

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

KATEDRA VETERINÁRNÍCH DISCIPLIN



**Příprava nástroje pro detekci polohy
kinetochor v meióze**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Helena Soumarová

Konzultant: MVDr. Martin Anger, CSc.

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Příprava nástroje pro detekci polohy kinetochor v meióze“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne:

.....

Helena Soumarová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla v první řadě poděkovat mému konzultantovi MVDr. Martinovi Angerovi, CSc., za výběr tematiky, metodické vedení a taktéž za finanční zajištění (GAČR grant 523/09/0743 a EMBO SDIG grant 1817) mojí diplomové práce, která byla uskutečněna v Laboratoři kontroly buněčného dělení na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově. Práce byla rovněž podpořena Interní grantovou agenturou ÚŽFG jako projekt s názvem „Příprava nástroje pro vizualizaci kinetochor v meióze“, registrační číslo ÚŽFG/11/14, termín řešení projektu 3. 5. 2011 – 9. 12. 2011.

Z celého týmu Laboratoře kontroly buněčného dělení bych pak zvláště chtěla poděkovat MVDr. Anně Danylevské, za pomoc při klonování cDNA konstruktů a za ověření jeho funkčnosti mikroinjekcí do myších oocytů a také MVDr. Jaroslavě Šebestové za pomoc při přípravě aplikace do Interní grantové agentury ÚŽFG.

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo získat funkční mRNA fluorescenčně značeného proteinu mSpindly, pomocí které by bylo možné vizualizovat chromozomální kinetochory v průběhu časosběrné mikroskopie. Detekce polohy kinetochor je nezbytná pro potřeby studia poruch segregace chromozómů.

Tato práce předkládá ucelenou literární rešerši vysvětlující problematiku buněčného cyklu, jeho kontrolu, vývoj oocytů a mechanismus dělení pohlavních buněk. Dále je popsána stavba chromozómu, zejména umístění a funkce kinetochory a její vztah k proteinu Spindly. Vysvětlen je také význam tohoto proteinu v rámci buněčného cyklu. Pro pochopení metodiky je zařazena také kapitola, která se věnuje tzv. centrálnímu dogmatu molekulární biologie a kapitola popisující aplikace základních technik genetických manipulací, se kterými bylo v průběhu laboratorních úkonů pracováno.

Metodická část se věnuje laboratornímu postupu k vytvoření geneticky modifikovaného proteinu. Součástí procedury bylo získání specifické DNA sekvence a příprava plasmidového vektoru obsahujícího sekvenci proteinu mSpindly a zeleného fluorescenčního proteinu EGFP. Vektor byl linearizován a použit pro syntézu mRNA kódující fúzní protein EGFP-mSpindly. Získaná mRNA byla použita k mikroinjekci do myšího oocytu. Zde došlo k vytvoření fluorescenčně značeného proteinu, který se fyziologicky lokalizuje na chromozomálních kinetochorách. Tímto způsobem byly kinetochory vizualizovány.

Výsledky práce jsou podpořeny obrazovou dokumentací a popisem situace. Výsledky záznamu zrání oocytů pomocí časosběrné mikroskopie jsou dále analyzovány a potvrzují, že lze pomocí fluorescenčně značeného proteinu vizualizovat kinetochory v reálném čase bez nutnosti fixace buněk v jednotlivých stádiích meiotického dělení. Takovýto nástroj může být užitečný ve studiích zaměřených na výzkum poruch segregace chromozómů v meióze savců a na způsob vzniku aneuploidii.

Klíčová slova: meióza, kinetochora, chromozóm, Spindly, aneuploidie, SAC, kontrolní bod

Summary

The main goal of this study was to develop functional mRNA encoding EGFP-tagged mSpindly protein, which will be used for kinetochore visualisation during oocyte maturation using time-lapse microscopy. Detection of kinetochores is required for studies related to chromosome segregation errors.

This diploma thesis starts with literature review covering cell cycle and its control mechanisms, oocyte development and cell division of female germ cells. Part of the review is also focused on chromosome structure with special attention to the localization and function of the kinetochore proteins. Specific part is dedicated to the expression and localization of the Spindly protein throughout cell cycle and its possible role in kinetochore function. Due to the recombinant DNA techniques frequently used in this study, the chapter focused on the central dogma of molecular biology is included.

The material and methods section describes the laboratory techniques and procedures involved in cloning of fusion protein and mRNA production by *in vitro* transcription. The procedures started with preparation of cDNA library from mouse testes. This library was then used for subcloning of specific cDNA sequence encoding mouse Spindly protein by PCR into a plasmid vector containing Enhanced green fluorescent protein (EGFP) sequence. After linearization, this vector was subsequently used for *in vitro* synthesis of mRNA encoding mouse Spindly protein fused to EGFP. Resulted mRNA was microinjected into mouse oocytes and the localization pattern of mSpindly was studied.

The EGFP-mSpindly fusion protein showed localization to the kinetochores. Using microinjection of EGFP-Spindly fusion protein will be therefore used for visualization of kinetochores in live oocytes throughout meiosis. This tool will be used in studies focused on chromosome segregation errors in mammalian meiosis and the origin of aneuploidy.

Keywords: meiosis, kinetochore, chromosome, Spindly, aneuploidy, SAC, checkpoint

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	3
3	Literární rešerše.....	4
3.1	Buněčný cyklus	4
3.1.1	Kontrola buněčného cyklu	5
3.2	Specifika mitózy a meiózy	7
3.2.1	Mitóza	7
3.2.2	Meióza	9
3.2.3	MTOC, centrosom, mikrotubuly a vřeténko.....	12
3.3	Folikulogeneze a oogeneze.....	14
3.4	Oogeneze a meiotické zrání oocytů.....	15
3.5	Stavba chromozómu	16
3.5.1	Chromatin	17
3.5.2	Nukleozóm.....	17
3.5.3	Centromera a kinetochora.....	18
3.6	Spindly protein	20
3.7	SAC	21
3.8	APC/C a nástup anafáze	22
3.9	Aneuploidie v meióze.....	23
3.10	Centrální dogma molekulární biologie	24
3.10.1	Replikace DNA.....	26
3.10.2	Výroba proteinů	28
3.11	Genové inženýrství a techniky genetické manipulace.....	30
3.11.1	PCR.....	30
3.11.2	Klonovací vektory	31
3.11.3	Agarózová elektroforéza.....	31
3.11.4	Fluorescenční proteiny.....	32
4	Materiál a metody	33
4.1	Příprava oocytů, kultivace a mikroinjekce	33
4.2	Získání specifické DNA sekvence z testikulární mRNA	33
4.2.1	Izolace RNA	34
4.2.2	Syntéza cDNA	34

4.2.3	PCR amplifikace specifické sekvence mSpindly	35
4.3	Zaklonování sekvence mSpindly do vektoru pRNA.....	35
4.3.1	Restrikční štěpení.....	35
4.3.2	Ligace vektoru a insertu.....	36
4.4	Transformace a pomnožení rekombinantního plasmidu	36
4.4.1	Testace kolonií pomocí PCR	36
4.5	Izolace plasmidové DNA.....	37
4.5.1	Testační štěpení plasmidu.....	37
4.6	Linearizace plasmidu	38
4.7	Příprava cRNA <i>in vitro</i>	38
4.7.1	Transkripce <i>in vitro</i>	38
4.7.2	Vytvoření poly(A) konce RNA	38
4.8	Live imaging – časoběrná mikroskopie	38
5	Výsledky	39
5.1	Získání specifické sekvence z testikulární mRNA	39
5.2	Zaklonování sekvence mSpindly do vektoru pRNA	39
5.3	Testace kolonií pomocí PCR	40
5.4	Testace rekombinantního plasmidu	40
5.5	Sekvenace	41
5.6	Testace RNA.....	41
5.7	Analýza obrazových výsledků.....	42
6	Diskuze.....	44
7	Závěr	46
8	Seznam použitých zkratk	47
9	Použitá literatura	49
10	Přílohy	52
10.1	Sekvence mSpindly	53
10.2	Sekvence mSpindly získaná z testikulární mRNA	54
10.3	Mapa vektoru pRNA	55

1 Úvod

Meióza, proces dělení zárodečných buněk, sestává z mnoha složitých navazujících dějů, které mají pevný řád a jsou přísně regulovány mechanismy na molekulární úrovni. Výsledkem dvou po sobě jdoucích dělení v rámci meiózy je vznik jedné (oocyty) nebo čtyř (spermie) gamet čili pohlavních buněk, které mají poloviční počet chromozómů nesoucích genetickou informaci a tudíž i polovinu genetické výbavy. V případě, že dojde k selhání jakéhokoli prvku z řetězce složitých molekulárních procesů, může být narušen celý průběh meiózy a ve svém důsledku to může vést až k poruchám segregace chromozómů čili k aberacím zvaným aneuploidie. Často tato numerická chromozomální aberace způsobí poruchy neslučitelné se životem a důsledkem jsou v tomto případě aborty plodu. Aneuploidie mohou mít za následek i vady jako jsou tělesné malformace a poruchy vývoje centrální nervové soustavy a postižení jedinci také bývají neplodní.

Také v průběhu mitózy může mít aneuploidie fatální následky. Aneuploidie je totiž příčinou mnoha typů rakoviny, což znamená, že stabilita genomu je zásadní v životě buněk, které se dělí po celý život organismu. Takovými buňkami jsou buňky epitelů, zejména buňky kůže a výstelky střev, kde také nejčastěji ke vzniku rakoviny u lidí dochází.

Hlavním zpětnovazebným kontrolním mechanismem, který dohlíží na správný rozchod chromozómů jak v mitóze, tak i v meióze, je takzvaný *Spindle Assembly Checkpoint* (zkráceně spindle checkpoint) neboli SAC. V průběhu meiózy se může oslabený nebo špatně fungující spindle checkpoint velkou měrou podílet na aneuploidii spojených s vysokým věkem matek, které známe u lidí. Místo připojení mikrotubulů ke chromozómům se nazývá centromera. Právě v místě centromery se nachází proteinový komplex zvaný kinetochora, který umožňuje připojení mikrotubulů na chromozómy a je tedy pomyslným „lepidlem“ mezi těmito dvěma prvky. Centromera je také posledním místem v meióze, kde zůstávají replikované chromozómy čili sesterské chromatidy ještě spojeny pomocí proteinového komplexu zvaného cohesin. Pokud nedojde k oddělení sesterských chromatid v tomto místě, nebo pokud se oddělí předčasně, může to být také příčinou aneuploidii.

Abychom pochopili chyby, které se v průběhu dělení pohlavních buněk stávají, a zjistili, jak aneuploidie vznikají, musíme být schopni sledovat polohu kinetochory v každém okamžiku meiotického dělení. K tomu se často používají sondy označené pomocí fluorescenčních proteinů, které při excitaci zářením o dané vlnové délce emitují světlo o vlnové délce vyšší v rámci viditelného spektra. K takovému označení je obvykle zapotřebí sledované buňky fixovat v různých stádiích dělení. Při sledování oocytů to znamená fixovat

v každém stádiu meiotického zrání určitý počet oocytů, což znamená, že není možné sledovat vývoj jednotlivých buněk v reálném čase. Takové simulace jsou procesu *in vivo* velice vzdálené a výsledky vyvozené z takových pokusů mohou být zkreslené. V tomto směru by tato studie mohla být přínosem, poněvadž nabízí možnost sledovat polohu kinetochor chromozómů při zrání oocytů v reálném čase a pozorovat konkrétní buňky od začátku do konce meiotického dělení.

Tato studie je zaměřena na protein s názvem mSpindly, který se na kinetochore vyskytuje po celé meiotické zrání myších oocytů a jeho koncentrace a lokalizace se v průběhu meiózy jen nepatrně mění. Zřetelně se zde vyskytuje v prometafázi, kdy jsou kinetochory hlavním cílem jeho lokalizace. V dalších fázích meiotického zrání se protein přesouvá i na póly vřeténka. Klíčovým momentem pro studium aneuploidí je okamžik přechodu z metafáze do anafáze a v ten moment je důležité sledovat, co se v buňce s chromozómy děje. Použití značeného proteinu mSpindly snad pomůže lépe nahlédnout do tajů buněčného dělení a mechanismu vzniku poruch segregace chromozómů.

2 Cíl práce

Práce vychází z hypotézy, že je možné s pomocí EGFP-značeného mSpindly proteinu (EGFP = *Enhanced Green Fluorescent Protein*, zelený fluorescenční protein) vizualizovat chromozomální kinetochory a detekovat jejich polohu pro potřeby studia poruch segregace chromozomů v meioze savců. Cílem práce je získat funkční mRNA pro EGFP-značený mSpindly protein.

Za účelem dosažení cíle bylo stanoveno několik dílčích cílů:

1. Příprava oocytů pro kultivaci in vitro
2. Příprava vektoru obsahujícího DNA sekvenci mSpindly proteinu
 - PCR amplifikace specifické sekvence mSpindly s využitím DNA polymerázy PhusionTM
 - zaklonování sekvence do vektoru pRNA za použití restriční endonukleázy
 - osekvenování výsledného konstruktů
 - pomnožení a linearizace vektoru pro přípravu RNA in vitro
3. Příprava cRNA in vitro za použití mMESSAGING mMACHINE[®] kitu
 - testace RNA pomocí agarózové elektroforézy
 - testace RNA pomocí mikroinjekce do oocytu (spolupráce)
4. Mikroinjekce připravené cRNA do myších oocytů a následná časosběrná mikroskopie (spolupráce)
5. Analýza obrazových výsledků

3 Literární rešerše

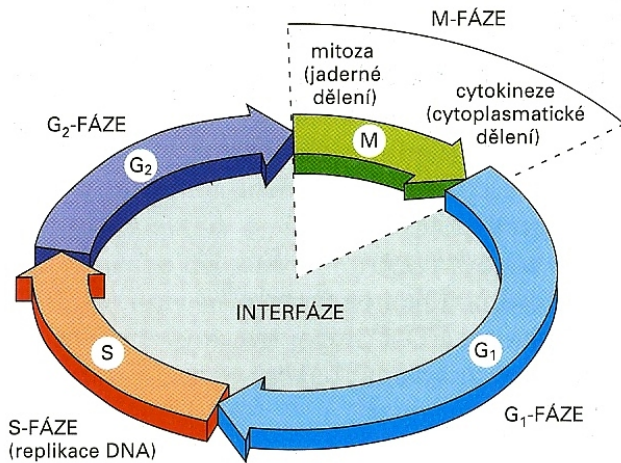
3.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je sled dějů, které na sebe vzájemně navazují, a na základě zpětnovazebných kontrolních mechanismů nemůže jeden následovat, aniž by nebyl správně dokončen ten předchozí. Pokud by k něčemu takovému došlo, mohlo by to mít fatální následky, například ve formě nádorového bujení. Mnohé rysy buněčného cyklu jsou napříč organismy takřka totožné. Celý cyklus je totiž řada procesů, které mají pokaždé stejný úkol. Tím je zkopírovat svoji genetickou informaci a rozdělit ji do dceřiných buněk tak, aby každá nesla přesnou kopii kompletního genomu. V eukaryotních buňkách má cyklus několik fází. Základní fází je **interfáze**, ve které se v každém okamžiku nachází většina buněk v organismu a je také mnohonásobně delší než fáze, ve které se buňky dělí (Obr. 1). Jejím úkolem je připravit buňku na dělení. V této době se replikují organely, tvoří se nové proteiny a replikuje se také genetická informace – DNA (Alberts et al., 2005).

Interfáze se dále dělí na tři fáze. **G1- fáze** (z angl. *gap* = mezera) je fází exprese regulačních genů buněčného cyklu. To znamená, že je fází zvýšené produkce proteinů, které budou zapotřebí pro syntézu DNA a dochází zde tedy v maximální míře k transkripci genů a k translaci v proteiny. Přechod mezi fází G1 a S-fází je kritický bod regulovaný řadou buněčných mechanismů. Pokud jsou ve fázi G1 zaznamenány signály, které znamenají, že něco není v pořádku, podstoupí buňka programovanou buněčnou smrt čili apoptózu. Následující fází je **S-fáze** (syntetická), jejímž hlavním úkolem je syntéza DNA, tedy její replikace (Alberts et al., 2005; Crews et al., 2000). Po replikaci zůstávají replikované molekuly DNA, kterým se nyní říká **sesterské chromatidy**, pevně spojeny po celé délce pomocí proteinového komplexu **cohesinu**. U kvasinek tento stav trvá až do M-fáze, kde se tento komplex začíná proteolyticky odbourávat (Bernard et al., 2002). U savců dochází k deaktivaci cohesinu již v profázi, kdy se odbourává většina proteinů cohesinu, a to pomocí fosforylace Polo-like kinázou PLK (Petronczki et al., 2003). V poslední fázi se buňka intenzivně připravuje na M-fázi. V **G2-fázi** má opět hlavní slovo proteosyntéza, nyní se ale vytváří proteiny nutné pro rozdělení buňky. Jsou to zejména motorové proteiny, které mají za úkol přesunovat důležité molekuly tam, kde jsou právě potřeba pro zapojení do intracelulárních procesů (Alberts et al., 2005; Crews et al., 2000).

Po dlouhé přípravě v rámci interfáze následuje u dělících se buněk stěžejní fáze buněčného cyklu, **M-fáze**. Somatické čili tělní buňky v tomto okamžiku podstupují jaderné

dělení – mitózu. Záradečné buňky, které dávají vznik buňkám pohlavním čili gametám, podstupují dělení speciální. Je jím meióza, jejímž hlavním úkolem je dát vznik unikátnímu jedinci díky procesu zvanému crossing-over a redukovat genetickou výbavu gamety na polovinu (Alberts *et al.*, 2005). Proto se také nazývá redukční dělení.



Obrázek 1: Průběh buněčného cyklu. V interfázi buňka roste a hromadí proteiny. V M-fázi se odehrává karyokineze následovaná cytokinezí, vlastním rozdělením buňky. Replikace DNA se odehrává v S-fázi (Alberts *et al.*, 2005).

3.1.1 Kontrola buněčného cyklu

Kontrola buněčného cyklu obnáší velké množství složitých biologických procesů a funguje na základě zpětnovazebných kontrolních mechanismů. Pokud dojde v průběhu buněčného cyklu k nějaké odchylce je pravděpodobné, že bude narušen celý cyklus (Alberts *et al.*, 2005).

V rámci buněčného cyklu existují tři důležité **kontrolní body**, takzvané **checkpointy** (Murray, 1994). Hlavní funkcí těchto zpětnovazebných kontrolních mechanismů je udržovat v buňkách stabilní množství nepoškozené DNA a případně zabránit buňce s poškozenou DNA v jejím dělení (Kastan *et Bartek*, 2004).

První kontrolní bod se nachází ve fázi G₁ a nazývá se **G₁ checkpoint**. Zde je kontrolována zejména velikost buňky (Alberts *et al.*, 2005) a také možná poškození DNA před vstupem do S-fáze. Pokud by byla DNA poškozena, v buňkách se vyskytují zvýšené hladiny tumor supresorového proteinu p53, který způsobí uvolnění inhibitorů Cdk (cyklin dependentních kináz), zejména působí jako transkripční faktor inhibičního proteinu p21 a zvyšuje jeho expresi vazbou na regulační oblast genu tohoto proteinu. Protein p21 přímo reaguje se specifickými komplexy cyklin-Cdk, které jsou nezbytné pro iniciaci replikace DNA, která je takto pozdržena (Alberts *et al.*, 2005; Murray, 1994). Obdobně, pokud by byl zapotřebí další růst, umožňuje tento kontrolní bod regulačnímu systému, aby pozdržel buňku v této fázi a oddálil replikaci DNA. Tento kontrolní bod také umožňuje zásadní krok v životě většiny somatických buněk, které zde mohou vystoupit z buněčného cyklu. Tyto buňky tak

vstupují do zvláštní fáze G0 ve které se buňka dále nedělí. V této klidové fázi se tedy v každém okamžiku nachází většina savčích somatických buněk, některé (buňky kosterního svalstva, nervové buňky) v tomto stavu setrvávají celý život, jiné aktivují buněčný cyklus, pokud je zapotřebí příslušnou tkáň obnovit (hepatocyty – jaterní buňky). V této části buněčného cyklu je aktivita regulátorů a exprese cyklinů a Cdk minimální. Některé buňky se ale dělí v průběhu života neustále a z buněčného cyklu nevystupují. To jsou zejména buňky epitelů, tedy kůže a výstelky střev, které jsou proto nejvíce ohroženy vznikem malignancí (Alberts et al., 2005).

Druhým kontrolním bodem je **G2 checkpoint**, který umožňuje kontrolu před započítím vlastního dělení buňky. Zejména je nutné zkontrolovat kompletní replikaci DNA (MPF viz dále). Hlavním způsobem, kterým buňky řídí své procesy je fosforylace (připojení fosfátu) nebo defosforylace klíčových proteinů. Tím se obvykle změní jejich funkce a zejména prostorové uspořádání čili konformace. O tyto fosforylační reakce se starají enzymy, které se nazývají **kinázy** a **fosfatázy** (Alberts et al., 2005).

