

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

**Regulace PKB/Akt fosforylace během
znovuzahájení meiosy**

Tereza Böhmová

Praha 2009

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petr Šolc

Sekce reprodukce a vývojové biologie savců

Laboratoř biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk

Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR v.v.i.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala pouze na základě citované literatury a konzultací se svým školitelem Mgr. Petrem Šolcem.

Poděkování

Svému školiteli Mgr. Petru Šolcovi a také Prof. MVDr. Janu Motlíkovi, DrSc. velice děkuji za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie a biochemie zárodečných buněk. Svému školiteli dále děkuji za vedení a s tím související věnovaný čas i užitečné rady během práce v laboratoři a při psaní této práce. Všem kolegům děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Zvláštní poděkování patří mé matce za předané hodnoty a za výchovu a péči, často na úkor vlastního pohodlí a potřeb.

Velké díky také patří Bohu.

Tato diplomová práce byla financovaná v rámci projektu CDC25 fosfatázy - klíčové regulátory meiotického zrání savčích oocytů a raného embryonálního vývoje (Česko-americká spolupráce, ME08030, 2008-2011).

Abstract

Regulation of PKB/AKT phosphorylation during resumption of meiosis

PI3K-PKB signal pathway participates in the CDK1 activation, which is necessary for meiosis resumption of mouse oocytes. That's why we wanted to examine the role of PKB in this process more in the details. The activity of PKB is associated with its phosphorylation at Thr308 and Ser473. These phosphorylations are probably independent and influence PKB function. Thr308 phosphorylated PKB is implicated in resumption of meiosis (GVBD), whereas Ser473 phosphorylation is not – as oocytes with reduced phosphorylation on Thr308 have delayed GVBD kinetics and oocytes with inhibited phosphorylation of Ser473 reinitiate meiosis comparably to control oocytes. Conversely, oocyte treatment with synthetic biologically active PtdIns(3,4,5)P₃ leads to stronger phosphorylation at Thr308 and accelerated GVBD kinetics. It was also found, that the kinase responsible for Ser473 phosphorylation in mouse oocytes is ATM.

Klíčová slova: buněčný cyklus, znovuzahájení meiózy, PI3K, PtdIns(3,4,5)P₃, PKB, AKT, PDK2, Ser473 kináza

Keywords: cell cycle, meiosis resumption, PI3K, PtdIns(3,4,5)P₃, PKB, AKT, PDK2, Ser473 kinase

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Přehled BC.....	10
2.1.1	CDK aktivita.....	11
2.2	Biologie oocytu.....	17
2.2.1	oogeneze.....	17
2.2.2	meiotické zrání.....	18
2.3	PI3K-PKB signální dráha.....	23
2.3.1	Fosfoinositidové kinázy.....	23
2.3.2	Protein kináza B.....	25
2.3.3	PI3K-PKB v BC.....	29
2.3.4	PI3K-PKB v oogenezi.....	33
2.3.5	PI3K-PKB v imunitním systému.....	35
3	Materiál a metody.....	38
3.1	Sběr a kultivace oocytů.....	38
3.2	Western blot (WB).....	38
3.3	DNA klonování a kultivace bakterií.....	40
3.4	Příprava mRNA.....	41
4	Výsledky.....	43
5	Diskuze.....	53
6	Souhrn.....	56
	Seznam citované literatury.....	58

Seznam použitých zkratek

Ag	antigen
Ala	alanin
APC/C	komplex s E3 ubiquitin ligázovou aktivitou (z angl. <u>a</u> naphase <u>p</u> romoting <u>c</u> omplex/ <u>c</u> yclosome)
Asp	kyselina <u>a</u> sparagová
ATP	adenosintrifosfát (z angl. <u>a</u> denosin <u>t</u> riphosphate)
BC	<u>b</u> uněčný <u>c</u> yklos
BCA	metoda stanovení koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (z angl. <u>b</u> icin <u>ch</u> onic <u>a</u> cid)
BCR	receptor B lymfocytů (z angl. <u>B</u> <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor)
Ca ²⁺	vápenatý iont
ca-Akt	konstitutivně aktivní protein kináza B (z angl. <u>c</u> onstitutive- <u>a</u> ctive Akt)
CAK	kináza aktivující cyklin-dependentní kinázu (<u>C</u> dk <u>a</u> ktivační <u>k</u> ináza)
CamKII	kalmodulin-dependentní kináza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (z angl. cyclic <u>a</u> denosin <u>m</u> onophosphate)
CDC25	rodina fosfatáz cyklin-dependentních kináz (z angl. <u>c</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle <u>2</u> 5)
CDK	cyklin- <u>d</u> ependentní <u>k</u> ináza
CKIs	inhibitory cyklin-dependentních kináz (z angl. <u>c</u> yclin- <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitors)
CSF	<u>c</u> ytostatický <u>f</u> aktor
cyc	cyklin (z angl. <u>c</u> yclin)
DAG	<u>d</u> iacylglycerol
DN	„ <u>d</u> ouble“ <u>n</u> egativní
dn	<u>d</u> ominantně <u>n</u> egativní
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DNA-PK	<u>D</u> NA protein <u>k</u> ináza
DP	„ <u>d</u> ouble“ <u>p</u> ozitivní
ECL	směs používaná k zesílení chemiluminiscence (z angl. <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminiscence)
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
EMI 1/2	ranný mitotický inhibitor (z angl. <u>e</u> arly <u>m</u> itotic <u>i</u> nhibitor)
F1	první <u>f</u> iliální generace
FCS	fetální telecí sérum (z angl. <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FcγRIIB	inhibiční Fc receptor B
FSH	<u>f</u> olikuly <u>s</u> timulující <u>h</u> ormon
Gab2	protein asociovaný s Grb2 (z angl. <u>G</u> rb2 <u>a</u> ssoiated <u>b</u> inding protein)
GCs	granulózní buňky (z angl. <u>g</u> ranulosa <u>c</u> ells)
GPCR	receptor spojený s G proteiny (z angl. <u>G</u> protein <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptor)
Grb2	protein vázaný s růstovými faktory (z angl. <u>g</u> rowth factor <u>b</u> ound protein 2)
GSK	glykogen <u>s</u> yntáza <u>k</u> ináza
GST	gluthathion- <u>S</u> -transferáza
GV	zárodečný váček (z angl. <u>g</u> erminal <u>v</u> esicle)
GVBD (NEBD)	rozpad jaderné membrány (z angl. <u>g</u> erminal <u>v</u> esicle <u>b</u> reak <u>d</u> own/ <u>n</u> uclear <u>e</u> nvelope <u>b</u> reak <u>d</u> own)

hCG	lidský choriogonadotropin (z angl. <u>h</u> uman <u>c</u> horiogonadotropin)
HM	<u>h</u> ydrofobický <u>m</u> otiv
IBMX	inhibitor fosfodiesteráz (<u>i</u> sobutyl <u>m</u> ethyl <u>x</u> anthin)
IFN γ	<u>i</u> nter <u>f</u> eron <u>γ</u>
IFN γ -R	<u>i</u> nter <u>f</u> eron <u>γ</u> receptor
IKK	kináza inhibitoru jaderného faktoru κ B (z angl. <u>i</u> nhibitor of <u>κB</u> <u>k</u> inase)
IL	<u>i</u> nter <u>l</u> eukin
ILK	kináza spojená s integriny (z angl. <u>i</u> ntegrin- <u>l</u> inked <u>k</u> inase)
ILR	<u>i</u> nter <u>l</u> eukin receptor (např. IL2-R - <u>i</u> nter <u>l</u> eukin <u>2</u> receptor)
INK4	rodina inhibitorů CDK4 a CDK6 kináz (z angl. <u>i</u> nhibitors of CDK <u>4</u>)
IP ₃	inositoltrifosfát (z angl. <u>i</u> nositoltriphosphate)
ITIM	<u>i</u> munoreceptorový tyrosinový <u>i</u> nhibiční <u>m</u> otiv
I κ B	<u>i</u> nhibitor jaderného faktoru <u>κB</u>
JAK	<u>J</u> anusova <u>k</u> ináza
KL	<u>k</u> it <u>l</u> igand
LH	<u>l</u> uteinizační <u>h</u> ormon
MAPK	<u>m</u> itogen <u>a</u> ktivovaná protein <u>k</u> ináza
MCSF	faktor stimulující makrofágy (z angl. <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony <u>s</u> timulating factor)
MDM2	E3 ubiquitin ligáza s p53 vazebnou aktivitou (z angl. <u>m</u> urine <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>2</u>)
MEM	manipulační médium
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility complex)
MI	<u>m</u> etafáze <u>I</u> . meiotického dělení
MII	<u>m</u> etafáze <u>II</u> . meiotického dělení
MPF	cyklin B-Cdk 1 komplex (z angl. <u>m</u> etaphase <u>p</u> romoting <u>f</u> actor)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <u>m</u> ass <u>s</u> pektrometry)
mTORC1	mTOR komplex 1 (z angl. <u>m</u> TOR <u>c</u> omplex <u>1</u>)
mTORC2	mTOR komplex 2 (z angl. <u>m</u> TOR <u>c</u> omplex <u>2</u>)
myr-Akt	<u>m</u> yrystoylovaná <u>A</u> kt
NES	signál pro export z jádra (z angl. <u>n</u> uclear <u>e</u> xport <u>s</u> ignal)
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T lymfocytů (z angl. <u>n</u> uclear <u>f</u> actor of <u>a</u> ctivated <u>T</u> lymphocytes)
NF κ B	jaderný faktor κ B (z angl. <u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κB</u>)
NK	<u>n</u> egativní <u>k</u> ontrola
NLS	jaderný lokalizační signál (z angl. <u>n</u> uclear <u>l</u> ocalization <u>s</u> ignal)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PDE3A	fosfodiesteráza 3A (z angl. <u>p</u> hosphodiesterase <u>3A</u>)
PDGF	destičkový růstový faktor (z angl. <u>p</u> latelet- <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
PDK1	fosfoinositid-dependentní kináza 1 (z angl. <u>p</u> hosphoinositide- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase <u>1</u>)
PDK2/Ser473K	fosfoinositid-dependentní kináza 2 (z angl. <u>p</u> hosphoinositide- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase <u>2</u>)/ <u>s</u> erin <u>473</u> kináza
PGCs	primordiální zárodečné buňky (z angl. <u>p</u> rimordial <u>g</u> erm <u>c</u> ells)
PH	plekstrin <u>h</u> omologní
PI	fosfoinositid (z angl. <u>p</u> hospho <u>i</u> nositide)
PI3K	fosfoinositid-3-kináza (z angl. <u>p</u> hospho <u>i</u> nositide- <u>3</u> - <u>k</u> inase)

PI4K	fosfoinositid-4-kináza (z angl. <u>phosphoinositide-4-kinase</u>)
PK	pozitivní <u>k</u> ontrola
PKA	protein <u>k</u> ináza <u>A</u>
PKB/Akt	protein <u>k</u> ináza <u>B</u>
PKC	protein <u>k</u> ináza <u>C</u>
PLC γ	fosfolipáza C γ (z angl. <u>phospholipase C γ</u>)
PLK1	kináza podobná Polo (z angl. <u>polo like kinase</u>)
PMSF	inhibitor serinových proteáz (z angl. <u>phenylmethylsulphonyl fluoride</u>)
PMSG	gonadotropin používaný pro stimulaci tvorby folikulů (z angl. <u>pregnant mare serum gonadotropin</u>)
PP2A	protein fosfatáza 2A (z angl. <u>protein phosphatase 2A</u>)
PtdIns	fosfatidylinositol (z angl. <u>phosphatidylinositol</u>)
PtdIns(3,4,5)P ₃	fosfatidylinositol-4,5-trifosfát (z angl. <u>phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</u>)
PtdIns(4,5)P ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (z angl. <u>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</u>)
Rag1	<u>r</u> ekombinaci <u>a</u> ktivující gen <u>1</u> , kódující Rag1 protein
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. <u>ribonucleic acid</u>)
RNAi	<u>R</u> NA <u>i</u> nterference
RTK	<u>r</u> eceptor s tyrosin <u>k</u> ináзовou aktivitou
SAC	kontrolní bod uspořádání vřeténka (z angl. <u>spindle assembly checkpoint</u>)
SCF	faktor kmenových buněk (z angl. <u>stem cell factor</u>)
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit (z angl. <u>severe combined immunodeficiency</u>)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. <u>sodium dodecylsulphate</u>)
SDS/PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (z angl. <u>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</u>)
Ser	<u>s</u> erin
SH2	doména homologní se Src proteinem (z angl. <u>Src-homology 2 domain</u>)
SHIP	inositol fosfatáza obsahující SH2 doménu (z angl. <u>SH2-containing inositol phosphatase</u>)
siRNA	krátká interferující RNA (z angl. <u>short interfering RNA</u>)
TCR	receptor T lymfocytů (z angl. <u>T cell receptor</u>)
TF	<u>t</u> ranskripční <u>f</u> aktor
Thr	<u>t</u> hreonin
TSC1	hamartin (z angl. <u>tuberous sclerosis complex 1</u>)
TSC2	tuberin (z angl. <u>tuberous sclerosis complex 2</u>)
Tyr	<u>t</u> yrosin
WB	<u>w</u> estern <u>b</u> lot

1 Úvod

PI3K-PKB signální dráha se uplatňuje v regulaci buněčného dělení nejen somatických buněk, ale také buněk germinální linie – oocytů. Význam PKB (AKT) při znovuzahájení meiózy byl popsán u oocytů ježovky, Xenopa i myši. U myších oocytů PKB aktivuje fosfodiesterázu PDE3A, která spouští aktivaci cyklin B-CDK1 komplexu, klíčového pro průběh meiotického dělení.

