, polo-boxy (pb1 a pb2). Plk4 (zvaná též Sak či Stk18), která se od ostatních Plk odlišuje přítomností pouze jednoho polo-boxu (pb2) a tří PEST sekvencí, je naprosto nezbytná pro APC-dependentní ubiquitinaci cyklinu B1 v myších postgastrulačních embryích, její precizní regulace během buněčného cyklu je nutná pro buněčný růst a zdárný průběh karyokineze. Podobně jako Plk1 je indikátorem malignity nádorů a proliferační aktivity buněčné populace obecně. Sak má také své uplatnění v p53 regulační dráze. Tato práce přináší parciální sekvenci cDNA pro Sak exprimovanou v prasečím oocytu, analýzy fragmentu proteinu, dynamiku exprese mRNA během růstu a zrání oocytu zjištěnou pomocí Real-Time RT-PCR a efekt  $\alpha$ -amanitinu, inhibitoru RNA-polymerázy II a RNA-polymerázy III, na tuto expresi. Zjištěná sekvence proteinu vykazuje velmi vysokou homologii se známými analogickými proteiny lidoopů, člověka a ostatních savců. Zahrnuje krátký úsek kinázové domény, PEST1 a aminokyselinový motiv analogní k sekvenci, jenž je charakteristická pro izoformu Sak-a člověka. Měření exprese mRNA ukázalo vysoké hladiny během růstových fází, prudký pokles u vzorků GV-oocytů a téměř konstantní hladinu s velmi slabým náznakem pozvolného poklesu během M-I a M-II. Tato exprese indikuje již dříve diskutovanou roli Sak během růstu a zrání oocytů, pravděpodobně spojenou s Tec tyrosin kinázou a rodinou transkripčních faktorů Fos.

## 3 Poděkování

Rád bych tímto poděkoval všem osobám zúčastněným na práci předcházející této SOČ. Má práce by nebyla myslitelná bez obětavé pomoci, důvěry, rady a trpělivosti prof. MVDr. Jana Motlíka, DrSc., jehož odborné i lidské kvality se mi staly nedostižným vzorem, z Laboratoře fyziologie reprodukce Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky v Liběchově, Mgr. Jiřího Klímy, Ph.D. ze stejné laboratoře, paní Ing. Lucie Němcové z Laboratoře vývojové biologie liběchovského pracoviště UŽFG AV ČR, tito tři jsou společně se mnou spoluautory připravované primární publikace, a slečny Venduly Šlechtové z Laboratoře genetiky ryb stejného ústavu. Moje vřelé díky patří samozřejmě samotnému Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, jehož pracoviště a hlavně pracovníci mi umožnili pracovat na této práci. Za dlouhou spolupráci je mou milou povinností poděkovat především pracovníkům Laboratoře fyziologie reprodukce a za neobvyklou ochotu vděčím všem z Laboratoře vývojové biologie, kde probíhala vlastní Real-Time RT-PCR kvantifikace, a Laboratoře genetiky ryb, ve které se Sak-inzert sekvenoval. Zvláště děkuji Petru Šolcovi za neobyčejnou ochotu a pomoc při řešení různých dílčích problémů. Za spolupráci na tomto projektu je mi ctí poděkovat Oddělení struktur a funkce proteinů Ústavu fyzikální biologie Jihočeské univerzity v Nových Hradech, především RNDr. Ruedingeru Ettrichovi, Ph.D. a jeho studentům. Cenné rady též poskytl Ing. Petr Jansa, CSc. z Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze Krči. Za bezchybnou technickou asistenci vděčím Lence Trávníčkové, Patricii Jandurové, Kateřině Opatové a Štěpánovi Hladkému. Mé díky patří pedagogickému sboru Havlíčkova gymnázia v Havlíčkově Brodě, zvláště pak RNDr. Jaroslavu Kocmanovi, RNDr. Květoslavě Růžičkové, PhDr. Marii Kotoulkové a RNDr. Marii Vlkové, za nezištnou všeobecnou pomoc, podporu a radu. Za stejné vděčím i paní Jindřišce Kalinové, Zdence Stejskalové, Petru Kratochvílovi a Dino Hykyšovi. Za podporu též děkuji své rodině.

## 4 Úvod

Studium růstu oocytů a mechanismů jejich meiotické maturace je velmi důležité nejen pro zemědělské a veterinární aplikace, reprodukční medicínu a biologii, ale data jím získaná mají často neocenitelné uplatnění při výzkumu rakoviny a molekulární regulace buněčného cyklu obecně. Prasečí oocyt nám umožňuje více se přiblížit fyziologii lidské somatické buňky či ova než častěji používaný myší model a studovat důležité výzkumné problémy, které nejsme schopni či nesmíme zkoumat na lidských gametách. Kromě toho nám tyto gigantické a snadno synchronizovatelné buňky umožňují studovat funkci často velmi důležitých proteinů přítomných ve stopových množstvích, jež není možno zkoumat na somatických buňkách, neboť je nelze tak dokonale synchronizovat, takže výsledky těchto studií jsou zatíženy velkou chybou vzniklou tím, že byly použity buňky v různých fázích buněčného cyklu. Ze všech uvedených faktů je jasné, že prasečí oocyt je neocenitelným modelem pro studium buněčného cyklu, a proto bylo užito tohoto modelu pro studium exprese mRNA jednoho ze členů rodiny Polo kináz, důležitých regulátorů meiózy, mitózy i buněčné diferenciaci - Plk4.

### 4.1 Polo kinázy

Polo kinázy ("*Polo-like kinases*" - Plk) představují důležitou skupinu serin/threonin na cyklinech nezávislých protein kináz, které jsou naprosto nezbytné pro zdárný průběh buněčného cyklu, diferenciaci či dělení v buňkách všech eukaryotních organismů. [11]

Rodina Polo kináz zahrnuje původní Polo (*Drosophila melanogaster*), podle které byla tato skupina pojmenována [11], Cdc5 (*Saccharomyces cerevisiae*) [6, 30, 11], Plo1 (*Schizosaccharomyces pombe*) [25], Plc1, Plc2 and Plc3 (*Caenorhabditis elegans*), Plx1, Plx2 a Plx3 (*Xenopus laevis*) [28] a savčí proteiny - Plk1 (savčí homolog kinázy Polo octomilky) [1, 2, 3, 11, 22], Plk2 (Snk „*serum inducible kinase*“ identifikovaná u myši a člověka) [21], Plk3 (myší Fnk „*FGF - inducible kinase*“ a lidská Prk „*Polo-related kinase*“) [3, 35] a Plk4 (Sak – „*Snk/Fnk-akin kinase*“) [8, 9, 12, 13, 20, 22, 32, 38].

Všechny Polo kinázy (kromě Sak) jsou charakteristické dvěma polo-boxy (pb1 a pb2), doménami na C-terminu molekuly, které jsou fylogeneticky velmi konzervativní [11, 15]. Tyto polo-boxy lokalizují enzymy v buňce, čímž umožňují jejich správné funkce. Sak, nejméně prozkoumaný protein této rodiny, má však je jeden polo-box (pb2), jež ale plní funkci obou polo-boxů ostatních Plk. Navíc molekula Plk4 obsahuje tři PEST sekvence [8, 9, 12, 13, 20, 22, 32], jež enzym také lokalizují a regulují (prostřednictvím ubiquitinace). Jak prokázaly experimenty provedené na lidském modelu, delece PEST sekvencí vede ke stabilizaci proteinu [8, 38]. Všechny Polo kinázy také charakterizuje kinázová doména na N-terminu [8, 9, 12, 13, 15].

#### 4.1.1 Plk1

Plk1 reguluje progresi buněčného cyklu skrze aktivaci Cdc25C fosfatázy v G2/M kontrolním bodě [1, 2, 3, 11, 22]. Plk1 je tedy nutná pro aktivaci startovního množství aktivované formy



Cdc25C, jež je schopno defosforylovat inhibiční fosforylace cyklin-dependentní kinázy 1 (Cdk1, Cdc2) na Thr-14 a Tyr-15 vytvořené Myt1 a Wee1 kinázami. Plk1 též translokuje cyklin B z cytoplazmy do jádra, čímž umožňuje eventuální aktivaci MPF [1, 2, 3, 11, 22]. Nutná je však ještě aktivující fosforylace Thr-161 vytvořená CAK kinázou, tedy komplexem cyklinu H a Cdk7 [31]. Polo kináza 1 také reguluje mitotickou figuru, maturaci a separaci centrozomů, vytváření a dynamiku dělicího vřeténka [1, 2, 3, 11]. V návaznosti na předchozí fakta je pochopitelné, že byl prokázán klíčový význam Plk1 pro reiniciaci meiózy v savčích oocytech [1]. Konstitutivní exprese vede k nádorové transformaci myších fibroblastů. I z tohoto důvodu lze považovat úroveň exprese Plk1 jako relativně spolehlivý ukazatel malignity nádorů a proliferační aktivity buněčné populace obecně [22].

#### 4.1.2 Plk2

Funkce Plk2 je spojena s buněčnou diferenciací, a proto byla tato kináza nalezena především v tkáních dospělých jedinců, které nejsou proliferačně aktivní, kde plní své fyziologické funkce, jenž zahrnují především regulaci polymerizace (společně s Plk3) mikrotubulů neuronů. Plk2 má však své místo i v řízení buněčného cyklu a normální embryogenezi, neboť myší fibroblasty, u kterých byla Plk2 cíleně eliminována metodou Gene Knockout, rostou mnohem pomaleji než buňky Plk2+/+. U Plk2-/- embryí bylo prokázáno značné zpomalení ontogeneze [21].

Bylo také zjištěno, že Plk2-/- fibroblasty jsou morfologicky značně odlišné od normálních buněk, což jasně ukazuje i na důležitou cytoskeletální roli Plk2, jenž je charakteristická i pro Plk3. Problematické překonání restriktivního uzlu, G1/S kontrolního bodu, u Plk2-/- buněk indikuje spoluúčast této kinázy na aktivaci Cdc25A fosfatázy [21].