Posledním kontrolním bodem je **spindle checkpoint**, který dohlíží zejména na správnou segregaci chromozomů (kapitola 3.7).

3.1.1.1 Cyklin dependentní kinázy

Kinázy (proteinkinázy – většina kináz fosforyluje proteiny) regulují ohromné množství biologických procesů prostřednictvím fosforylace proteinových substrátů. Jsou to tedy enzymy, které katalyzují přenos jedné fosfátové skupiny z ATP (univerzální energetický nosič) na jeden postranní řetězec určité aminokyseliny cílového proteinu. Tím změní jeho konformaci a protein se stane aktivním (popř. neaktivním). Jiné enzymy slouží k defosforylaci a nazývají se **fosfatázy** (Alberts et al., 2005). Kinázy, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, se nazývají cyklin-dependentní proteinkinázy, zkráceně **Cdk**. To proto, že jejich aktivita je závislá na **cyklinech**, které jsou také proteinové povahy. Název „cykliny“ je odvozen od jejich kolísavých hladin v průběhu buněčného cyklu, které se cyklicky mění. Kinázy spolu s cykliny vytváří komplexy cyklin-Cdk (Alberts et al., 2005). Například komplex cyklinB-Cdk1 je zodpovědný za vstup do M-fáze a nazývá se MPF čili M-fází podporující faktor (*M-phase Promoting Factor*) (Jackman et al., 2003), nebo také *Maturation Promoting Factor* čili zrání podporující faktor (Sirard, 2001).

3.2 Specifika mitózy a meiózy

Hlavním rozdílem mezi meiózou a mitózou jakožto mezi dvěma buněčnými děleními je to, co bude předáno buňkám dceřiným. Zatímco úkolem mitózy je zmnožení tělních buněk, tedy buněk tkání, které potřebují průběžně obnovovat, úkol meiózy se zásadně liší, poněvadž vytváří haploidní gamety z diploidních zárodečných buněk a díky speciálnímu procesu zajišťuje genetickou diverzitu populace (Harigaya et Yamamoto, 2007).

Meióza je dělení buněk, které budou na konci svého vývoje sloužit jako buňky pohlavní. Tyto buňky mají ale na rozdíl od ostatních somatických buněk vysoce specifickou funkci. Hlavním znakem meiozy je zvláštní proces zvaný **crossing-over**, který způsobí, že každý jedinec vzniklý pohlavním rozmnožováním je jedinečný díky tomu, že jeho genetická výbava prošla rekombinací mezi mateřskou a otcovskou DNA. Dalším specifikem meiozy je to, že redukuje genetickou výbavu na polovinu. Pohlavní buňka totiž slouží ke spojení s jinou pohlavní buňkou. Kdyby byly tyto buňky děleny klasickou mitózou, po spojení takových buněk by se genom násobil. Z tohoto důvodu se buňky sloužící k pohlavnímu rozmnožování dělí zvláštním způsobem. Je totiž nezbytné, aby před vykonáním své funkce zredukovaly svou genetickou výbavu na polovinu. Tímto způsobem se z **diploidních** zárodečných buněk vytvoří buňky **haploidní** (Alberts et al., 2005).

3.2.1 Mitóza

Jak již bylo výše řečeno, je úkolem mitózy rozdělit buňku na dvě. Důležitou roli zde zastává mitotické vřeténko jako hlavní nástroj mitotického aparátu pro segregaci chromozómů, které zajišťuje motilitu kondenzovaných chromozómů. Procesy mitózy se odehrávají v pěti fázích (Obr. 2).

Nástup **profáze** je zpravidla rozlišen ve chvíli, kdy chromozómy kondenzují a stávají se tedy viditelnými. V průběhu celé profáze dále pokračuje kondenzace a chromozómy jsou čím dál zřetelnější. V důsledku replikace DNA v S-fázi buněčného cyklu je nyní chromozóm sestaven ze dvou identických dceřiných chromatid, které jsou spojené pomocí proteinů a jsou to vlastně budoucí dceřiné chromozómy. V profázi se již také formují kinetochory na centromeře každé z chromatid a rozestupují se dceřiné centrozomy. To probíhá tak, že mikrotubuly vyrůstající z opačných centrozomů v místě styku dále dorůstají a „odtláčují“ centrozomy na opačné póly buňky. Na konci profáze dochází k dezintegraci jádřerka (*nucleolus*) v jádře, které jakoby „mizí“ (Alberts et al., 2005).

Ukazatelem nástupu **prometafáze** je rozpad jaderné membrány do váčků, čímž je umožněn pohyb chromozómů v cytoplasmě. Opačná orientace sesterských kinetochor je

zodpovědná za to, že se po chvíli připojí na kinetochory mikrotubuly vystupující z centrozomů opačných pólů mitotického vřeténka. Tyto mikrotubuly se nazývají kinetochorové. Mikrotubuly, které vystupují radiálně z centrozomu směrem k membráně, se nazývají astrální a ty, které se střetnou svými plus konci s mikrotubuly z opačného pólu, se s nimi spojí asociovanými proteiny a říká se jim polární (Alberts et al., 2005).

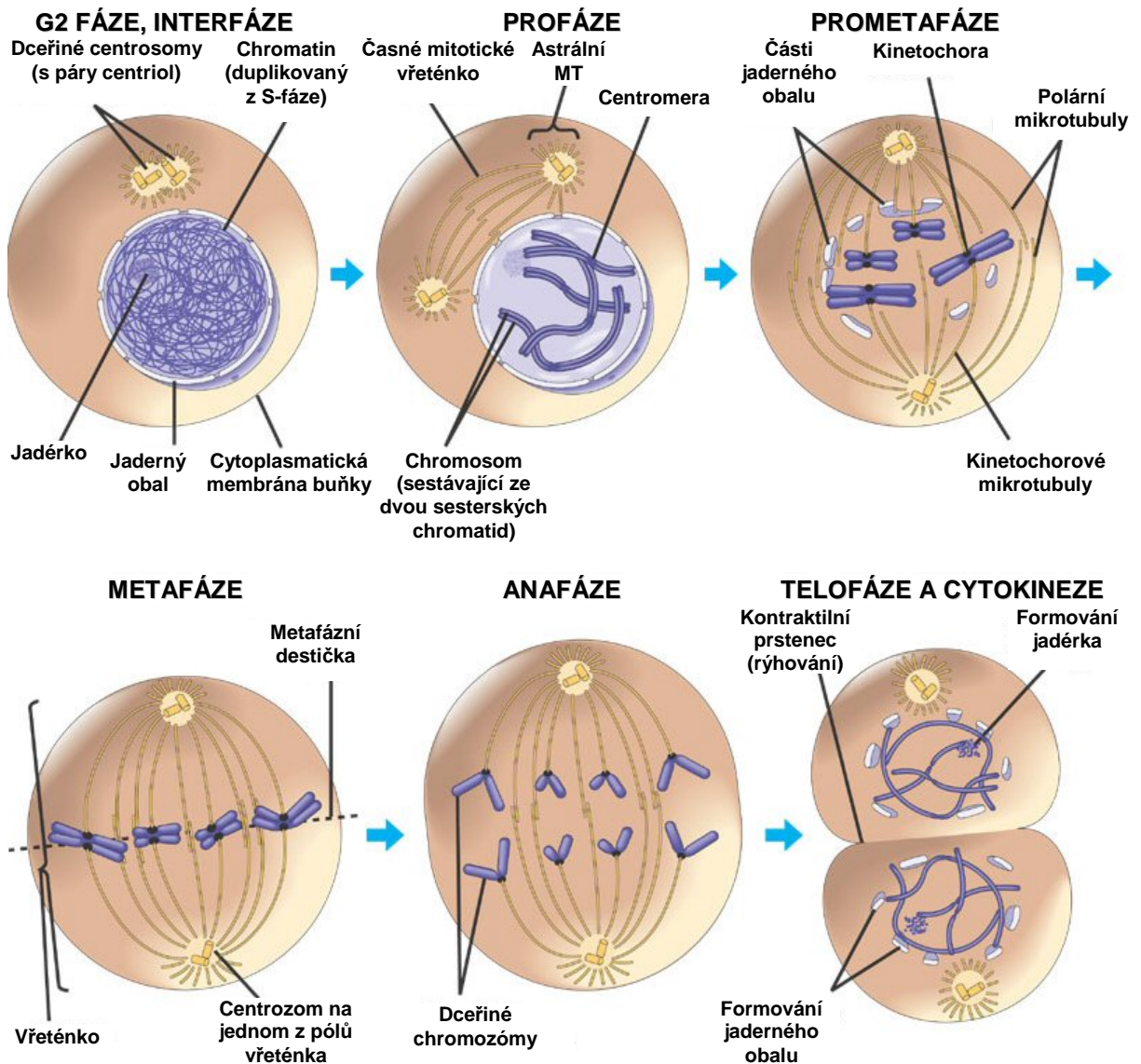
Připojení mikrotubulů z opačných pólů na chromozóm na něm vytváří tah, který způsobí, že se chromozómy postupně srovnají v ekvatoriální rovině buňky za vzniku tzv. **metafázní ploténky**, která jednoznačně určuje nástup **metafáze**. Ačkoliv je průběh této fáze relativně klidný, je metafáze jakožto příprava na segregaci chromozómů nejdelší fází mitózy.

Díky působení proteinového komplexu APC (viz kapitola 3.8) a částečně také díky vzrůstu intracelulární hladiny Ca^{2+} , který se podílí na aktivaci APC (Arredouani et al., 2010) dochází k aktivaci separázy a následně k degradaci proteinů (komplex cohesin) spojujících sesterské chromatidy. Tento stav je charakteristický pro **anafázi**, kde začíná segregace chromozómů. Kinetochorové mikrotubuly se zkracují díky depolymerizaci v oblasti kinetochor a tím přitahují chromozómy k pólům. Naopak polární mikrotubuly se prodlužují a prodlužuje se tedy i vřeténko a celá buňka. Na konci anafáze se chromozómy shromáždí v oblasti pólu.

V momentě, kdy se okolo chromozómů začíná znovu formovat jaderná membrána, nastupuje mitotická fáze závěrečná – **telofáze** (Cheeseman et Desai, 2008; Alberts et al., 2005). V této fázi se rozvolňují kondenzované chromozómy, čímž je znovu umožněna syntéza RNA a dochází k vizualizaci jadérka (Kovář, 2003).

Po dokončení mitózy obvykle následuje **cytokineze**. V té se pomocí kontraktálního prstence zaškrtní celá buňka v polovině, čímž rozdělí cytoplasmu a orgány přibližně na polovinu a vytvoří z jedné buňky dvě.

Obrázek 2: Mitóza. Znázornění jednotlivých fází a procesů v nich. V G2-fázi se duplikoval centrozom. K rozestupu centrozomů dochází v profázi, kdy už jsou značně kondenzované chromozómy. Jsou zde již jasně patrné sesterské chromatidy. V prometafázi se rozpadá jaderná obálka (GV/NE), mikrotubulům (MT) je umožněno připojení na kinetochory, což vede k nástupu metafáze a srovnání chromozómů v ekvatoriální (rovníkové) rovině buňky. Zkracováním mikrotubulů v anafázi dochází k jejich segregaci a přitahování k pólům a polární mikrotubuly roztačují vřeténko. V telofázi se začíná formovat GV a jadérko. Po skončení mitózy následuje cytokineze. Stahováním kontraktálního prstence se buňka rozdělí na dvě. Převzato a upraveno z http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/mitosis_phases.html



3.2.2 Meióza

Účelem tzv. meiotického dělení je vytvořit v několika krocích buňky, které musí být speciálně uzpůsobeny pro pohlavní rozmnožování. Gamety vznikající meiózou jsou tedy velice specifické buňky, poněvadž jejich úkolem je splynout s gametou opačného pohlaví a dát vznik novému jedinci. Aby se mohla splynutím gamet vytvořit diploidní **zygota** a z ní následně diploidní embryo, musí být gamety haploidní. Každý savec je vybaven somatickými buňkami se dvěma sadami chromozómů a je zapotřebí speciálního mechanismu dělení buněk

odlišného od mitózy, který umožní redukci diploidního genomu na haploidní tedy redukci počtu chromozómů na polovinu. Vytvoření haploidních gamet z diploidních zárodečných buněk je úkolem meiózy (Alberts et al., 2005).

Dalším ohromným specifíkem meiózy je proces nazývaný **crossing-over**, při němž dochází k rekombinaci homologních chromozómů (mateřského a otcovského), což vede ke vzniku variability potomstva. To je velice důležité z hlediska evoluce, kde vznikají a fixují se nové formy a kombinace znaků, které přináší nositelům nové výhody (Alberts et al., 2005).

Na počátku pohlavního rozmnožování bylo tedy potřeba mitózu trochu pozměnit, aby se vytvořila gameta (ačkoliv je meióza mnohem komplexnější a složitější proces než mitóza, doposud nebyly nalezeny důkazy, které by potvrzovaly, že se meióza vyvinula později) (Petronczki et al., 2003). Vzniklo tak redukční dělení zvané meióza (z řeckého *meioun* = redukovat) (John et Lewis, 1973), při níž se uskuteční dvě jaderná dělení podobná dvěma po sobě jdoucím mitózám s tím rozdílem, že mezi dvěma meiózami neprobíhá žádná interfáze, to znamená ani replikace DNA. Tato dvě dělení se označují jako meióza I a meióza II. **Meióza I** je velice specifická a v mnoha ohledech se značně odlišuje od mitózy. Zásadním rozdílem mezi dvěma meiotickými děleními je dlouhá profáze v meióze I, ve které se uskutečňuje genetická rekombinace (Obr. 3). **Profáze I** sestává z pěti fází. Na začátku jsou dekonzenzované chromozómy oběma svými konci připojeny k jadernému obalu a v této fázi nelze opticky rozlišit sesterské chromatidy, které jsou pevně spojeny cohesinem po celé délce. Tato fáze se nazývá **leptotene**. V další fázi dochází k postupnému párování homologních chromozómů pomocí proteinových struktur (synaptonemální komplex) za vzniku **bivalentů** neboli tetrad. To se odehrává ve fázi **zygotene** (Alberts et al., 2005).

Po dokončení párování nastupuje **pachytene**. Tato fáze je nejdůležitější událostí celé meiózy a tvoří často až 90 % času potřebného na uskutečnění meiózy. Ve fázi pachytene se totiž odehrává genetická rekombinace, tedy crossing-over. Při tomto procesu se recipročně vymění úseky nesesterských homologních chromatid tak, že se DNA rozpojí ve stejných místech obou rekombinujících chromatid a fragment jedné homologní chromatidy se znovu napojí místo fragmentu druhé chromatidy a naopak. Místa, kde se DNA překřížuje a rozpojuje, se nazývají **chiazmata** a homologní chromozómy v nich zůstávají spojené až do anafáze I (Petronczki et al., 2003). Důsledkem crossing-overu je to, že všechny 4 buňky (u meiózy spermií) vzniklé v meióze mají odlišnou genetickou výbavu (u oocytů vzniká pouze jediná buňka, genetická výbava se liší od vzniklých pólových tělísek – zkráceně PB).

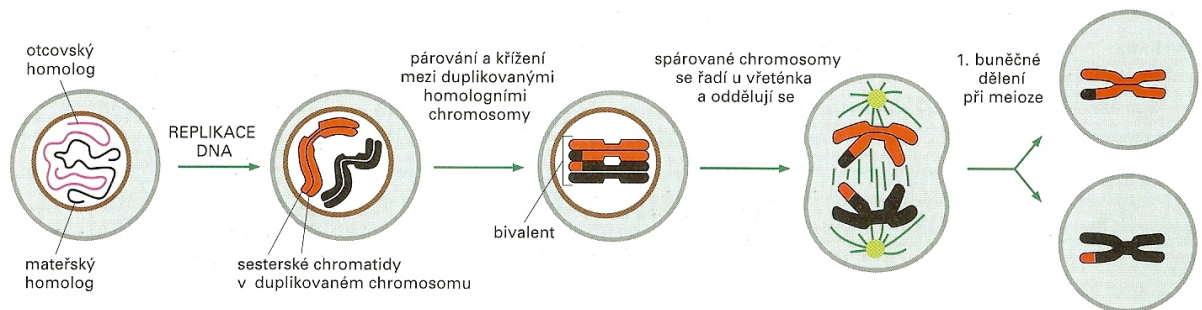
Ve fázi **diplotene** se homologní chromozómy opět rozpojují, ale v chiazmatech zůstávají spojené. Poslední fáze profáze I se nazývá **diakineze**. Nyní jsou již dobře odlišitelné

sesterské chromatidy, je již dokončena úplná kondenzace chromozómů a dochází k rozpadu jaderné membrány. Na rozdíl od mitózy (a meiozy II), kde se každá kinetochora sesterských chromatid připojuje k opačnému pólu a vytváří tak vůči sobě amfitelní připojení potažmo biorientaci, na centromerách sesterských chromatid v meioze I jsou obě kinetochory připojeny **syntelně** čili obě ke stejnému pólu.

Podobně jako v mitóze následuje **prometafáze I**. V prometafázi I je jasně patrná orientace bivalentů, centromery jsou orientované směrem k pólům, ale chromozómy nejsou ještě shromážděny (John et Lewis, 1973). V **metafázi I** se v ekvatoriální rovině řadí místo jednotlivých chromozómů celé páry, z nichž každý homologní chromozóm sestávající ze dvou chromatid je připojený oběma kinetochorami pouze k jednomu pólu vřeténka. V **anafázi I** se oddělí sesterské chromatidy distálně od vytvořených chiasmat (sesterské chromatidy zůstávají nadále spojené v oblasti centromery), což nastartuje uvolnění chiasmat a oddělení homologních chromozómů (Petronczki et al., 2003).

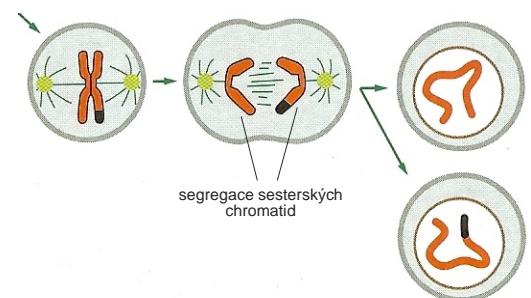
Obrázek 3: Meióza I. V profázi I dochází ke crossing-overu, vyměňují se části nesesterských homologních chromatid, chromatidy se napojují v chiazmatech (překříženích). V metafázi I se bivalenty (tetrády) řadí v ekvatoriální rovině, homology jsou spojeny v chiazmatech, sesterské chromatidy jsou spojeny cohesinem. V anafázi I se homology rozcházejí, sesterské chromatidy se rozvolnily v důsledku uvolnění distálního cohesinu, ale zůstávají spojené cohesinem v oblasti centromer.

Převzato a upraveno z Alberts et al., 2005.



Obrázek 4: Meióza II. Analogický proces k mitóze, ale do meiózy II vstupuje haploidní buňka. V anafázi II dochází k segregaci sesterských chromatid, ze kterých se stanou dceřiné chromozómy. Oocyt dokončuje meiózu II, pouze pokud dojde k oplození a výsledkem je zralé vajíčko se dvěma pólými tělísky (není na obrázku).

Převzato a upraveno z Alberts et al., 2005.



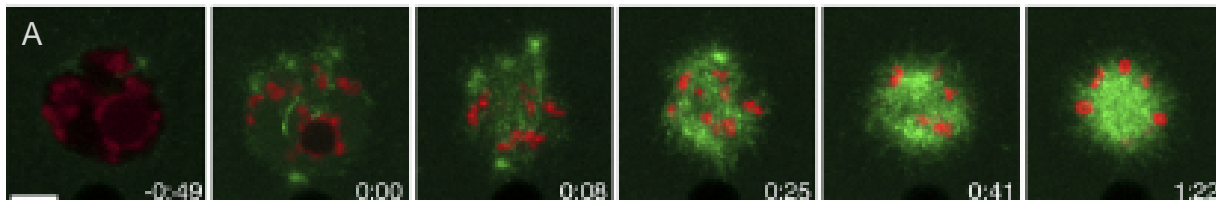
Výsledkem meiózy I jsou dvě dceřiné buňky (pouze u meiózy spermie jsou obě plnohodnotné), které mají již polovinu genetické výbavy a jsou tedy **haploidní**. U oocytů je výsledkem meiózy I pouze jedna buňka jedno pólóvé tělísko (viz kapitola 3.4). Každý chromozóm je ještě stále tvořen dvěma geneticky odlišnými chromatidami. Mezi dvěma

meiózami neproběhne žádná interfáze, protože je nutné zabránit replikaci DNA (Petronczki et al., 2003). To je klíčové pro redukci diploidního genomu somatické buňky na haploidní genom gamet. Chromozómy tedy dekondenzují jen částečně a jaderný obal se neformuje. Okamžitě po cytokinezi totiž nastává **meióza II**, která se již velice podobá mitóze (Obr. 4). Na rozdíl od mitózy mají vstupující buňky již jen jednu sadu chromozómů. Na konci meiózy oocytů čili samičích pohlavních buněk vzniká jedna buňka s haploidním počtem chromozómů, každý tvořen pouze jedinou chromatidou. Místo další buňky v meióze I se takzvaně vyděluje první pólóvé tělísko a oocyt v metafázi II čeká na oplození. Teprve po splynutí se spermií vyděluje oocyt druhé pólóvé tělísko a dokončuje meiózu (Browder, 1985). Pouze v meióze samčích pohlavních buněk čili spermií vznikají čtyři buňky s haploidním počtem chromozómů, které také sestávají pouze z jediné chromatidy. Všechny čtyři spermie, které v meióze vzniknou, jsou geneticky odlišné (Kovář, 2003).