Aktivace PKB je spojena s fosforylací na dvou místech – Thr308 a Ser473. Fosforylace Thr308 je regulována PtdIns(3,4,5)P₃, které umožňují membránovou kolokalizaci PKB s PDK1, kinázou fosforylující Thr308. PI3K aktivitě oponuje lipidová fosfatáza PTEN s 3'aktivitou. Jaká kináza fosforyluje PKB na Ser473 není úplně jasné. Jako potenciální Ser473 kináza (PDK2) jsou zvažovány ATM, DNA-PK, ILK kinázy a mTOR/riCTOR komplex. Vysoce pravděpodobná je buněčná a dějová specifita PDK2.

Prvním cílem diplomové práce bylo popsat regulaci fosforylace PKB v souvislosti se znovuzahájením meiózy na modelu myších oocytů. K tomu účelu byla sledována kinetika GVBD, snadno pozorovatelné charakteristické události při znovuzahájení meiózy a PKB fosforylace na Thr308 a Ser473 v různých situacích.

Nejdříve byl studován mechanismus fosforylace PKB obecně, pomocí LY294002, pan-PI3K inhibitoru, ovlivňujícího celou PI3K superrodinu (zahrnující i kandidátní Ser473 kinázy) a dále syntetických lipidů – biologicky aktivních (PtdInsP₃), simulujících aktivaci PI3K i biologicky neaktivních (SH6 inhibitor). Poté byl sledován účinek inhibice konkrétní potenciální PDK2 – ATM kinázy (KU55933 inhibitor) na GVBD a PKB fosforylaci.

Druhým cílem diplomové práce byla příprava expresních vektorů a následně mRNA kódujících fosfatázu PTEN a konstitutivně aktivní PKB, fúzované s fluorescenčním proteinem. Tyto mRNA budou využity v mikroinjekčních experimentech, týkajících se úlohy PKB při znovuzahájení meiózy myšími oocyty.

2 Literární přehled

2.1 Přehled BC

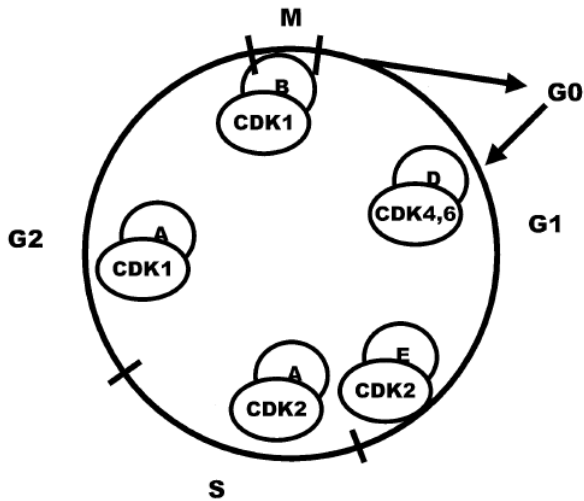
Buněčný cyklus (BC) je sérií událostí v buňce, které vedou k jejímu rozdělení, což sebou přináší potřebu bezchybné replikace DNA a její korektní segregace ve formě mitotických chromozomů. Pro správný průběh BC je nutná přesná regulace všech dějů probíhajících v rámci tohoto procesu.

Buňky, které nedostávají stimuly k proliferaci, jsou quiescentní - tento stav bývá také označován jako „G0“ fáze buněčného cyklu. Po obdržení podnětu (růstové faktory, signály z extracelulární matrix) vstupují buňky do G1 fáze, kdy se připravují na následující S fázi, během které replikují DNA. V G2 fázi je zkontrolována nenarušenost genetického materiálu před tím, než buňka vykoná vlastní buněčné dělení – mitózu nebo meiózu v případě gamet. Průchod buňky BC řídí cyklin-dependentní kinázy (CDKs) v komplexu spolu se svými pozitivními regulátory cykliny (cyc) (Jones and Kazlauskas 2000). V savčích buňkách existuje několik typů CDKs, které asociují s určitými cykliny. Schéma BC a komplexů cyklin-CDK aktivních v jednotlivých fázích cyklu znázorňuje Obr. č. 1.

Registrace proliferačních signálů vede k aktivaci komplexu cycD-CDK4/CDK6, který fosforyluje protein Rb. Ten v nefosforylovaném stavu blokuje transkripční faktory rodiny E2F. Již počáteční fosforylace Rb prostřednictvím cycD-CDK4/CDK6 komplexu a uvolnění transkripčních faktorů E2F indukují expresi cyklinu E, a tak je umožněna aktivace CDK2 kinázy. Cyklin E-CDK2 komplex pokračuje ve fosforylaci Rb proteinu a proteinů Rb rodiny, čímž vzniká pozitivní zpětná vazba (Obr. č. 2A) (Sears and Nevins 2002). Události směřující k fosforylaci Rb proteinů jsou závislé na růstových faktorech. Pozitivní zpětná vazba je součástí tzv. restrikčního bodu, od kterého je průběh BC nezávislý na přítomnosti růstových faktorů a může být zastaven pouze aktivací některého z „kontrolních bodů“, které směřují k inhibici komplexů cyklin-dependentních kináz aktivních v dané části BC.

Dále uvolňované E2Fs umožní expresi genů důležitých pro průchod S fází, během které je funkční komplex cycA-CDK2. V G2 fázi je cyklin A v komplexu s CDK1 a v mitóze je velmi významná aktivita cyklin B-CDK1 komplexu (Boonstra 2003).

Obr. č. 1: Komplexy CDK s cykliny řídící průchod buněčným cyklem



Quiescentní buňky v G0 fázi vstupují do G1 fáze buněčného cyklu díky aktivaci komplexu cyklin-dependentní kinázy 4 nebo 6 (CDK4,6) s cyklinem D (D). Pro přechod z G1 do S fáze je důležitá aktivita cycE-CDK2 komplexu, v pozdní S fázi asociuje CDK2 s cyklinem A (A). G2 je kontrolována cycA-CDK1 komplexem a průchod mitózou (M) řídí aktivita CDK1 v komplexu s cyklinem B (B). G1/2 a S fáze, předcházející mitóze se souhrně označují jako interfáze. Převzato z (Boonstra 2003)

2.1.1 CDK aktivita

Cyklin-dependentní kinázy jsou samy o sobě neaktivní, pro jejich činnost je nezbytná již popsaná tvorba heterodimeru s cykliny. Aktivita těchto komplexů je ovlivňována jednak fosforylací klíčových míst kinázy, ale také proteinovými inhibitory CDK (CKIs).

2.1.1.1 CDK inhibitory

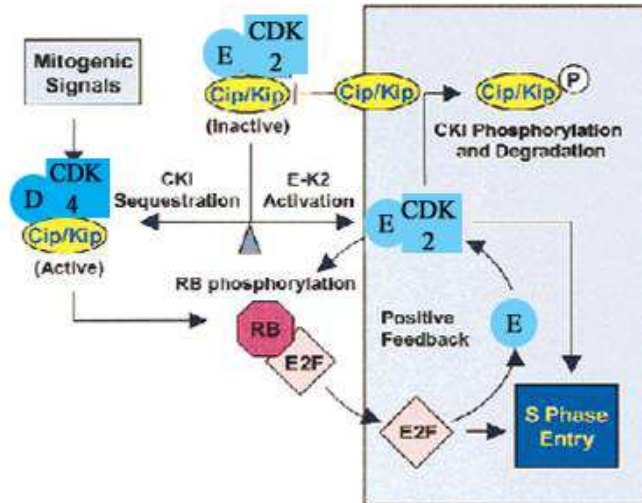
CKIs zahrnují dvě skupiny inhibitorů. INK4 rodina (z anglického inhibitors of CDK4) je tvořena proteiny p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} a p19^{INK4d}, které blokují funkci katalytické domény kináz CDK4 a CDK6.

Proteiny z Cip/Kip rodiny (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) působí na všechny cyklin-CDK komplexy – ovšem nejen inhibičně. Negativně totiž regulují funkci „jen“ cyklin E- a A-dependentních kináz. Proteiny p21 a p27 jsou dokonce důležité pro uspořádání komplexu cyklinu D a CDK4/6 kináz - jak ukazují výsledky experimentů prováděných na p21/p27 double knock-out myších. Tato asociace s cycD-CDK4 komplexy navíc vede k sekvenci Cip/Kip inhibitorů od jejich substrátů, např. cycE-CDK2 komplexu. CycE-CDK2 je tedy aktivní a kromě jiného suprimuje Cip/Kip rodinu - zprostředkovává totiž fosforylací p27, což vede k degradaci p27 proteinu. Opět tak dochází k zesílení vlastní CDK2 aktivity. (Obr. č. 2A) V případě zvýšené exprese INK4 proteinů při G1 arresu nastává možná kompetice INK4 a Cip/Kip inhibitorů o

vazbu na CDK4 – převládají-li INK4 proteiny, dochází vytěsnění Cip/Kip proteinů a ty mohou inhibovat cyklin E-CDK2 komplex (Obr. č. 2B) (Sherr and Roberts 1999).

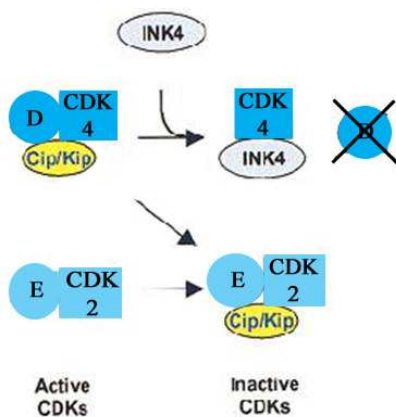
Obr. č. 2: Role inhibitorů CDKs v G1-S přechodu

A



Stimulace buněk (např. růstovými faktory) vede k zahájení BC. Dochází k aktivaci komplexu cycD-CDK4 (D-CDK4), k čemuž napomáhá také asociace tohoto komplexu s proteiny Cip/Kip rodiny. Tyto proteiny jsou tak zároveň sekvestrovány od svého vazebného partnera – CDK2 kinázy (CDK2). CycD-CDK4 inhibičně fosforyluje Rb proteiny. Tím je uvolněn transkripční faktor E2F, který indukuje expresi mimo jiné cyklinu E (E), tvořícího komplex s CDK2. CycE-CDK2 (E-CDK2) dále fosforyluje Rb proteiny a také indukuje degradaci Cip/Kip proteinů. Toto, společně s pozitivní zpětnou vazbou fosforylace Rb proteinů, upevňuje vstup do S fáze. Převzato a upraveno z (Sherr and Roberts 1999)

B



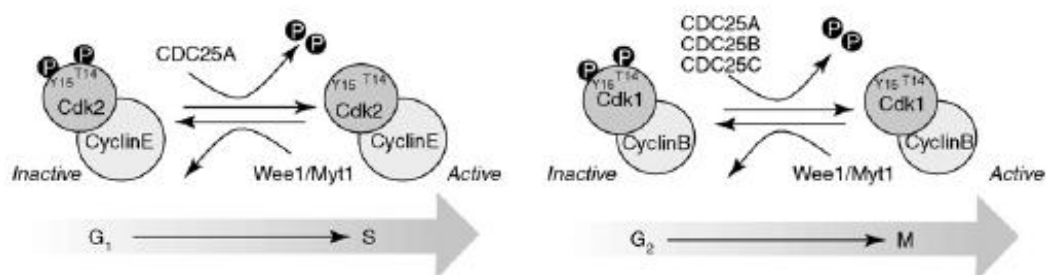
Aktivita CDK4 je blokována vazbou s INK4 proteiny přítomnými v nedostatku podnětů pro vstup do buněčného cyklu. To vede zároveň k vytěsnění Cip/Kip proteinů, které tak působí inhibičně na cycE-CDK2 komplex (E-CDK2), čímž je zajištěno zastavení BC v G1 kontrolním bodě. Převzato a upraveno z (Sherr and Roberts 1999)

2.1.1.2 Fosforylace CDKs

Kromě tvorby komplexu s cyklinem je pro aktivitu cyklin-dependentních kináz nutná fosforylace threoninu (Thr) nacházejícího se v aktivační smyčce (lokalizace Thr se liší u jednotlivých kináz (např. Thr161 u CDK1)) pomocí Cdk aktivační kinázy (CAK) (Solomon and Kaldis 1998). CAKs aktivita, a tedy i jimi zprostředkovaná fosforylace CDKs, je během BC konstitutivní (Obaya and Sedivy 2002) a kromě umožnění vazby ATP do katalytického místa, zvyšuje stabilitu komplexu cyklin-CDK (Desai, Wessling et al. 1995).