Zajímavé jsou studie, které interpretují Plk2 jako cílový gen při aktivaci p53 proteinu, což je velmi známý a důležitý tumor-supresorový gen/protein, jehož poškození je detekováno cca v 50% maligních nádorů. V případě poškození DNA a aktivace p53 tento transkripční faktor iniciuje nejen transkripci CIP skupiny inhibitorů, ale mimo jiné i transkripci mRNA pro Plk2, jenž má stabilizovat dělicí vřeténko, například před účinky nocodazolu a paclitaxelu (taxolu), přičemž je její úloha nesmírně důležitá a nelze ji nijak nahradit. Nicméně tyto výsledky stále zůstávají ve stádiu diskusí a problematika není v žádném případě rozpracována na takovou úroveň, abychom mohli přijmout jasný závěr. [21, 32]

#### 4.1.3 Plk3

Stejně jako Plk2 je Polo kináza 3 orientována spíše na diferenciaci, což se jasně projevuje v G2/M kontrolním bodě, kde fosforylací na Ser-216 inhibuje aktivitu Cdc25C fosfatázy, čímž zamezí aktivaci MPF [35]. Plk3 se ale také podílí na organizaci dělicího vřeténka, je nezbytná pro správnou migraci zdvojených centrozomů, regulaci dynamiky mikrotubulů a cytoskeletu, což téměř jednoznačně určuje lokalizace tohoto proteinu na výše uvedené mitotické struktury [3]. Polo kináza 3 reguluje společně s Plk2 polymerizaci, respektive depolymerizaci, mikrotubulů i v procesu diferenciaci nervových buněk. [3, 21, 35]

#### 4.1.4 Plk4

Plk4, nazývaná též Sak či Stk18, je nejméně prozkoumaným proteinem této rodiny. Všechny dostupné předchozí studie, kterých je minimum, se zaměřují na lidskou či myší Sak a nikdo doposud nestudoval tuto kinázu na prasečím modelu. Navíc je třeba zdůraznit, že na výše uvedených modelech byla zjištěna jen základní data.

Myší *sak* gen, situovaný na proximálním rameni chromozomu 3 (lidský na 4q28), kóduje dvě izoformy, Sak-a a Sak-b. Alternativní sestřih (v oblasti exonů 5 a 6) způsobuje, že výsledný Sak-a protein má 925 aminokyselinových zbytků a molekulovou hmotnost 103,88 kDa, zatímco Sak-b představuje formu se 464 zbytky a molekulovou hmotností 52,67 kDa, přičemž prvních 416 aminokyselinových zbytků mají oba proteiny naprosto identické, dále se liší. Sak-a dále obsahuje dalších 509 zbytků a Sak-b jen 48 [9, 12, 13, 15, 32, 38]. Homologní úseky N-terminu obsahují kinázovou doménu. Jako zajímavý je třeba považovat fakt, že C-konec obsahuje velmi důležité motivy a domény (pb) nutné pro funkci enzymu [9, 12, 13, 15, 32, 38]. O fyziologické úloze Sak-b není nic známo a pouze se předpokládá, že je odlišná od funkce Sak-a [8]. V každém případě byly oba transkripty, Sak-a i Sak-b, detekovány v proliferujících buňkách dospělých organismů a embryonálních tkáních, přičemž mRNA pro Sak-a je více abundantní. [8, 9, 13]

Jak již bylo řečeno, u myši jsou Sak-a protein i mRNA ve velkém množství obsaženy v proliferujících a meioticky aktivních tkáních, nejvíce v testes, embryonálních tkáních a tumorech během S-G2-M fází buněčného cyklu, takže se lze důvodně domnívat, že Plk4 sehrává svoji fyziologickou roli právě v buněčné proliferaci a meióze [8, 9, 12, 13], jak indikuje její lokalizace v buňce. Metodou GFP proteinu byla v myších embryonálních buňkách Sak-a lokalizována v nukleolu během G2 fáze a G2/M kontrolního bodu, na centrozomech v mitotické profázi, během anafáze je rozptýlena po celé buňce (kolokalizována s tubulinem) a v telofázi v mitotické rýze [12], přičemž byla v rané G1 fázi ubiquitinována a následně degradována v proteozomu [8, 12]. V rané G1 fázi není detekovatelná ani mRNA pro Sak (obě formy).

Byla publikována i data získaná předchozími Northern a *in situ* RNA-hybridizacemi na myším modelu, které ukázaly, že exprese Sak-a koreluje s meiotickou či mitotickou aktivitou. V tkáních myši je Sak exprimována v hematopoetických buňkách, v buňkách sleziny, brzlíku, střední výstelky, granulózních buňkách vyvíjejícího se folikulu a v růstovém regionu folikulu vlasového. Výsledky *in situ* RNA-hybridizace indikují také vysoké hladiny Sak mRNA ve spermatocytech a oocytech představujících objekt zájmu této práce. Myší oocyty získané pomocí superovulace účinkem gonadotropinu v různých fázích oogeneze vykazují vysoké hladiny Sak mRNA. Nicméně doposud publikované práce neuvádějí, o jaké růstové fáze se jedná ani žádná přesná data. [9]

Sak-a je také nezbytná pro APC-dependentní degradaci cyklinu B v myších postgastrulačních embryích, a proto bylo v embryích s Plk4<sup>-/-</sup> pozorováno množství velkých apoptických buněk neschopných dekonenzovat chromatin, tedy dokončit dělení, k čemuž je degradace cyklinu nezbytná [12]. Sak-a je také v počátku G1 fáze degradována právě díky APC [8].

Experimenty na lidských leukocytech indikují, že Sak-a pravděpodobně sehrává i určitou roli v PTK-signální dráze [38], neboť je Sak spojena s Tec, cytoplazmatickou tyrosin kinázou, jenž je

aktivována receptory cytokinu, povrchovými antigeny lymfocytů, receptory spojenými s heterodimerickými G-proteiny, a je zapojena do mnoha dějů, na kterých se tato tyrosin kináza účastní. Tec je efektozem Sak [32, 38], neboť indukuje její expresi a také tento protein stabilizuje, protože jej fosforyluje, čímž se mění jeho konformace. Tec tak maskuje PEST sekvence, přičemž vymizením PEST není Sak možno ubiquitinovat [8, 38], takže je detekovatelná pouze v přítomnosti Tec [38]. Tec indukuje aktivitu c-Fos transkripčního faktoru, který je společně s Jun rodinou nezbytný pro děje předcházející překonání restričního uzlu a uvolnění E2F z inhibičního vlivu hypofosforylovaného Rb proteinu, tedy především pro transkripci mRNA G1-specifických cyklinů (hlavně cyklin D1, D2, D3) [4, 17, 33]. Inaktivace genu c-fos inhibuje buněčný růst [4, 17, 33, 39]. Spojitost Sak-a s Tec podporuje i fakt, že byla společně imunoprecipitována s dvěma proteiny (43 kDa a 190 kDa), které mohou být její potenciální substráty, případně s ní být úzce svázány [8], přičemž jeden z nich je pravděpodobně právě Tec [38]. Spojitost Sak s G1/S kontrolním bodem indikuje samozřejmě i přítomnost PEST sekvencí, jež se vyskytují v proteinech spojených s terminací G1 fáze a s restričním uzlem, neboť i skrze PEST sekvence probíhá regulace jejich aktivity proteiny spojenými s receptory na povrchu buňky (PTK) [8, 38].

Konstitutivní nadměrná exprese Sak-a inhibuje buněčný růst a přesná regulace funkce Sak-a je z tohoto hlediska naprosto nezbytná. Delece ATP-vazebného místa Sak inhibuje negativní efekt na růst buněk, což značí, že kinázová aktivita Sak-a se projevuje právě takto. Sak- a je též nutná pro zachování integrity buněčného jádra, konstitutivní exprese Sak indukuje multinukleaci, a regulaci mitotických struktur během buněčného dělení, především během anafáze. Nadměrná exprese Sak-a nezastavuje buněčný cyklus v žádné specifické fázi. [8, 32]

V poslední době je také diskutován i možný efekt Sak-a na p53 v procesu karcinogeneze [8, 22, 32], přičemž abnormální dynamika během buněčného cyklu či nadměrná exprese Sak-a může tento proces indikovat (podobně jako Plk1). Sak-a byla společně s Plk1 (na úrovni mRNA) studována na lidských kolorektálních nádorech pomocí Real-Time RT-PCR, metodou užitou i v této práci, a bylo zjištěno, že hladina exprese Sak nekoreluje se stádiem nádoru, ale s věkem pacienta, přičemž je u starších pacientů více abundantní [22, 32]. Působení Sak-a na p53 má též spojitost s kontrolou duplikace centrozomů, na které se v myších fibroblastech p53 podílí, neboť vymizení aktivity p53 vede k mnohonásobné duplikaci centrozomů, jenž je způsobována též konstitutivní, neregulovanou, expresí Sak-a [8, 32]. Je též velice pravděpodobné, že se Plk4 podílí i na regulaci dalších mitotických struktur, zvláště v anafázi. Vymizení aktivity p53 způsobené Sak-a také vysvětluje spojitost tohoto proteinu s rakovinným bujením.

## 4.2 Růst a zrání oocytů

Vzhledem k použitému modelu prasečího oocytu považuji za vhodné osvětlit alespoň základní údaje týkající se růstu a meiotické maturace savčích oocytů.