3.2.3 MTOC, centrosom, mikrotubuly a vřeténko

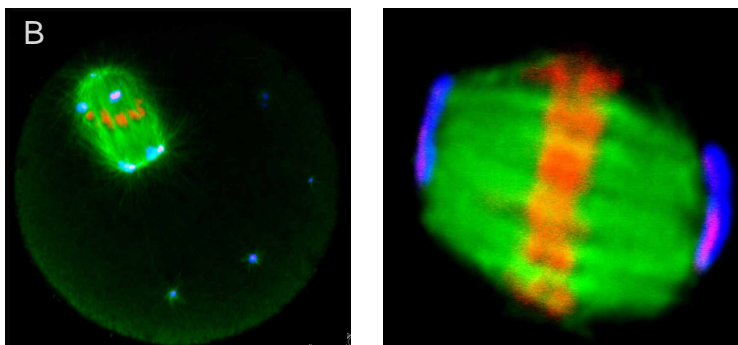
Vřeténko, jak mitotické, tak meiotické je útvar sloužící k organizaci a separaci chromozómů v rámci buněčného dělení. Hlavní úlohu při formování vřeténka má obvykle **centrosom** (ne oocyty savců) (Schuh et Ellenberg, 2007). Je to organizovaná struktura uvnitř buňky a v interfázi se nachází vně jádra v jeho blízkosti. Centrosomy jsou vlastně organizační centra mikrotubulů, která zodpovídají za jejich orientaci a umístění. Pokud buňka vstupuje do dělení, mikrotubuly z centrosomů přímo „vyrůstají“ (Alberts et al., 2005). Každý centrosom se skládá z páru centriol a centrosomového materiálu, což je amorfní proteinová hmota. V průběhu buněčného cyklu podstupuje centrosom řadu funkčních změn a podstupuje takzvaný centrosomový cyklus. Protože buňka z každého dělení vyjde jen s jedním centrosomem a pro dělení buňky jsou potřeba centrosomy dva, je potřeba tyto struktury replikovat podobně, jako se v S-fázi buněčného cyklu replikuje DNA. V G1-fázi proto dochází k jistému rozestupu centriol centrosomu. V S-fázi začíná z každé z původních centriol vyrůstat v kolmém směru centriola nová, což trvá až do fáze G2 (Kovář, 2003). **Centrioly** jsou hlavními součástmi centrosomu. Jsou to zvláštní struktury sestávající z válcovitě uspořádaných krátkých mikrotubulů. Jejich funkce není zcela objasněna, poněvadž se nevyskytují v rostlinných buňkách. Další součástí organizačních center mikrotubulů (mikrotubuly organizující centra - MTOCs a centrosomy) je tzv. **γ -tubulin**, který vytváří prstence – **nukleační místa**. Z nukleačních míst pak vystupují vlákna **mikrotubulů**. V γ -tubulinových prstencích jsou ukotveny mikrotubuly svými mínus konci (Alberts et al., 2005).

Zcela odlišné je ovšem utváření vřeténka v samičích buňkách podstupujících meiózu, tedy v oocytech savců všech dosud prozkoumaných druhů. Savčí oocyty neorganizují mikrotubuly prostřednictvím centrosomů, ale mají k tomuto účelu vytvořeny jiné specializované struktury – mikrotubuly organizující centra – *Microtubule Organizing Centers* – **MTOCs** (Schuh et Ellenberg, 2007). Tyto struktury se nepředávají dceřiným buňkám podobně jako centrosomy, ale většina z nich se utváří *de novo* z cytoplasmatické mikrotubulární sítě v průběhu profáze. Hustota mikrotubulární sítě se postupně snižuje a množství mikrotubulů se lokálně zvyšuje v ohniscích **pericentrinu**. Pericentrin je protein, který je společně s **γ -tubulinem** hlavní součástí pericentriolárního materiálu MTOC. Počet MTOCs s postupující profází narůstá a po GVBD se objevuje okolo 80 mikrotubulárních ohnisek. Jistou úlohu zde sehrává G-protein s názvem **Ran**, který je nezbytný pro masívní vzrůst počtu mikrotubulů po GVBD. To napomáhá individualizaci nahloučených chromozomů (Schuh et Ellenberg, 2007). Bezprostředně po GVBD kolem chromozomů tedy vzroste počet mikrotubulů tak, že utvoří denzní klubko mikrotubulů (Obr. 5A) s ohnisky γ -tubulinu, které se postupně bipolárně prodlužuje ve směru dvou dominantních pólů. Na konci elongace vřeténka je zformováno **acentrosomální** vřeténko se dvěma zřetelnými póly (Obr. 5B) (Schuh et Ellenberg, 2007).



Obrázek 5: Mikrotubuly organizující centra MTOCs.

A: znázorněno formování mikrotubulárního klubka, MTOCs se přesouvají centripetálně. Časový údaj je ve vztahu ke GVBD. Mikrotubuly jsou obarveny zeleně (EGFP), histony H2B chromozomů červeně (Schuh et Ellenberg 2007).



B: Nahloučená MTOCs se přesunula na póly (modře). Na obr. vlevo jsou vidět i samostatná MTOCs, prometáze I. Vpravo metafáze I. Převzato a upraveno z <http://www.alpcan.com/>

Mikrotubuly jsou polarizované polymerní struktury. Svými mínus konci jsou ukotveny v nukleárních místech a radiálně dorůstají připojováním molekul **tubulinu** na svých

plus koncích. Plus konci se také mikrotubuly kotví na kinetochory chromozómů. Molekuly tubulinu jsou tedy stavební jednotky mikrotubulů. Jsou sestavené z globulárních podjednotek α -tubulinu a β -tubulinu vytvářejících spolu $\alpha\beta$ -dimery (Alberts et al., 2005). Molekuly tubulinu se k sobě vážou vertikálně a vytváří tak protofilamentum (mínus konec $\alpha\beta - \alpha\beta - \alpha\beta - \alpha\beta$ plus konec). Protofilamenta se vážou k sobě a 12-15 protofilament se spojuje v trubicovitou dutou strukturu – mikrotubulus o průměru 25 nm (Cheeseman et Desai, 2008). Díky striktnímu řazení molekul tubulinu získává mikrotubulus polaritu, která je nezbytná k dopravě molekul na správná místa prostřednictvím motorových proteinů v průběhu celého buněčného cyklu. Při buněčném dělení polarita mikrotubulů umožňuje správné srovnání chromozómů a jejich následnou bezchybnou segregaci do dceřiných buněk.

Důležitou vlastností mikrotubulů je tak zvaná **dynamická nestabilita**, díky níž mikrotubuly neustále polymerizují a znovu depolymerizují. Polymerizace využívá energii z hydrolyzy GTP, který je navázán na předchozí β -tubulin zabudovaný v mikrotubulu a který s ním vytváří GTP-tubulin. Vazbou dalšího tubulinu (GTP-tubulinu) odevzdá předchozí tubulin energii za vzniku GDP-tubulinu a tato energie se uloží jako mechanické napětí mezi molekulami GDP-tubulinu. Tímto způsobem vzniká mikrotubulus, který je sestaven celý z GDP-tubulinových dimerů a pouze na polymerizujícím konci tubulinové dimery s navázaným GTP. Jelikož je disociace GDP-tubulinu na depolymerizujícím konci více než 1000x intenzivnější než disociace GTP-tubulinu na polymerizujícím konci, koncové molekuly vytváří na mikrotubulu jistou ochranu proti depolymerizaci, čepičku GTP-tubulinu. I tyto molekuly však mohou být odbourány a v tom případě nastává uvolnění uloženého mechanického napětí a rapidní zkrácení mikrotubulu (Cheeseman et Desai, 2008). Tak se mikrotubuly neustále zkracují a prodlužují. Ve výsledku se zdá, jako kdyby z centrosomu neustále vybíhaly stovky paprsků a krátkými výstřely prozkoumávaly svoje okolí. Díky tomu si centrosom může „vybírat“, s jakými částmi buňky se spojí a při buněčném dělení může díky dynamické nestabilitě přitáhnout chromozómy k pólům (Alberts et al., 2005).

3.3 Folikulogeneze a oogeneze

U většiny druhů pohlavně se rozmnožujících živočichů představuje gameta jedinečné propojení mezi současnou a následující generací. Správný vývoj plně zralého a funkčního vajíčka je vrcholem dlouhé komplexní cesty plné specifických buněčných či molekulárních událostí odehrávajících se v cytoplasmě i v jádře. Potom, co zárodečná buňka **oogonie** opustí linii mitoticky se dělících zárodečných kmenových buněk a vstoupí do meiózy, dochází také k rozsáhlým změnám v okolí této buňky. Tím je započat cyklus oogeneze. Oocyt, který má

své místo v ováriu (vaječníku) je úzce spojen s okolní tkání. Zde se utváří ovariální folikul obklopující oocyt. Folikul prochází strukturální a funkční diferenciací – folikulogenezí současně s oocytární oogenezí. Na počátku je malý primordiální oocyt součástí primordiálního folikulu. V primárním folikulu se okolo oocytu utváří velice pevná, pro oocyt typická, obalová glykoproteinová vrstva zona pellucida a v jeho okolí se začínají vyskytovat granulózní buňky. Postupně se folikul vyvíjí až do stádia terciálního zralého folikulu, který se také nazývá **Graafův** folikul a je připraven ovulovat. V tomto folikulu se již nachází dutina vyplněná folikulární tekutinou tzv. antrum a folikuly obsahující dutinu se nazývají antrální folikuly. V porovnání s ostatními somatickými buňkami je oocyt ohromná buňka s nepoměrně velkým obsahem cytoplasmy vzhledem k objemu plasmatické membrány, která jí obaluje. Proto signály z vnějšího prostředí přijímají prostřednictvím okolních buněk. Tyto buňky bezprostředně obklopující oocyt uvnitř folikulu se nazývají **granulózní** buňky (součástí *membrana granulosa*), **kumulární** buňky (součástí vejconosného hrbolku *cummulus oophorus*) nebo také **folikulární** buňky a jsou svými výběžky s oocytem pevně spojeny (Browder, 1985).

3.4 Oogeneze a meiotické zrání oocytů

Klíčovým rozdílem mezi oogenezí čili vývojem oocytů a spermiogenezí je vznik jediného velkého plnohodnotného oocytu namísto čtyř spermií. V prvním meiotickém dělení oocytů následuje po telofázi I modifikovaná cytokineze, při níž nedochází k rovnoměrnému rozdělení cytoplasmy, ale polovina genetické informace se oddělí jako nepotřebný materiál ve formě **pólového tělíska** – *Polar Body* (PB). Druhý neméně důležitý rozdíl je ten, že meióza II může být ukončena pouze po oplození, kdy dochází k vydělení druhého PB. V savcích oocytech je tedy meióza dlouhodobý proces. Než se meióza dokončí, může to u některých druhů (člověk) trvat až 40 let, protože zásoba oocytů v ováriu při narození je konečná (Sirard, 2001). Některé experimenty však naznačují, že by se nové oocyty mohly rekrutovat z kmenových buněk i po narození (Johnson et al., 2005, Lee et al., 2007) To ale zatím nebylo věrohodně potvrzeno.

Ve stádiu časného vývoje plodu dochází k velice rychlému množení oogonií, což pokrývá ztráty způsobené spontánní degenerací čili atrezií oogonií a pachytenních a diplotenních oocytů. Přibližně okolo 13. dne nitroděložního vývoje samice myši a ve 3. měsíci nitroděložního vývoje ženy začne transformace oogonií na oocyty (Browder, 1985).

Před meiózou se odehrává poslední mitotická interfáze. Ve fázi G1 dostane oogonie zásadní signál, na základě něhož oogonie podstoupí tzv. **premeiotickou S-fázi**. Po té vstupují

oocyty do dlouhé meiotické profáze. Raná stádia meiotické profáze (leptotene, zygotene, pachytene) proběhnou u myši relativně rychle, ale u lidí to může trvat i několik měsíců. V okamžiku zrození (u myši po 19 dnech nitroděložního vývoje) jsou oocyty ve stádiu diplotene. V tomto období začínají sférický oocyt obklopotvat folikulární buňky a vytváří se primordiální folikul. Většina oocytů zůstává ve stádiu diplotene zadržena pouze s minimálními změnami za velice dlouhou dobu. Primordiální folikuly s malými oocyty uvnitř představují ohromnou zásobu, ze které je později selektováno pouze několik (desítek, stovek), aby se vyvinuly v preovulatorní folikuly s plně vyvinutými oocyty. Ty folikuly, které nastoupí do fáze růstu, zvětšují svojí velikost množením folikulárních buněk a zvětšováním uzavřeného oocytu. Oocyty mají v této chvíli ještě stále velké jádro se zřetelným sférickým jádérkem (Browder, 1985). Stádium oocytu s intaktním jádrem se také označuje jako GV (*Germinal Vesicle*).

Vlivem hormonálních změn těsně před ovulací (vlna LH - luteinizační hormon) dojde v plně vyvinutém preovulatorním folikulu ke znovunastartování meiózy, k ukončení stádia diplotene, ukončení meiózy I a následně k ovulaci. Po ukončení diakineze dochází k důležité události označované jako GVBD (*Germinal Vesicle Breakdown*). To znamená, že dochází k dezintegraci čili k rozpadu jaderného obalu, což umožní smísení cytoplasmy a karyoplasmy a také segregaci chromozómů. Po GVBD již na oocytu nejsou hranice jádra a jádérka patrné. Chromozómy pak podstoupí metafázi I, velice krátkou anafázi I a telofázi I a další fáze meiózy a krátce po ovulaci vstoupí do metafáze II. Přesuny chromozómů jsou zde opět zastaveny a ovulovaná vajíčka čekají na oplození. Tato perioda mezi GVBD a metafází II se nazývá **meiotické zrání**. Od MII se z oocytu stává zralé **vajíčko** – **ovum** (Browder, 1985).

3.5 Stavba chromozómu

U eukaryotních organismů je DNA ve všech jaderných buňkách svinuta v útvech, které se nazývají chromosomy. V somatických buňkách diploidních organismů může DNA vytvářet dva, deset nebo i mnoho desítek chromozómů, což je pro každý živočišný druh specifické. Chromozómy, které se v somatických čili tělních buňkách (jiné buňky než pohlavní) nacházejí vždy ve dvou kopiích - od matky a od otce se nazývají **autozómy** a tvoří páry navzájem **homologních** chromozómů. Výjimku tvoří nehomologní pár pohlavních chromozómů - **gonozómů** X a Y, který ve svých buňkách nosí samci savčího typu **abraxas** nebo samice typu ptačího – typ **drosophila**. Aby mohly být lineární molekuly DNA svinuty a kondenzovány do úsporných tyčinek, je zapotřebí několika proteinů, kolem kterých se

molekula DNA může ovinout díky chemickým vazbám mezi ní a proteiny. Toto sbalení čili kondenzace chromozómů se však nevyskytuje v buňkách neustále. Po většinu buněčného cyklu zůstává podstatná část DNA rozvolněná - dekonzenzovaná a k dramatické kondenzaci dochází až na počátku dělení buňky, aby bylo snazší od sebe replikované chromozómy (= chromatidy) oddělit (Alberts et al., 2005).

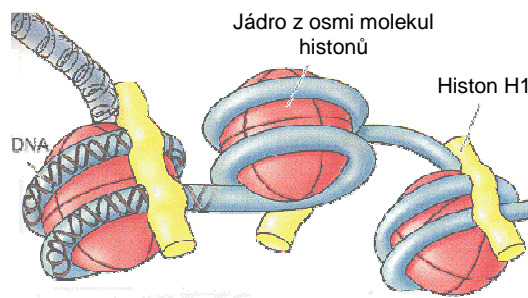
3.5.1 Chromatin

Jako chromatin označujeme celou chromozomální hmotu, tedy komplex DNA a proteinů, které jsou pozorovatelné díky své barvitelnosti (z řeckého *chroma* – barva) (Alberts et al., 2005). Z hlediska terminologie je důležité zmínit dělení chromatinu na euchromatin a heterochromatin. **Heterochromatin** je ta část genomu, která je značně kondenzovaná (zhuštěná) a proto se barví tmavě. Charakter heterochromatinu vykazují po většinu buněčného cyklu zejména **telomery** (koncové části chromozómů) a **centromery** (střední „zaškrcená“ část chromozómu) a jsou pro něj charakteristické repetitivní sekvence a nízká frekvence rekombinací v meióze. Části DNA, které jsou málo kondenzované a vykazují tudíž slabou barvitelnost, se nazývají **euchromatin**. Geny umístěné v euchromatinu, který je pod vlivem heterochromatinu, jsou výrazně tlumeny a jejich transkripce do RNA je inhibována (heterochromatin je transkribován jen velice omezeně). Gen, který byl pokusně umístěn do heterochromatické centromery nebo poblíž heterochromatinu byl zcela utišen. (Richards et Elgin, 2002).

3.5.2 Nukleozóm

Dvoušroubovice DNA je navázána na proteiny, které se nazývají **histony**. Histony jsou sestaveny z kladně nabitých (bazických) aminokyselin, aby mohly vázat záporně nabitou (acidickou) DNA. DNA je omotána okolo histonového jádra, které je složeno z osmi proteinových podjednotek. Proteiny H2A, H2B, H3 a H4 spolu nejprve vytvářejí tetramer, a dva tetramery se spojují v oktamer. Nukleohistonový komplex neboli komplex DNA a histonů potom vytváří nukleozóm. Ten drží pohromadě histon H1 (Purves et al., 1997; Sládeček et Nedvídek, 1978). Na jeden nukleozóm připadá asi 200 nukleotidových párů. Po obtočení jednoho jádra DNA obtáčí další v opačném směru (Obr. 6). Takto zformovaná DNA tvoří aktivní chromatin, který může být exprimován (přepisován a překládán) do podoby RNA a proteinů. Podle způsobu, jakým jsou histony chemicky modifikovány, buňka pozná, co má s daným úsekem DNA v danou chvíli dělat. Pokud jsou například určité histony

methylovány znamená to, že je příslušný gen vypnut. Acetylace potom znamená naopak zapnutí genu (Purves et al., 1997).



Obrázek 6: Nukleozóm. Nukleozóm sestává z DNA omotané okolo oktameru z histonů. Nukleohistonový komplex spojuje histonová molekula H1. Převzato a upraveno z Purves et al., 1997.

3.5.3 Centromera a kinetochora

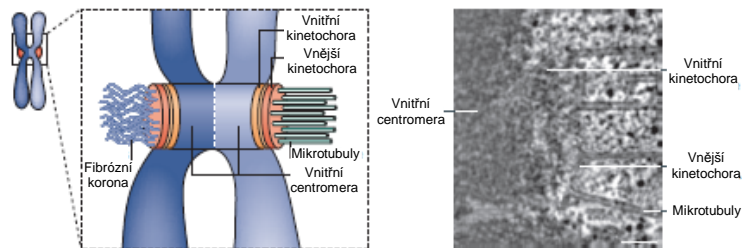
Centromera je specializovaný region eukaryotního chromozómu – tedy úsek DNA, který je místem formování kinetochor a připojení mikrotubulů a tedy místem organizace pohybu chromozómů v průběhu mitózy a meiózy (Clarke, 1998). Zatímco na kinetochoru (potažmo centromeru) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se v metafázi váže pouze jeden mikrotubulus, u lidí se na každou kinetochoru připojuje mikrotubulů 20-30 (Vagnarelli et al., 2008) a někteří autoři (Gassmann et al., 2007; Kovář, 2003) dokonce uvádí připojení až 40 mikrotubulů. Rozdíl je dán délkou úseku centromery a tedy i velikostí kinetochory. Zatímco u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je centromera pouze bodová a tvoří ji jen 125 bp (Vagnarelli et al., 2008) až 220 bp (Clarke, 1998; Vagnarelli et al., 2008), DNA centromery je u vyšších eukaryot charakterizována vysoce repetitivními tandemovými sekvencemi, které u lidí tvoří řetězce dlouhé až 0,2-7 Mb. Těmito opakujícími se sekvencemi jsou 171 bp dlouhé **α -satelity**, které se přirozeně vyskytují ve všech lidských centromerách. α -Satelity se dále dělí na dva typy – typ I a typ II. Typ I je úzce spojen s funkcí centromery a obsahuje tzv. CENP-B box, který představuje místo pro vazbu centromerického proteinu CENP-B (Vagnarelli et al., 2008).