Druhým významným prvkem regulace aktivity CDK kináz jsou CDC25 fosfatázy (cell division cycle 25). V komplexu s cyklinem je totiž cyklin-dependentní kináza negativně fosforylována na dvou místech ATP vazebné domény (Thr14 a Tyr15) činností Wee1/MYT1 kináz (Pines 1999) a teprve defosforylace těchto míst vede k aktivaci CDKs. Protože změna fosforylace umožňuje rychlejší reakci buňky na podněty, při přechodu do další fáze BC je důležitá aktivace CDC25 fosfatáz, naopak při aktivaci některého z kontrolních bodů BC je cílem CDC25 inhibice, která vede k poklesu CDKs aktivity. Důležité je poznamenat, že regulace aktivity CDC25 fosfatáz se liší při nenarušeném průchodu BC a při znovuzahájení BC po jeho pozastavení aktivací kontrolního bodu – vztahy popsané dále platí pro „normální“ BC. V savčích buňkách existují tři CDC25 izoformy – CDC25 A, B a C, částečně se lišící svou specifikou. Zatímco CDC25A defosforyluje *cycE/cycA-CDK2* i *cycB-CDK1* komplexy, v případě CDC25B a C je podstatná aktivace *cycB-CDK1* komplexu (Obr. č. 3) – B a C izoformy se tedy účastní „pouze“ regulace mitotických dějů na rozdíl od CDC25A důležité i v S fázi (Donzelli and Draetta 2003).

Obr. č. 3: Regulace aktivity CDK kináz v G1-S a G2-M přechodu



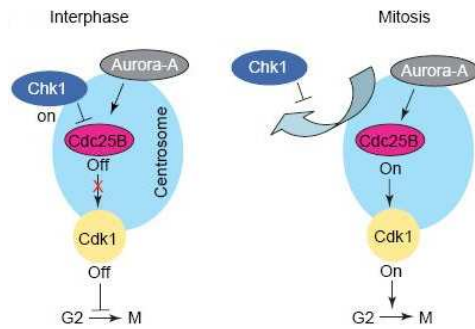
Komplex cyklinu s CDK je inhibičně fosforylován na Thr14 (T14) a Tyr15 (Y15) kinázami Wee1/Myt1. Aktivitu *cycE-CDK2* komplexu na konci G1 fáze umožní defosforylace CDC25A fosfatázou, na aktivaci *cycB-CDK1* před vstupem do mitózy se podílejí kromě CDC25A také B a C izoformy. Převzato a upraveno z (Trinkle-Mulcahy and Lamond 2006)

V závislosti na E2F a C-MYC je na konci G1 fáze syntetizována Cdc25a mRNA, CDC25A protein kontroluje průchod S fází (Galaktionov, Chen et al. 1996; Vigo, Muller et al. 1999).

V G2 fázi vrcholí akumulace CDC25B izoformy. Ta je lokalizována v cytozolu a pro vstup do mitózy může být významná frakce CDC25B vyskytující se na konci G2 fáze na centrozomu (Lindqvist, Kallstrom et al. 2005). Na tomto místě totiž pravděpodobně dochází k prvotní aktivaci cycB-CDK1 komplexu (Jackman, Lindon et al. 2003), u kterého před mitózou převládá export z jádra nad jaderným importem (Lindqvist, Kallstrom et al. 2005), a tak je kontakt obou molekul možný. O správném načasování aktivace CDK1 komplexu v tomto modelu rozhodují CHK1 a AURORA A kinázy, nacházející se také na centrozomu. AURORA A se autofosforyluje v pozdní G2 fázi, což je nejspíše usnadněno interakcí s vazebným proteinem AJUBA (Hirota, Kunitoku et al. 2003). Aktivní AURORA A následně pozitivně fosforyluje CDC25B na Ser353 (Dutertre, Cazales et al. 2004). Předčasné aktivaci CDC25B brání přítomnost CHK1 kinázy na centrozomu během interfáze (Kramer, Mailand et al. 2004). Inhibicí CDC25B se CHK1 podílí na synchronizaci centrozomálních dějů (tvorba dělicího vřeténka, regulováno CDC25B) a jaderných dějů (kondenzace chromozómů, vliv CDC25A) (Lindqvist, Kallstrom et al. 2005). Při vstupu do mitózy CHK1 z centrozomu disociuje, tím je uvolněna aktivace CDC25B a následně cycB-CDK1 komplexu. (Obr. č. 4A) Tato aktivní forma komplexu se translokuje do jádra (spolu s neaktivní variantou), kde fosforyluje CDC25C (a zvýší tak její aktivitu) a CDC25A fosfatázu (kterou tím stabilizuje). Při vstupu do mitózy translokuje do jádra také CDC25B. Koncentrace CDC25B v jádře je maximální od metafáze po anafázi, kdy dochází k její rychlé degradaci (Kieffer, Lorenzo et al. 2007). CDC25 fosfatázy pak defosforylují převažující neaktivní cycB-CDK1 komplexy v jádře (Mailand, Podtelejnikov et al. 2002). Dochází tak ke vzniku pozitivní zpětné vazby a rychlému nárůstu cycB-CDK1 aktivity. V průběhu mitózy i meiózy jsou důležité změny aktivity CDK1 kinázy, regulované anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) komplexem. Vzhledem k podobnosti základních principů mezi oběma typy dělení, budou tyto změny více rozebrány v souvislosti s meiózou.

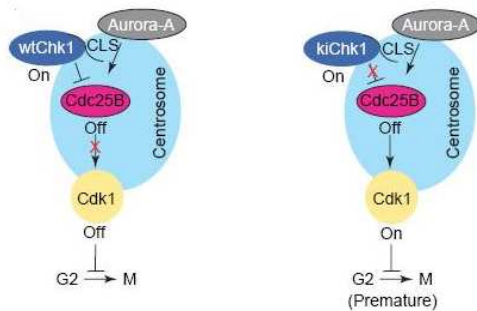
Obr. č. 4: Model prvotní aktivace cycB-CDK1 komplexu na centrozomu

A



Na konci G2 fáze je na centrozomu umožněn kontakt CDC25B a cycB-CDK1 komplexu. Aktivitu CDC25B regulují CHK1 a AURORA A. AURORA A pozitivně fosforyluje CDC25B, ovšem CDC25B je současně inhibičně fosforylována CHK1 kinázou. Teprve disociace CHK1 z centrozomu před vstupem do mitózy umožní činnost CDC25B a tedy i aktivaci CDK1 kinázy. Převzato a upraveno z (Doxsey, Zimmerman et al. 2005)

B



O platnosti výše popsaného modelu svědčí grafické znázornění výsledků experimentů s CHK1 obsahující centrozom-lokalizační sekvenci (CLS). Funkční CHK1 inhibovala CDC25B zprostředkovanou CDK1 aktivitu, oproti tomu při použití CHK1 bez kinázové aktivity k inhibici CDC25B nedošlo a buňky vstupovaly do mitózy předčasně. Převzato a upraveno z (Doxsey, Zimmerman et al. 2005)

2.1.1.3 APC/C

Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) je multiproteinový komplex s aktivitou E3 ubiquitin ligázy, zajišťuje tedy ubiquitinaci a následnou degradaci proteinů (King, Peters et al. 1995) a tím se významně podílí na správném průběhu mitózy i meiózy. Substrátovou specifitu APC/C určují koaktivátory CDC20 a CDH1 (Fang, Yu et al. 1998), jejichž asociace je pro funkci APC/C potřebná, stejně jako přechodná interakce APC/C s E2 ubiquitin-konjugčním enzymem (Peters 2002). Oba koaktivátory váží APC/C s větší afinitou, je-li fosforylován (Fang, Yu et al. 1998) (pozitivně APC/C^{CDC20} ovlivňuje fosforylace cycB-CDK1 komplexem, případně Polo podobnou kinázou 1 (PLK1) ve spolupráci s CDK1, naopak PKA zprostředkovaná APC/C fosforylace jeho aktivitu inhibuje) (Kotani, Tugendreich et al. 1998). PLK1 se podílí na stimulaci APC/C^{CDC20} také regulací vazby s CDC20. Nově syntetizovaný CDC20 protein interaguje s EMI1 (Early Mitotic Inhibitor) a to brání asociaci s APC/C (Reimann, Gardner et al. 2001). PLK1 v profázi EMI1 fosforyluje a cílí ho k degradaci. Tak vzniká komplex APC/C^{CDC20} (Hansen, Loktev et al. 2004), který ubiquitínuje cyklin B a dochází ke snížení aktivity CDK1, potřebnému pro vstup do anafáze. Protože v případě APC/C^{CDH1} působí fosforylace CDK1 komplexem negativně (Zachariae, Schwab et al. 1998), je tento komplex aktivován teprve po štěpení cyklinu B. APC^{CDH1} komplex značí k degradaci především sekurin (Jeganathan, Malureanu et al. 2005), čímž umožní aktivaci separázy a následný rozchod homologních chromozomů/sesterských chromatid v anafázi (Peters 2006). Tyto poznatky získané in vivo knock-out studii vedly k úpravě původního názoru, že CDH1 koaktivátor je důležitý především v konečných fázích dělení, kdy činnost APC^{CDH1} vede ke štěpení substrátů (např. kináz AURORA A a PLK1), umožňujícímu vstup do G1 fáze dalšího BC (Baker, Dawlaty et al. 2007). Předěšlé informace o funkci APC/C byly získány experimenty na somatických buňkách, platí tedy hlavně pro mitotické dělení, které je ale v mnoha bodech analogické s meiózou. Regulace APC/C v myších oocytech je popsána dále v části týkající se průběhu meiotického dělení.

2.2 *Biologie oocyty*

2.2.1 oogeneze

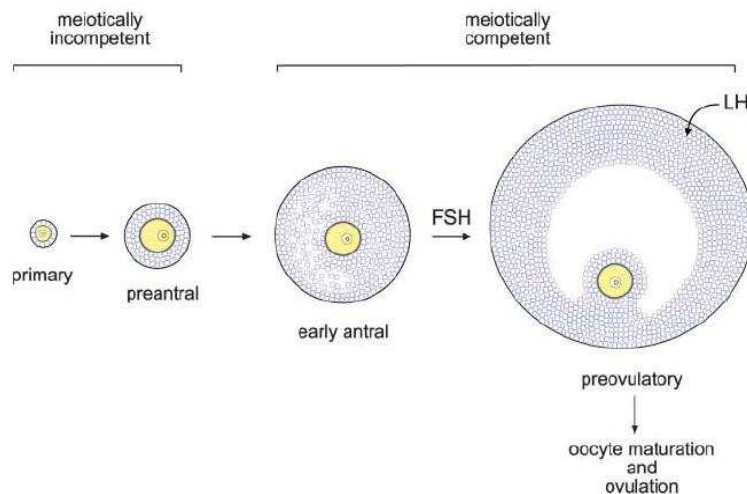
Oocyty pochází z primordiálních zárodečných buněk (PGCs), které v časném zárodečném vývoji migrují do oblasti budoucích gonád. Zde se oogonie (jak jsou tyto PGCs označovány) mitoticky dělí, čímž dají základ výslednému počtu oocytů. Ještě během embryonálního vývoje začíná klíčový proces v oogenezi – meióza. Tento typ dělení se skládá ze dvou buněčných dělení následujících bezprostředně po sobě, což umožňuje vznik haploidních gamet, genetická variabilita potomstva je zvyšována tzv. crossing overem probíhajícím na počátku prvního meiotického dělení. Savčí oocyty dosahují profáze prvního meiotického dělení (profáze I) a v tomto stádiu je jejich vývoj dočasně zastaven (tento stav je označován jako tzv. meiotický arrest). Následuje vznik ranných primordiálních folikulů tím, že oocyt obklopí somatické granulózní buňky (GCs). Oogeneze pokračuje až v době pohlavní dospělosti kontinuálním růstem vždy určité populace folikulů a později také oocytů uvnitř folikulů. Buňky okolo oocyty se dělí a mění svůj zploštělý tvar na kuboidní - folikul, ve kterém je okolo oocyty jedna vrstva kuboidních GCs, se nazývá primární. Dalším stádiem je sekundární folikul (Trousou and Gosden 2003). Granulózní buňky již tvoří více vrstev, dále diferencují a ve folikulu se utváří dutina (antrum) – buňky, které zůstaly v kontaktu s oocytem jsou označovány jako kumulární, vnější vrstvu tvoří murální granulózní buňky (Mehlmann, 2005). (Obr. č. 5) Tyto zralé antrální folikuly jsou označovány jako Graafovy. Teprve oocyty, nacházející se v antrálních folikulech, jsou připraveny na dokončení meiotického dělení, jsou tzv. meioticky kompetentní (Trousou and Gosden 2003).