U savců lze za počátek oogeneze považovat již embryonální vývin, kdy z primordiálních zárodečných buněk (PGC) vzniká velké množství oogonií. To je však v sedmém měsíci gravidity redukováno, přičemž zbývající oogonie vstupují do prvního meiotického dělení, kterým se z nich stávají transkripčně aktivní 4C oocyty obklopené jednou vrstvou granulózniích buněk na bazální lamině. Tento útvar je nazýván primordiální folikul. Tyto oocyty tvoří zásobu zárodečných

buněk pro celé reprodukční období samice, což také znamená, že jejich počet je konečný a nelze jej v dalším období života zvětšovat. [1, 31]

Pravidelně vstoupí určitá skupina primordiálních folikulů do růstové fáze, jenž je charakteristická zvětšením velikosti oocyty (u prasete se jedná o zvětšení průměru z 30  $\mu\text{m}$  na 120  $\mu\text{m}$ ), které je nutné pro následující meiotické zrání a raný embryonální vývoj. Tento děj je doprovázen intenzivní transkripcí, translací, syntetickými reakcemi a vznikem nových organel. Současně intenzivně proliferují granulózní buňky. Tato proliferace je dependentní na oocytárním parakrinním růstovém faktoru GDF9 z rodiny TGF- $\beta$ . Musíme si však uvědomit, že i folikulární a kumulární buňky sekretují růstové a diferenciační faktory nutné pro růst folikulu a vývoj cév zajišťujících jeho krevní zásobení. [1, 31]

V posledním stádiu folikulogeneze plně dorostlý („*fully grown*“ - FG) oocyt v Graafově folikulu získává meiotickou kompetenci, což je schopnost reagovat na hormonální stimul a znovu zahájit meiózu, a může být stimulován zvýšením hladiny luteinizačního hormonu („*LH-peak*“). To vede k ovulaci a reiniciaci meiózy a v důsledku kondenzace chromatinu k ukončení transkripční aktivity. [1, 31]

Důležitým mikroskopickým indikátorem je rozpad zárodečného váčku - GVBD („*germinal vesicle breakown*“) - způsobený aktivitou MPF, který je společně s MAPK („*mitogen-activated protein kinase*“) aktivovanou kolem doby aktivace MPF (dle druhu organismu), klíčový pro meiózu. MPF zůstává aktivní až do anafáze prvního meiotického dělení, kdy dochází k jeho přechodnému poklesu. V metafázi II je opět aktivní, což trvá až do aktivace oocyty při oplození. Tento metafázi II arrest je způsoben především cytotatickým faktorem (CSF), jež je složen hlavně z MOS (protein, jenž je produktem genu *c-mos*) a MAPK. CSF zabráňuje degradaci cyklinu B (fosforylačně inhibuje APC) a udržuje MPF aktivní (= neschopnost terminace dělení). Časový interval od znovuzahájení meiózy až do M-II arrestu je označován jako zrání oocytů. [1, 31]

### 4.3 Cíle práce

Tato práce, která se jako první zaměřuje na prasečí Sak, přináší základní data o Plk4, jenž je exprimována v prasečím oocyty, doposud neznámou sekvenci prasečí parciální cDNA pro tento protein, genetickou a fylogenetickou analýzu sekvence prasečí Plk4 kódovanou touto cDNA, dynamiku exprese v průběhu růstu a maturace oocyty a efekt  $\alpha$ -amininitinu (= amatoxin vytvářející pevný komplex s RNA-polymerázou II v poměru 1:1 a slabší komplex s RNA-polymerázou III, takže specificky blokuje jejich elongační krok, čímž působí jako inhibitor syntézy RNA) na tuto expresi. Dynamika exprese byla studována na vzorcích rostoucích oocytů mechanicky izolovaných z antrálních folikulů s průměrem 0,5 mm a 1,0 mm, což představuje po řadě oocytů s průměrem 80  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ , časnější stádia nebyla studována, protože je nelze mechanicky izolovat, pouze velmi složitě enzymaticky, a na FG oocyttech izolovaných též mechanicky z folikulů s průměrem 3-5 mm, v GV, M-I a M-II. FG oocytty mají 120  $\mu\text{m}$  v průměru.

## 5 Metodika

### 5.1 Izolace totální RNA, RT-PCR, PCR-amplifikace Sak-a parciální cDNA

Protože sekvence cDNA prasečí Sak kinázy nebyla známa, bylo osekvenováno přibližně 1,1 kbp a tato sekvence byla použita k návrhu primerů pro Real-Time kvantifikaci mRNA. Pro PCR amplifikaci Sak cDNA, která, jak bude uvedeno, byla získána reverzní transkripcí totální RNA oocytů, bylo tedy třeba navrhnout primery na sekvenci cDNA Polo kinázy 4 jiného organismu. Bylo užito myší Sak-a cDNA sekvence volně přístupné na serveru [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov), ze kterého pocházejí všechny sekvence genomické i cDNA, proteinů a další informace, a díky programům BLAST a Oligo6, které byly užity k návrhu všech primerů zmiňovaných v této práci, byl zakoupen následující pár primerů:

Název	Sekvence primeru	T <sub>m</sub>	Délka prod. (báze)
mSak-aUp	5' AGGACCTTATCCACCAGTTACTTC 3'	65,4 °C	1077
mSak-aLo	5' AGCTGTACCTACTGATGTTGTCAG 3'	63,2 °C	

**Tabulka 1 - Sak-primery navržené na myší sekvenci**

Aby bylo možno otestovat navržené primery, byla izolována pomocí RNeasy Mini Kit® (firma QIAGEN), protocol for animal cells, totální RNA z 300 prasečích GV oocytů (kolonka byla eluována 300 µl sterilní vody pro PCR) a provedena reverzní transkripce, RT. Reakční mixy (2 zkumavky po 20 µl) pro RT-reakci obsahovaly 11 µl RNA-templátu (odpovídá 11 oocytům), 2 µl RT-pufu (výrobce: Perkin-Elmer), 2 µl 50 mM roztoku MgCl<sub>2</sub> (Invitrogene; hořčičnaté kationty jsou nezbytné pro funkci enzymů), 2 µl 10 mM roztoku dNTP (Invitrogene), 20 IU RNase inhibitoru (Applied Biosystems), 1 µl 50 µM roztoku oligo-dT (Sigma Aldrich) nebo 1 µl 50 µM roztoku random hexamerů (Applied Biosystems; jeden mix samozřejmě jen s hexamery, druhý jen s oligo-dT) a po annealingu bylo přidáno 50 IU MuLV reverzní transkriptázy Moloneyho myšího leukemického viru (Applied Biosystems). Program termocyklátoru Biometra T3, na kterém byly provedeny všechny PCR a RT reakce v této práci zmíněné, byl následující: 65°C po 5 minut, 25°C - 10 minut (annealing hexamerů, přidání MuLV reverzní transkriptázy), 42°C po dobu jedné hodiny, 72°C po 5 minut (tepelná inaktivace MuLV, jejíž tepelné optimum je 37°C) a závěrečné chlazení na 10°C.

Produkt RT-reakce byl ihned užít jako templát pro PCR s navrženými Sak primery. Byly provedeny dvě PCR po 20 µl, jedna s templátem z RT-reakce s oligo-dT a jedna z reakce s hexamery. PCR mix: 2,0 µl templátu, 2,0 µl PCR-pufu (Invitrogene), 0,6 µl 50,0 mM roztoku MgCl<sub>2</sub> (Invitrogene), 0,1 µl z 100,0 µM roztoků každého primeru (Invitrogene), 0,5 IU Taq polymerázy, 0,4 µl 10 mM roztoku dNTP (Invitrogene), 17,0 µl PCR-vody; PCR-program na Biometra T3 termocyklátoru (35 cyklů): 94°C po dobu 15 sekund, 60°C - 30 sekund, 72°C - 75 sekund; finální fáze - 72°C - 5 minut. Produkt PCR byl elektroforeticky rozdělen na 1,0 % agarózovém gelu (úzké jamky) obsahujícím 0,2 µg/ml ethidium bromidu, přičemž byl další ethidium bromid ve stejné koncentraci doplněn do elektroforetického TAE-pufu, aby se eliminovaly účinky toho, že ethidium bromid je díky svému opačnému pohybu (vůči DNA putující k anodě) vyplavován z gelu. Po 45 minutách elektroforézy při konstantním napětí 400 V byl gel vyjmut a pomocí kamery Diana (Raytest, BioTech) a software AIDA (Raytest, BioTech)

byl pořízen obrázek gelu (fluorescence ethidium bromidu vyvolaná UV-zářením), který ukázal jasný a specifický band amplifikované Sak cDNA. Nicméně tyto primery poskytují příliš dlouhý produkt, takže by bylo problematické je užít jako Real-Time RT-PCR primery. Navíc při PCR s větším počtem cyklů dávají poměrně velké množství nespecifických produktů, viz příloha č. 3. Nicméně specifický band prokázal funkčnost primerů, takže byla provedena preparativní PCR. Do pěti zkumavek byly přidány stejné PCR-mixy jako v předchozím případě, ale byl použit pouze produkt RT-reakce s oligo-dT, jehož band se jevil více specifický, PCR-program je též identický s předchozím, stejně jako elektroforetická separace, při které bylo, vzhledem k preparativnímu účelu této amplifikace, ovšem použito vysoce čisté agarózy, ethidium bromidu a pufru. Nadstandardní čistota a kvalita chemikálií a pečlivost v odměřování a vážení byly nutné i v případě komponent PCR-mixu. Opět byly získány specifické Sak bandy, jež byly vyříznuty z gelu (185 mg gelu), eluovány v 15 µl vody zbavené nukleáz (zvláště upravené a extrémně čisté). Měření absorbance ukázalo koncentraci DNA 0,014 µg/µl.