Na centromerách se mimojiné nachází pět nejznámějších centromerických proteinů CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-G a CENP-H, které jsou součástí kinetochory (Warburton, 2001). Dalšími proteiny kinetochor jsou tzv. **proteiny vnitřní centromery** – *Inner Centromere Proteins* – INCENP (vnitřní centromera je označení pro úsek chromatinu mezi dvěma sesterkými kinetochorami) (Cheeseman et Desai, 2008). Mezi ty patří proteiny **survivin**, **shugoshin 1 (sgo1)**, a **shugoshin 2 (sgo2)**, které zde nejspíš hrají roli „senzorů“ majících za úkol měřit napětí v oblasti centromery. Díky těmto proteinům totiž může buňka včas odhalit kinetochory, které se ještě nepřipojily k mikrotubulům. V takovém případě

generují signál, který říká: „Pozor! Slabé napětí!“, což vede k opravě chybného připojení mikrotubulů (Cimini, 2008). Podobnou úlohu má i **Aurora B** kinasa, která se na vnitřní centromeře také nachází a pro správné rozdělení genetické informace je nepostradatelná (Cimini, 2008). Kromě těchto proteinů bylo na kinetochorách identifikováno několik desítek dalších proteinů, u lidí sestávají kinetochory z cca 80 proteinů. Ačkoliv je hlavní motiv mezi eukaryotními organismy konzervativní (málo proměnlivé), vykazují proteiny mezi druhy pouze nízkou homologii a to méně než 20 %. Další důležitou součástí kinetochory jsou motorové proteiny, které zajišťují pohyb chromosomů po mikrotubulech k plus nebo minus konci. Protein **CENP-E**, který je součástí fibrózní korony kinetochor, zajišťuje pohyb k plus konci mikrotubulů, tedy směrem od pólů ke středu a motorový protein **dynein** zajišťuje pohyb k minus konci (Cheeseman et Desai, 2008).

Kinetochory jsou tedy proteinové struktury, které utváří na centromerách komplexy (Kovář, 2003; Warburton, 2001) s trojvrstevnou strukturou (Obr. 7) (Kovář, 2003). Nachází se na každé sesterské chromatidě, pod kterou leží centromerický heterochromatin (Warburton, 2001). Spolu s centromerami vytváří tzv. centromerický - kinetochorový komplex (Pidoux et Allshire, 2000; Warburton, 2001), který se nachází na primární konstrikci chromosomu. Tento komplex je zodpovědný za správný rozchod replikovaných sesterských chromatid do dceřiných buněk (Warburton, 2001). Kinetochory se na centromeře nachází v místě, kde je přítomen protein **CENP-A**, který je jinou formou histonu H3 (Cheeseman et Desai, 2008; Gassmann et al., 2007) a odlišuje se od něj přítomností histonové smyčky (*CENP-A targeting domain*). Kinetochorové struktury se v průběhu buněčného dělení mění, ale některé proteiny zůstávají na kinetochorách v průběhu celého buněčného cyklu. Jsou to proteiny CENP-A, CENP-B a proteiny CCAN (*Constitutive Centromere-Associated Network*) (Cheeseman et Desai, 2008). Role kinetochor je klíčová po rozpadu jaderné membrány, kdy kinetochory zprostředkovávají bezchybné spojení mezi mikrotubuly z pólů vřeténka a centromerami chromozómů. Když se kinetochory obou sesterských chromatid správně připojí každá k opačnému pólu, vytvoří se takzvané **amfitelní** připojení (Cimini, 2008; McGuinness et al., 2009) zvané též **biorientace** (McGuinness et al., 2009). (V případě meiózy I vytváří sesterské kinetochory syntelní připojení).

Obrázek 7: Struktura kinetochory obratlovců. Centromera je místem nejvyšší kondenzace chromatinu a zároveň místem posledního spojení sesterských chromatid. Na centromery se váže proteinový komplex zvaný kinetochora, který má třívrstvou strukturu a umožňuje připojení chromatinu k mikrotubulům. Chromatin mezi dvěma sesterskými kinetochorami se nazývá vnitřní centromera. Na nepřipojené kinetochore se utváří tzv. fibrózní korona. Vpravo je snímek lidské kinetochory z elektronového mikroskopu. Převzato a upraveno z Cheeseman et Desai, 2008.



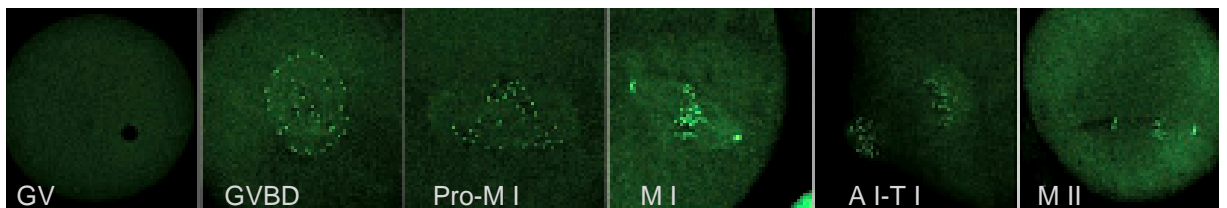
3.6 Spindly protein

Protein s označením Spindly byl identifikován v několika homologních verzích u různých živočišných druhů. Jeho hlavní funkcí je doprava motorového proteinu **dyneinu** na kinetochory a má také za úkol tlumit SAC. Protein Spindly byl teprve nedávno poprvé identifikován v S2 buňkách octomilky *Drosophila melanogaster*. Zde je dlouhý 807 aminokyselinových zbytků a obsahuje charakteristický region obsahující tzv. coiled-coil domény na N-konci, kde polypeptidový řetězec vytváří šroubovici. Gen u drosophily byl nazván CG15415. U drosophily má protein za úkol uvolnit z kinetochor Rod a Mad2 v metafázi. Další homolog proteinu byl identifikován u hád'átka *Caenorhabditis elegans*, kde nese označení SPDL-1 (RefSeq NP_495637) a je dlouhý 479 aminokyselin. Byl identifikován na základě konzervativního CC regionu. Během mitózy se nachází na mikrotubulech a po GVBD na kinetochorách, které opouští po připojení mikrotubulů. U lidí byl identifikován protein hSpindly (RefSeq NP_060255, 605 zbytků). Zde ohraničuje kinetochory v časně prometafázi jako „vnější kinetochorový protein“. Potom se přemísťuje k pólům vřetenka a po metafázním srovnání chromozómů se rozptyluje v cytosolu (Zhang et al., 2010).

V této studii bylo pracováno s modelovým organismem, s myší domácí *Mus musculus*. U tohoto živočišného druhu se nachází protein s názvem mSpindly (RefSeq NM_027411, příloha 10.1), který je dlouhý 608 aminokyselin a také obsahuje CC doménu, která je velice podobná homologům (Zhang et al., 2010). Celý gen kódující tento protein (cDNA bez intronů) je dlouhý 2526 bp včetně oblastí 5' a 3' UTR (*Untranslated Region* – nepřekládaný region). Z této sekvence přesně 1824 bp kóduje protein Spindly (včetně stop kodónu). Do vektoru byla zaklonována sekvence o velikosti 1821 bp, tedy pouze ORF bez start i stop kodónu, které jsou již ve vektoru obsaženy.

V myších oocytech se protein Spindly exprimuje od GV až do stádia MII. Ve stádiu GV se lokalizuje nespecificky a je volně rozptýlen cytoplasmě i karyoplasmě. První změna nastává ve stádiu GVBD, kdy se silně lokalizuje na kinetochorách. Ve stádiích MI a MII se již část proteinu přesunuje podél mikrotubulů na póly vřeténka (Obr. 8). Jeho hlavní funkcí je účast na inaktivaci SAC a formování vřeténka a nejspíš působí jako transportér (adaptér pro transport) důležitých molekul (Zhang et al., 2010). Pohyb Spindly proteinu podél mikrotubulů nejspíš vykonává motorový protein dynein, který stejně tak delokalizuje i proteiny SAC - proteiny Mad1, Mad2, BubR1 a proteiny RZZ. Tím, že dynein z kinetochor „odnáší“ proteiny SAC, je spindle checkpoint utlumen a dynein tak umožňuje nástup anafáze (Kardon et Vale, 2009).

Zhang et al., 2010 ve své studii poprvé ukázali nitrobuněčné lokalizace proteinu mSpindly (myší homolog) během meiotického zrání a zjistili, že pokud dojde k jeho odstranění v meióze, dělení se zastaví v metafázi a dál již nepokračuje, což bylo potvrzeno i dalšími autory. Zvýšení exprese tohoto proteinu po dodání exogenní mRNA ale nemělo při meiotickém zrání žádný pozorovatelný efekt (Zhang et al., 2010).



Obrázek 8: Intracelulární lokalizace mSpindly v průběhu zrání oocytů. Z obrázků je patrné, že specifická lokalizace proteinu začíná v GVBD. Na kinetochorách zůstává myší Spindly až do metafáze II, ale velká část je od MI lokalizována i na pólech vřeténka. Protein Spindly byl označen Myc tagem a obarven pomocí imunofluorescence (Zhang et al., 2010).

3.7 SAC

Zkratka SAC pochází z anglického *Spindle Assembly Checkpoint* a znamená něco jako „kontrolní bod dělicího vřeténka“ (zkráceně spindle checkpoint). Je jedním ze tří kontrolních bodů v průběhu buněčného cyklu a je také dalším z mnoha nezbytných faktorů pro bezchybnou segregaci chromozómů v mitóze i meióze, kde zajišťuje bezchybnou segregaci jak homologních chromozómů v meióze I, tak i segregaci sesterských chromatid v meióze II. Signální dráha spindle checkpointu kontroluje správné navázání mikrotubulů na kinetochory a zabraňuje nástupu anafáze, dokud nejsou chromozómy správně srovnány do metafázní ploténky v ekvatoriální rovině buňky (McGuinness et al., 2009; Zhang et al, 2010).

V tomto případě generuje každý nesrovnaný chromozóm „vyčkávací“ signál, který aktivuje SAC, což způsobí oddálení nástupu anafáze.

Signální dráha SAC zahrnuje proteiny Mad1, 2, 3 a Bub1, 2, 3 jako hlavní komponenty. Mps1 a **Aurora B** jsou další komponenty signální dráhy spindle checkpointu, které regulují aktivitu mitotického SAC (Zhang et al., 2010). Funkce Aurora B kinázy spočívá v tom, že destabilizuje nevhodná připojení mikrotubulů ke kinetochorám (Petronczki et al., 2003). Spindle checkpoint je aktivní v průběhu prometafáze I, když jsou obě sesterské chromatidy homologů připojeny syntelně, nebo pokud nejsou ještě plně připojeny, ale jsou ovlivněny tahem kinetochorálních mikrotubulů a je také reaktivován v případě ztráty připojení v metafázi I. V tom případě SAC udržuje buněčný cyklus „pozastavený“ tím, že inhibuje APC/C. Po tom, co jsou chromozómy správně připojeny a tahem vřeténka z opačných pólů zarovnány do metafázní ploténky je SAC inaktivován a komplex APC/C umožní nástup anafáze (Vogt et al., 2008)

V buňkách mnohobuněčných se vyskytují další 3 pomocné proteiny. Proteiny ZW10, Rod a Zwilch vytváří takzvaný **RZZ** komplex, který je zodpovědný za dopravu důležitých součástí kinetochor právě na místo kinetochory. Těmito součástmi jsou zejména komplex **dynein-dynactin** (motorové proteiny), Mad1 a Mad2 (Kardon et Vale, 2009; Zhang et al., 2010). Ve funkci mitotického SAC tedy sehrává komplex RZZ klíčovou roli, ale přesný mechanismus funkce ještě není znám (Zhang et al., 2010). Dynactin je multipodjednotkový komplex, který reguluje funkci dyneinu a nejspíš funguje jako dyneinový receptor (Barisic et al., 2010).

3.8 APC/C a nástup anafáze

Jak už vyplývá z anglického názvu *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*, jedná se o proteinový komplex podporující nástup anafáze. Jelikož je nástup anafáze charakteristický oddělením sesterských chromatid nebo homologních chromozómů a jejich přitahováním k pólům, je zřejmé, že systém musí nějakým způsobem odbourat spojení mezi chromozómy.

Anaphase promoting complex je komplex takzvané E3 ubiquitin ligázy, která umožňuje likvidaci klíčových regulačních proteinů jak v mitóze, tak při redukčním dělení – meióze. Pro zachování bezchybné segregace chromozómů je nutné, aby tyto regulační proteiny nebyly likvidovány předčasně. Proto je regulace aktivity APC/C klíčová pro zachování správné segregace v obou typech buněčného dělení (Cooper et Strich, 2011). Pokud nejsou všechny páry chromozómů v metafázi I srovnány, APC/C je inhibován

prostřednictvím Mad2 (protein SAC dráhy). APC/C^{Cdc20} závislý na Cdc20 (*Cell-Division Cycle protein*) je vazbou tohoto proteinu aktivován a komplex APC/C-Cdc20 tak spustí ubiquitinaci a následnou degradaci **securinu**. Securin je inhibitor **separázy**, která je jeho likvidací aktivována (Petronczki et al., 2003). Na konci metafáze I fosforyluje PLK kináza protein **Rec8** (specifická součást meiotického cohesinu) podél ramen chromozómů, čímž ho označí pro likvidaci separázou (Vogt et al., 2008), která ho odstraní. V oblasti centromery je protein Rec8 ochráněn před fosforylací PLK díky shugoshinu (Cheeseman et Desai, 2008; Vogt et al., 2008) a fosfatáze PP2A. Ačkoliv je Polo kináza považována za jediného zprostředkovatele důležité fosforylace Rec8, zkušební vyřazení jejích fosforylačních míst z funkce nemělo vliv na odstranění Res8 a k nástupu anafáze přesto došlo. Z tohoto důvodu byla provedena studie u kvasinek, kde se zdá být kináza CK1 (*Casein Kinase*) z hlediska fosforylace Rec8 důležitější než PLK (Anger, 2010). Po odstranění Rec8 z ramen chromozómů se oddělí sesterské chromatidy distálně od chiasmat (zůstávají spojené v oblasti centromery), homologní chromozomy se oddělí i v chiasmatech a je umožněn nástup anafáze. V meióze II již centromerický cohesin chráněn není a je po podobném sledu událostí odstraněn separázou, čímž dojde k nástupu anafáze II (Petronczki et al., 2003).

3.9 Aneuploidie v meióze

Aneuploidie je abnormální počet chromozómů (euploidie = správný počet chromozómů), který neodpovídá počtu typickému pro daný živočišný druh. Pokud nedojde před porodem ke spontánnímu abortu, vede aneuploidie k vážným poruchám nervové soustavy, nejčastěji jako důsledek trisomie 13, 18 nebo 21 (Driscoll et Gross, 2009; Malmanche et al., 2006), což znamená, že došlo k chybné segregaci a chromozóm se v somatických buňkách vyskytuje ne ve dvou, ale ve třech sadách. Správně odhadnout četnost aneuploidíí u lidí je ale velice těžké, jelikož u aneuploidních zygot často dochází ke spontánnímu potratu v raných stádiích těhotenství (Malmanche et al., 2006). Vysoká četnost aneuploidíí v meióze samičích gamet je nejčastější příčinou neplodnosti související s vysokým věkem (McGuinness et al., 2009).

Segregace chromosomů v eukaryotních buňkách závisí na správném připojení sesterských kinetochor k mikrotubulům vycházejícím z opačných pólů buňky, a to buď **syntelně**, to znamená sesterské kinetochory ke stejnému pólu v meióze I nebo **amfítelně** – sesterské kinetochory k opačným pólům (Petronczki et al, 2003). Správného připojení je dosaženo díky systému opravujícímu chyby, zejména díky Aurora B kináze, která destabilizuje nesprávná připojení kinetochor. Správná spojení mezi kinetochorami a

mikrotubuly jsou ale stabilizována tahem a rozrušujícím efektu Aurora B kinasy vzdorují. Pokud jsou totiž homologní chromozómy (sesterské chromatidy) tahány v opačných směrech, zatímco jsou drženy cohesinovým komplexem, znamená to, že jsou připojeny správně (McGuinness et al., 2009). Když se mikrotubuly spojí s nesprávnou kinetochorou, obvykle je takové připojení Aurora B kinázou porušeno, aby se mohlo vytvořit připojení správně (Petronczki et al., 2003). Pokud bylo připojení navázáno chybně, hovoříme o tak zvané **malorientaci** (John et Lewis, 1973) a důsledky takové chyby bývají fatální.

Mnozí autoři potvrzují (Dailey et al., 1996; McGuinness et al., 2009), že nevyšší procento aneuploidií vzniká právě v meióze I a je také známo že oocyty starších žen jsou mnohem citlivější právě k nondisjunkci v meióze I. Nejčastějším způsobem vzniku aneuploidií je předčasné oddělení – tzv. **predivize** sesterských chromatid, které by měly zůstat spojené až do anafáze II. Se vzrůstajícím věkem matek tento typ nondisjunkce ale pravděpodobně nesouvisí (Dailey et al, 1996). Důvodem takto vzniklých aneuploidií je zřejmě chybná funkce cohesinu, tedy proteinového komplexu, který váže sesterské chromatidy k sobě. Předčasná segregace se pak může objevit jako důsledek nedostatku proteinů cohesinu, který se v průběhu profáze neobnovuje (Pellestor et al., 2002). Méně častým mechanismem vzniku aneuploidií je nondisjunkce bivalentů (Dailey et al, 1996). To se může stát v případě, že se obě centromery bivalentu připojí ke stejnému pólu vřeténka a celý bivalent je tedy orientován **unipolárně**. Tento typ malorientace je ale nestabilní a jedna z centromer se obvykle reorientuje (John et Lewis, 1973). Nebo může být narušen průběh profáze I, což vede k tomu, že se jeden z homologních párů nespáruje a nedojde u něj ke crossing-overu. Tyto homology nevytvoří bivalent a v takovém případě nic nebrání tomu, aby byly obě centromery homologních chromozómů – **univalentů** připojeny ke stejnému pólu vřeténka (Dailey et al., 1996).

Jistou roli ve vzniku aneuploidií sehrává také pozice chiasmata bivalentu. Chiasmata, která vznikají blíže tedy proximálně k centromere, jsou držena dohromady větším množstvím proteinů cohesinu než chiasmata distální, která potom nejsou spojena dostatečně pevně (Kudo et al., 2009).

3.10 Centrální dogma molekulární biologie

Pro pochopení smyslu této studie a metodiky bylo nezbytné zařadit do literárního přehledu kapitoly popisující buněčné biopolymery a přenos informací mezi nimi. Takzvané centrální dogma molekulární biologie popisuje právě takový přenos informací, to znamená přepis mezi nukleovými kyselinami DNA a RNA a překlad nukleové kyseliny do proteinu.

DNA, RNA a proteiny jsou tedy základními biopolymery živých organismů a pro jejich studium prostřednictvím molekulární biologie a laboratorních postupů jako například PCR (polymerázová řetězová reakce – kapitola 3.11.1) jsou klíčové.

Je zřejmé, že DNA a RNA tvoří základ každého živého organismu. Představuje univerzální kód, kterým jsou kódovány polypeptidy, funkční proteiny a enzymy nutné pro výstavbu a funkci tkání. DNA i RNA jsou informační makromolekuly, jejichž princip (báze-cukr-fosfát) zůstal stejný napříč veškerými organismy v průběhu milionů let evoluce (mění se pořadí bází). Chemickou podstatou DNA je polymer **deoxyribonukleové kyseliny**, který tvoří řetězec pravidelně se opakujících složek. Základ tvoří cukr-fosfátová kostra a na fosfát jsou navázané **nukleové báze**. DNA je ale dvouvláknová a sestává tedy ze dvou takovýchto řetězců, které jsou spojeny slabými chemickými vazbami – vodíkovými můstky mezi komplementárními páry bází – bp (*base pair*). Pro syntézu nukleových kyselin, ať už *in vivo* nebo *in vitro* jsou ale zapotřebí modifikované báze ve formě **nukleotidů**. Ty obsahují pětiuhlíkatý sacharid **ribózu** (v RNA) nebo **2-deoxyribózu** (v DNA) a jeden (v nukleové kyselině) až tři zbytky kyseliny fosforečné (nukleotidy jsou tedy fosforylované nukleosidy). Takto jsou zabudovány do nukleových kyselin nebo se účastní přenosu energie jako součást kofaktorů. Pro syntézu DNA jsou nezbytné deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs, deoxyribonukleotidy) deoxyadenosintrifosfát dATP, deoxythymidintrifosfát dTTP, deoxyguanosintrifosfát dGTP a deoxycytidintrifosfát dCTP, pro syntézu RNA ribonukleosidtrifosfáty (ribonukleotidy) adenosintrifosfát ATP, uridintrifosfát UTP, guanosintrifosfát GTP a cytidintrifosfát CTP. Výchozím substrátem pro tvorbu nukleotidů jsou **nukleosidy**, které tvoří nukleová báze a sacharid ribóza nebo deoxyribóza. Takto sestavená DNA potom vytváří charakteristickou dvoušroubovici, nazývanou také **α -helix** (Alberts et al. 2005).