Jak dochází k aktivaci růstu primordiálních folikulů nebylo úplně jasné – a to především role folikuly stimulujícího hormonu (FSH). FSH je pro vývoj folikulů důležitý, ale není nezbytný v počátku folikulogeneze (do stádia preantrálního folikulu) (Dierich, Sairam et al. 1998). V této fázi je podstatné lokální působení molekul, především *kit* ligandu (KL, také SCF-Stem Cell Factor) a leukemického inhibičního faktoru (LIF), obou produkovaných granulózními buňkami a dále různých růstových faktorů, sekretovaných okolními buňkami – základního růstového faktoru fibroblastů (bFGF), Bmp4 anebo destičkového růstového faktoru (PDGF) (Rodrigues, Limback et al. 2008). Roli signalizace KL-Kit v gametogenezi potvrzují fenotypy transgenních myší, exprimujících Kit receptor nesoucí mutaci (Kissel, Timokhina et al. 2000). Kit aktivuje PI3K-PKB signální dráhu a působí tak na oocyt antiapoptoticky (Jin, Han et al. 2005; Reddy, Shen et al. 2005) – více popsáno dále. Přítomnost FSH může mít ovšem na iniciaci růstu synergistický účinek, neboť zvyšuje výskyt těchto faktorů. Další vývoj folikulů už je na FSH závislý. (Obr. č. 5) Tato závislost zajišťuje, že ke tvorbě zralých folikulů dochází pouze v období pohlavní dospělosti, do té doby folikuly v časně fázi vývoje zanikají. FSH indukuje expresi receptoru pro luteinizační hormon (LH) na murálních granulózních buňkách.

LH stimuluje znovuzahájení meiózy, tím umožní průchod meiózou do metafáze II (MII) a následnou ovulaci (uvolnění oocytu z folikulu) (Zeleznik 2004).

Znovuzahájení meiózy je provázeno kondenzací chromatinu a rozpadem jaderné membrány (NEBD-Nuclear Envelope BreakDown nebo také GVBD – Germinal Vesicle BreakDown) (Richard 2007). K dokončení meiotického dělení dochází až po oplodnění oocytu.

Obr. č. 5: Vývoj folikulů



Oocyt obklopený jednou vrstvou kuboidních granulózních buněk tvoří primární (primary) folikul. Granulózní buňky se dělí, vytváří více vrstev a tzv. preantrální (preantral) folikul. Postupně mezi granulózními buňkami vzniká dutina - antrum. Zralý (preovulatory) folikul se vyvíjí z časného antrálního (early antral) folikulu po stimulaci FSH. LH signalizace vede ke znovuzahájení meiózy meioticky kompetentním oocytem a jeho následnému uvolnění (ovulaci). Převzato z (Mehlmann 2005)

2.2.2 meiotické zrání

Meiotické dělení oocytů je typické dvěma bloky - v profázi I a v metafázi II. V meioticky kompetentním oocytu ve zralém folikulu jsou již nasyntetizované potřebné proteiny, jsou ale udržovány neaktivní (de Vant'ery, Gavin et al. 1996). Jedná se o složky cycB-CDK1 komplexu nazývaného také maturation/M-phase promoting factor (MPF), a další molekuly potřebné pro jeho aktivaci (Kanatsu-Shinohara, Schultz et al. 2000).

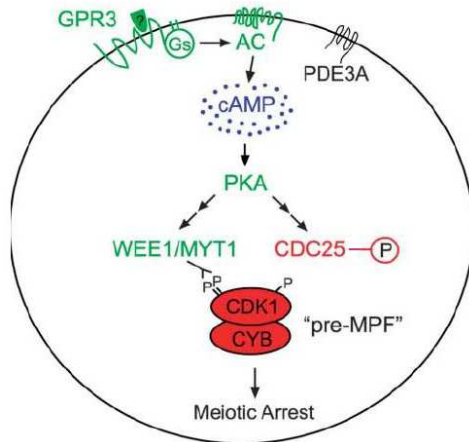
2.2.2.1 Znovuzahájení meiózy a role cAMP

Předčasné znovuzahájení meiózy inhibuje vysoká koncentrace cAMP. cAMP je produkováno samotným oocytem činností adenylyl cyklázy (Horner, Livera et al. 2003), aktivované stimulační Gs podjednotkou trimerního G proteinu (Mehlmann, Jones et al. 2002). Zvažovaná role transportu cAMP z okolních buněk prostřednictvím gap junctions (Webb, Marshall et al. 2002), jimiž jsou kumulární buňky s oocytem spojeny, není pro udržení meiotického bloku podstatná. Oocyty, u nichž byla redukována mRNA pro GPCR nebo GPCR3 receptor blokováni, totiž znovuzahájí meiózu uvnitř folikulu (Mehlmann 2005). Vysoká koncentrace cAMP je klíčová – aktivuje protein kinázu A (PKA) (Downs, Daniel et al. 1989). Její podíl na inaktivaci CDK1 je několikačetný. Fosforyluje, a tak aktivuje Wee1B kinázu, která pak inhibičně fosforyluje CDK1 kinázu (Han and Conti 2006). Zároveň PKA fosforyluje i CDC25B fosfatázu – ovšem tato fosforylace působí negativně. (Obr. č. 6) PKA zprostředkovaná fosforylace CDC25B na Ser321 brání předčasnému znovuzahájení meiózy – mikroinjekce Cdc25bSer321Ala mRNA do Cdc25b deficientních oocytů vede k jejich zrání i v přítomnosti vysoké koncentrace cAMP (Cdc25b deficientní oocyty mikroinjikované nemutovanou Cdc25b za těchto podmínek nezrají) (Pirino, Wescott et al. 2009). Pravděpodobným mechanismem je interakce CDC25B fosforylované na Ser321 se 14-3-3 proteiny, bránící translokaci CDC25B do jádra (Pirino, Wescott et al. 2009; Schultz 2009). CDC25B je pro vstup myších oocytů do meiózy nezbytná, neboť samice CDC25B deficientních myší jsou sterilní (Lincoln, Wickramasinghe et al. 2002), na rozdíl od samic CDC25C $-/-$ myší – CDC25C je tedy postradatelná (Chen, Hurov et al. 2001). Vzhledem k rané embryonální letalitě CDC25A knock-outu byl pomocí RNA interference (RNAi) prokázán význam CDC25A fosfatázy, která je důležitá i v dalších fázích meiotického dělení (Solc, Saskova et al. 2008).

Teprve náhlé zvýšení hladiny luteinizačního hormonu umožňuje pokles cAMP a meiotické zrání do metafáze II (Schultz, Montgomery et al. 1983). Protože LH receptory se nacházejí pouze na granulárních buňkách, působí LH na oocyty nepřímě. Indukuje expresi růstových faktorů podobných EGF (epidermální růstový faktor) (Ashkenazi, Cao et al. 2005), které dále působí na kumulární buňky (De La Fuente, O'Brien et al. 1999). V oocytu je následně cAMP štěpeno fosfodiesterázou PDE3A, jak bylo prokázáno jednak použitím inhibitorů PDE3A in vitro (Tsafiriri, Chun et al. 1996) i in vivo (Wiersma, Hirsch et al. 1998), ale především na modelu PDE3A deficientních myší (Masciarelli, Horner et al. 2004). PDE3A je aktivní před GVBD (Richard, Tsafiriri et al. 2001), což potvrzuje úlohu cAMP v inhibici CDK1 a to, že regulace fosfodiesterázy je při znovuzahájení meiózy klíčová. K aktivaci PDE3A u myších oocytů vede fosforylace protein kinázou B (Han, Vaccari et al. 2006), stejně jako u jiného experimentálního modelu, Xenopa (Andersen, Roth et al. 1998). Objasnění signálních drah

stojících za aktivaci fosfodiesterázy může napomoci k identifikaci dosud neznámého podnětu od kumulárních buněk, který v oocytu indukuje tyto děje.

Obr. č. 6: Signalizace udržující meiotický arrest myších oocytů



Adenylát cykláza (AC), aktivovaná prostřednictvím stimulační podjednotky (Gs) receptoru spojeného s G proteinem (GPR3), udržuje v oocytu vysokou koncentraci cAMP během vývoje pozastaveného v profázi I. To umožňuje aktivaci PKA, která pozitivně fosforyluje Wee/Myt1 kinázy a zároveň fosforylací inhibuje CDC25 fosfatázu. Dochází tedy k negativní fosforylaci cyklin B-CDK1 (cyB-CDK1, pre-MPF) komplexu. Tím je bráněno znovuzahájení meiózy. CDK1 aktivita je umožněna aktivací fosfodiesterázy 3A (PDE3A), která cAMP štěpí a PKA tak nepůsobí inhibicí CDK1. Převzato a upraveno z (Mehlmann 2005)

2.2.2.2 Meiotická maturace po znovuzahájení meiózy

Iniciální relativně nízká aktivita cyklin B-CDK1 komplexu je dostatečná pro znovuzahájení meiózy. V průběhu meiózy I aktivita CDK1 roste a ovlivňuje tvorbu bipolárního vřeténka (Brunet and Maro 2005). Ovšem při průchodu meiózou dochází k výrazným změnám CDK1 aktivity, především skrze syntézu a degradaci cyklinu B. (Obr. č. 7) Přechod z meta- do anafáze je zajištěn degradací cyklinu B (Ledan, Polanski et al. 2001). V tomto procesu je podstatná regulace APC/C, která je u myších oocytů důležitá již od samého začátku meiózy.

APC s CDH1 koaktivátorem se účastní udržení bloku v profázi I (Reis, Chang et al. 2006). CDH1 je pozitivně ovlivňován (pravděpodobně přímo) jednou ze dvou izoform CDK14 fosfatázy exprimovaných v savčích buňkách – CDC14B variantou, jejíž deplece pomocí RNAi vyvolává u oocytů předčasné GVBD (Schindler and Schultz 2009). Roli v regulaci znovuzahájení meiózy má zřejmě (na základě nepřímých důkazů) protein EMI1. Krátce po GVBD hladina EMI1 klesá a uvolňuje aktivitu APC^{CDH1} v prometáfázi (Marangos, Verschuren et al. 2007), která brání příliš rychlému průchodu metafází, pravděpodobně degradací CDC20 koaktivátoru APC a tedy kontrolou časování ubiquitinace cyklinu B a sekurinu (Reis, Madgwick et al. 2007). Podle tohoto modelu při postupu oocytu do metafáze I klesá činnost

APC^{CDH1} společně s růstem aktivace CDK1, která inhibičně fosforyluje APC^{CDH1} (Zachariae, Schwab et al. 1998) a začíná se uplatňovat APC^{CDC20}, jehož aktivita v metafázi vzroste - rozhodují tedy velmi jemné změny APC aktivity. Signál vedoucí k expresi EMI1 v profázi stejně jako mechanismy regulující odlišnou substrátovou specifitu APC^{CDH1} v jednotlivých fázích meiózy nejsou dosud známy, možná je regulace vazbou určitých proteinů v APC/C komplexu (Marangos, Verschuren et al. 2007).