## 5.2 Inzerce amplikonu do plazmid. vektoru, transfekce a vlastní sekvenování cDNA

Získaná DNA byla vložena do pCR®II plazmidového vektoru pomocí TA Cloning Kit® (obojí dodávané firmou Invitrogen), přičemž poměr linearizovaného vektoru ku inzertu činil (vypočteno podle manuálu k TA Cloning Kit®) 3:1. Následná inzerce-ligace probíhala 14 hodin při 14°C v ligačním mixu následujícího složení (objem činil 10,00 µl, všechny chemikálie pocházely z TA Cloning Kit®): 1,37 µl cDNA eluátu, 1,00 µl ligačního pufru, 1,00 µl vektoru pCR®II (koncentrace: 25,00 ng/µl), 5,60 µl vody a 1,00 µl Th DNA-ligázy. Následně byly D45α buňky přibalené k výše uvedenému kitu (podle postupu uvedeného v manuálu) transformovány ligační směsí (10,00 µl obsahu ligačního mixu do 200,00 µl kultury buněk) a byly naočkovány tři Petriho misky s agarem se selekčním antibiotikem.

Po několika dnech byly některé viditelné kolonie seškrábnuty z agaru do 20 µl LB média [složení jednoho litru LB média: 10 g tryptonu (Difco), 5 g extraktu z kvasinek (stejný dodavatel Difco), 10 g NaCl (Roth)] s kanamycinem (30 µg/ml - Sigma Aldrich), ve kterém byly za stálého promíchávání inkubovány asi 8 hodin při 37°C, následně byl tento objem zředěn v poměru 1:500 stejným LB médiem a při stejných podmínkách inokulace pokračovala dalších 16 hodin. Před vlastním PCR-testem přítomnosti Sak-inzertu a plazmidu byla bakteriální kultura centrifugována při 4°C po dobu 15 minut za 6000g a dále se postupovalo podle QIAGEN® Plasmid Purification Handbook. PCR mixy (2•10,0 µl - všechny chemikálie dodány firmou Invitrogene) obsahovaly: 0,2 µl templátu, který představuje plazmidová DNA izolovaná z bakterií pomocí QIAGEN® Plasmid Midi Kit a přiložené QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 2,0 µl PCR-pufru (Invitrogene), 0,6 µl 50 mM roztoku MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl 10 mM roztoku dNTP, 0,1 µl 100 µM roztoků každého primeru, 0,5 IU Taq DNA-polymerázy a 16,5 µl PCR-vody. PCR-program byl užit stejný jako v předchozím případě. Jako primery pro tuto PCR byl použit výše popsáný pár mSak-aUp, mSak-aLo primerů, které umožňují amplifikaci fragmentu představujícího asi 1,1 kbp, a T7, M13rev primery dodávané společně s TA Cloning Kit® (Invitrogen), jež umožňují amplifikaci nejen inzertu, ale i fragmentu vektoru, což dává cca 1,4 kbp, a představují indikátor přítomnosti vektoru, nezávislý na pozitivní inzerci. Kolonie vykazující přítomnost vektoru i inzertu byly ponechány pomnožit se, následně z nich byla izolována plazmidická DNA stejným kitem jako v posledním případě, znovu byly za stejných podmínek testovány s

identickými primery a pozitivní výsledek testu umožnil odeslat tuto DNA ke sekvenaci (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems) na sekvenátoru ABI PRISM 310, AB. Jako sekvenačních primerů bylo užito T7 a M13rev, přičemž bylo samozřejmě provedeno několik sekvenací, jejichž překryvem a odfiltrováním sekvencí vektoru byla získána sekvence vlastního Sak-inzertu.

### 5.3 Real-Time RT-PCR primery

Výsledky sekvenace umožnily navrhnout vhodné primery pro Real-Time RT-PCR kvantifikaci mRNA, které amplifikují přijatelný fragment DNA. Byly zakoupeny 2 páry primerů (Generi Biotech s.r.o. CZ), jež však umožňují jejich vzájemnou kombinací vytvořit 4 možné a funkční kombinace Real-Time RT-PCR primerů.

Číslo páru	Název	Sekvence	T <sub>m</sub>	Délka prod. (báze)
1	RT1Up	5'GAGCCCATTCCTCTGATAGA 3'	61,2 °C	316
	RT1Lo	5'CCAAACCACTGTTGCACCAT 3'	65,9 °C	
2	RT2Up	5'CTGGCACTTCTAACCAATCT 3'	59,1 °C	376
	RT2Lo	5'GTACGTTTCTGATAACCCAAT 3'	58,7 °C	
3	RT1Up	5'GAGCCCATTCCTCTGATAGA 3'	61,2 °C	397
	RT2Lo	5'GTACGTTTCTGATAACCCAAT 3'	58,7 °C	
4	RT2Up	5'CTGGCACTTCTAACCAATCT 3'	59,1 °C	295
	RT1Lo	5'CCAAACCACTGTTGCACCAT 3'	65,9 °C	

**Tabulka 2 - Real-Time RT-PCR primery**

Po dodání primeru bylo třeba navržené kombinace otestovat, a proto byly granulózní buňky, ve kterých bylo možno předpokládat relativně vysokou hladinu mRNA pro Sak, kultivovány v MEMu (Sigma Aldrich) s 8% fetálního séra (Sigma Aldrich) a uhlíčanem sodným (Sigma Aldrich), aby se docílilo zvýšení podílu buněk v S, G2 a M fázích buněčného cyklu, ve kterých je mRNA Sak-a abundantní. Následně byla izolována totální RNA pomocí RNeasy Mini Kit® (QIAGEN), the protocol for animal cells, a byly provedeny RT-reakce [RT-mix (20,00 µl): 2,27 µl totální RNA (templátu), 2 µl RT-pufu (Perkin-Elmer), 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogene), 2 µl 10 mM roztoku dNTP (Invitrogene), 20 IU RNase inhibitoru (Applied Biosystems), 1 µl 50 µM hexamerů (Applied Biosystems) a po annealingu bylo přidáno 50 IU MuLV reverzní transkriptázy (Applied Biosystems). RT-program termocyklátoru Biometra T3 byl následující: 65°C po 5 minut, 25°C po 10 minut, 42°C po dobu jedné hodiny, 72°C po 5 minut a závěrečná konzervace při 10°C. Na získané cDNA byl proveden vlastní PCR-test primerů a jako indikátor přítomnosti cDNA vzniklé reverzní transkripcí cílové mRNA pro Plk4 byly také užity původní mSak-aUp a mSak-aLo primery. PCR-mix (5•20,0 µl) obsahoval: 1 µl produktu předchozí RT-reakce, 2 µl PCR-pufu (Invitrogene), 0,6 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogene), 0,4 µl 10 mM roztoku dNTP (Invitrogene), 0,1 µl z 100 µM roztoků každého primeru, 0,5 IU Taq polymerázy (Invitrogene), 17,5 µl H<sub>2</sub>O. Program termocyklátoru byl složitější (35 cyklů): 94°C po 15 sekund, 60°C po 30 sekund, 72°C po 30/75 sekund (mSak-Up, mSak-Lo dávají delší produkt, takže je třeba 75 sekund, ostatním postačí 30 sekund), 72°C po 5 minut a 10°C konzervace. PCR-produkty byly elektroforeticky rozděleny (stejně jako v předchozím případě) za použití stejných chemikálií, pufu a přístrojů. Obrázek gelu ukázal, že k amplifikaci došlo ve všech

případech, ale nejvíce specifický band bez primerových vlásenek a jiných nežádoucích amplifikací poskytuje pár Real-Time RT-PCR primerů označený jako RT2. Specifita tohoto páru primerů se potvrdila i při následném určení melting pointu produktu (viz příloha č. 14).

#### 5.4 Sestavení sad oocytů a kultivační podmínky

Jak již bylo uvedeno, dynamika exprese Sak byla studována na GV, M-I, M-II oocytech (120  $\mu\text{m}$  v průměru), na rostoucích oocytech pocházejících z folikulů s průměrem 0,5 mm (oocyt má průměr 80  $\mu\text{m}$ ) a 1 mm folikulů (100  $\mu\text{m}$ ), též na rostoucích oocytech z 0,5 mm folikulů kultivovaných 8 a 20 hodin v  $\alpha$ -amanitinu, tedy celkem na 7 vzorcích, přičemž každý vzorek sady obsahoval 50 oocytů.

Prasečí oocyty použité k experimentům byly izolovány z ovarii pocházejících z místních jatek. Tato ovaria jsou získávána z vykolených kusů, během jedné hodiny za fyziologické salinity a teploty (25°-30°C) převezena do laboratoře, kde byla následně dvakrát promyta v PBS pufru. Metodika izolace a kultivace výše opsaných typů oocytů se však liší.

Rostoucí oocyty byly izolovány z folikulů, u kterých se teprve začíná formovat folikulární antrum. Tyto folikuly jsou situovány pod povrchem vaječníku, takže je třeba ostrým skalpelem opatrně odříznou poměrně tenký řez, který se umístí do izotonického a izobazického transferového média (výrobce BIOVETA, fosfáty pufovaný roztok doplněný glukózou, pH 7,4), kde se pod mikroskopem či binokulární lupou pomocí velmi tenkých jehel a injekčních stříkaček izolují vlastní oocyty. Je však třeba si uvědomit, že izolace je poměrně náročná a ne vždy se podaří oocyt izolovat. Poměrně problematické je i určení velikosti folikulu, což se řeší pomocí různých pomůcek (mřížky). Izolované oocyty s kvalitním kumulem byly poté promyty v kultivačním médiu (viz dále) a následně pomocí tenké skleněné kapiláry mechanicky zbaveny kumulárních buněk, což vyžaduje značnou opatrnost. Oocyty bez kumulů byly znovu omyty v transferovém médiu, následně umístěny do Eppendorf-zkumavek, zbytky média byly odsáty a oocyty zamrazeny (-30°).