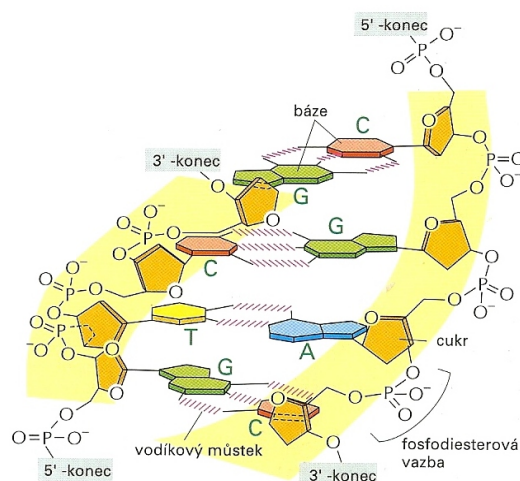
To, co určuje genetický kód, jsou báze v DNA a jejich pořadí a kombinace. Bázemi v DNA jsou bicyklické báze, **puriny** - **adenin (A)** a **guanin (G)**, a monocykly – **pyrimidiny** - **cytosin (C)** a **thymin (T)**. Komplementárně se báze páruje vždy monocyklická báze s bicyklickou, tedy purin s pyrimidinem: A-T a G-C, přičemž mezi A-T jsou jen dva vodíkové můstky a mezi G-C tři. (Alberts et al., 2005). Tato skutečnost není pouze náhodná. Segmenty na DNA, které obsahují velké množství bází T a A jsou totiž často součástí tzv. **regulačních oblastí** genů, protože v těchto místech je spojení mezi dvěma vlákny DNA slabší, snáze zde pak dochází k rozvolnění dvoušroubovice a přepisu následujících genů. Protože je snadné v takovýchto oblastech dvoušroubovici rozvolnit, často jsou tyto báze obsaženy i v replikačních počátcích (Alberts et al., 2005).

Podmínkou párování je ovšem opačná orientace dvou **komplementárních** vláken. To znamená, že vlákno orientované 3'→5' se může párovat pouze s přesně komplementárním vláknem orientovaným 5'→3' (Obr. 9) (Alberts et al., 2005).

Rozdílem mezi DNA a RNA je složení bází a způsob vzniku. Zatímco DNA obsahuje čtyři báze A, T, G, C, u RNA došlo k nahrazení báze thyminu (T) za **uracil (U)**. Zachována je ale stále komplementarita, takže při přepisu genů do RNA se uracil páruje s adeninem. Jsou zde ale také další neméně podstatné rozdíly mezi DNA a RNA. RNA je totiž v naprosté většině případů molekula jednovláknová, a vzniká **přepisem** neboli **transkripcí** DNA, zatímco DNA až na výjimky vzniká pouze replikací již existujících molekul (nebo jako cDNA reverzní transkripcí z RNA) (Alberts et al., 2005).

Obrázek 9: Prostorové uspořádání dvoušroubovice

DNA. Na obrázku je znázorněna jedna a půl otáčky dvoušroubovice, kterou tvoří čtyři páry nukleotidů. Je zřejmé že G jednoho řetězce se páruje s C řetězce druhého třemi H-můstky, a T se páruje s A druhého řetězce dvěma H-můstky. Z obrázku je také patrné, že zatímco jedno vlákno končí v dolní části fosfátem, který je navázán na 5.uhlíku cukru, komplementární vlákno končí hydroxylovou skupinou -OH, navázanou na 3.uhlíku cukru. Na horních koncích je situace opačná. Takovéto orientaci se říká **antiparalelní** a je podmínkou pro párování komplementárních vláken DNA. Konec DNA na kterém se nachází fosfátová skupina je tedy označen 5' (pět s čarou) konec a opačný konec s volným hydroxylyem 3' konec (Alberts et al., 2005).



3.10.1 Replikace DNA

Jak již bylo výše zmíněno, před každým dělením buňky je zapotřebí zdvojnásobit genetickou výbavu, která je v jádře každé jaderné buňky uložena ve formě DNA. Proces, při kterém k tomuto zdvojnásobení dochází, se nazývá **replikace** (Alberts et al., 2005).

Díky tomu, že jsou obě vlákna dvoušroubovice přesně komplementární, to znamená, že si odpovídají pořadím párujících se bází, může být ke každému ze dvou vláken na principu komplementarity dosyntetizována kopie vlákna opačného – komplementárního. Každé vlákno tedy při replikaci slouží jako templát (předloha, šablona) pro vlákno nové. Pokud bychom ale chtěli DNA řetězce od sebe oddělit, například v laboratoři molekulární genetiky, k narušení vodíkových můstků bychom potřebovali teploty blízké 100 °C. Při takových teplotách se naruší všechny slabé vodíkové můstky a vlákna DNA se od sebe oddělí po celé délce. Uvnitř buněčného jádra si ovšem buňka poradila po svém. Při vstupu do dělení má buňka k dispozici speciální proteiny a proteinové komplexy specifických funkcí. Tyto proteiny si již dopředu

syntetizovala a teď je použije k procesu replikace. Proto se skupina takových pomocníků nazývá **replikační aparát** (Alberts et al., 2005). Syntéza proteinů replikačního aparátu je pravděpodobně spřažená s replikací DNA a je tedy závislá na fázi buněčného cyklu (Kovář, 2003).

Nejprve je tedy potřeba řetězce od sebe oddělit. K tomu v buněčném jádře nedochází po celé délce DNA, ale po malých kouscích na mnoha místech zároveň. Tyto sekvence se nazývají **replikační počátky Ori** a obsahují specifické sekvence nukleotidů, které se vyznačují zejména vysokým podílem adeninu a thyminu (snažší rozvolnění díky párování dvěma vodíkovými můstky). V lidském genomu se například nachází až 10000 replikačních počátků (Alberts et al., 2005), při délce genomu 3,2 miliardy bp. Tento replikační počátek rozpoznají tzv. iniciační proteiny, které se na DNA na specifické sekvenci navážou a malé oblasti dvoušroubovice od sebe řetězce oddělí. Na dvoušroubovici tak v každém replikačním počátku vznikne „oko“, které se postupně rozšiřuje ve dvou tzv. **replikačních vidličkách**, které postupují na obě strany. V okamžiku oddělení řetězců iniciačními proteiny se na jednotlivé řetězce vážou další proteiny replikačního aparátu. Jednou ze základních součástí replikačního aparátu je protein helikáza. Ta se váže do replikační vidličky a za pomoci energie získané z hydrolýzy ATP dvoušroubovici rozplétá a posouvá replikační vidličku dále. Dalšími důležitými proteiny jsou tzv. SSB proteiny z anglického *Single Strand Binding proteins*, které zabraňují znovuspojení již oddělených vláken (Alberts et al., 2005).

Nejdůležitějším proteinem replikačního aparátu je DNA dependentní **DNA polymeráza**, která má na starosti hlavní úkol replikace. Ke stávajícímu vlákně připojuje jeden po druhém komplementárně nukleotidy a syntetizuje tak postupně nové vlákno podle stávajícího řetězce. Není ovšem schopná začít připojovat nukleotidy na jedno vlákno, na kterém doposud žádné komplementární nukleotidy nejsou, protože umí navázat jen na konec 3' a vytvářet **fosfodiesterovou** vazbu (mezi 3'-OH skupinou řetězce a 5'fosfátovou skupinou přidávaného nukleotidu) a tedy pouze prodlužovat komplementární vlákno a to pouze ve směru 5'→3'. Proto má v replikačním aparátu pomocníka, tzv. **primázu**, která dokáže nasednout na templátový řetězec a nasyntetizovat úsek dlouhý cca 10 nukleotidů, jeho podstatou je ale RNA, která je později vyštěpena **nukleázou** a nahrazena řetězcem DNA **opravnou DNA polymerázou**. Tím primáza poskytne DNA polymeráze 3'konec, který potřebuje pro kopírování templátového vlákna (Alberts et al., 2005; Kovář, 2003). Díky polymerázové 5'→3' aktivitě je také vždy jedno z vláken syntetizováno kontinuálně a nazývá se proto **vedoucí řetězec** (*Leading Strand*) a druhé vždy po krátkých úsecích postupně, jak se replikační vidlička posouvá. Druhé vlákno je označované jako **vážnouch** nebo **opožďující**

řetězec z anglického *Lagging Strand*. Tyto úseky se nazývají **Okazakiho fragmenty** a každý je dlouhý cca 1000 nukleotidů (Kovář, 2003).

3.10.2 Výroba proteinů

Všechny procesy a důležité buněčné útvary, které zde byly až do současné chvíle popsány, spojují jisté, pro život esenciální biochemické sloučeniny. Jsou jimi proteiny. Vše živé, buněčná struktura, tvar, funkce, mezibuněčné interakce, vše závisí na proteinech, jejich výrobě a správné funkci. Výroba proteinů začíná přepisem (transkripcí) genu v jádře z DNA do mRNA. mRNA je následně v cytoplasmě upravena a přeložena (translatována) do polypeptidového řetězce, ze kterého je dalšími úpravami vytvořen protein (Alberts et al., 2005).

3.10.2.1 Transkripce

Transkripce neboli přepis DNA je prvním krokem ve výrobě proteinů a znamená **přepis** genetického kódu do RNA. Pokud je v buňce potřeba určitý protein, začne se v buňce transkribovat příslušný gen. V určitém místě před sekvencí genu (regulační oblast genu) se dvoušroubovice DNA rozvolní a na jedno z vláken nasedne **RNA polymeráza** (obě vlákna mohou obsahovat různé geny v jednom místě). Nově vznikající komplementární vlákno RNA ale nezůstává s DNA spojeno, a současně s pokračující syntézou se uvolňuje. Transkripce je kontinuální proces, který je přerušen pouze v M-fázi díky příliš kondenzovaným chromozomům. Karyokineze tedy vede k redukci proteosyntézy (Kovář, 2003).

Transkripcí vznikají tři typy RNA. V první řadě již zmíněná **mRNA**, která před nabytím plné funkčnosti musí projít tzv. maturací. Dalším typem je **rRNA**, která je základním stavebním materiálem ribozomů a nazývá se ribozomová. **Ribozomy** jsou speciální organely v cytoplasmě (většinou poblíž jádra), které slouží k syntéze proteinů. Jsou sestaveny z velké a malé podjednotky, které vytváří molekuly rRNA a malé proteiny. Posledním typem je **tRNA** čili transferová RNA. Molekula tRNA je obvykle dlouhá přibližně 80 nukleotidů. Má charakteristický tvar jetelového listu a díky trojici bází na antikodonové smyčce a aminokyselině připojené na 3' konci se stará o dopravu aminokyselin k ribozomům (Alberts et al., 2005).

Nově nasyntetizované vlákno nezralé hnRNA (budoucí mRNA) je potřeba před vykonáním jeho poslání upravit a to na obou jeho koncích. Těmto úpravám se říká **posttranskripční úpravy** (*RNA processing*). Aby mohlo být dopraveno až do ribozomu, potřebuje na svůj 5' konec připojit tzv. **čepičku** v procesu zvaném *capping*. Jelikož musí

vlákno doputovat až do cytoplazmy, kde se na ribozomech proteosyntéza odehrává, potřebuje ještě ochránit svůj 3' konec, který jaderným pórem prochází jako poslední. Nepotřebné RNA jsou totiž nukleázami okamžitě štěpeny. Z tohoto důvodu jsou funkční mRNA opatřovány tzv. **poly(A)** koncem polyadenylací (*polyadenylation*). To znamená, že se na 3' konec připojí velké množství adeninů a při náhodném štěpení se nejprve zasahuje do této redundantní sekvence. Vzhledem k tomu, že v průběhu genů eukaryotních živočichů dochází k častému přerušování kódujících sekvencí (exony) sekvencemi, které proteiny nekódují (introny), je potřeba tyto oblasti z RNA vystříhnout. To umožňuje speciální útvar – tzv. spliceozom, který provede **RNA splicing** čili sestřih (Alberts et al., 2005).

3.10.2.2 Translace

Zralá mRNA, která doputovala do ribozomu, jím postupně prochází a podstupuje translaci tedy překlad do proteinu. Tři po sobě jdoucí nukleotidy mRNA tvoří tzv. **triplet** neboli **kodon**, který kóduje jednu aminokyselinu dle **čtecího rámce** (v důsledku mutace může dojít k posunu čtecího rámce, což může vést ke změně funkce kódovaného proteinu). Ačkoli existuje 64 různých kombinací tripletů nukleotidů, aminokyselin je pouze 21 a tak existuje většinou více nukleotidů, které kódují stejnou aminokyselinu. To znamená, že genetický kód je **redundantní** (Alberts et al., 2005).

Současně s mRNA k ribozomu ve velkém putují tRNA nesoucí aminokyseliny. tRNA obsahuje velice důležitou antikodonovou smyčku, ve které se nachází **antikodon**, který se páruje s kodony mRNA. Druhá důležitá oblast se nachází na 3' konci molekuly a nese připojenou aminokyselinu specifickou pro danou tRNA. Nejprve se připojuje **iniciační tRNA** s připojeným methioninem (nasedá na iniciační kodón AUG). Postupným posunováním mRNA ribozomem pak dochází k připojování dalších aminokyselin kovalentní vazbou pomocí enzymů **aminoacyl-tRNA syntetáz** za spotřeby energie z hydrolýzy ATP a vzniká polypeptidový řetězec, který začíná aminokyselinou methioninem s volným N-koncem (volný dusík amino skupiny –NH₂). Na druhém konci polypeptidového řetězce se nachází C-konec (volný uhlík karboxy skupiny –COOH). Ukončení syntézy polypeptidového řetězce je zprostředkováno rozpoznáním **stop kodónu** UAA, UAG nebo UGA. Po dokončení syntézy polypeptidového řetězce dochází v rámci posttranslačních úprav k mnoha chemickým modifikacím jako je fosforylace, defosforylace, ubiquitinace, vytvoření disulfidických můstků, proteolýza, methylace, acetylace, hydroxylace, připojení prostetických skupin a k mnoha dalším, které jim umožní zaujmout trojrozměrnou strukturu a správnou funkci hotového proteinu (Alberts et al., 2005).

3.11 Genové inženýrství a techniky genetické manipulace

Proces konstrukce umělých rekombinantních molekul, ve který byla například cizí DNA vložena do molekuly genetického vektoru, se nazývá genové inženýrství nebo genetická manipulace, protože se tím biochemicky vytváří nové genetické kombinace. Tento proces je také označen jako klonování molekul nebo genů, protože dochází k vytvoření linií identických organismů (v tomto případě bakterií nebo virů) nesoucích kompoziční molekulu (Primrose et Twyman, 2006).

Konkrétní vymezení pojmu genového inženýrství nastínil Vladimír Vondrejs (2010), který definoval genové inženýrství takto: „*Genové inženýrství je soubor poznatků, metod a strategií sloužících k získání, úpravě a přenosu genetického materiálu do buněk za účelem jejich genetické modifikace, včetně metod analýzy získaného, upraveného a přenášeného genetického materiálu a modifikovaných organismů.*“

3.11.1 PCR

Základní a nyní již nezbytnou technikou v molekulární genetice, která značně zjednodušila a mnohonásobně zrychlila všechny procesy, je bezesporu PCR, ačkoli je to metoda, která byla vyvinuta teprve na přelomu 80. a 90. let dvacátého století (Primrose et Twyman, 2006). Dle anglického názvu *Polymerase Chain Reaction* polymerázová řetězová reakce je proces, který umožnil zjednodušit prenatální diagnostiku, forenzní, antropologické a paleontologické disciplíny díky své neuvěřitelné citlivosti vyžadující pouze velice malá množství tkáně obsahující jaderné elementy. PCR pracuje s miniaturními množstvími reakcí o objemu většinou 20 – 50 μ l, kde purifikovaná DNA nebo kompletní vzorek tvoří pouze zlomek objemu. Polymerázová řetězová reakce tedy umožňuje enormní amplifikace DNA, ať už kompletní nebo specifické, které je možno tímto způsobem zároveň pozměňovat (Primrose et Twyman, 2006).

Tato metoda je založena na opakovaném kopírování požadovaného úseku DNA s využitím termostabilní DNA polymerázy, která v opakovaných cyklech přisedá na oligonukleotidové primery, které hybridizovaly s templátovou DNA na začátku a na konci požadovaného úseku (Alberts et al., 2005). Tak můžeme namnožit DNA nebo z RNA vytvořit cDNA (*complementary DNA*) za použití **reverzní transkriptázy** (RT-PCR). Pro PCR jsou tedy nezbytné dva oligonukleotidové primery, dlouhé 17-30 nukleotidů, které musí být komplementární s amplifikovanou DNA sekvencí. Poté, co se vlákna DNA denaturují pomocí teplot okolo 95 °C, po následném snížení teploty cca na 55 °C každý primer přisedne (*annealing*) čili hybridizuje s jedním vláknem DNA. V další - polymerační fázi se teplota

zvýší na cca 70 °C a DNA polymeráza syntetizuje (*extension*) vlákno komplementární. Tím jsou vytvořeny dvouvláknové cílové sekvence, které mohou být opakovaně denaturovány a po přisednutí primerů mohou být stejně tak syntetizována komplementární vlákna. Tyto tři kroky se opakují, obvykle se využívá amplifikace sekvence v cca 25 - 35 cyklech, během nichž se znásobí požadovaná sekvence skoro 300 miliónkrát. Další nezbytnou součástí PCR kromě vhodně navržených primerů je vhodný pufr zajišťující optimální pH, dNTPs čili nukleotidy a enzym DNA polymeráza, která pro svou činnost potřebuje navíc ionty Mg^{2+} . DNA polymerázy pro reakce PCR jsou extrahovány z bakterií rodu *Pyrococcus sp.* nebo dalších bakterií, které vykazují rezistenci k vysokým teplotám a tyto DNA polymerázy jsou termostabilní a vydrží i vysoké denaturační teploty (Primrose et Twyman, 2006).

3.11.2 Klonovací vektory

Klonování – tedy vytváření identických kopií specifické DNA vyžaduje požadovanou sekvenci, nejčastěji gen, co nejefektivněji namnožit, aby bylo možné s ní dále pracovat. Maximálního namnožení dosáhneme, když přimějeme bakterii, aby replikovala naši DNA společně s tou svojí a současně ji předala dceřiným buňkám, protože bakterie se velice rychle množí. K tomu slouží vektory čili nosiče genetické informace, nejčastěji DNA bakteriofága, viru, který bakterie napadá, nebo malá kruhová molekula DNA - tzv. bakteriální **plasmid**. Plasmidový vektor musí obsahovat replikační počátek, který je rozpoznáván DNA polymerázou a je tedy nezbytný pro replikaci plasmidu v bakterii nezávisle na bakteriálním chromozómu. Nezbytnou součástí je také **restrikční místo**, které je rozpoznáno specifickou **restrikční endonukleázou** a plasmid zde můžeme rozštěpit a pomocí **ligázy** vložit do tohoto místa fragment cizorodé DNA – tzv. **insert**. Rekombinantní plasmid pak přijmou **kompetentní buňky** - většinou *E.coli* v procesu **transformace** (Alberts et al., 2005).

3.11.3 Agarózová elektroforéza

Základní metodou pro testaci fragmentů DNA nebo RNA je agarózová elektroforéza. Mechanismem funkce agarózové elektroforézy je separace fragmentů DNA nebo RNA podle délky na základě rychlosti jejich pohybu médiem gelového charakteru, přičemž větší molekuly se pohybují pomaleji (Alberts et al., 2005). Médium tvoří polysacharid agaróza rozpuštěný ve vhodném pufracním činidle, který má po převaření konzistenci gelu. Agaróza umožňuje separaci molekul od stovek bp do cca 20 kb. Pro separaci menších molekul se používá polyakrylamidový gel (Primrose et Twyman, 2006).

Tuhý agarózový gel se vloží do stejnosměrného elektrického pole a do jamek v gelu se nanáší vzorek nukleových kyselin DNA nebo RNA. Jelikož jsou kyseliny záporně nabitě, pohybují se od **katody** ke kladně nabitě elektrodě **anodě** (Alberts et al., 2005). Pro vizualizaci potřebných molekul je nutné přidat látku, která při následném vystavení UV paprskům emituje záření. Proto se přidává do pufru v elektrickém poli látka zvaná **ethidium bromide** (EtBr). Po dobu trvání elektroforézy je gel v pufru namočen a tato látka se inkorporuje do DNA. Nevýhodou je, že ethidium bromide má mutagenní účinky a je tedy potenciálně karcinogenní a při práci s ním je zapotřebí jistá opatrnost. Nově proto byly vyvinuty fluorescenční DNA barvy bez mutagenního účinku, například SYBR SafeTM (Primrose et Twyman, 2006).