Dokud nejsou správně napojeny chromozomy k mikrotubulům dělicího vřeténka, je APC/C inhibován tzv. spindle-assembly checkpointem (SAC). Pro inhibici APC/C^{CDH1} je důležitá vysoká míra cycB-CDK1 aktivity (Brunet and Maro 2005), která negativně ovlivňuje CDH1 – CDK1 fosforylovaný CDH1 protein neinteraguje s APC/C (Zachariae, Schwab et al. 1998). Teprve ve chvíli, kdy jsou chromozomy v pořádku napojeny, klesá CDK1 aktivita. V přechodu z metafáze do anafáze je důležitá CDC14A fosfatáza, která defosforyluje CDK1 substráty, tedy i APC/C^{CDH1}, které pak nepřímo zprostředkovává uvolnění aktivity separázy. Aktivita APC/C^{CDC20} je blokována díky komplexu proteinů asociujících na kinetochoru chromozomů nepřípojených k mikrotubulům dělicího vřeténka. K centromerním proteinům se váže BUB1 a dále MAD2, který sekvstruje CDC20 interakcí s ním (Peters 2002). MAD2 je pro správné načasování uvolnění aktivity APC/C nezbytný. Deplece MAD2 vyvolává předčasný rozchod chromozomů a následnou aneuploidii, vyvolané desktrukcí cyklinu B a nástupem anafáze dříve než v kontrolních, nedepletovaných oocytech (Homer, McDougall et al. 2005). Rozchod homologních chromozomů během anafáze I je umožněn ochranou kohezinů v oblasti centromery. Protein BUB1 vede k centromerní lokalizaci proteinů Shugoshin a PP2A fosfatázy, které brání štěpení kohezinů separázou (Vogt, Kirsch-Volders et al. 2008).

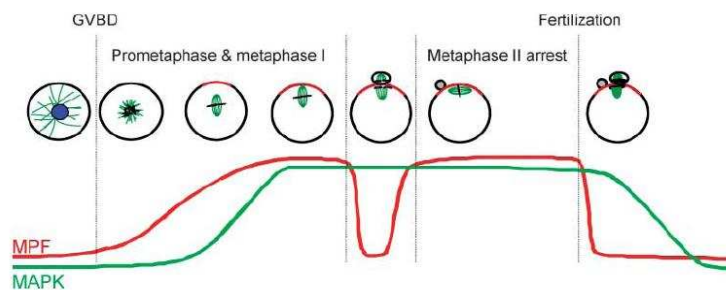
Aby pokračovala meióza druhým dělením, je třeba rychlá reaktivace cyklin B-CDK1 komplexu. Té je možné u Xenopa dosáhnout dvěma způsoby – syntézou cyklinu B (Hochegger, Klotzbucher et al. 2001) a inhibicí MYT1 kinázy C-MOS/MAPK/p90RSK signální dráhou (Kishimoto 2003). U myších c-mos deficientních oocytů nevstoupí do MII necelých 40 % oocytů (Araki, Naito et al. 1996), proto je pravděpodobný význam C-MOS a MAPK i u myši.

Oocyty obratlovců pozastavují zrání před oplazením v metafázi II, k čemuž je třeba udržet vysokou hladinu CDK1 aktivity, a tedy zabránit aktivaci APC/C. Pro tento blok je nezbytný tzv. CSF (cytostatický faktor). Původně byla za aktivitu podstatnou pro funkci CSF považována C-MOS/MAPK dráha, neboť oocyty postrádající MOS - ty, které dosáhly MII, dokončily meiózu i bez oplodnění (Hashimoto, Watanabe et al. 1994). Později bylo ale zjištěno, že C-MOS signalizace slouží pouze k ustanovení MII arestu (Tunquist and Maller 2003), a jeho udržení zaštiťuje EMI2 (Early Mitotic Inhibitor 2). EMI2 splňuje požadavky na Ca²⁺ senzitivní degradaci CSF - k uvolnění MII bloku totiž dochází po masivním zvýšení koncentrace vápníku v důsledku oplodnění (Shoji, Yoshida et al. 2006). EMI2 u Xenopa je totiž fosforylován nejprve CamKII (kalmodulin-dependentní kináza) a dále PLK1, což vede k jeho degradaci (Schmidt,

Rauh et al. 2006). Savčí EMI2 má fosforylační motivy pro CamKII a PLK1 (Vogt, Kirsch-Volders et al. 2008), proto je pravděpodobná účast EMI2 na udržení CSF aktivity i v myších oocytech. V anafázi II se rozchází již sesterské chromatidy, a na konci meiózy tak vzniká haploidní oocyt.

MAPK se účastní ustanovení stability dělicího vřeténka, kromě toho je pravděpodobně důležitá pro vstup do druhého meiotického dělení a ustanovení druhého meiotického bloku v metafázi II (viz výše). Aktivita MAPK není v průběhu meiózy tak dynamická jako CDK1 aktivita – pozvolna narůstá v prometafázi a zůstává v maximu od metafáze I až do metafáze II. Po oplození dochází k opět pomalému poklesu (Brunet and Maro 2005). (Obr. č. 7)

Obr. č. 7: Aktivita cyklin B-CDK1 a MAPK během meiotického zrání



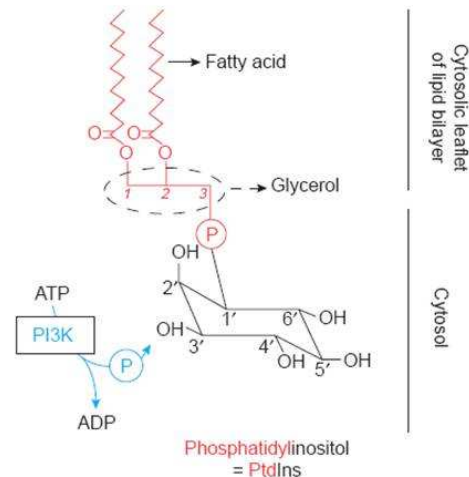
Průchod meiózou charakterizují důležité změny aktivity cycB-CDK1 komplexu (MPF). Aktivita CDK1 narůstá po GVBD s maximem v metafázi I. meiotického dělení. Pro vstup do anafáze je nutný výrazný pokles CDK1 působení, které opět roste v s postupem do metafáze II. meiotického dělení. Po oplození pokračuje meióza anafází II a tedy CDK1 aktivita opět klesá. Hladina aktivity MAP kinázy (MAPK) není tak dynamická – roste po znovuzahájení meiózy, maximální aktivita je konstantní od metafáze I po metafázi II a zvolna klesá po oplození. Převzato z (Brunet and Maro 2005)

2.3 PI3K-PKB signální dráha

2.3.1 Fosfoinositidové kinázy

Jednou z hlavních složek uplatňujících se při signalizaci z plazmatické membrány jsou fosfatidylinositoly (PtdIns) a jejich fosforylované deriváty - fosfoinositidy (PI). (Vanhaesebroeck and Alessi 2000; Martelli, Faenza et al. 2006) (Obr. č. 8)

Obr. č. 8: Struktura fosfatidylinositolu a jeho fosforylace



Kostru fosfatidylinositolu (PtdIns) tvoří glycerol s navázaným zbytkem vyšší karboxylové kyseliny na prvních dvou hydroxylových (-OH) skupinách. K -OH skupině v pozici 3 je přes fosfát navázán cyklický inositol. Karboxylové kyseliny kotví PtdIns do membrány, takže inositolová část je v cytozolu přístupná pro modifikující enzymy. Fosfoinositid-3-kinázy (PI3K) fosforylují třetí -OH skupinu inositolu za spotřeby energie jedné makroergní vazby v ATP. Převzato z (Vanhaesebroeck and Alessi 2000)

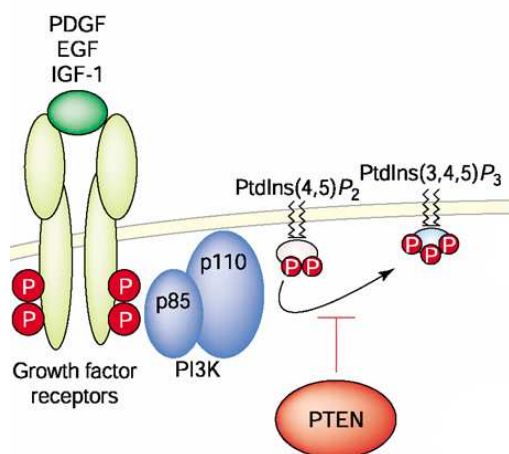
Do skupiny fosfoinositidových kináz (tzv. PI3K-superfamily) patří fosfoinositid-3-kinázy (PI3K), fosfoinositid-4-kinázy (PI4K) a PI3K příbuzné kinázy, na základě shodné katalytické domény (PI3Kc). PI3K se podle strukturálních vlastností dělí na tři třídy, přičemž v přenosu signálu z membránových receptorů mají význam kinázy třídy I (Marone, Cmiljanovic et al. 2008).

Fosfoinositid-3-kinázy fosforylují 3' hydroxy skupinu cyklického inositolu fosfoinositidů, a protože preferovaným substrátem in vivo pro PI3K třídy I jsou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfáty (PtdIns(4,5)P₂) (Stokoe, Stephens et al. 1997), produktem jejich činnosti jsou hlavně PtdIns(3,4,5)P₃ (Obr. č. 9), rozpoznávané plekstrin homologní (PH) doménou obsaženou v některých ostatních proteinech (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). PI3K (respektive PI3K-PKB) signální dráha se tak uplatňuje v mnoha pro buňku důležitých dějích, jako je proliferace, translace, inzulinový metabolismus, ale také regulace cytoskeletu a buněčná migrace (Brazil, Yang et al. 2004; Marone, Cmiljanovic et al. 2008).

Podle způsobu své aktivace se PI3K dále rozlišují. PI3K IA jsou aktivované receptor-tyrosinovými kinázami (RTKs), k aktivaci PI3K IB kináz dochází signalizací prostřednictvím receptorů spojených s G proteiny. PI3K I kinázy jsou tvořeny katalytickou (p110) a regulační podjednotkou. U PI3K IA asociuje p110 $\alpha/\beta/\delta$ izoforma PI3Kc s p85/p55/p50 podjednotkou, PI3K IB rodina je zastoupena jednou p110 γ katalytickou podjednotkou, vážící p101 regulační protein (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Regulační podjednotka slouží v případě PI3K IA kináz jako adaptor, neboť obsahuje SH2 (Src-homology 2) domény, rozpoznávající fosforylované tyrosiny v intracelulární části receptorů. Tím umožňuje lokalizaci PI3K v blízkosti buněčné membrány a tedy aktivitu p110 podjednotky a tvorbu PI (Martelli, Faenza et al. 2006). (Obr. č. 9)

Pro udržení rovnováhy jsou důležité fosfatázy, a to SHIP (inositol fosfatáza obsahující SH2 doménu) s 5' fosfatázovou aktivitou a především PTEN s 3' fosfatázovou aktivitou (Vazquez and Sellers 2000).

Obr. č. 9: Aktivace a činnost fosfoinositid-3-kináz



Vazba ligandu k receptoru růstových faktorů má za následek fosforylaci tyrosinů v intracelulární části receptoru. K těmto tyrosinům se prostřednictvím SH-2 domény váže regulační podjednotka (p85) fosfoinositid-3-kinázy (PI3K). Takto je katalytická doména (p110) PI3K lokalizována k membráně. Zde se nacházejí i její substráty – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfáty (PtdIns(4,5)P₂), jejichž fosforylací vznikají PtdIns(3,4,5)P₃. Ty jsou pro změnu substrátem fosfatázy PTEN, důležité pro kontrolu aktivace PI3K signální dráhy. Převzato a upraveno z (Brazil, Yang et al. 2004)

2.3.2 Protein kináza B

PI3K kináza působí skrze aktivaci efektorových proteinů obsahujících PH doménu, velmi významným cílem je protein kináza B (PKB nebo také AKT).