Efekt  $\alpha$ -amanitinu na syntézu Sak mRNA byl studován na rostoucích oocytech (průměr 80  $\mu\text{m}$ ) izolovaných výše uvedeným způsobem. Tyto oocyty však byly po vlastní izolaci kultivovány s kumuly v médiu M 199 (M7528 - Sigma Aldrich) s FCS (výsledná koncentrace v médiu - 10%, dodáno Sigma Aldrich), L-glutaminem (0,68 mM; Sigma Aldrich), penicilinem a streptomycinem (P 4333, P 0781 - Sigma Aldrich), jejichž koncentrace v médiu byly 10000 IU/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu, 0,05 IU/ml FSH (Spofa) a vlastním  $\alpha$ -amanitinem (výsledná koncentrace v kultivačním médiu - 10 ng/ml - Sigma Aldrich), v atmosféře 5% oxidu uhličitého (simulace anaerobní prostředí pohlavních orgánů) při 38,5 °C (tělesná teplota prasete domácího). Další procedury byly stejné jako v předchozím případě.

FG oocyty byly izolovány ze zdravých, neatretických folikulů s 3-5 mm v průměru. Antrální folikulární tekutina byla aspirována přímou injekcí výše popsaných folikulů injekční stříkačkou, sedimentovala 20 minut při laboratorní teplotě, následně byla slita a sediment byl dvakrát promyt (mezi promýváními bylo opět 20 minut sedimentace) ve výše popsaném transferovém médiu. FG oocyty pak byly manuálně izolovány (vybíráme je oocyty s kvalitním kumulem) a společně s



kumuly kultivovány ve stejném médiu podobně jako v předchozím případě (M 199 s dodatečnými komponentami, samozřejmě bez  $\alpha$ -amanitinu). Při kultivaci oocyty pokračují v meiotické maturaci, za 28 hodin dosáhnou metafáze I, za 44 hodin metafáze II. Kultivace byla samozřejmě mikroskopicky kontrolována. Poté byla stejná množství (50 oocytů) GV, M-I a M-II oocytů omyta a zmrazena ( $-30^{\circ}\text{C}$ ).

## 5.5 Real-Time RT-PCR

Real-Time RT-PCR (jednokroková reverzně transkripční-polymerázová řetězová reakce s detekcí produktu v čase), použitá pro měření exprese Sak-a mRNA, kvantifikuje počáteční množství templátu nejspecifičtěji, nejcitlivěji a nejreprodukovatelněji. Je vhodnější než ostatní metody kvantifikace či semikvantifikace, využívající až konečné množství amplifikovaného produktu. Metoda je založena na detekci a kvantifikaci fluorescenčního signálu, měnícího se během reakce v důsledku hromadění produktu [5].

Existuje několik možných přístupů využívajících různé reakční chemie (*TaqMan probes*, *molecular beacons*, *scorpions*). V této studii bylo užito indikátoru SYBR Green I. Jedná se o sekvenčně nespecifický fluorescenční agent včleňující se do jakékoli vznikající dsDNA. Chování této látky během PCR-cyklu lze popsat následovně. V počátku reakce vykazuje nenavázaná SYBR Green velice slabé fluorescenční pozadí (background). Při nasedání primerů a během prodlužování nového řetězce se SYBR Green začleňuje do dsDNA a po excitaci světlem o vlnové délce 470 nm emituje fluorescenční signál, který je přímo úměrný množství produktu. Naměřená data jsou automaticky normalizována, aby mohla být vynesena v rozsahu 0-100% do grafu závislosti fluorescence na počtu cyklů.

Velmi důležitým parametrem je i  $C_T$  („*threshold cycle*“), cyklus, ve kterém emise fluorescence překročí uživatelem zafixovaný práh.

Sekvenční nespecifita SYBR Green I je výhodou pro její použití k detekci jakéhokoliv produktu. Odpadá potřeba navrhovat drahé sondy, specifické pro každý rozdílný templát. Specifitu reakce popisuje analýza tání produktu (melting), při níž je měřena fluorescence konečného produktu v závislosti na zvyšující se teplotě. Teplota, při níž je polovina produktu denaturována, je tzv. teplota tání ( $T_m$ ). Tato teplota samozřejmě závisí na nukleotidovém složení a délce dsDNA, takže určitý pár primerů dává produkt se stále stejným  $T_m$ .

V této SOČ se prezentují Real-Time RT-PCR kvantifikace, které byly vždy provedeny pomocí QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN), QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit Handbook (QIAGEN), Rotor-Gene (Corbett Research) a software k tomuto přístroji (Rotor-Gene Real-Time Analysis Software - Corbett Research). Reakční směs o celkovém objemu 12,5  $\mu\text{l}$  obsahovala: 1X QIAGEN OneStep RT-PCR pufr, dNTP (každý 400  $\mu\text{M}$ ), SYBR Green I (1:50.000 z 10,000x zásobního roztoku, Molecular Probes, Oregon), primery (každý 400  $\mu\text{M}$ ), RNAsin inhibitor (5 IU), QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (0,5  $\mu\text{l}$ ), mRNA (část eluátu představující 2 oocyty nebo 0,175  $\mu\text{g}$  RNA z kumulárních buněk - PCC). Reakční podmínky: reverzní transkripce –  $50^{\circ}\text{C}$ , 30 min., iniciační aktivace enzymu –  $95^{\circ}\text{C}$ , 15 minut, cyklování: denaturace –  $94^{\circ}\text{C}$ , 20 sekund, annealing –  $60^{\circ}\text{C}$ , 20 sekund, extenze  $72^{\circ}\text{C}$ , 30 sekund. RNA byla vždy

izolována z 50 oocytů pomocí RNeasy Mini Kit® (QIAGEN), the protocol for animal cells, kolonka byla eluována 50 µl vody.

### 5.5.1 Vytvoření standardní křivky

Pro kvantifikaci hladiny transkriptu lze použít několik metod - absolutní kvantifikaci, při které je výsledkem koncentrace či počet kopií templátu, a relativní kvantifikace, při níž se množství stanovované mRNA vztahuje k množství jiné mRNA. Touto referenční mRNA („*house-keeping gen*“) může být interní transkript či externí molekula mRNA, která se nenachází v transkriptomu sledovaného vzorku.

V této práci byl jako externí standard využita mRNA pro králičí β-globin (přidána před izolací RNA z oocytů, 1 ng/oocyt). Pro mRNA Sak-a i β-globinu byly vytvořeny standardní křivky (závislost  $C_T$  na koncentraci templátu) v rozpětí  $10^{-1}$ - $10^{-6}$ . Program pro vyhodnocování fluorescenčního záznamu automaticky určuje  $C_T$  a stanovuje relativní koncentrace templátů v rozdílných vzorcích. Relativní koncentrace mRNA pro Sak-a pro jednotlivé vzorky byla vztažena na odpovídající hodnotu mRNA pro β-globin.

### 5.5.2 Efekt α-amanitinu na expresi mRNA referenčních genů - primery

Efekt stejné koncentrace α-amanitinu na RNA-polymerázu II byl zkoumán též na jiných genech, aby bylo možno srovnat efekt této látky na expresi mRNA u oocytů a kumulárních buněk. Byly kultivovány (podobně jako v oddílu 5.3) prasečí kumulární buňky (PCC) a pomocí Real-Time RT-PCR byl studován efekt α-amanitinu na expresi β-aktinu a histonu 2A. Byly provedeny pouze komparativní analýzy.

Gen	F/R	Sekvence	$T_m$	Délka prod. (báze)
β-aktin	F	5' GAGAAGCTCTGCTACGTCG 3'	60°C	255
	R	5' CCAGACAGCACCGTGTGG 3'	60°C	
Histon 2A	F	5' AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG 3'	60°C	208
	R	5' CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG 3'	60°C	

**Tabulka 3 - Real-Time RT-PCR primery referenčních genů**

## 6 Výsledky

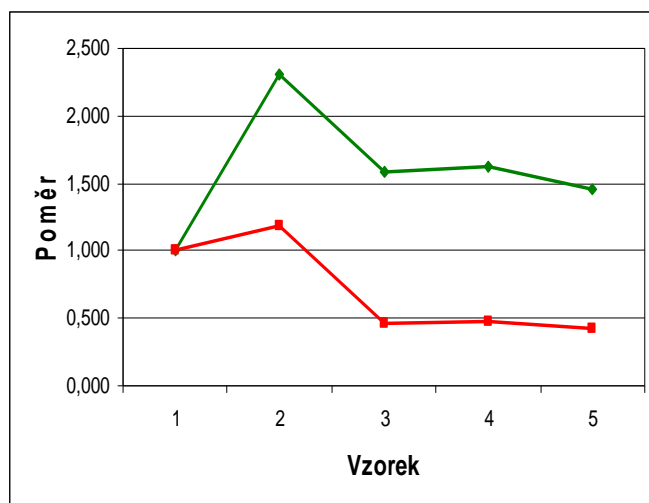
Výsledky tohoto studia budou zpracovány v podobě primární publikace. V tomto článku budou uvedeny i sekvence  $\beta$ -globinových primerů a výsledky dalších Real-Time RT-PCR kvantifikací.

### 6.1 Výsledky sekvenace a fylogenetická analýza sekvence

Sekvence Sak-inzertu získaná sekvenací je uvedena v příloze č. 7, sekvence proteinu kódovaná tímto fragmentem je uvedena v příloze č. 8. V dalších přílohách jsou prezentovány analýzy těchto sekvencí.

### 6.2 Dynamika exprese mRNA prasečí Plk4

Je třeba si uvědomit, že studované rostoucí oocyty se mezi sebou výrazně liší průměrem (samozřejmě závislým na fázi oogeneze), tedy i objemem, a proto by bylo optimální sestavit sady vzorků tak, aby celkový objem oocytů byl v každém vzorku stejný, neboť jen tak lze hodnověrně srovnávat jednotlivé vzorky mezi sebou. Nicméně ze vzorce pro výpočet objemu koule  $V=(4\pi r^3)/3$  vyplývá takové množství rostoucích oocytů, které není možno, zvláště díky jejich obtížnější izolaci, získat, skladovat ani s ním pracovat, takže je třeba přepočítat vzájemné poměry množství mRNA pro Sak vztahované k prvnímu ze vzorků, k oocytům s průměrem 80  $\mu\text{m}$ . Takto vypočítaný poměr je vynášen vždy červeně. V grafech jsou však vynášeny i poměry (opět vztahované k prvnímu vzorku) množství mRNA bez ohledu na objem (zelená). Tato SOČ prezentuje výsledky pouze jedné sady vzorků, další budou uvedeny v připravované primární publikaci.