3.11.4 Fluorescenční proteiny

Jsou proteiny původně patřící pouze mořským organismům, většinou pocházejících z korálových útesů. Jejich hlavní vlastností je to, že dokáží emitovat záření skoro v celém viditelném spektru okolo 450 až do 655 nm. Nejznámějším fluorescenčním proteinem je zřejmě zelený fluorescenční protein pocházející z *Aequorea victoria* (wtGFP, z anglického *Green Fluorescent Protein - wild type*). Ten je nejprostudovanějším fluorescenčním proteinem s nepřeberným množstvím mutantních typů a vědeckých využití.

Fluorescence proteinů je zajištěna díky takzvanému **chromoforu**, který vzniká při maturačním procesu a je složen z konzervativní sekvence tří aminokyselin. Chromofor se nachází uvnitř rigidní β -soudečkovité struktury o jedenácti vláknech, která přechází ve vnitřní šroubovici α -helix, jež nese chromoforní tripeptid. Ten po translaci podstupuje jisté autokatalytické reakce, čímž takzvaně „zraje“ a získává schopnost fluorescence.

Tato 3D struktura je fluorescenčním proteinům společná. V čem se liší členové rodiny GFP je zejména první aminokyselina tripeptidu. Tato odlišnost potom zodpovídá za konečnou vlnovou délku (barvu) emitovaného záření (Bettati et al., 2011).

4 Materiál a metody

Do pomocného vektoru, kterým je kruhový bakteriální plasmid byla pomocí PCR vložena (zaklonována) DNA sekvence fluorescenčního proteinu a sekvence mSpindly proteinu. Tento produkt byl transformován do nepatogenního kmene bakterie *E. coli*. Kultivací bakterií ve vhodném médiu byla potřebná DNA zmnožena spolu s bakteriemi a následně byla izolována v dostatečném množství. Po vyčištění DNA byl kruhový plasmid linearizován a DNA byla *in vitro* transkripcí (oproti analogickému procesu *in vivo* značně zjednodušená) přepsána do komplementární „cRNA“, která je obdobou buněčné mRNA (kapitola 3.10.2).

Vytvořená cRNA byla mikroinjikována (ve spolupráci) do cytoplasmy myšího oocyty, kde byl fyziologicky procesem translace utvořen geneticky modifikovaný protein, mSpindly protein s připojeným fluorescenčním proteinem EGFP-mSpindly. Pomocí časosběrné mikroskopie byl zaznamenán pohyb kinetochor chromozómů v meióze myších oocytů.

4.1 Příprava oocytů, kultivace a mikroinjekce

Pro mikroinjekce byly použity oocyty myši domácí *Mus musculus* kmene CD1. Oocyty stádia GV obklopené kumulárními buňkami byly izolovány disagregací ovárií samic starších 11 týdnů. Disagregace byla provedena v médiu M2 (Specialty Media/Sigma-Aldrich) s přidavkem 200 mM inhibitoru zrání IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine; Sigma-Aldrich) při 37 °C. Oocyty zbavené většiny kumulárních buněk byly kultivovány v kapkách média (cca 50 µl) převrstvených minerálním olejem (Sigma-Aldrich). GV oocyty byly mikroinjikovány v médiu M2 s přidavkem IBMX pomocí mikroinjektoru FemtoJet (Eppendorf). Do cytoplasmy byla mRNA mikroinjikována v objemu 5-10 pl tedy v konečné koncentraci 0,1 mg/ml vody RNázové (Ambion). Pro zrání oocytů bylo použito médium M16 (Specialty Media) a oocyty byly inkubovány při teplotě 37 °C a 5 % atmosféře CO₂ po 1-2 hodinách od mikroinjekce nezbytných pro expresi proteinu. Dále byly sledovány pouze oocyty, které podstoupily GVBD do 90 minut po přemístění do média bez IBMX.

4.2 Získání specifické DNA sekvence z testikulární mRNA

Pro tvorbu cDNA proteinu mSpindly byla použita kompletní buněčná testikulární mRNA z varleční tkáně myši domácí *Mus musculus*.

4.2.1 Izolace RNA

Kompletní tkáňová RNA byla izolována pomocí kitu RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen). Z varleční tkáně bylo pro izolaci RNA odebráno 30 mg a homogenizováno v roztoku 600 μ l pufru RLT s předem přidaným merkaptoethanolem (14,3M β -ME, působí jako inhibitor RNáz) v ředění 100:1. Tkáň byla homogenizována pomocí vortexu cca 1 minutu. Homogenizát byl centrifugován po 3 min při 13 000 rpm (*ronds per minute* – otáčky za minutu). Supernatant obsahující RNA byl odpipetován do čisté zkumavky a přidán stejný objem 70 % ethanolu, čímž byly vytvořeny podmínky pro selektivní vazbu RNA na membránu a celý obsah zkumavky byl opatrně promíchán. Po 700 μ l byl obsah pipetován na kolonku s membránou. Po každých 700 μ l byla kolonka centrifugována 15 s při 10 000 rpm. Po promytí 700 μ l pufru RW1 byl vzorek krátce centrifugován. Následně bylo přidáno 500 μ l pufru RPE s přidaným ethanolem k dalšímu promytí a upevnění vazby RNA na membráně a reakce byla krátce centrifugována. Po přidání dalších 500 μ l pufru RPE byl vzorek centrifugován 2 minuty při 10 000 rpm, pro lepší odstranění ethanolu byla membrána vysušena v nové zkumavce 1 minutu při maximálních otáčkách (13 000 rpm). Na závěr byla kolonka přemístěna do zkumavky 1,5 ml a provedena eluce aplikací 50 μ l RNáz prosté vody (Ambion) na střed membrány. Na závěr byl vzorek centrifugován 1 min při 10 000 rpm.

4.2.2 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA byl použit kit ProtoScript[®] M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) a bylo využito obou dodaných primerů ve dvou samostatných reakcích. Pro reakci bylo zapotřebí cca 1 μ g RNA. Toto množství bylo odhadnuto na objem 6 μ l získané RNA. Do každé ze dvou reakcí byly přidány 2 μ l primerů a to buď oligonukleotidy 23 bází dlouhé - OLIGO d(T)₂₃VN (50 μ M) pro hybridizaci s poly(A) koncem mRNA nebo šestinukleotidové hexamery - Random Primer Mix (60 μ M), který zajišťuje náhodná a pevná místa přisednutí, která pokrývají kompletní RNA. Obě reakce byly denaturovány 5 minut při 70 °C a dány na led. Po zchlazení byl přidán k oběma reakcím Reaction Mix o objemu 10 μ l (reakční mix obsahuje pufr pH 8,3, ionty K⁺ a Mg²⁺, dNTPs) a Enzyme Mix o objemu 2 μ l (obsahuje reverzní transkriptázu a inhibitor RNáz). Reakce byly inkubovány 60 minut při 42 °C a následně byly inaktivovány enzymy 5 min při 80 °C. Každá reakce byla doplněna do 50 μ l přídatkem 30 μ l vody (Ambion).

4.2.3 PCR amplifikace specifické sekvence mSpindly

Pro PCR reakce bylo využito DNA polymerázy Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Tato polymeráza je založená na polymerázách odvozených od *Pyrococcus sp.* a obsahuje navíc speciální doménu zvyšující výkonnost. Pro reakci 50 µl bylo odměřeno 32,5 µl vody a 10 µl pufru 5xGC Buffer, který je vhodnější pro dlouhé sekvence nebo sekvence bohaté na G/C regiony. Pufr poskytuje Mg²⁺ nezbytný pro funkci DNA polymerázy. Dále byl do reakce přidán 1 µl směsi dNTP a genově specifické primery pro sekvenci mSpindly každý v objemu 1,25 µl. Templátová cDNA z předchozího kroku byla přidána v objemu 2 µl a dále bylo přidáno 1,5 µl pufru DMSO, který napomáhá denaturaci DNA bohaté na G/C. Na závěr bylo přidáno 0,5 µl Phusion™ DNA polymerázy.

Primery byly navrženy s přidáním restrikčního místa pro endonukleázu NheI. Forward primer je 28-mer TGCTAGCGAGGCAGATATCACAAATCTT a reverse primer 29-mer AGCTAGCCTGCTGTGAGCACTGCGTTTCT. Teplota pro annealing primerů byla pokusně stanovena na hotové oocytární cDNA na 53 °C. Byly stanoveny následující podmínky cyklů pro thermocycler.

1. Počáteční denaturace	98 °C	30 s	1 cyklus	
2. {	Denaturace	98 °C	7 s	} 35 cyklů
	Annealing primerů	53 °C	20 s	
	Elongace DNA – extension	72 °C	45 s	
3. Závěrečná elongace – final extension	72 °C	7 m, 30 s	1 cyklus	

4.3 Zaklonování sekvence mSpindly do vektoru pRNA

Pro zaklonování sekvence byl zhotoven vektor (Příloha 10.3) obsahující sekvenci fluorescenčního proteinu EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Před vlastním klonováním byl vektor i insert enzymaticky štěpen za vzniku lepivých konců, aby bylo možné vektor se sekvencí požadovaného proteinu spojit. Restrikční místa na vektoru i insertu odpovídají restrikční endonukleáze NheI (palindromická sekvence GCTAGC).

4.3.1 Restrikční štěpení

Do dvou 50 µl reakcí bylo přidáno 5 µl 10x NEB Buffer No. 2, který je pro NheI endonukleázu vhodný. Dále bylo přidáno 43 µl DNA a 2 µl enzymu NheI. Obě reakce byly inkubovány 3 hodiny při 37 °C. Po restrikčním štěpení obou komponent byl defosforylován vektor. Tím bylo dosaženo toho, aby se jeho konce znovu nespojily a aby se nespojovaly

molekuly mezi sebou. Defosforylační reakce byla inkubována 1 hodinu při 37 °C s 1 µl fosfatázy SAP.

4.3.2 Ligace vektoru a insertu

Pro spojení obou fragmentů byla vytvořena ligační reakce. Pro správný poměr vektoru i insertu do ligační reakce bylo potřeba zjistit poměr koncentrací pomocí počítačového programu, který měří intenzitu světelného pruhu z agarózové elektroforézy (1 µl barvy 6x Loading Dye na 5 µl DNA). Do 20 µl reakce byly přidány 2 µl pufru T4 DNA Ligase Buffer a následně molekulární voda (Ambion) v množství doplňující celou reakci na 20 µl. Dále byl přidán vektor a insert ve správném poměru a nakonec T4 DNA ligáza. Celá reakce byla inkubována 1 hodinu při teplotě 16 °C.

4.4 Transformace a pomnožení rekombinantního plasmidu

Aby byla získána potřebná DNA v dostatečném množství pro přípravu cRNA, rekombinovaný bakteriální plasmid byl transformován do bakteriálních buněk inaktivovaného kmene *E. coli*. Kompetentní buňky byly skladovány při teplotě -80 °C. Do zkumavky se 2 µl produktu ligační reakce bylo přidáno 20 µl kompetentních buněk a reakce byla inkubována na ledu (+4 °C) 20 minut. Následně byly buňky vystaveny tepelnému šoku, tzn. inkubace 40 s ve vodní lázni při teplotě 42 °C a zchlazení na ledu po další 2 minuty. Na závěr bylo přidáno SOC médium temperované na 37 °C v objemu 200 µl a reakce byla dále inkubována 1 hodinu při 37 °C a 750 rpm. Celé množství bylo rovnoměrně rozetřeno na agarovou plotnu s ampicilinem, ta byla následně inkubována při 37 °C přes noc.

Následující den bylo vybráno 22 kolonií, které byly kultivovány v 2 ml média LB (*Lysogeny Broth* – médium pro růst bakterií) 4 hodiny při 37 °C. 1 µl z každé namnožené kolonie byl použit jako templát pro následující PCR reakci.

4.4.1 Testace kolonií pomocí PCR

Obsah specifické sekvence v plasmidech vybraných kolonií byl testován PCR amplifikací pomocí Quick-Load Taq 2x Master Mix (NEB), kde byly jako templát využity 2 µl bakteriální suspenze. Do každé reakce bylo přidáno 9,5 µl molekulární vody, 12,5 µl QL Master Mix (s obsahem Taq polymerázy, nukleotidů a barvy loading dye pro elektroforézu), po 0,5 µl forward a reverse primer. Byly stanoveny následující podmínky cyklů.

1. Počáteční denaturace	95 °C	5 m	1 cyklus
2. {	Denaturace	95 °C	} 35 cyklů
	Annealing primerů	52 °C	
	Elongace DNA – extension	68 °C	
3. Závěrečná elongace – final extension	68 °C	5 m	1 cyklus

4.5 Izolace plasmidové DNA

Dle výsledků PCR byla vybrána kolonie, která byla přemístěna do 100 ml přehřátého LB média a inkubována 18 hodin při 37 °C a 150 rpm.

Pro izolaci plasmidu byl použit kit Hi Speed Plasmid Midi Kit (Qiagen). Centrifugací při 6000 rpm po dobu 45 minut při 4 °C byla utvořena peleta, která byla následně resuspendována v 6 ml pufru P1. Dále byl přidán pufr P2 a směs byla promíchána převrácením. Suspenze se zbarvila modře a byla inkubována 5 minut při RT (*Room Temperature* - pokojová teplota). Po 5 minutách byl přidán vychlazený pufr P3 a suspenze byla opět opatrně promíchána, došlo k precipitaci a zbělení suspenze. Lyzát byl přemístěn do QIAFilter Cartridge a inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Po 10 minutách byl obsah cartridge vytlačen do HiSpeed Tip, který byl předtím ekvilibrován přidáním 4 ml pufru QBT. Potom, co celý obsah protekl přes HiSpeed Tip, byla promyta membrána 20 ml pufru QC. DNA byla následně eluována 5ml pufru QF. Eluát byl precipitován 3,5 ml isopropanolu a byl inkubován 5 minut při RT. Precipitovaná DNA byla zachycena na membráně filtru a nečistoty byly odmyty 70 % EtOH a protlačováním vzduchu byl filtr vysušen. Na závěr byla provedena eluce plasmidové DNA z filtru protlačováním 1 ml Pufru TE do 1,5 ml zkumavky. Správná sekvence byla zkontrolována pomocí sekvenace (Příloha 10.2).

4.5.1 Testační štěpení plasmidu

Aby byla ověřena správná orientace specifické sekvence ve vektoru pRNA bylo provedeno testační štěpení pomocí různých enzymů. Byly vytvořeny dvě 20 µl enzymatické reakce se dvěma enzymy, kde základ tvořily 2 µl pufru NEB Buffer No. 2 a 14 µl vody. Dále byly přidány 2 µl rekombinantního plasmidu a po 1 µl enzymů v kombinacích NheI/XbaI a Not/XbaI (poloha restrikčních míst příloha 10.1 a 10.3). Dále byla vytvořena enzymatická reakce s enzymem NheI v množství 1 µl, 2 µl pufru č. 2, 2 µl plasmidu a 15 µl vody.

4.6 Linearizace plasmidu

Purifikovaný plasmid byl linearizován enzymatickým štěpením v reakci 100 μ l. K 87 μ l plasmidu bylo přidáno 10 μ l pufru NEB Buffer No. 4 a 3 μ l enzymu AscI. Reakce byla inkubována 60 hodin při 37 °C. Plasmid byl purifikován pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

4.7 Příprava cRNA *in vitro*

4.7.1 Transkripce *in vitro*

Pro transkripční reakci byl použit kit mMMESSAGE mMACHINE[®] (Ambion). Jako první byla odměřena Nuclease-free voda (prostá nukleáz) jako doplněk do 20 μ l. Následně byl do reakce přidán roztok 2x NTP/CAP (nukleotidy a analog čepičky [$m^7G(5')ppp(5')G$]) v objemu 10 μ l. Dále byly přidány 2 μ l pufru 10x Reaction Buffer a linearizovaný templát v množství 10 μ g na reakci. Na závěr byly přidány 2 μ l enzymu Enzyme Mix. Reakce byla promíchána a inkubována 2 hodiny při 37 °C. Pro odstranění zbytků DNA byl na závěr přidán 1 μ l DNázy TURBO DNase a reakce byla dále inkubována 15 minut při 37 °C.

4.7.2 Vytvoření poly(A) konce RNA

Pomocí Poly(A) Tailing kitu (Ambion) byl produkt z transkripční reakce opatřen poly(A) koncem. Do 20 μ l reakce bylo přidáno 36 μ l Nuclease-free vody (prostá nukleáz). Dále bylo přidáno 20 μ l pufru 5x E-PAP, 10 μ l MnCl₂ (25 mM) a 10 μ l ATP (10mM). Před přidáním enzymu bylo z reakce odebráno 0,5 μ l pro testaci. Na závěr byly přidány 4 μ l polyadenylační polymerázy E-PAP. 100 μ l reakce byla inkubována 1 hodinu ve 37 °C a následně uskladněna při -20 °C.

4.8 Live imaging – časoběrná mikroskopie

Oocyty byly v průběhu experimentu kultivovány v inkubačním boxu EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, inkubátor mikroskopu), v atmosféře 5 % CO₂ při 37 °C. Pro získání obrazové dokumentace byl použit konfokální mikroskop Leica SP5 vybavený objektivy Plan-Neofluar 20x/0.5 a C-Apochromat 40x/1.3 NA s olejovou imerzí. Snímky byly pořizovány každých 12-15 minut po 18 hodin.

5 Výsledky

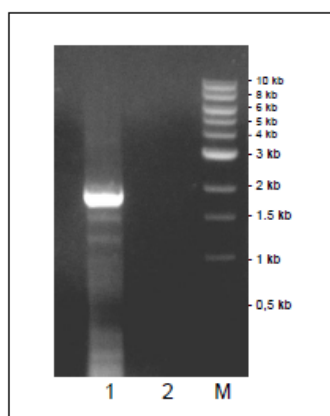
5.1 Získání specifické sekvence z testikulární mRNA

Pro získání DNA sekvence proteinu mSpindly byla extrahována testikulární RNA myši domácí za použití RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen), ze které byla syntetizována cDNA pomocí ProtoScript[®] M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs). Do této reakce byly použity oba typy dodaných primerů a to jak náhodné hexamery, tak i oligonukleotidy d(T)23. Získaná sekvence byla amplifikována v PCR reakci s využitím DNA polymerázy Phusion[™] High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Je zřejmé, že cDNA z reakce s náhodnými hexamery byla vhodným templátem pro amplifikaci sekvence proteinu mSpindly (Obr. 5.1.2). Jako primery byly pro PCR navrženy oligonukleotidy 28 bázový a 29 bázový (Obr. 5.1.1) s restrikčními místy pro NheI (zvýraznění). Získaná sekvence proteinu bez start a stop kodónu v délce 1821 bp byla použita pro zaklonování do vektoru pRNA.

Obrázek 5.1.1 Primery pro PCR.

Pro amplifikaci DNA sekvence mSpindly byly navrženy primery, které obsahují restrikční místa pro restrikční endonukleázu NheI. Stejné restrikční místo je obsaženo ve vektoru a slouží k ligaci vektoru a insertu.

Spindly_UP: 5'-TGCTAGCGAGGCAGATATCACAAATCTT-3'
Spindly_LOW: 5'-AGCTAGCCTGCTGTGAGCACTGCGTTTCT-3'



Obrázek 5.1.2 PCR amplifikace DNA sekvence mSpindly.

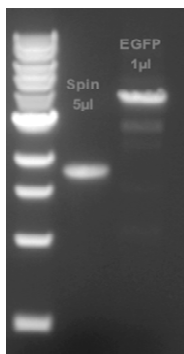
M - marker 1 kb DNA Ladder (NEB, pro fragmenty od 0,5 kb do 10 kb)

- 1 - pruh velikosti 1821 bp, templátem cDNA, pro jejíž syntézu byl použit mix náhodných hexamerů.
- 2 - templátem cDNA z reakce využívající oligo d(T) primery.

5.2 Zaklonování sekvence mSpindly do vektoru pRNA

Shodně enzymaticky upravené templáty byly ligovány, čímž byl plasmid cirkularizován a připraven tak pro transformaci. Pro sestavení ligační reakce bylo nutné stanovit správný poměr vektoru a insertu z hlediska poměru koncentrací a velikostí obou

molekul. Dle obrázku 5.2.1 byl poměr komponent V/I do ligační reakce stanoven na 1/5. Vektor byl pro reakce naředěn 10x, výsledná koncentrace tedy byla 0,1x pRNA.

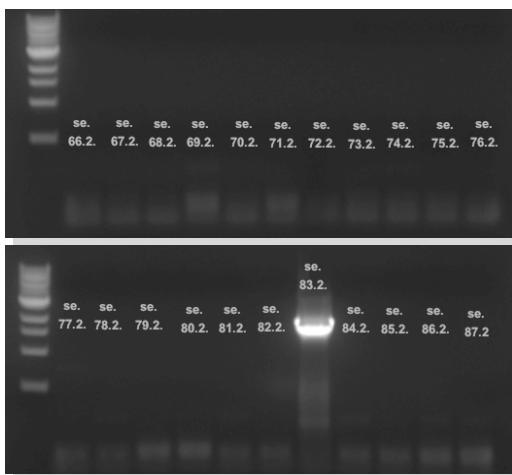


Obrázek 5.2.1 Stanovení poměru V/I do ligační reakce.