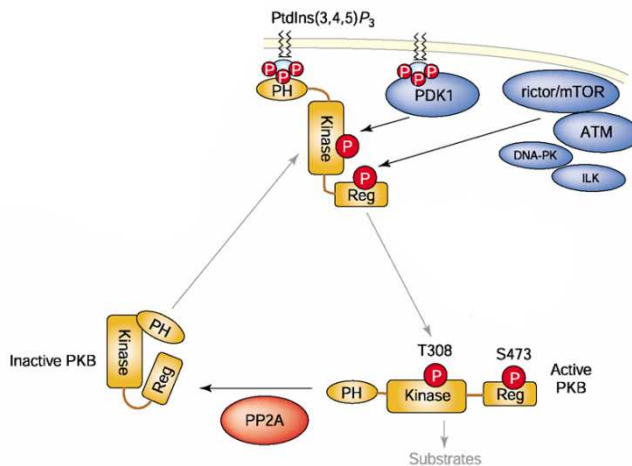
2.3.2.1 struktura a aktivace

PKB patří mezi tzv. AGC kinázy, spolu s protein kinázou C (PKC) a protein kinázou A. Exprimované jsou tři PKB izoformy (PKB α , PKB β a PKB γ , označované také jako AKT1, AKT2 a AKT3), které jsou mezi sebou homologní z 80% (Lawlor and Alessi 2001). Pro aktivitu PKB je důležitá fosforylace dvou míst - Thr308 a Ser473 u PKB α a analogických zbytků u dalších izoform. Threonin 308 se nachází v kinázové doméně, Ser473 je součástí C-terminální domény (oblasti nazývané hydrofobický motiv - HM). Jejich fosforylace závisí na PI3K aktivitě (Alessi and Cohen 1998) a vazbě PtdIns(3,4,5)P₃ a PtdIns(3,4)P₂ (Stokoe, Stephens et al. 1997). V nestimulovaných buňkách je koncentrace těchto fosfoinositidů minimální, PKB je tedy lokalizovaná v cytozolu ve stavu, kdy jsou fosforylační místa kryta N-terminální PH doménou. Po stimulaci například inzulinem nebo EGF vyvolá vazba PtdIns(3,4,5)P₃/PtdIns(3,4)P₂ k PH doméně změnu konformace PKB spojenou s odkrytím Thr308 a Ser473, a zároveň tak PKB translokuje k membráně (Alessi and Cohen 1998). (Obr. č. 10)

PI jsou důležité také pro membránovou lokalizaci fosfoinositid-dependentní kinázy 1 (PDK1), která fosforyluje PKB na Thr308. PH doména PDK1 má afinitu také k PtdIns(4,5)P₂, vyskytující se v nestimulovaných buňkách a PtdIns(3,4,5)P₃ váže s výrazně vyšší afinitou než PH doména PKB. Proto je i v buňkách, ve kterých není PI3K dráha aktivovaná, určitá subpopulace PDK1 vázaná k membráně (Currie, Walker et al. 1999). Stimulace růstovými faktory tedy umožní kolokalizaci PDK1 s PKB na membráně (Stokoe, Stephens et al. 1997; Vanhaesebroeck and Alessi 2000).

Identita kinázy fosforylující PKB na Ser473 není doposud plně objasněna. Vzhledem k redukci fosforylace na obou místech při inhibici fosfoinositidových kináz (tedy celé superrodiny včetně PI3K-příbuzných kináz) byla Ser473-kináza (Ser473K) nazvána jako fosfoinositid-dependentní kináza 2 (PDK2) a současně tento fakt zužuje spektrum možných Ser473-kináz na enzymy pocházející z PI3K-superfamily (Obr. č. 10) (Dong and Liu 2005). Fosforylace PKB na Ser473 v souvislosti s potenciálními PDK2 je zevrubně popsána dále.

Obr. č. 10: Regulace aktivace protein kinázy B



Neaktivní protein kináza B (PKB) se nachází v cytozolu v konformaci, kdy jsou obě důležitá fosforylační místa - Thr308 (T308) a Ser473 (S473), skryta. Vazba fosfatidylinositol-3,4,5- trifosfátu (PtdIns(3,4,5)P₃) k PH doměně změní konformaci, takže jsou oba zbytky přístupné fosforylaci. T308 v kinázové doměně je fosforylován fosfoinositid-dependentní kinázou 1 (PDK1), fosforylace S473 v C terminální regulační doměně není stále vyřešena - pravděpodobně Ser473 kinázy jsou ILK, ATM, DNA-PK a rictor/mTOR komplex. Aktivovaná PKB translokuje z membrány dále do buňky. Zde je možná defosforylace protein fosfatázou PP2A. Převzato a upraveno z (Brazil, Yang et al. 2004)

PKB patří mezi kinázy ovlivňující pozitivně proliferaci buněk. S tím je spojena pozitivní regulace BC (blíže popsána dále), ale také inhibice apoptózy. Aby mohla tyto funkce PKB vykonávat, je nutná její lokalizace do jádra. Dosavadní model předpokládá aktivaci PKB na plazmatické membráně a následnou translokaci do jádra. Zde je ale pravděpodobný vlastní cyklus PtdIns - byla prokázána jaderná lokalizace molekul účastnících se jeho regulace (PI3K, PTEN). Zda je možná aktivace PKB přímo v jádře ovšem není jasné. Pro vstup PKB do jádra není její fosforylace potřebná, otázkou zůstává přítomnost aktivačních kináz. Po stimulaci inzulinem je PDK1 nejspíše na membráně fosforylován v sekvenci pro jaderný export (NES), a tak se částečně zvýší její jaderná subpopulace. Názory na význam lokalizace PDK1 v jádře se liší - uvažováno je, že se jedná o způsob sekvence PDK1 od cytozolických substrátů (Lim, Kikani et al. 2003), ale také o možnost zesílení činnosti jaderných kináz aktivovaných PDK1 (například PKB) (Scheid, Parsons et al. 2005). Dvě z potenciálních PDK2 kináz jsou také jaderné (ATM, DNA-PK), což aktivaci PKB v jádře nevyklučuje (Martelli, Faenza et al. 2006).

Fosforylaci a následnou aktivitu PKB může ovlivnit interakce s různými proteiny. TCL1 například působí jako PKB koaktivátor a je o něm uvažováno také jako o proteinu umožňujícím jadernou lokalizaci PKB (Martelli, Faenza et al. 2006). Protein CTMP fosforylaci PKB naopak blokuje. Regulace PKB prostřednictvím asociace s proteiny je detailněji rozebrána v (Brazil, Yang et al. 2004) a (Fiorenza, Torcia et al. 2008). Aktivita PKB je dále inhibována činností protein fosfatázy 2A (PP2A) (Mumby 2007).

2.3.2.2 Identita Ser373K

Jednou z prvních kináz studovaných v souvislosti s fosforylací PKB v HM doméně byla kináza spojená s integriny (ILK). Fosforylace PKB prostřednictvím ILK byla prokázána *in vitro* (Persad, Attwell et al. 2001). Význam ILK *in vivo* byl sledován na modelu makrofágů, u kterých byl proveden podmíněný knock-out ILK pomocí Cre-rekombinázy. Tento zásah vedl ke snížení fosforylace Ser473, která byla obnovena při transfekci pouze nemutovanou ILK. ILK varianta bez kinázové aktivity (vlivem záměny Ser343 za Ala) fosforylaci PKB neobnovila (Troussard, Mawji et al. 2003). Tyto výsledky ukazují na roli ILK přímo jako PKB S473 kinázy. Ovšem při použití jiného ILK konstruktů působícího jako dominantně negativní (dn) byla vyvozena funkce ILK spíše jako adaptoru (dn-ILK sice specificky redukovala fosforylaci Ser473 v COS1 buňkách, ta ale byla částečně indukována transfekcí dn-ILK se současnou záměnou mimikující fosforylaci Ser v FSF motivu v aktivační doméně ILK - tzv. dn-ILK-FDF/FEF varianta) (Lynch, Ellis et al. 1999). K podobným závěrům vedly i výsledky experimentů na ILK-deficientních fibroblastech (stimulace inzulinem/PDGF vyvolala fosforylaci Ser473 bez ohledu na delecii ILK) (Sakai, Li et al. 2003).

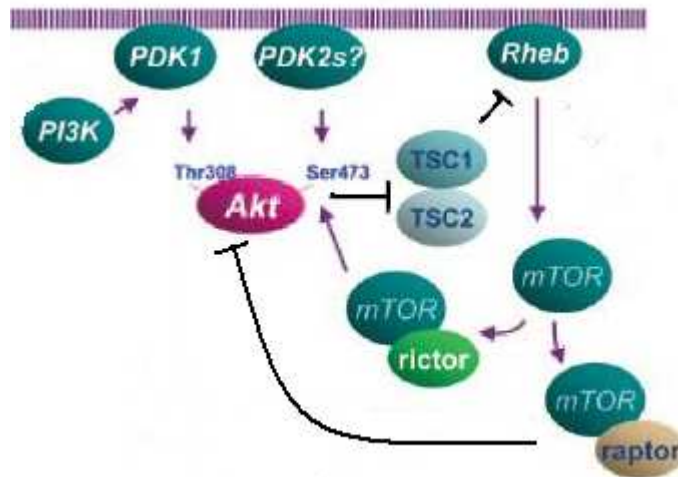
Nově byla popsána možnost kooperace ILK s molekulou RICTOR (rapamycin insensitive companion of mTOR). Hmotnostní spektrometrií (MS) ILK imunoprecipitátu byla zjištěna asociace ILK a RICTORu, a současně PKB fosforylované na Ser473. RICTOR je adaptorový protein jednoho ze dvou komplexů vytvářených mTOR kinázou¹ (mammalian target of rapamycin), která ale v ILK precipitátu prokázána nebyla. Snížení exprese ILK nebo rictoru vedlo k inhibici fosforylace Ser473 na PKB spojené se zvýšením apoptózy. To, že pro aktivaci PKB je podstatná interakce obou molekul, ukazuje výsledek overexprese N-koncového fragmentu RICTORu – opět redukce fosforylace PKB v HM (McDonald, Oloumi et al. 2008).

Na různých buněčných liniích byla publikována role vlastního mTOR-RICTOR komplexu (mTORC2). Výsledky, na kterých je založena, opět pochází především z redukce fosforylace Ser473 po inhibici exprese RICTOR nebo mTOR molekuly pomocí RNAi. Aktivita mTORC2 byla ovlivněna přítomností séra, což ukazuje na možnost aktivace PKB prostřednictvím mTORC2 po stimulaci buněk růstovými faktory (Sarbasov, Guertin et al. 2005). V této práci ovšem vedlo k poklesu Ser473 fosforylace také snížení exprese mTORu, narozdíl od výsledků získaných při studii ILK a RICTOR interakce, kdy se použití mTOR krátké interferující RNA (siRNA) projevilo vyšší fosforylací serinu (McDonald, Oloumi et al.

¹ Molekula mTOR (mammalian target of rapamycin) v buňkách tvoří dva komplexy lišící se citlivostí na rapamycin. Jako první byl popsán komplex mTOR-RAPTOR (mTORC1), rapamycin-senzitivní, který je nepřímo aktivován PKB. Oproti tomu mTOR-RICTOR komplex (mTORC2) rapamycinem inhibován není. (Obr. č. 11)

2008) . To je pravděpodobně dáno metodikou – jak zmiňují sami autoři, při akutním snížení mTOR exprese také klesá RAPTOR protein (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Výsledkem je tedy částečné uvolnění negativní zpětné vazby a inhibice PKB mTOR-RAPTOR komplexem. (Obr. č. 11) K ovlivnění RAPTORu při stabilní redukci mTORu již nedochází, a proto je možný pokles fosforylace PKB.

Obr. č. 11: Vztah protein kinázy B a mTOR komplexů



Protein kináza B (AKT) je aktivovaná fosforylací na Thr308 fosfoinositid-dependentní kinázou 1 (PDK1), také závislou na PI3K, a dále fosforylací na Ser473 PDK2 kinázou, jejíž identita není plně objasněna. AKT inhibuje TSC1-TSC2 komplex a tak umožňuje aktivitu mTOR kinázy (k té je totiž potřebná vazba Rheb GTPázy, inhibované TSC1-TSC2). mTOR v buňce tvoří dva typy komplexů. Asociace s adaptorem RAPTOR vede k vzniku mTORC1 komplexu, oproti tomu mTORC2 komplex je tvořen vazbou mTORu a RICTOR proteinu. Zatímco mTORC1 je nepřímě aktivován AKT kinázou, mTORC2 je jednou z potenciálních PDK2. mTORC1 navíc zpětně inhibuje AKT aktivitu. Převzato a upraveno z (Dong and Liu 2005)

Oproti tomu na aktivaci PKB vlivem DNA poškození se mohou podílet ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) a DNA protein kináza (DNA-PK).