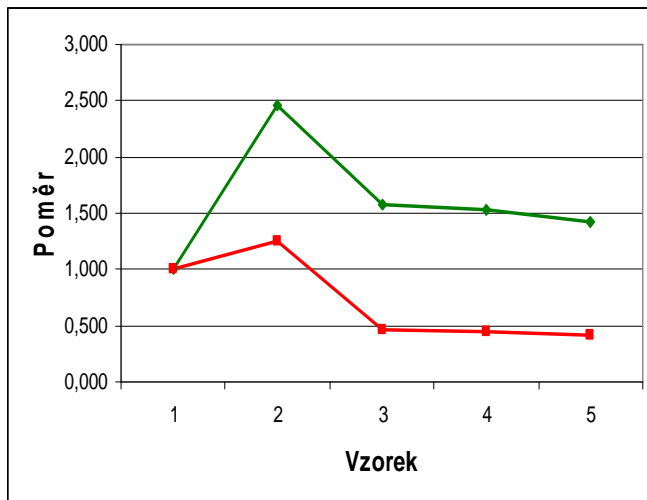


Vzorek	Poměr (objem)	Poměr (oocyty)
1	1,000	1,000
2	1,183	2,311
3	0,470	1,587
4	0,482	1,625
5	0,430	1,451

Tabulka 4 - Hodnoty ke grafu 1

Graf 1 - Dynamika exprese Sak, relativní kvantifikace

Vzorky: 1 – rostoucí oocyty s průměrem 80  $\mu\text{m}$ ; 2 – rostoucí oocyty s průměrem 100  $\mu\text{m}$ ; 3 – FG oocyty (120  $\mu\text{m}$ ) v GV; 4 – FG oocyty (120  $\mu\text{m}$ ) M-I; 5 – FG oocyty (120  $\mu\text{m}$ ) v M-II;



Vzorek	Poměr (objem)	Poměr (oocyty)
1	1,000	1,000
2	1,255	2,452
3	0,469	1,584
4	0,452	1,526
5	0,420	1,416

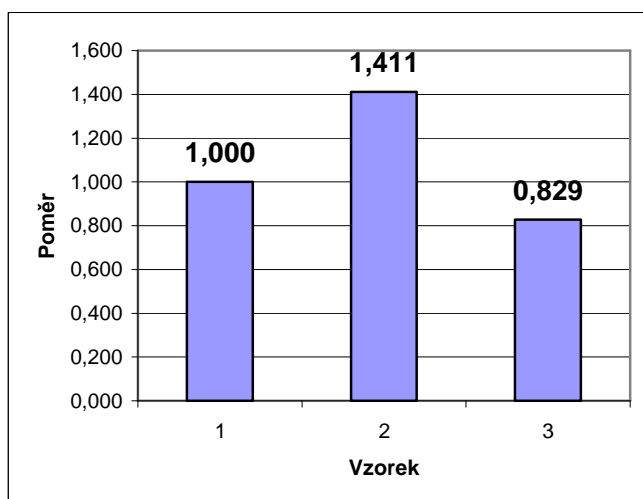
Tabulka 5 - Hodnoty ke grafu 2

**Graf 2 - Dynamika exprese Sak, absolutní kvantifikace**

Vzorky: 1 – rostoucí oocyty s průměrem 80  $\mu\text{m}$ ; 2 – rostoucí oocyty s průměrem 100  $\mu\text{m}$ ; 3 – FG oocyty (120  $\mu\text{m}$ ) v GV; 4 – FG oocyty (120  $\mu\text{m}$ ) M-I; 5 – FG oocyty (120  $\mu\text{m}$ ) v M-II;

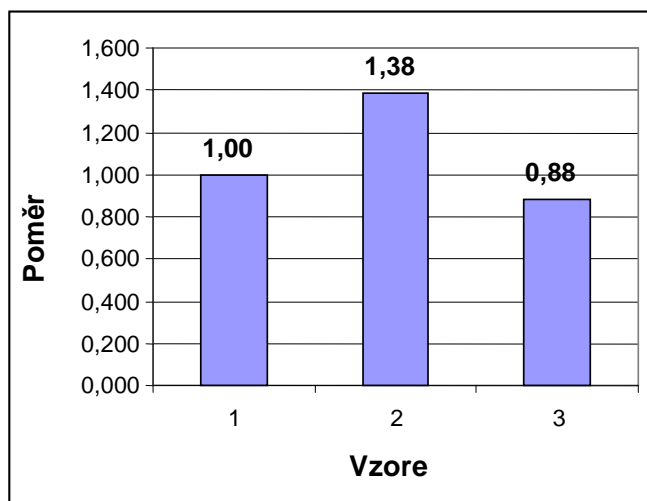
### 6.3 Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA prasečí Plk4

V grafů popisujících efekt  $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA Sak není třeba přepočítávat poměry (opět vztahené k prvnímu vzorku s nejkratší dobou kultivace v  $\alpha$ -amanitinu) koncentrace transkriptu, neboť se jedná o oocyty se stejným objemem. Zde se také prezentují výsledky jen jedné sady vzorků, další kvantifikace budou uvedeny v připravované primární publikaci.



**Graf 3 – Efekt  $\alpha$ -amanitinu na expresi Sak, relativní kvantifikace**

Vzorky: 1 – rostoucí oocyty s 80  $\mu\text{m}$  v průměru bez kultivace v  $\alpha$ -amanitinu; 2 - rostoucí oocyty s 80  $\mu\text{m}$  v průměru kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 8 hodin; 3 – rostoucí oocyty s 80  $\mu\text{m}$  v průměru kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 20 hodin

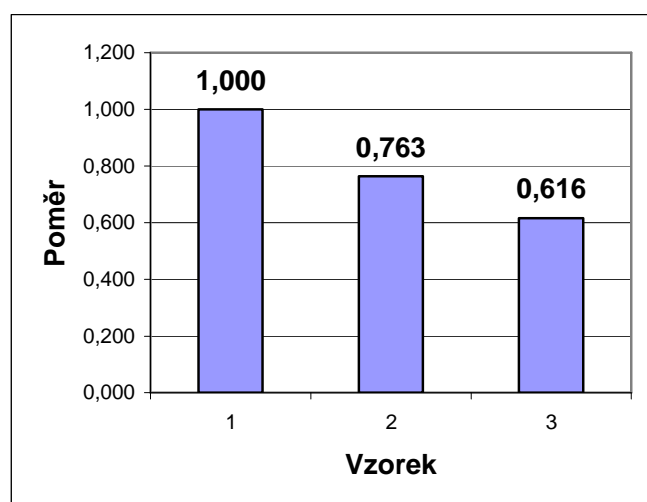


**Graf 4 - Efekt  $\alpha$ -amanitinu na expresi Sak, absolutní kvantifikace**

Vzorky: 1 – rostoucí oocyty s 80  $\mu$ m v průměru bez kultivace v  $\alpha$ -amanitinu; 2 - rostoucí oocyty s 80  $\mu$ m v průměru kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 8 hodin; 3 – rostoucí oocyty s 80  $\mu$ m v průměru kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 20 hodin

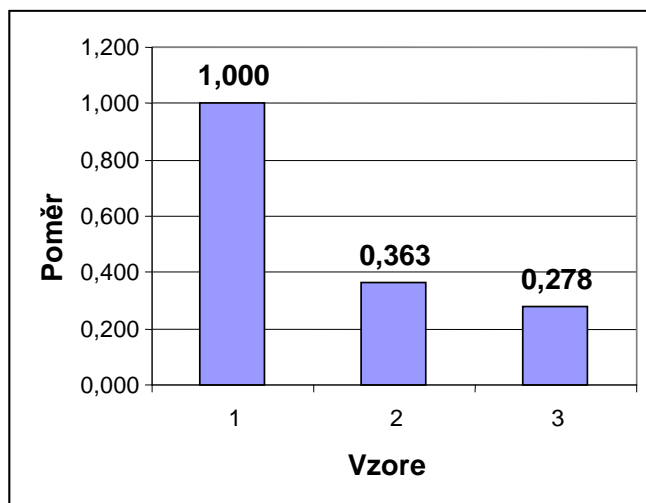
### 6.3.3 Efekt $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA referenčních genů

Byla provedena pouze relativní kvantifikace (vždy vztaženo k prvnímu vzorku bez kultivace v  $\alpha$ -amanitinu).