Dle intenzity světelných pruhů byly stanoveny vzájemné poměry vektoru a insertu oštěpených enzymem NheI. S přihlédnutím k velikosti obou molekul byl stanoven nutný objem insertu na 10 µl a objem zředěného vektoru (0,1x pRNA) na 2 µl.

5.3 Testace kolonií pomocí PCR

Produkty ligačních reakcí – cirkularizované rekombinantní plasmidy byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli*, které následně vytvořily kolonie na agarové plotně s ampicilinem. Bylo vybráno 22 kolonií, které byly namnoženy v kultivačním médiu. 2 µl ze všech namnožených kolonií byly použity jako templát pro PCR reakce (Obr. 5.3.1). Pro následné namnožení ve 100 ml LB média byla použita kolonie s označením se. 83.2.

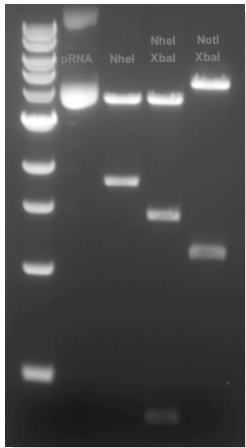


Obrázek 5.3.1 Testace bakteriálních kolonií.

Templátem pro PCR byly namnožené kolonie mSpindly-EGFP. Pomocí agarózové elektroforézy byla detekována pouze jediná pozitivní kolonie obsahující plasmid pRNA-EGFP-mSpindly. Kolonie s označením se. 83.2 byla použita pro další postup.

5.4 Testace rekombinantního plasmidu

Namnožené kolonie s rekombinantním plasmidem EGFP-mSpindly byly použity pro purifikaci plasmidů za pomoci kitu Hi Speed Plasmid Midi Kit (Qiagen). Následně bylo provedeno testační štěpení a výsledek byl otestován na gelu (Obrázek 5.4.1).



Obrázek 5.4.1 Testační štěpení „double digest“.

Pro 3 různá restrikční štěpení bylo použito pokaždé 2 μ l suspenze plasmidu.

V reakci s enzymem NheI byl vyštěpen pouze úsek mSpindly, v reakci s enzymy NheI/XbaI byl vyštěpen úsek mSpindly rozdělený na kratší (cca 380 bp) a delší část, cca 1450 bp (Příloha 10.1), enzymy NotI a XbaI ohraničují pouze sekvenci EGFP s částí sekvence mSpindly a s částí sekvence vektoru.

Právě štěpení těmito dvěma enzymy je rozhodující pro zjištění správné orientace insertu. V tomto případě je orientace správná, vyštěpen je krátký úsek mSpindly (cca 380 bp) + EGFP (tj. cca 1,2 kb). Pokud by byl insert orientován opačně, byl by vyštěpený úsek asi o 1 kb delší. (Stupnice markeru viz obrázek 5.1.2)

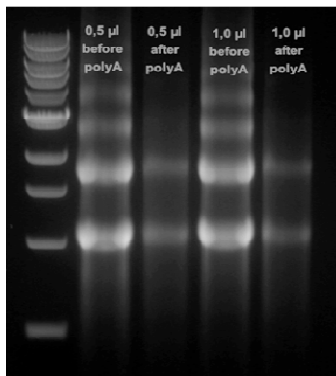
Ve sloupci vedle markeru je prázdný vektor jako referenční pro určení velikosti vektoru.

5.5 Sekvence

Správná sekvence byla ověřena pomocí sekvenace, která odhalila několik nukleotidových záměn (Příloha 10.2). Tyto záměny většinou nevedou ke změně aminokyseliny ve výsledném proteinu, pouze v jednom případě mutace vede k záměně aminokyseliny alaninu za kyselinu asparagovou. Takováto četnost mutací mohla být způsobena tím, že byl izolován typ proteinu, který je specifický pro meiotické buňky (izolace z varleční tkáň). Důležité je, že až na jednu aminokyselinu je sekvence shodná se sekvencí klonovanou ze somatických buněk.

5.6 Testace RNA

Pro vyšší stabilitu RNA a efektivitu translace je nezbytné, aby RNA měla na svém 5'konci čepičku 7-methylguanointrifosfátu a na 3'konci poly(A) konec. RNA byla nasyntetizována a opatřena čepičkou v reakci s využitím mMESSAGING mMACHINE[®] kitu (Ambion), kde byl analog čepičky součástí roztoku nukleotidů. Pro přidání poly(A) konce byl použit kit Poly(A) Tailing Kit (Ambion), čímž bylo dosaženo syntézy poly(A) konce o délce minimálně 150 b. Takto ošetřená RNA byla použita pro mikroinjekci do oocytů (Obr. 5.5.1).



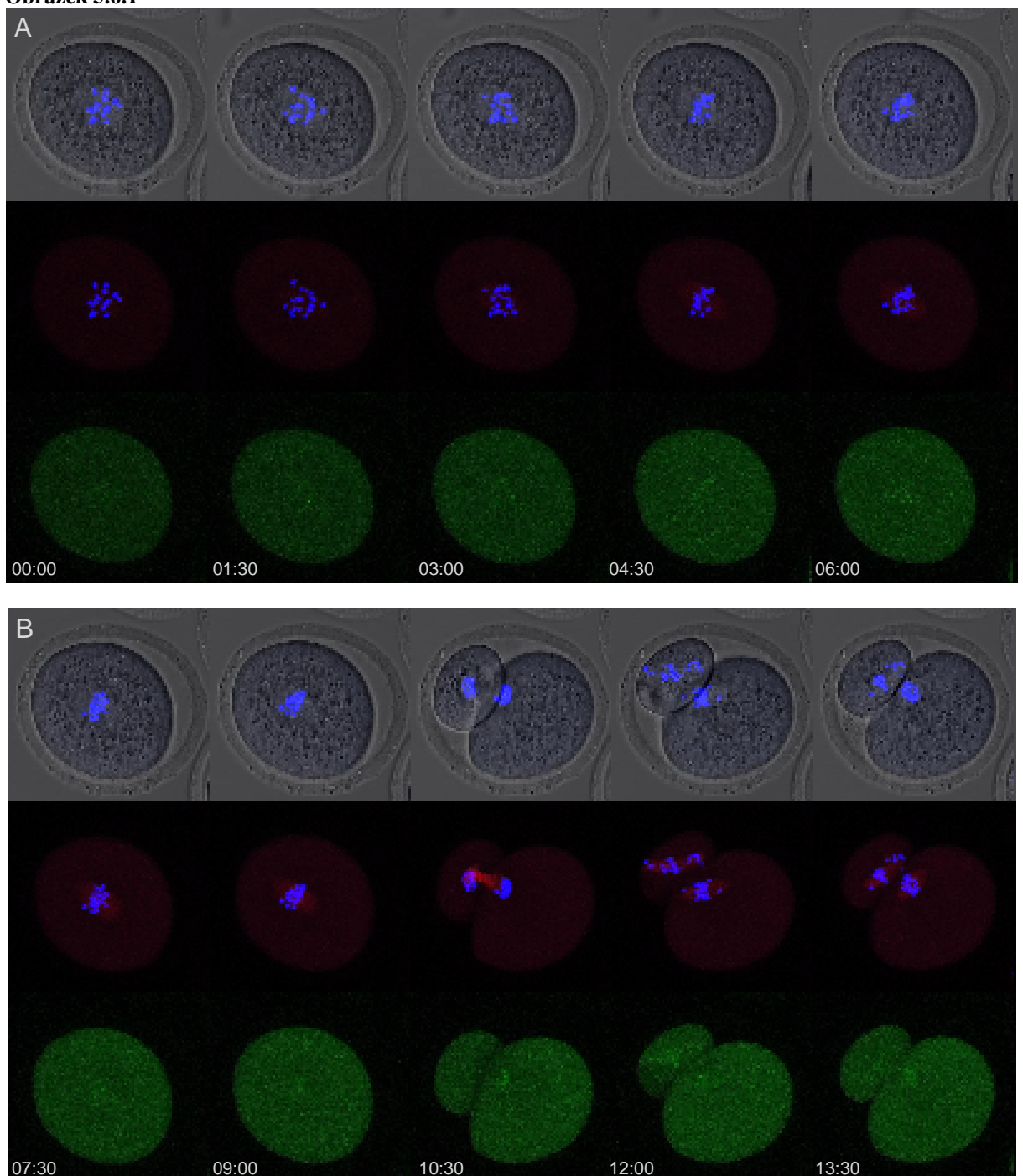
Obrázek 5.5.1 Testace mRNA.

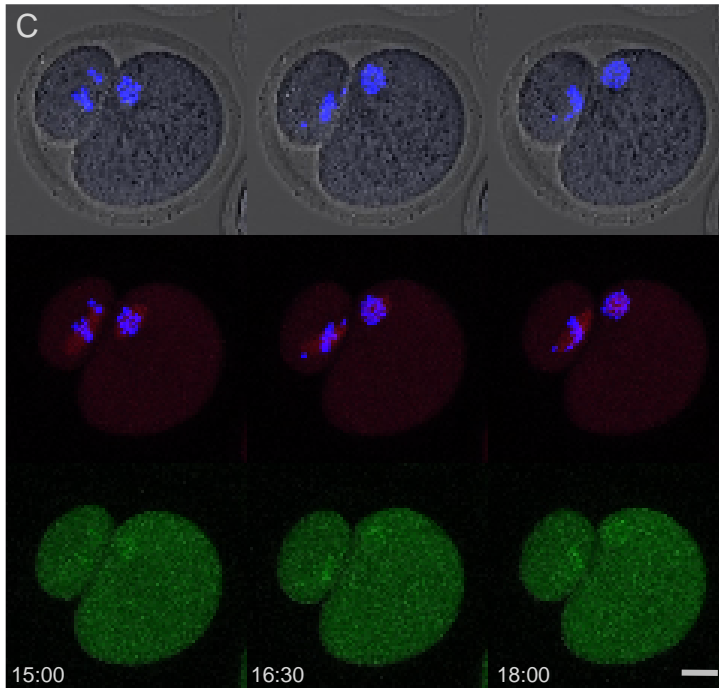
Testace získané mRNA před/po polyadenylační reakci. Po polyadenylační reakci je mRNA o cca 150 b delší. Takto otestovaná mRNA byla použita pro mikroinjekci do myších oocytů stádia GV.

5.7 Analýza obrazových výsledků

Pomocí konfokálního mikroskopu bylo zaznamenáno zrání oocytů mikroinjikovaných připravenou EGFP-mSpindly cRNA. Po celou dobu časosběrné mikroskopie byly oocyty kultivovány v inkubačním boxu EMBL při 37 stupních a 5 % CO₂. Obrázek 5.6.1 dokazuje, že lze pomocí EGFP-značeného mSpindly proteinu vizualizovat kinetochory.

Obrázek 5.6.1



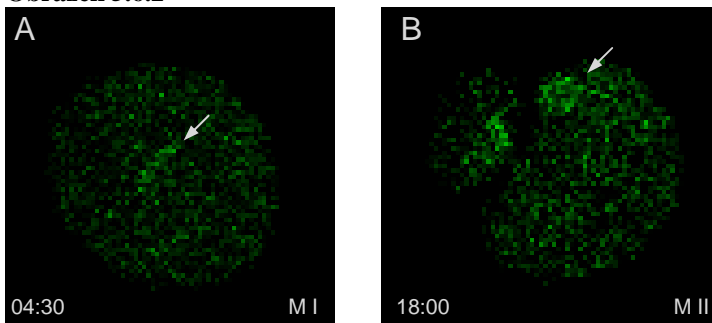


Obrázek 5.6.1 Časoběrná videomikroskopie.

V blocích A, B, C je na 13 po sobě jdoucích snímcích je zachyceno zrání myšního oocytu v devadesátiminutových intervalech. Horní řada zobrazuje polohu DNA (modrozelené barvení histonu H2B-CFP) ve fázovém kontrastu, kde je zřetelně ohraničená oblast oocytu. Prostřední řada je prolutím obrazu H2B-CFP a tubulin-mCherry (červené barvení mikrotubulů vřeténka). Spodní řada ukazuje expresi EGFP-mSpindly rekombinantního proteinu. Měřítka vpravo dole je cca 20 μm .

Časový údaj je ve vztahu k GVBD.

Obrázek 5.6.2



Obrázek 5.6.2 Lokalizace mSpindly v metafázi.

Na vybraných snímcích, které byly částečně upraveny je patrná zvýšená lokalizace mSpindly na kinetochorách (šipky) v metafázi I, boční pohled na metafázní figuru (A), a v metafázi II, pohled shora na metafázní figuru (B).

Je zřejmé, že ačkoli se protein lokalizuje v cytoplasmě rozptýleně, jeho zvýšená lokalizace na kinetochorách je zjevná a vizualizace kinetochor prostřednictvím modifikovaného proteinu EGFP-mSpindly je možná.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit funkční mRNA pro EGFP-značený protein mSpindly, pomocí které by mělo být možné vizualizovat chromozomální kinetochory pro potřeby studia poruch segregace chromozómů v meióze savců. Vytvořená mRNA byla mikroinjikována do oocyty a s využitím detekce pomocí konfokálního mikroskopu byly v průběhu 18 hodin vizualizovány kinetochory chromozómů při meiotickém zrání oocyty myši domácí. Výsledky této studie se poněkud odlišují od těch získaných na fixovaných buňkách (Zhang et al., 2010), kde se mSpindly lokalizuje v průběhu meiotického zrání v cytoplasmě výrazně méně než na kinetochorách, jak je patrné z obrázku 8. Z výsledků časosběrné mikroskopie se zdá, že se mSpindly lokalizuje v cytoplasmě relativně hojně. To by mohlo být způsobeno právě rozdílem v metodě vizualizace, kdy fixace buněk znamená jiné podmínky experimentu. Přesto lze kinetochory od pozadí jasně odlišit, popřípadě je možné snímky pořízené s využitím tohoto nástroje dekonvolovat a tím vysokou úroveň signálu pozadí odstínit. Přestože se získaná specifická sekvence proteinu mSpindly v několika případech liší od sekvence v databázi NCBI s označením NM_027411 (Přílohy 10.1 a 10.2), vedou tyto rozdíly k záměně aminokyseliny pouze v jednom případě. Taková záměna pravděpodobně nemá na funkci proteinu vliv.

Tato studie je unikátní v tom, že pro vizualizaci kinetochor používá nástroj, jehož funkci je možné sledovat v reálném čase na konkrétní buňce od začátku do konce meiotického dělení. V tomto směru nelze výsledky této studie konfrontovat s jinými závěry. Určitou podobnost lze najít ve studiích, které vizualizují kinetochory v reálném čase v buňkách mitotických (Jaqaman et al., 2010), pomocí značení centromerického proteinu CENP-A (forma histonu H3) fúzí s EGFP. Linie těchto buněk jsou předem geneticky modifikovány, aby fúzní protein expimovaly. Dle mého názoru by konstrukce fúzního proteinu, který je součástí kinetochory nebo centromery, mohla narušit funkci proteinového komplexu kinetochory a průběh meiotického dělení, a jeho využití ve studiích zaměřených na poruchy segregace chromozómů by mohlo mít vliv na průkaznost výsledků. Použitím proteinu, který není konstitutivní součástí kinetochory ani centromerického chromatinu, se tato studie vyhýbá možnosti, že by byly výsledky průběhu meiotického dělení zkreslené.

Úskalím zvoleného postupu by mohla být velikost proteinu mSpindly, která v některých ohledech znesnadňuje laboratorní postupy. Také vysoká úroveň lokalizace modifikovaného proteinu v cytoplasmě by mohla mít negativní dopad na interpretaci výsledků získaných s použitím tohoto nástroje. V tomto směru by podnětem pro další výzkum

mohlo být vytvoření takové mutace fluorescenčně značeného mSpindly proteinu, který by byl ochuzen o veškeré původní funkční domény kromě té, která zodpovídá za lokalizaci na kinetochorách. Tím by bylo možné dosáhnout toho, aby byla lokalizace kinetochor vizualizována s maximální přesností v průběhu celého meiotického zrání. Takový nástroj by byl také podstatně menší a laboratorní práce se specifickou sekvencí tohoto nástroje by mohla být značně zjednodušená a některé procedury (například PCR) by byly mnohonásobně kratší. Intenzivněji se studiu konkrétních domén věnovala pouze jediná studie, která sledovala funkci proteinu po vyřazení určitých částí z funkce. Byla však prováděna na lidském homologu proteinu Spindly, který je v některých ohledech odlišný. Další výzkum v oblasti funkce jednotlivých domén proteinů Spindly by mohl být v tomto případě také přínosem.

7 Závěr

Hypotéza, která byla v úvodu stanovena, byla tedy přijata. Byla získána funkční mRNA pro fluorescenčně značený protein mSpindly a cíl práce byl tímto splněn. Jak vyplývá z analýzy obrazových výsledků, pomocí fluorescenčně značeného fúzního proteinu EGFP-mSpindly je možné chromozomální kinetochory vizualizovat v reálném čase, bez nutnosti fixace buněk v jednotlivých stádiích meiotického zrání. Tím je umožněno sledovat jednotlivé buňky od začátku do konce meiotického zrání. Vyvinutý nástroj lze použít v dalších studiích zaměřených na poruchy segregace chromozómů v meióze savců a na způsob vzniku aneuploidí.

8 Seznam použitých zkratk

APC/C	<i>anaphase-promoting complex or cyclosome</i> ; E3-ubiquitinligáza, komplex proteinů katalyzující polyubiquitinaci (označení jako odpad) proteinů určených k degradaci, aktivována při přechodu metafáze/anafáze
ATP	adenosintrifosfát; nukleotid sloužící jako nejběžnější intracelulární nosič energie, při svém vzniku je schopen do své struktury energii vratně zabudovat a později ji v jiném pochodu uvolnit
Aurora B	kináza, která fosforyluje histon H3 a destabilizuje nesprávná připojení mikrotubulů na kinetochory
bp	<i>base pair</i> ; pár basí, základní jednotka délky řetězce DNA (RNA), spojení mezi dvěma dusíkatými basemi dvou komplementárních řetězců DNA prostřednictvím vodíkových můstků
Bub	<i>budding unperturbed by benzimidazole</i> ; skupina proteinů signální dráhy SAC
CC	<i>coiled-coil</i> ; šroubovicová struktura úseku peptidového řetězce
Cdc20	<i>cell-division cycle protein</i> ; klíčový regulátor buněčného cyklu, důležitý při nástupu anafáze, kde tvoří komplexy s APC/C (APC/C ^{Cdc20})
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; cyklin-dependentní proteinkinázy, enzymy katalyzující fosforylaci proteinů pouze pokud je navázán příslušný cyklin, důležité v regulaci buněčného cyklu
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> ; azurový fluorescenční protein
CK1	<i>casein kinase</i> ; kináza důležitá pro segregaci chromosomů zejména u kvasinek, kde fosforyluje Rec8 protein
cRNA	označení pro uměle syntetizovanou mRNA (komplementární k DNA, ze které byla získána <i>in vitro</i> transkripcí)
EtBr	<i>ethidium bromide</i> ; barvivo pro vizualizaci nukleových kyselin, používá se při elektroforéze, při vystavení UV záření 260nm emituje oranžové fluorescenční světlo o vlnové délce 590nm
EtOH	ethanol
FP	<i>fluorescent protein</i> ; fluorescenční protein, při excitaci zářením určité vlnové délky emituje záření o vyšší vlnové délce
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; široce používaný zelený fluorescenční protein, excitační maximum má při 395nm a emisní při 509nm, což odpovídá zelené barvě viditelného spektra
G-protein	membránový protein z rodiny GTPáz důležitý pro vnitrobuněčnou signalizaci, 2 konformace dle toho, jestli je navázán GTP nebo GDP
GTP	guanosintrifosfát; nukleotid, podobně jako ATP může fungovat jako energetický nosič
GV	<i>germinal vesicle</i> ; intaktní jaderná membrána, označení pro oocyt před začátkem meiotického zrání
GVBD	<i>germinal vesicle break down</i> ; rozpad jaderné membrány, fáze v meiotickém dělení oocyty značící nástup prometáfáze, začíná meiotické zrání; totéž co NEBD <i>nuclear envelope break down</i>
hnRNA	<i>heterogenous nuclear RNA</i> ; heterogenní RNA, pre-mRNA, primární transkript, nezralá mRNA musí projít úpravami, aby se z ní vytvořila mRNA
kb	<i>kilobase pair</i> ; tisíc párů basí, 1 000 bp