Zajímavé je, že při identifikaci DNA-PK jako Ser473K byla mimo jiné také použita MS, jako v případě ILK. Jako vzorek byla ale použita pouze jedna ze dvou frakcí fosforylujících HM-PKB, výsledky se tedy úplně nevylučují. Kromě toho i získaná data nasvědčují existenci více PDK2 kináz, a to na modelu buněk deficientních na DNA-PK. U M059J buněk je sice pomocí integrace fragmentu kódujícího DNA-PK prokázána fosforylace PKB DNA protein kinázou, ovšem i u buněk původních (tedy bez DNA-PK) je bazální hladina fosforylace Ser473 (Feng, Park et al. 2004). Role DNA-PK v aktivaci PKB v reakci na DNA poškození byla prokázána i studiem akumulace p53 proteinu. Přirozeně je p53 degradován prostřednictvím ubiquitin-ligáz (např. MDM2). Po ozáření buněk dochází k inhibici MDM2 funkce skrze supresi

glykogen-syntáza kinázy (GSK) 3 β , což je PKB substrát, podílející se na aktivitě MDM2. A jako kináza zprostředkující PKB aktivaci byla na modelu fibroblastů pocházejících z myší s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID), DNA-PK deficientních, prokázána DNA-PK, jedna z PI3K-příbuzných kináz rozpoznávajících DNA léze (Boehme, Kulikov et al. 2008). Tato fakta naznačují význam DNA-PK v aktivaci jaderné PKB, a možnost aktivace cytozolické PKB alternativním způsobem (Toker 2008).

ATM kináza je známa především jako jaderná, ale svou funkci uplatňuje také v cytozolu. V souvislosti s tím byla popsána fosforylace PKB na Ser473 nejen v reakci na DNA poškození, ale také po stimulaci inzulinem (Halaby, Hibma et al. 2008). Pro tuto aktivitu ATM je podstatná její katalytická doména, homologická s p110 podjednotkou PI3K, která indukuje fosforylaci PKB pouze na Ser473, n rozdíl od p110 α (tedy PI3Kc) vedoucí k fosforylaci obou klíčových míst. Význam ATM byl prokázán na základě indukce fosforylace serinu po transfekci ATM a dále in vitro kinázovými testy. V nich ATM fosforylovala celou molekulu PKB, pokud se nejednalo o ATM variantu s defektní kinázovou aktivitu. Fosforylace glutation-S-transferáza (GST) fúzního proteinu s posledními 80-ti aminokyselinami PKB („GST-HM“ PKB) nebyla detekována ani v případě funkční ATM, z čehož autoři usuzují, že ATM nefosforyluje PKB přímo (Viniegra, Martinez et al. 2005). Tyto testy byly prováděny bez jakékoli exogenní stimulace ATM aktivity, takže je možné, že v přítomnosti například inzulinu nebo záření by k fosforylaci GST-HM PKB došlo. Při studiu ILK jako potenciální PDK2 totiž sice docházelo k in vitro fosforylaci HM úseku PKB bez vnějších podnětů, ale DNA poškození indukovalo fosforylaci peptidů obsahujících sekvenci několika aminokyselin z okolí serinu (Feng, Park et al. 2004).

Mechanismus fosforylace PKB na Ser473 tedy není stále jasný. Rozdílné výsledky mohou vznikat v důsledku odlišných buněčných modelů, ale také použitím různých metod. Z tohoto hlediska je zajímavá práce testující roli jednotlivých kandidátních kináz v jednom konkrétním buněčném modelu – adipocytech, u kterých je Ser473 PKB fosforylován především komplexem RICTOR-mTOR (Hresko and Mueckler 2005). Vysoce pravděpodobná je tedy buněčná specifita Ser473K, nebo dokonce možnost existence více kináz, uplatňujících se v závislosti na podnětu indukujícím aktivaci PKB.

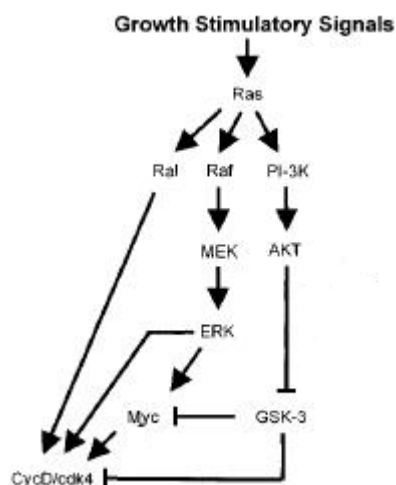
2.3.3 PI3K-PKB v BC

PI3K-PKB signální dráha ovlivňuje BC jednak tím, že působí antiapoptoticky (Kennedy, A J Wagner et al. 1997), a dále se projevuje na úrovni G1/S (Auger, Serunian et al. 1989) a G2/M přechodů.

Důležitost PKB při vstupu do buněčného cyklu je nasnadě již vzhledem k faktu, že PI3K signalizace je aktivována receptory růstových faktorů. PKB reguluje stabilitu cyklinu D.

Ten může být v jádře fosforylován GSK3 β kinázou na Thr286, a je tak exportován do cytozolu, kde dochází k jeho ubiquitin-dependentní degradaci (Diehl, Cheng et al. 1998). Pokud se buňka nachází v prostředí s dostatkem růstových faktorů, PKB inhibičně fosforyluje GSK3 β a cyklin D je stabilní (Cross, Alessi et al. 1995) pro tvorbu komplexu s CDK4/6 kinázou. GSK3 β zprostředkovává také degradaci C-MYC transkripčního faktoru, tato fosforylace je ovšem závislá na předcházející fosforylaci C-MYC MAPK signální dráhou – takto je zajištěna pevnější kontrola množství C-MYC i v podmínkách příznivých pro proliferaci (Sears, Nuckolls et al. 2000). Zároveň PI3K-PKB signalizace vede k iniciaci transkripce c-Myc a cyklinu D. (Obr. č. 12)

Obr. č. 12: PI3K-PKB signalizace v G1/S přechodu



Stimulace růstovými faktory vede k aktivaci fosfoinositid-3-kinázy (PI3K) a protein kinázy B (AKT). AKT inhibičně fosforyluje glykogen-syntáza kinázu 3(GSK-3), a tím umožňuje tvorbu cyklin D-CDK4 komplexů (CycD/cdk4) - GSK3 má totiž negativní vliv přímo na cyklin D stabilitu, ale také na transkripční faktor Myc, který působí na cyklin D pozitivně. Růstové faktory se podílí na aktivaci cycD/CDK4 také přes Ral a Ras/Raf/MEK/ERK signální dráhu. Převzato a upraveno z (Sears and Nevins 2002)

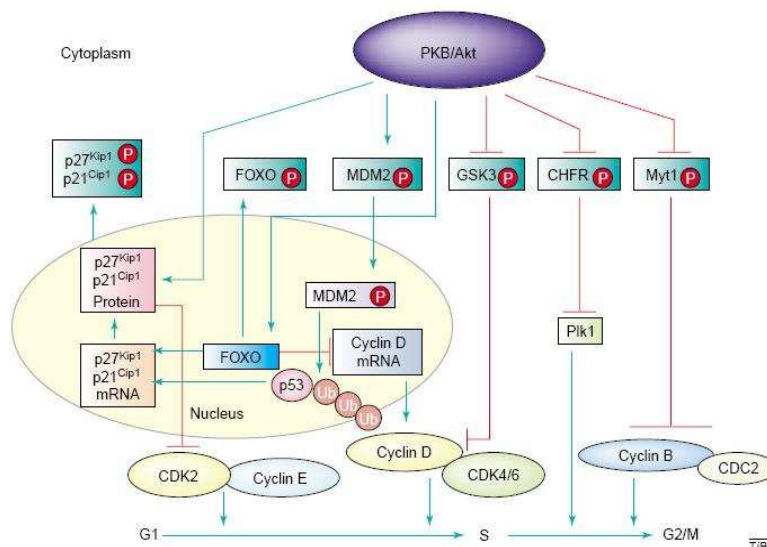
Aktivita CDK kináz je v G1 fázi ovlivňována proteinovými inhibitory, prozatím byla popsána PKB-dependentní regulace p27 a p21 proteinů. Přímá fosforylace p21 v jeho jaderné lokalizační sekvenci (NLS) vede k lokalizaci p21 do cytozolu (Zhou, Liao et al. 2001). Mimojaderné lokalizace p27 může být dosaženo stejným způsobem – fosforylací v NLS (na Thr157), která naruší import p27 do jádra (Liang, Zubovitz et al. 2002). Kromě toho může být p27 z jádra exportován v důsledku fosforylace jiného místa v molekule (Ser10) - tato fosforylace ovšem není zprostředkována PKB, na rozdíl od fosforylace na Thr157 (Viglietto, Motti et al. 2002). V cytozolu je p21 využit pro vznik stabilních cycD-CDK4/6 komplexů (Liang and Slingerland 2003) a lokalizace převážné části p27 v cytozolu dále umožní aktivaci cyklin E-CDK2 a degradaci zbytkového p27 v jádře pozitivní zpětnou vazbou (Viglietto, Motti

et al. 2002). (Obr. č. 2A) Míra degradace p27 a jeho stabilita jsou také regulovány PKB. Po rozpoznání fosforylace p27 cyeE-CDK2 komplexem je p27 ubiquitinován činností SCF^{SKP2} ubiquitin ligázy. Hladina SKP2 v průběhu BC kolísá (Wirbelauer, Sutterluty et al. 2000) – a právě exprese SKP2 ovlivňuje PI3K-PKB signální dráha. Inhibice PI3K signalizace LY294002 inhibitorem u lidských rakovinných buněk vede k výraznému poklesu SKP2 proteinu a detekci p27 (Pene, Claessens et al. 2002). Analogické výsledky byly získány u PTEN deficientních myších embryonálních buněk (tedy pokles p27 a naopak vyšší exprese SKP2) (Mamillapalli, Gavrilova et al. 2001). K regulaci SKP2 dochází již na úrovni transkripce, neboť po stimulaci adipocytů dochází nejprve k aktivaci PKB a následně k růstu Skp2 mRNA (Auld, Caccia et al. 2007). p27 stabilita je regulována také nepřímo, přes mTOR signální dráhu - inaktivací tuberinu (TSC2). Při zablokování PI3K signalizace dochází spolu s inhibicí PKB k aktivitě TSC1-TSC2 komplexu (komplex tuberinu s hamartinem - TSC1) (Obr. č. 11) a stabilizaci p27 proteinu (Liang and Slingerland 2003). Vazbu inhibice TSC2 protein kinázou B a regulace p27 prokazuje snížená aktivita p27 v buňkách postrádajících TSC2 (Soucek, Yeung et al. 1998). Protože inhibice p27 může být zablokována rapamycinem (Nourse, Firpo et al. 1994), je zřejmě důležitá aktivace mTORC1 (která je uvolněna v důsledku TSC2 inhibice PKB kinázou) (McManus and Alessi 2002; Liang and Slingerland 2003).

PI3K-PKB signalizace se uplatňuje také v G2-M přechodu a při znovuzahájení BC po detekci poškození DNA v G2 fázi. Při sledování PKB aktivity v průběhu buněčného cyklu bylo zjištěno její zvýšení v G2 fázi, které kleslo s dokončením mitózy u HeLa buněk, a dále buněk epiteliálního původu (MDCK linie), což poukazuje na možnost specifity role PKB pro určité buněčné typy. Inhibice PI3K dráhy sice vedla k opoždění G2 fáze také u fibroblastů, u epiteliálních buněk byl ale vývoj pozastaven. K tomuto bloku nedošlo při současné transfekci inhibovaných buněk konstitutivně aktivní PKB („ca-Akt“, tato forma neobsahuje PH doménu, a aktivitu zajišťují záměny Ser a Thr za Asp napodobující fosforylaci těchto míst) (Shtivelman, Sussman et al. 2002). Účast PI3K a PKB při vstupu do mitózy a v signálních drahách spojených s DNA poškozením dále povrzuje fenotyp PTEN deficientních embryonálních kmenových buněk. Tyto buňky po ozáření γ paprsky neaktivovaly G2/M kontrolní bod, stejně jako buňky transformované konstruktem myr-Akt (tato PKB varianta je cílená k membráně a aktivaci pomocí lipidové kotvy v podobě kyseliny myristoylové napojené místo PH domény) (Kandel, Skeen et al. 2002). Dalším důkazem je vývoj nádorových onemocnění v tkáních, ve kterých byla provedena tkáňově specifická delece Pten (Lu, Chang et al. 2007). Mechanismus působení protein kinázy B byl rozpracován v zatím poslední z mála prací, zabývajících se tímto tématem. Protože při přechodu z G2 fáze do mitózy je možná účast PLK1 (fosforylační cyklinu B) (Jackman, Lindon et al. 2003), byl studován potenciální vztah mezi těmito dvěma molekulami. PLK1 je ubiquitinylována proteinem CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains), který jí tak cílí k degradaci (Kang, Chen et al. 2002). N koncová doména CHFR je

fosforylována PKB v sekvenci typické pro forkhead asociované proteiny a tato fosforylace inhibuje ubiquitin-ligázovou aktivitu CHFR - mutovaná forma CHFR nefosforylovatelná PKB díky záměně za Ala sice vykazuje autoubiquitylaci a tedy nižší množství v buňce, ale vyšší aktivitu oproti přirozené CHFR. Kromě toho mutovaný CHFR redukoval množství PLK1 proteinu a následně množství buněk procházejících mitózou, přestože nebylo vyvoláno DNA poškození. U buněk transformovaných ca-Akt nedocházelo po ozáření k poklesu PLK1 proteinu a PLK1 aktivity na rozdíl od buněk bez transfekce. Stejný výsledek byl získán při transfekci myristoylované PKB s expresí indukovatelnou hydroxytamoxifenem (zde byly po ozáření porovnány buňky stimulované a nestimulované hydroxytamoxifenem), nebo na modelu buněk nesoucích neaktivní PTEN fosfatázu. Pokud tedy během G2 fáze není zjištěno poškození DNA, PKB pravděpodobně inhibuje CHFR protein, a tím je možný nárůst aktivity PLK1 a iniciace vstupu do mitózy. V opačném případě je neznámým způsobem PKB inhibována a CHFR protein aktivní (Shtivelman 2003). Kromě inhibice CHFR byla popsána suprese funkce CHK1 fosforylací skrze PKB (King, Skeen et al. 2004).