**Graf 5 – Efekt  $\alpha$ -amanitinu na expresi  $\beta$ -aktinu**

Vzorky: 1 – prasečí kumulární buňky (PCC) bez kultivace v  $\alpha$ -amanitinu; 2 – PCC kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 8 hodin, 3 – PCC kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 20 hodin



**Graf 6 - Efekt  $\alpha$ -amanitinu na expresi histonu 2A**

Vzorky: 1 – prasečí kumulární buňky (PCC) bez kultivace v  $\alpha$ -amanitinu; 2 – PCC kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 8 hodin, 3 – PCC kultivované v  $\alpha$ -amanitinu po dobu 20 hodin

## 7 Diskuse

Výsledky Real-Time RT-PCR kvantifikace mRNA indikují vysoké hladiny transkriptu pro Sak během růstu oocytů i během meiotické maturace. Indukce exprese může být způsobena některým členem PTK signální dráhy, neboť předchozí studie provedené na modelu lidských lymfocytů naznačují spojitost Sak s Tec tyrosin kinázou [38], která je důležitým členem této skupiny kináz. Můžeme se domnívat, že růstové faktory indukují prostřednictvím PTK expresi Sak, pravděpodobně cestou aktivace c-Fos transkripčního faktoru [39]. V cytokiny řízené aktivaci c-Fos v lidských krevních buňkách je Tec zapojena spolu s dalšími geny nezbytnými pro události předcházející hyperfosforylaci Rb proteinu a uvolnění E2F [4, 17, 33, 38, 39]. Tec zabraňuje ubiquitinaci a následné degradaci Sak (fosforylací podmíněná změna konformace, která maskuje PEST sekvence) a umožňuje akumulaci jak transkriptu, tak proteinu. Pokud množství Sak přesáhne určitou hranici, začne na růst působit inhibičně, pravděpodobně hyperfosforyluje Tec (či jinou PTK), čímž se přeruší signální dráha a buňka není schopna na stimuly určité skupiny růstových faktorů reagovat. Touto cestou Sak kináza může přispívat k dokončení růstové fáze oocytu. Inhibiční fosforylací Tec klesá i exprese Sak. Podobný mechanismus by mohl fungovat v G1/S přechodu somatických buněk, po jehož překonání nelze buňku růstovými faktory ovlivňovat. Tuto hypotézu podporuje již dříve publikovaná exprese mRNA i proteinu, která je iniciována na konci G1 fáze, stejně tak i přítomnost PEST sekvencí v molekule Sak. Nicméně je také možné, že exprese mRNA je přímo závislá na stimulaci růstovými faktory skrze PTK a případný inhibiční vliv velkého množství Sak v tomto nehraje žádnou roli, neboť ho buňka nikdy nedosáhne. I tak lze interpretovat dříve publikovanou expresi Sak v G1/S. V tomto případě by po odeznění pozitivního vlivu Tec ustala exprese mRNA. Oba možné scénáře zahrnují akumulaci stabilizovaného proteinu, který se uplatňuje i během dělení jako součást APC (viz dále). Nejen z tohoto důvodu lze též uvažovat o možné roli Sak během meiotické maturace, během které je hladina proteinu i transkriptu též vysoká, jak je zřejmé z této i předchozích studií.

Výsledky publikované v této práci naznačují vyšší hladiny mRNA ve zrajících oocytech ve srovnání s plně dorostlými oocyty, což je mimo jiné způsobeno kondenzovaným, transkripčně neaktivním, chromatinem. V tomto případě se pravděpodobně jedná o stabilizovaný transkript určený především pro transkripčně neaktivní embryonální stádia. V každém případě je velmi pravděpodobné, že se Sak, podobně jako na modelu embryonálních buněk [12], podílí na APC-dependentní degradaci cyklinu B a na dynamice mikrotubulů během anafáze. Z předešlých studií i z výsledků získaných popsány experimenty je vhodné považovat Sak za komponentu APC, neboť její exprese během buněčného cyklu opisuje dynamiku tohoto komplexu [8, 9, 12] a podílí se na dějích s APC spojených [12]. V každém případě je však třeba si uvědomit, že problematika zapojení Sak do jednotlivých kinázových kaskád a doposud objasněných regulačních drah zůstává stále nejasnou a výše popsané hypotézy jsou z velké části spekulace. Nicméně lze jen potvrdit názor předchozích studií, že cílená a precizní regulace Sak proteinu i mRNA je nezbytná pro fyziologický růst, průběh buněčného cyklu, mitózy, meiózy a embryogeneze [8, 9, 12].

Efekt  $\alpha$ -amanitinu na expresi mRNA pro Sak, který se díky značné velikosti oocytu zpožďuje, v somatických kumulárních buňkách se jasně projevuje velmi brzy, naznačuje, že Sak je během růstu oocytů velmi intenzivně exprimována, takže inhibiční efekt  $\alpha$ -amanitinu lze zaznamenat až později, takže i přes jeho přítomnost dochází ke krátkodobému poměrně znatelnému nárůstu

hladiny mRNA pro Sak, což je samozřejmě také způsobeno i charakteristikou oocyty jako gigantické buňky.

cDNA získaná reverzní transkripcí mRNA pro Sak byla osekvenována, aby bylo možno vytvořit Real-Time RT-PCR primery specifické pro prase. Osekvenovaný fragment představuje jedinou dostupnou sekvenci prasečí Sak. Vykazuje vysokou homologii s lidskou Plk4 a analogickými proteiny lidoopů a psa. Homologie s myší Plk4 je také nezanedbatelná, ale rozhodně není srovnatelná s homologii vůči lidské Sak, což potvrzuje výhody prasečího modelu nastíněné v úvodu.

V sekvenci hypotetického fragmentu proteinu vzniklého translací zjištěné parciální sekvence je zachycena PEST1 z 93 % identická s lidskou PEST1 a z 78 % homologní s PEST1 myší Plk4. V této sekvenci se také nachází i analog motivu, který je charakteristický pro lidskou izoformu Sak-a a není obsažen v molekule Sak-b [38]. Tato sekvence je z 77 % homologní a indikuje, že zkoumaný transkript je prasečím analogem lidské Sak-a, ke které byl tento výzkum směřován. Možná amplifikace mRNA pro Sak-b byla cíleně eliminována výběrem primerů pro PCR, neboť ty zasahují oblast, která je místem delece u Sak-b [13]. Amplifikace sekvence genu *sak* byla také vyloučena, protože mezi analogními pozicemi primerů na myší sekvenci se nachází relativně velký intron.

Srovnání výsledků s literárními údaji indikují, že tento enzym je významným členem rodiny Plk kináz. Z tohoto důvodu je třeba se v následujících experimentech zaměřit na studium Sak-a proteinu, aby bylo možno blíže objasnit jeho fosforylaci a buněčnou lokalizaci v průběhu růstu a zrání savčích oocytů, což může značně napomoci objasnění jeho fyziologické i rakovinotvorné funkce v buňkách somatických, a tak prohloubit naše poznatky týkající se molekulární regulace buněčného cyklu, které jsou již dnes neocenitelné v diagnostice a léčbě rakoviny i v dalších biomedicínských oborech.



## 8 Literatura

1. ANGER, Martin. Identifikace Polo kinázy a její exprese v průběhu buněčného cyklu, disertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Liběchov 2001.
2. ANGER, Martin, KUES, Wilfried A., KLIMA, Jiri, MIELENZ, Manfred, KUBELKA, Michal, MOTLIK, Jan, ESNER, Milan, DVORAK, Petr, CARNWATH, Joseph W., and NIEMANN, Heiner. Cell Cycle Dependent Expression of Plk1 in Synchronized Porcine Fetal Fibroblasts. Figures by Anger et al. *Molecular Reproduction and Development*, January 2003, vol. 65, p. 245-253.
3. BAHASSI, El Mustapha, CONN, Christopher W., MYER, David L., HENNIGAN, Robert F., MCGOWAN, Clare H., SANCHEZ, Yolanda, STAMBROOK, and Peter J. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. Photograph by Bahassi et al. *Nature*, September 2002, vol. 21, no. 21, p. 6633-6640.
4. BROWN, Jennifer R., NIGH, Elizabeth, LEE, Richard J., YE, Hong, THOMPSON, Margaret A., SAUDOU, Frederic, PESTELL, Richard G., and GREENBERG, Michael E. Fos Family Members Induce Cell Cycle Entry by Activating Cyclin D1. Photograph by Brown et al. *Molecular and Cellular Biology*, September 1998, vol. 19, no. 8, p. 5609-5619.
5. BUSTIN, Stephen A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Figures by Stephen A. Bustin, *Journal of Molecular Endocrinology*, October 2000, vol. 25, no. 2 p. 169-193.
6. CHENG, Liang, HUNKE, Linda, HARDY, and Christopher F. J. Cell Cycle Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Polo-Like Kinase Cdc5p. Photograph by Cheng et al. *Molecular and Cellular Biology*, December 1998, Vol. 18, No. 12, p. 7360-7370.
7. DONOHUE, Patrick J., ALBERTS, Gregory F., GUO, Yan, WINKLES, Jeffrey A. Identification by Targeted Differential Display of an Immediate Early Gene Encoding a Putative Serine/Threonine Kinase. Photograph by Donohue et al. *JBC - J. Biol. Chem.*, April 1995, vol. 270, no. 17, p. 10351-10357
8. FODE, Carol, BINKERT, Christoph, and DENNIS, James W. Constitutive Expression of Murine Sak-a Suppresses Cell Growth and Induces Multinucleation. Figures by Fode et al. *Molecular and Cellular Biology*, May 1996, vol. 16, no. 9, p. 4665-4672.
9. FODE, Carol, MOTRO, Benny, YOUSEFI, Shida, HEFFERNAN, Mike, DENNIS, James W. Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the *Drosophila* polo kinase and involved in cell proliferation. Photograph by Fode et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, July 1994, vol. 91, p. 6388-6392.
10. GIEFFERS, Christian, PETERS, Beate H., KRAMER, Edgar R., DOTTI, Carlos G., and PETERS, Jan-Michael. Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. Photograph by Gieffers et al. *Cell Biology*, September 1999, vol. 96, no. 20, p. 11317-11322.
11. GLOVER, David M., HAGAN, Iain M., and TAVARES, Álvaro A.M. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis, *Genes & Development*, December 1988, vol. 12, no. 24, p. 3777-3787.
12. HUDSON, John W., KOZAROVA, Anna, CHEUNG, P., MACMILLAN, Jennifer. C., SWALLOW, Carol. J., CROSS, J. C., and DENNIS, James W. Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. Photograph by Hudson et al. *ScienceDirect - Current Biology*, March 2001, vol. 11, no. 6., p. 441-446.
13. HUDSON, John W., CHEN, Lin-yun, FODE, Carol, BINKERT, Chris, and DENNIS, James W. Sak kinase gene structure and transcriptional regulation, Figures by Hudson et al. *ScienceDirect - Current Biology*, January 2000, vol. 241, no. 1., p. 65-73.