LB	<i>lysogeny broth</i> ; nutričně bohaté médium užívané pro kultivaci bakterií a jejich rychlý růst
LH	<i>luteinizing hormone</i> ; luteinizační hormon, náhlý vzrůst - předovulační vlna tzv. LH peak bezprostředně předchází ovulaci
Mad	<i>mitotic arrest defficient</i> ; skupina proteinů signální dráhy SAC
Mb	<i>Megabase pair</i> ; milion párů basí, 1 000 000 bp
MPF	<i>M-phase promoting factor</i> ; komplex cyklinB-Cdk1 umožňující buňce vstup do M-fáze
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; mediátorová RNA, templát pro tvorbu polypeptidového řetězce, vzniká transkripcí DNA po sestřihu hnRNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Národní centrum pro biotechnologické informace
NEB	<i>New England Biolabs</i> ;
NheI	restrikční endonukleáza získaná z bakterie <i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i> , palindromatická rozpoznávací sekvence GCTAGC
NTP	nukleosidtrifosfát; nukleotid, plural NTPs
ORF	<i>open reading frame</i> ; otevřený čtecí rámeček, sekvence nukleotidů ohraničená iniciačním kodonem a stop kodonem (bez stop kodonu), podle níž může být spojitě syntetizován polypeptidový řetězec (většinou mRNA)
PB	<i>polar body</i> ; pólové tělíčko, polovina genetické informace vydělená z oocyty při meióze jako nepotřebný materiál
pRNA	označení plasmidového vektoru pro syntézu mRNA
PLK	<i>Polo-like kinase</i> ; kináza, která fosforyluje Rec8 protein cohesinu a umožňuje tak jeho odstranění a nástup anafáze
RefSeq	<i>reference sequence</i> ; veřejná databáze nukleotidových a proteinových sekvencí, číslo znamená označení sekvence v databázi
Rod	<i>rough deal</i> ; společně s proteiny ZW10 a Zwi1 tvoří komplex RZZ
RT	<i>room temperature</i> ; pokojová teplota
RZZ	komplex proteinů Rod, ZW10, Zwi1, který je zodpovědný za dopravu důležitých proteinů na kinetochory
SAC	<i>spindle assembly checkpoint</i> ; zpětnovazebný kontrolní mechanismus dělicího vřeténka, kontroluje správné připojení mikrotubulů na kinetochory
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i> ; alkalická fosfatáza katalyzuje defosforylaci na 5' a 3' konci DNA a RNA nebo odstraňuje fosfátovou skupinu z proteinů
SOC	vyživující médium užívané v závěrečných fázích transformace <i>E. coli</i>
Sgo	<i>shugoshin</i> ; protein vnitřní centromery, chrání cohesin před fosforylací
T4	označení pro DNA ligázu izolovanou z bakteriofága T4
UTR	<i>untranslated region</i> ; nepřekládaný region zralé RNA, který nekóduje proteiny, na 3' i na 5' konci mRNA (3'UTR, 5'UTR), obvykle obsahuje informace pro regulaci translace a stability mRNA
ZW10	společně s proteiny Rod a Zwi1 tvoří komplex RZZ

9 Použitá literatura

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2005. *Espero Publishing*, 2. vyd., ISBN-10: 80-902906-2-0. 740 s.
- Anger, M. 2010. Kinases involved in Rec8 phosphorylation revealed. *Cell Cycle*. Volume 9, Issue 14, 2708-2708.
- Arredouani, A., Yu, F., Sun, L., Machaca, K. 2010. Regulation of store-operated Ca^{2+} entry during the cell cycle. *Journal of Cell Science*, Volume 123, 2155-2162.
- Barisic, M., Sohm, B., Mikolcevic, P., Wandke, C., Rauch, V., Ringer, T., Hess, M., Bonn, G., Geley, S. 2010. Spindly/CCDC99 is required for efficient chromosome congression and mitotic checkpoint regulation. *Molecular Biology of the Cell*. Volume 21, Issue 12, 1968-1981.
- Bernard, P., Allshire, R. C. 2002. Centromeres become unstuck without heterochromatin. *Trends in Cell Biology*, Volume 12, Issue 9, 419-424.
- Bettati, S., Pasqualetto, E., Lolli, G., Campanini, B., Battistutta, R. 2011. Structure and single crystal spectroscopy of Green Fluorescent Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, Volume 1814, Issue 6, 824-833.
- Browder, L. W. 1985. *Developmental biology: A comprehensive synthesis: Volume 1: Oogenesis*. Plenum Press, ISBN 0-306-41866-5. 632 p.
- Cimini, D. 2008. Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1786, Issue 1, 32-40.
- Cheeseman, I. M., Desai, A. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 9, January, 33-46.
- Clarke, L. 1998. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development*, Volume 8, Issue 2, 212-218.
- Cooper, K. F., Strich, R. 2011. Meiotic control of the APC/C: similarities & differences from mitosis. *Cell Division*. Volume 6, Issue 16, 1-7.
- Crews, C. M., Mohan, R. 2000. Small-molecule inhibitors of the cell cycle. *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 4, Issue 1, 47-53.
- Dailey, T., Dale, B., Cohen, J., Munné, S. 1996. Association between Nondisjunction and Maternal Age in Meiosis-II Human Oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 176-184.
- Driscoll, D. A., Gross, S. 2009. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *The New England Journal of Medicine*, Volume 360, Issue 24, 2556-2562.
- Gassmann, R., Kline, S. L., Carvalho, A., Desai, A. 2007. Analysis of kinetochore assembly and function in *Caenorhabditis elegans* embryos and human cells. *Methods*, Volume 41, Issue 2, 177-189.
- Harigaya, Y., Yamamoto, M. 2007. Molecular mechanisms underlying the mitosis/meiosis decision. *Chromosome Research*, Volume 15, 523-537.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A., Pines, J. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*, Volume 5, 143-148.
- Jaqaman, K., King, E. M., Amaro, A. C., Winter, J. R., Jonas F. Dorn, J. F., Elliott, H. L., Nunu Mchedlishvili, N., McClelland, S. E., Iain M. Porter, I. M., Posch, M., Toso, A., Danuser, G., McAinsh, A. D., Meraldi, P., Swedlow, J. R. 2010. Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases. *J. Cell. Biol.*, Volume 188, Issue 5, 665-679.
- John, B., Lewis, K. R. 1973. *The meiotic mechanism*. Oxford University Press, ISBN 0-19-914148-7. 32 p.

- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell*, Volume 122, 303–315.
- Kardon, J. R., Vale, R. D. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 10, December, 854-865.
- Kastan, M. B., Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Kovář, J. 2003. Buněčná proliferace a mechanismy její regulace I. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2. vyd., ISBN 80-246-0704-2. 64 s.
- Kovář, J. 2005. Buněčná proliferace a mechanismy její regulace II. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2. vyd., ISBN 80-246-1133-3. 74 s.
- Kudo, N. R., Anger, M., Peters, A. H. F. M., Stemmann, O., Theussl, H. C., Helmhart, W., Kudo, H., Heyting, C., Nasmyth, K. 2009. Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *Journal of Cell Science*, Volume 122, 2686-2698.
- Lee, H. J., Selesniemi, K., Niikura, Y., Niikura, T., Klein, R., Dombkowski, D. M., Tilly, J. L. 2007. Bone Marrow Transplantation Generates Immature Oocytes and Rescues Long-Term Fertility in a Preclinical Mouse Model of Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure. *Journal of Clinical Oncology*, Volume 25, No 22, 3198-3204.
- Malmanche, N., Maia, A., Sunkel, C. E. 2006. The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Letters*, 580(12), 2888-2895.
- McGuinness, B. E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Barnabé, A. M., Helmhart, W., Kudo, N. R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., Nasmyth, K. 2009. Regulation of APC/C Activity in Oocytes by a Bub1-Dependent Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* 19, 369-380.
- Melnik, B. S., Molochkov, N. V., Prokhorov, D. A., Uversky, V. N., Kutysenko, V. P. 2011. Molecular mechanisms of the anomalous thermal aggregation of green fluorescent protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 10 p.
- Murray, A. 1994. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 6, Issue 6, 872-876.
- Pellestor, F., Andréo, B., Arnal, F., Humeau, C., Demaille, J. 2002. Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Human Reproduction*, Volume 17, Issue 8, 2134-2145.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., Nasmyth, K. 2003. Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, Volume 112, Issue 4, 423-40.
- Pidoux, A. L., Allshire, R. C. 2000. Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 12, Issue 3, 308-319.
- Primrose, S. B., Twyman, R. M. 2006. Principles of gene manipulation and genomics. Blackwell Publishing, Malden, 7th ed., ISBN 978-1-4051-3544-3. 644 p.
- Purves, W. K., Orians, G. H., Heller, H. C. 1997. Eukaryotic chromosome structure. Dostupné z http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap01/chrom_struct.html, citováno (29.9.2011).
- Sirard, M. A. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, Volume 55, Issue 6, 1241-1254.
- Richards, E. J., Elgin, S. C. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489–500.

- Schuh, M., Ellenberg, J. 2007. Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell*, Volume 130, Issue 3, 484-498.
- Sládeček, F., Nedvídek, J. 1978. Dělení buňky. Univerzita Karlova v Praze, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1. vyd., 60 s.
- Vagnarelli, P., Ribeiro, S. A., Earnshaw, W. C. 2008. Centromeres: Old tales and new tools. *FEBS Letters*, Volume 582, Issue 14, 1950-1959.
- Vogt, E., Kirsch-Volders, M., Parry, J., Eichenlaub-Ritter, U. 2008. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 651, Issues 1-2, 14-29.
- Vondřejš, V. 2010. Otazníky kolem genového inženýrství. Academia, Praha, 1. vyd., ISBN 978-80-200-1892-2. 134 s.
- Warburton, P. E. 2001. Epigenetic analysis of kinetochore assembly on variant human centromeres. *Trends in Genetics*, Volume 17, Issue 5, 243-247.
- Zhang, Q. H., Wei, L., Tong, J. S., Qi, S. T., Li S., Ou, X. H., Ouyang, Y. C., Hou, Y., An, L. G., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2010. Localization and function of mSpindly during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle*. Volume 9, Issue 11, 2230-2236.

10 Přílohy

Seznam příloh

10.1 Sekvence mSpindly.....	52
10.2 Sekvence mSpindly získaná z testikulární mRNA	53
10.3 Mapa vektoru pRNA.....	54

10.1 Sekvence mSpindly

V sekvenci je tmavě šedou vyznačen start a stop kodón ohraničující ORF. Světle šedou je vyznačena oblast, která byla použita pro návrh primerů. Celá sekvence mRNA (cDNA) je dlouhá 2526 bp, ORF bez START a STOP kodónu je dlouhá 1821 bp.

384 bází od konce je vyznačena oblast, která je štěpitelná enzymem XbaI a byla využita k testování správného zaklonování sekvence.

RefSeq NM_027411:

```
ATTCAAAAATCCCCGGCGCTTACTTAGCAGTGCTGCTGCCGAGTGAAGAGGGAGTTATTTCTGTGCTG
AGGTGGAGTTAGTGTCACGAATCTGGGAGTCCAGTGCTCTCCGGACAGGCCTCCGGTTGCAGCAGCCAG
GAAGCGTGAGGAGAGAGTAGGTTGAGAACAGACATCATGGAGGCAGATATCACAAATCTTCGGAACAA
ACTCAAAGAGTGTGAAGACGAGCGACTGAAAGCTGCACACTATGGCCTACAGCTCTTGGAGAGGCAGA
CGGAACTGCAGAGCCAACTGGATAAATGTCATGAAGAAATGATGATCACAGCAGAGAAATACAACCAA
GAGAAGCATGCCCTTCAAAGAGAAGTGGAGCTCAAGAGTCGGATGTTAGACAGCCTGAGCTGTGAGTG
TGAAGCTCTGAAACAGCAGCAGAAGGCCGAGCTGGAGCAGCTAGAGGTGCAGCTACATAGGAGCCACC
GGCAGGAAGTGAGCGACCTGAAGAACAAGTTAGAAAATCTGAAAGTGGAAATTGGATGAAGCAAGGCT
TGGCGAGAAGCAGCTGAAGCAGAAGCTGGATCTGCAGGGGAACTTCTCGCTCACAAGTCAGAAGAGC
TCCGGCTCCTGTCTGAGCAGAGAGTGCTCAGTAGCATGTCTTCCGAGCTGCTGGCTCTTGAGACTGAGC
TGACGGCAGCGGAAGGTGTGAAGAATGCCCTCAAAGAAGAGGTGAATGAACTGCAGTACAAACAAGAG
CAGCTAGAATGTCTCAATACTTCTTACTGCACCAGGTAGACAGGCTTAAAGAAGAAAAAGAGGAGCG
TGAGAGAGAAGCGGTCTTACTATAATGCCTTGGAGAAAAGCTCGTGTAGAGAACCAGGATCTTCAGG
TACAGCTGGGTACGCACTCCAGCAGGGCGGCGGACCCCAATAGCAAAGGGAAGCTCGCTGTTCCGAGAGG
TGGAGGATCGAAGGGTGGCAATGGAACGCCAGCTCAACTTGATGAAAGACAAATACCAGTCACTGAAG
AAGCAAAATGCGTTCACCAGAGATCAGATGAACAAGATGAAGTTACAAATCTCCACATTGCTGAGGAT
GAGGGCTCGCAGACTGAGTTTGAACAGCAGGAGCGGTTGTTTGCCATGATAGAACAGAAGAATGGTG
AAATAAAACACCTTTTAGGGGAAATTAATAAACTGGAGAAATTTAAGAAGTTATATGAAAGTATGGA
ATCGAGGCCCTCCACATCAGACACCGCTTGTGTGCTAGAAGACAGCACCTATTACTCAGATCTACTTCA
GCTGAAGCTTGATAAGCTAAACAAAGAAAATGAAAGCACAAAGGACGAGCTGTCCATCCAGAGGATGA
AGGCTTTATTTGAGAGCCAGCGGGCCCTGGATATTGAGCGGAAACTGTTTACAAATGAAAGACACCTG
CAGCTCTCAGAAAGTGAAAACATGAAACTGAGAGCGAAGCTAGATGAACTCAAGCTGAAGTATGAACC
GGAAGAGAGAATTGAAGTACCTGTACTCAAAAGGAGGCGCGAGGTGCTGCCATTGAATATAACCACGC
CAGAAGAAACAGAAGAAACAGCTGCTGCCAGTGCCACTGAGGATGGAGTTCTAGACTCCCACCTCAC
AGGGAGGAGGAATCCTGTCTTAATAGCTTAAAAGATAACACTGTGCAGTGGAACAGCCAGCCTCTTC
ATGTGTGCAGCCAGCCAGCCTCTCTCCTCATAAGAACCTGCATCTGGATACACAGCCGAAGAAGGAGAA
GAAGTGTGTGAAGCTTGTGGATAGTCCGGCCAACATTTGAGGTCTTACATGAACAAAGTGGGAATACCC
CCAATTTCTCCAGGTTAACTGCAGAATCAAAGCTTCCAACAGAAGTGAAGGAAAGGATAGAAAACACA
AGCAAATTTGGGAAAAGGAGCTTGTAAAGAAATCACACAACATCATATATGTGTCTCAAAGTCAGCCCC
AGAAACGCAGTGCTCACAGCAGTAGTGAGGCCTGCGCGCTGGGCCACGCTAACCATCGCTCCTATGCGT
GGGACACCTTTGTGGAGCTTTGCATAGGTCAGTGCTGAAGCCTGGCGTGCTCGCACCGCTGTGACCAAG
ACTTCCGATGTGGCTGTGATTCTGACCATAAGTCCTTAACTGATGATCCTTCTCAGAAGTGTGGGTCA
CAGGGAACAGACCAGATCAGAAGAGAATGGGAGAATTTAAACCTACTTGCTGTGTTGGATGTGGAGTT
TGAACATGGTTAAATAATCTGTCATAAGAACC AAAAATTAGAAAATGGAACACTTAAAATTATTTAT
AATTTTCTTTGTACATCGTTTTGCACTTAGATTTTCTTGTCTTGTA AAAATAATGAAATTGGCTTGA
AAATATATATTACTACAAAATGTTTTAAAGTGTGAAGTACCTATATTCATATGTGTAATTTAGATTTT
ATGACTCAAACATCAATAATTTTGAATTTAAAATAAAAATGTCAGTAATTTCTTCTAAAAA AAAAA
AAAAA
```


10.2 Sekvence mSpindly získaná z testikulární mRNA

V sekvenci, která byla získána z testikulární mRNA, se vyskytlo několik chyb, které jsou červeně vyznačeny. Důvodem je možná existence jiného typu proteinu v meiotických buňkách, ze kterých byla jeho sekvence získána. Chyby však vedly k záměně aminokyseliny u proteinu pouze v jediném případě a tím je šedě vyznačená trojice bází GAT místo GCT. Tato mutace vede k nahrazení alaninu za kyselinu asparagovou. Znázorněn je ORF úsek sekvence proteinu mSpindly ohraničený START a STOP kodónem.

```
ATGGAGGCAGATATCACAAATCTTCGGAACAACTCAAAGAGTGTGAAGACGAGCGACTGAAAGCTGC
ACACTATGGCCTACAGCTCTTGGAGAGGCAGACGGAAGTGCAGAGCCAAGTGGATAAATGTCATGAAG
AAATGATGATCACAGCAGAGAAAATACAACCAAGAGAAGCATGCCCTTCAAAGAGAAGTGGAGCTCAAG
AGTCGGATGTTAGACAGCCTGAGCTGTGAGTGTGAAGCTCTGAAACAGCAGCAGAAGGGCAGCTGGA
GCAGCTAGAGGTGCAGCTACATAGGAGCCACCGGCAGGAAGTGAAGCAGCCTGAAGAACAAGTTAGAAA
ATCTGAAAGTGAATTGGATGAAGCAAGGCTTGGCGAGAAGCAGCTGAAGCAGAAGCTGGATCTGCAG
GGGGAACCTTCGCTCACAAGTCAGAAGAGCTCCGGCTCCTGTCTGAGCAGAGAGTGTCTCAGTAGCTG
TCTTCGGAGCTGCTGGATCTTCAGACTGAGCTGACGGCAGCGGAAGGTGTGAAGAATGCCCTCAAAGA
AGAGGTGAATGAACTGCAGTACAAACAAGAGCAGCTAGAATGTCTCAATACTTCTTACTGCACCAGG
TAGACAGGCTTAAAGAAGAAAAAGAGGAGCGTGAGAGAGAAGCGGTCTTACTATAATGCCTTGGAG
AAAGCTCGTGTAGAGAACCAGGATCTTCAGGTACAGCTGGGTCACGCACTCCAGCAGGCGGGCGGACCC
AATAGCAAAGGGAAGTTCGCTGTTTCGAGAGGTGGAGGATCGAAGGGTGGCAATGGAACGCCAGCTCAA
CTTGATGAAAGACAAATACCAGTCAATGAAGAAGCAAAATGCGTTCACCAGAGATCAGATGAACAAGA
TGAAGTTACAAATCTCCACATTGCTGAGGATGAGGGGCTCGCAGACTGAGTTTGAACAGCAGGAGCGG
TTGTTTGCCATGCTAGAACAGAAGAATGGTCAAATAAAACACCTTTTAGGGGAAATTAATAAACTGGA
GAAATTTAAGAAATATATGAAAGTATGGAATCGAGGCCTTCCACATCAGACACCGCTTGTGTGCTAG
AAGACAGCACCTATTACTCAGATCTACTTCAGCTGAAGCTTGATAAGCTAAACAAAGAAAAATGAAAGC
ACAAAGGACGAGCTGTCCATCCAGAGGATGAAGGCTTTATTTGAGAGCCAGCGGGCCCTGGATATTGA
GCGGAAACTGTTTACAAATGAAAGACACTTGCAGCTCTCAGAAAGTAAAACATGAAACTGAGAGCAAG
AGCTAGATGAACTCAAGCTGAAGTGAACCGAAGAGAGAATTGAAGTACCTGTACTCAAAGGAGG
CGCGAGGTGCTGCCATTGAATATAACCACACAGAGAAGAAACAGAAGAAACAGCTGCTGCCAGTGCCAC
TGAGGATGGAGTTTCTAGACTCCCACCTCACAGGGAGGAGGAATCCTGTCTTAATAGCTTAAAAGATA
ACACTGTGCAGTGGAAACAGCCAGCCTTTCATGTGTGCAGCCAGCCAGCCTCTCTCCTCATAAGAACC
TGCATCTGGATACACAGCCGAAGAAGGAGAAGAAGTGTGTGAAGCTTGTGGATAGTCCGGCCAACATT
GAGGTCTTACATGAACAAAGTGGGAATACCCCAATTCTCCAGGTTAACTGCAGAATCAAAGCTTCC
AACAGAAGTGAAGGAAAGGATAGAACTACAAGCAAATTTGGGAAAAGGAGCTTGTAAAGAAATCACAC
AACATCATATATGTGTCCTCAAAGTCAGCCCAGAAACGCAGTGCTCACAGCAGTAG
```

10.3 Mapa vektoru pRNA

Modře je vyznačen promotor pro transkripci *in vitro*, odkud se syntetizuje cRNA, žlutě start a stop kodóny pro translaci cRNA *in situ* v oocytu, červeně rozpoznávací místa pro restriční endonukleázy (NheI – místo pro vložení insertu – mSpindly), fialově místo pro restriční endonukleázu, kde se vektor linearizuje (Převzato a upraveno z McGuinness et al., 2009). Vektor byl modifikován a použit pro vytvoření GFP-Spindly cRNA.