14. HWANG, Byung J. , MÄLLER, Hans-Michael , and STERNBERG, Paul W. Genome annotation by high-throughput 5' RNA end determination. Photographies by Hwang et al. Proc Natl Acad Sci USA, February 2004. vol. 101, no. 6, p. 1650-1655.
15. JANG, Young-Joo, LIN, Chin-Yo, MA, Sheng, and ERIKSON, Raymond L. Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. Figures by Jang et al. Cell Biology, February 2002, vol. 99, no. 4, p. 1984–1989.
16. JASPERSEN, Sue L., CHARLES, Julia F., TINKER-KULBERG, Rachel L., and MORGAN, David O. A Late Mitotic Regulatory Network Controlling Cyclin Destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. Photography by Jaspersen et al. Mol Biol Cell., October 1998, vol. 9, no. 10, p. 2803–2817.
17. KAWASAKI, Hiroki, KOMAIL, Koichiro, OUYANG, Zhufeng, MURATA, Miki, HIKASA, Mari, OHGIRI, Mami, and SHIOZAWA, Shunichi. c-Fos/activator protein-1 transactivates wee1 kinase at G1/S to inhibit premature mitosis in antigen-specific Th1 cells. Photographies by Kawasaki et al. EMBO Journal, July 2001, vol. 20, no. 16, p. 4618-4627.
18. KOLN, Kurt W. Molecular Interaction Map of the Mammalian Cell Cycle Control and DNA Repair Systems. Photography by Kurt W. Koln. Mol Biol Cell, August 1999, vol. 10, no. 8, p. 2703–2734.
19. KRAMER, Edgar R., SCHEURINGER, Nadja, PODTELEJNIKOV, Alexandre V., MANN, Matthias, and PETERS, Jan-Michael. Mitotic Regulation of the APC Activator Proteins CDC20 and CDH1. Photography by Kramer et al. Mol Biol Cell., May 2000, vol. 11, no. 5, p. 1555–1569.
20. LEUNG, Genie C., HUDSON, John W., KOZAROVA, Anna, DAVIDSON, Alan, DENNIS, James W., and SICHERI, Frank. The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. Photography by Leung et al. Nature Structural Biology, September 2002, vol. 9, no. 10 , p. 719-724.
21. MA, Sheng, CHARRON, Jean, and ERIKSON, Raymond L. Role of Plk2 (Snk) in Mouse Development and Cell Proliferation. Photography by Ma et al. Molecular and Cellular Biology, October 2003, vol. 23, no. 19, p. 6936-6943.
22. MACMILLAN, Jennifer C., HUDSON, John W., BULL, Shelley, DENNIS, James W., and SWALLOW, Carol J. Comparative Expression of the Mitotic Regulators SAK and PLK in Colorectal Cancer. Annals of Surgical Oncology, 2001, vol. 8, no. 9, p. 729-740.
23. MANO, Hiroyuki, YAMASHITA, Yoshihiro, MIYAZATO, Akira, MIURA, Yasusada, and OZAWA, Keiya. Tec protein-tyrosine kinase is an effector molecule of Lyn protein-tyrosine kinase. Photographies by Mano et al. FASEB Journal, 1996. vol. 10, no. 1, p. 637-642.
24. MANO, Hiroyuki, YAMASHITA, Yoshihiro, SATO, K., YAZAKI K., and HIRAI, H. Tec protein-tyrosine kinase is involved in interleukin-3 signaling pathway. Photographies by Mano et al. Blood, January 1995, vol. 85, no. 2, p. 343-350.
25. MULVIHILL, Daniel P., PETERSEN, Janni, OHKURA, Hiroyuki, GLOVER, David M., and HAGAN, Iain M. Plk1 Kinase Recruitment to the Spindle Pole Body and Its Role in Cell Division in *Schizosaccharomyces pombe*. Photography by Mulvigill et al. Mol Biol Cell., August 1999, vol. 10, no. 8, p. 2771–2785.
26. OHYA, Ken-ichi, KAJIGAYA, Sachiko, KITANAKA, Akira, YOSHIDA, Koji, MIYAZATO, Akira, YAMASHITA, Yoshihiro, YAMANAKA, Takeo, IKEDA, Uichi, SHIMADA, Kazuyuki, OZAWA, Keiya, and MANO, Hiroyuki. Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase. Photographies by Ohya et al. Proc Natl Acad Sci USA, October 1999. vol. 96, no. 21, p. 11976-11981.
27. OHYA, Ken-ichi, KAJIGAYA, Sachiko, YAMASHITA, Yoshihiro, MIYAZATO, Akira, HATAKE, Kiyohiko, MIURA, Yasusada, IKEDA, Uichi, SHIMADA, Kazuyuki, OZAWA, Keiya, and MANO, Hiroyuki. SOCS-1/JAB/SSI-1 Can Bind to and Suppress Tec Protein-tyrosine Kinase. Photographies by Ohya et al. Journal of Lipid Research, October 1997, vol. 38, no. 43. p. 27178-27182.

28. QIAN, Yue-Wei, ERIKSON, Eleanor, LI, Chuan, MALLER, and James L. Activated Polo-Like Kinase Plx1 Is Required at Multiple Points during Mitosis in *Xenopus laevis*. Photography by Qian et al. *Mol Cell Biol.*, July 1998, vol. 18, no. 7, p. 4262–4271.
29. ROBERTS, Elisabeth C., SHAPIRO, Paul S., NAHREINI, Theresa Stines, PAGES, Gilles, POUYSSEGUR, Jacques, and AHN, Natalie G. Distinct Cell Cycle Timing Requirements for Extracellular Signal-Regulated Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathways in Somatic Cell Mitosis. Photography by Roberts et al. *Molecular and Cellular Biology*, October 2002, vol. 22, no. 20, p. 7226-7241.
30. SONG, Sukgil, GRENFELL, Tallessyn Z., GARFIELD, Susan, ERIKSON, Raymond L., and LEE, Kyung S. Essential Function of the Polo Box of Cdc5 in Subcellular Localization and Induction of Cytokinetic Structures. Photography by Song et al. *Molecular and Cellular Biology*, January 2000, vol. 20, no. 1, p. 286-298.
31. ŠOLC, P. Současný pohled na molekulární mechanismy regulace buněčného cyklu. Seminární práce, Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity v Praze. Liběchov 2003.
32. SWALLOW, Carol J., KO, Michael A., SIDDIQUI, Najeeb U., HUDSON, John W., and DENNIS, James W. Sak/Plk4 and mitotic fidelity. Photographies by Swallow et al. *Oncogene*, January 2005, vol. 24, no. 2, p. 306-312.
33. SYLVESTER, A. M., CHEN, D., KRASINSKI, K., and ANDREAS, V. Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. Photographies by Sylvester et al. *Clin Invest*, March 1998. vol. 101, no. 5, p. 940-948.
34. TOMLINSON, Michael G., KANE, Lawrence P., SU, Jennifer, KADLECEK, Theresa A., MOLLENAUER, Marianne N., and WEISS, Arthur. Expression and Function of Tec, Itk, and Btk in Lymphocytes: Evidence for a Unique Role for Tec. Photographies Tomlinson et al. *Mol Cell Biol.*, March 2004, vol. 24, no. 6, p. 2455-2466.
35. WANG, Qi, XIE, Suqing, CHEN, Jie, FUKASAWA, Kenji, NAIK, Ulhas, TRAGANOS, Frank, DARZYNKIEWICZ, Zbigniew, JHANWAR-UNIYAL, Meena, and DAIL, Wei. Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Human Polo-Like Kinase 3 Is Mediated through Perturbation of Microtubule Integrity. Photography by Wang et al. *Molecular and Cellular Biology*, May 2002, vol. 22, no. 10, p. 3450-3459.
36. WHITFIELD, Michael L., SHERLOCK, Gavin, SALDANHA, Alok J., MURRAY, John I., BALL, Catherine A., ALEXANDER, Karen E., MATESE, John C., PEROU, Charles M., HURT, Myra M., BROWN, Patrick O., and BOTSTEIN, David. Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. Photography by Whitfield et al. *Mol Biol Cell.*, June 2002, vol. 13, no. 6, p. 1977-2000.
37. YAMANAKA, Atsushi, HATAKEYAMA, Shigetsugu, KOMINAMI, Kin-ichiro, KITAGAWA, Masatoshi, MATSUMOTO, Masaki, and NAKAYAMA, Kei-ichi. Cell Cycle-Dependent Expression of Mammalian E2-C Regulated by the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome. Photography by Yamanaka et al. *Mol Biol Cell.*, August 2000, vol. 11, no. 8, p. 2821–2831.
38. YAMASHITA, Yoshihiro, KAJIGAYA, Sachiko, YOSHIDA, Koji, UENO, Shuichi, OTA, Jun, OHMINE, Ken, UEDA, Masuzu, MIYAZATO, Akira, OHYA, Ken-ichi, KITAMURA, Toshio, OZAWA, Keiya, and MANO, Hiroyuki. Sak Serine-Threonine Kinase Acts as an Effector of Tec Tyrosine Kinase. Photography by Yamashita et al. *JBC - J. Biol. Chem.*, August 2001, vol. 276, no. 42, p. 39012-39020.
39. YAMASHITA, Yoshihiro, WATANABE, Sumiko, MIYAZATO, Akira, OHYA, Ken-ichi, IKEDA, Uichi, SHIMADA, Kazuyuki, KOMATSU, Norio, HATAKE, Kiyohiko, MIURA, Yasusada, OZAWA, Keiya, and MANO, Hiroyuki. Tec and Jak2 Kinases Cooperate to Mediate Cytokine-Driven Activation of c-fos. Photographies by Yamashita et al. *Blood*, March 1998, vol. 91, no. 5, p. 1496-1507.