Obř. ř. 13: Cíle aktivity protein kinázy B



Protein kináza B (PKB) působí na velké množství cílových proteinů, a tak pozitivně ovlivňuje buněčnou proliferaci. Fosforylace p27 a p21 spolu s FOXO transkripčními faktory způsobuje jejich export z jádra do cytozolu, kde nemohou vykonávat svou inhibiční funkci vzhledem k buněčné proliferaci. Cytoplazmatickou lokalizací FOXO je negativně ovlivněna transkripce p21 a p27 mRNA, a naopak pozitivně regulována transkripce mRNA pro cyklin D. Na expresi cyklinu D má také pozitivní vliv PKB zprostředkovaná inhibice glykogen-syntáza kinázy 3 (GSK3). V G1 fázi se projevuje i stabilizace MDM2 proteinu PKB fosforylací. PKB negativně fosforyluje CHFR a MYT1, čímž podporuje G2/M přechod. Převzato z (Brazil, Yang et al. 2004)

2.3.4 PI3K-PKB v oogenezi

PI3K kináza je důležitá v oogenezi již při vývoji folikulů. Vazba KL (také SCF) na Kit receptor na povrchu oocytů aktivuje PI3K signální dráhu. Stimulace rostoucích myších oocytů SCF vede k přechodné fosforylaci PKB na Ser473 a následně PKB substrátu FOXO3a (FKHRL1) (Brunet, Bonni et al. 1999). FOXO3a je u primordiálních a primárních oocytů lokalizován v jádře, odkud je následkem fosforylace exportován, a tím inaktivován. Podobné výsledky byly získány i u částečně narostlých oocytů, s tím rozdílem, že fosforylace PKB byla stálá po 60 min od stimulace, stejně jako fosforylace FKHRL1. Tyto fosforylace jsou blokovány předošetřením oocytů pan-PI3K inhibítorem LY294002, a to potvrzuje aktivaci PKB skrze PI3K (Reddy, Shen et al. 2005). Podstatná je regulace funkce FOXO3a. Aktivita FKHRL1 v brzkém počátku folikulogeneze a růstu oocytů nejspíše reprimuje přílišnou aktivaci folikulů (myši postrádající FOXO3a mají již v 18. týdnu vyčerpanou zásobu folikulů) (Castrillon, Miao et al. 2003). V dalších fázích vývoje dochází naopak ke snížení aktivace FKHRL1 změnou jaderné lokalizace a to umožní další růst oocytu a sekundárních folikulů (Liu, Rajareddy et al. 2007). Účast PI3K signální dráhy při folikulogenezi dosvědčuje i pozorování předčasné aktivace všech primordiálních folikulů u myši s PTEN-deficientními oocyty (Reddy, Liu et al. 2008).

Poznatky týkající se role PI3K-PKB signální dráhy v meióze oocytů byly získány nejprve na modelu hvězdice nebo Xenopa. Podle dosavadních zjištění je situace u myších oocytů analogická spíše Xenopovi. Exprese myr-Akt (cílené do membrány díky lipidovému ocásku) v xenopích oocytech indukuje maturaci, spojenou se zvýšenou aktivitou PDE3 (Andersen, Roth et al. 1998). Znovuzahájení meiózy je u Xenopa vyvoláno stimulací progesteronem (fyziologický podnět) anebo inzulinem a dochází při něm k poklesu cAMP v oocytech (Sadler and Maller 1987). Maturace oocytů účinkem inzulinu je inhibována cilostamidem (specifický PDE3 inhibitor), to také ukazuje na roli PDE3 a PKB v této signální dráze (Andersen, Roth et al. 1998). Aktivace PDE3A fosforylací protein kinázou B byla následně prokázána i na modelu myších oocytů. (Obr. č. 6) Kotransfekce Pde3a společně s myr-Akt zvyšuje fosforylaci PDE3A a zároveň její aktivitu (cilostamid-senzitivní), která roste i po transfekci Pde3a spolu s neupravenou PKB. Jedná se ovšem pouze o aktivitu exogenní PDE3A, neboť pro test aktivity byla PDE3A imunoprecipitována pomocí protilátky vůči hemaglutininovému tagu, s kterým byl konstrukt exprimován, a stejná protilátka byla využívána ke kontrole celkové PDE3A. Zajímavé je, že při transfekci buněk samotnou PKB kinázou, bez Pde3a, k fosforylaci fosfodiesterázy nedochází. To je zřejmě dáno modelem, neboť kotransfekční experimenty byly prováděny pouze na somatických HEK293 buňkách, u kterých nemusí mít vztah PKB-PDE3A význam, a experimenty tedy prokazují pouze potenciální možnost fosforylace a aktivace PDE3A prostřednictvím PKB. Oocyty z Pde3a deficientních

myší mají proces maturace narušený v důsledku dlouhodobě zvýšené koncentrace cAMP (Masciarelli, Horner et al. 2004) a tento fenotyp je zvrácen jen transfekcí Pde3a. Exprese myr-Akt samostatně (bez PDE3A exprese) v Pde3a deficientních oocytech k meiotickému zrání nevede, u oocytů bez deficiencie overexprese myr-Akt způsobuje GVBD i při kultivaci s nižší koncentrací PDE3A inhibitoru, IBMX (Han, Vaccari et al. 2006). Inhibice PKB inhibitorem SH6 způsobuje opožděné zrání oocytů v metafázi I spojené s abnormálním vřeténkem (Hoshino and Sato 2008). Roli PKB-PDE3A-CDK1 signalizace v meióze naznačuje také kinetika aktivity enzymů in vivo (Han, Vaccari et al. 2006; Kalous, Solc et al. 2006). K fosforylaci a aktivaci PKB dochází 2 hodiny po injekci lidského choriongonadotropinu (hCG), indukujícího znovuzahájení meiózy in vivo, s maximem ve 2,5 hodinách (Kalous, Solc et al. 2006). Aktivita PDE3A se zvyšuje ve 2,5 hodinách po hCG (Han, Vaccari et al. 2006). Oba výše uvedené děje předchází CDK1 aktivaci a GVBD (Han, Vaccari et al. 2006; Kalous, Solc et al. 2006). Fosforylace PKB je navíc CDK1 nezávislá, oproti tomu inhibice PI3K signální dráhy LY294002 výrazně zpožďuje GVBD (Kalous, Solc et al. 2006).

Zajímavým bodem je pozorování odlišné lokalizace PKB fosforylované na Thr308 a Ser473. Ser473 fosforylovaná PKB se před GVBD nachází v oblasti jaderné membrány, ale také na centrozomu, a v MI i MII je asociována s mikrotubuly dělicího vřeténka. pThr308 PKB se nachází na centrozomu jak v čase okolo GVBD, tak i v obou metafázích (Kalous, Solc et al. 2006). Tato fakta o lokalizaci PKB také ukazují na její roli v meióze oocytů.

2.3.5 PI3K-PKB v imunitním systému

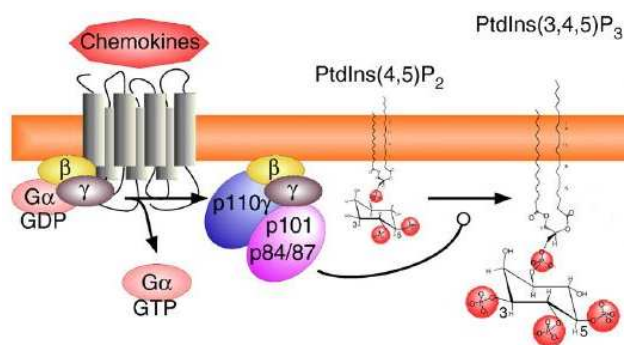
Přenos signálů z vnějšího prostředí do buňky za pomoci PI3K je důležitý také pro buňky imunitního systému. K aktivaci produkce fosfoinositidů dochází například po vazbě ligandu k receptoru T nebo B buněk (TCR a BCR) a cytokinovým receptorům, PI3K se tedy uplatňuje na několika různých úrovních (aktivace a vykonávání funkce B i T lymfocytů, ale také zrání T lymfocytů). Z hlediska exprese mají význam PI3K třídy IA s p110 δ katalytickou podjednotkou a třídy IB (obsahující p110 γ podjednotku), preferenčně exprimované v leukocytech (Koyasu 2003).

Při aktivaci T lymfocytů je důležité nejen rozpoznání antigenu (Ag) v komplexu s hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) pomocí TCR, ale především interakce CD28 kostimulačního receptoru na povrchu T lymfocytů s ligandy B7 rodiny na povrchu Ag-prezentujících buněk (např. CD80/86). CD28-B7 ligand interakce zajišťuje proliferační signály a pokud chybí, dochází k anergii T lymfocytů (Song, Lei et al. 2008). B lymfocyty zesilují svoji aktivaci a signalizaci ligací BCR a koreceptorového komplexu s CD19 molekulou. Výše uvedené molekuly mohou všechny aktivovat PI3K třídy IA (Fruman 2004). Kromě toho je PI3K aktivována cytokinovými receptory, ať už se jedná o receptory s vlastní RTK aktivitou, např. faktor stimuluje makrofágy (MCSF), c-kit anebo o receptory, jejichž Tyr v cytoplazmatické části je fosforylován JAK kinázou, asociující s receptory jako jsou interleukin (IL) 2 receptor (IL-2R), IL-7R nebo také receptor pro interferon γ (IFN γ R) (Koyasu 2003).

Membránová lokalizace a následná aktivita PI3 kináz třídy IA je zajištěna vazbou regulační podjednotky k fosforylovanému motivu (pYXXM, kde X je jakákoliv aminokyselina a jako třetí zbytek po Tyr následuje methionin). Tento motiv se může nacházet přímo v intracelulární receptorové doméně nebo v adaptorovém proteinu. PI3Ks IA jsou aktivovány přímo v případě CD28 kostimulačního receptoru, příkladem nepřímé aktivace je signalizace spuštěná vazbou IL-2 ke svému receptoru. Signalizační podjednotka IL2-R, γ , asociuje uvnitř buňky s JAK3 kinázou. JAK3 fosforyluje cytoplazmatickou část γ podjednotky, ke které se tak váže Shc protein. Následnou vazbou Grb2 a Gab2 k Shc dochází k aktivaci PI3K, neboť p85 vazebný motiv je obsažen teprve v Gab2 proteinu (Kashiwada, Lu et al. 2007).

Chemokinové receptory (což jsou GPCRs) aktivují PI3K třídy IB a to prostřednictvím interakce regulační podjednotky p101 se stimulační $\beta\gamma$ složkou trimerního G proteinu uvolněnou po vazbě ligandu k receptoru (Koyasu 2003; Fruman 2004).

Obr. č. 14: Aktivace PI3K třídy IB



PI3K třídy IB jsou aktivované receptory spojenými s G proteiny. Po vazbě ligandu k receptoru (např. chemokiny) asociuje stimulační $\beta\gamma$ dimer G proteinu k PI3K regulační podjednotce (p101 nebo p84 či p87), a tak je zprostředkována membránová lokalizace a aktivita p110 γ katalytické podjednotky, která má za následek tvorbu fosfatidylinositol(3,4,5)trifosfátů (PtdIns(3,4,5)P₃). Převzato a upraveno z (Marone, Cmiljanovic et al. 2008)

PI3K signalizace pokračující přes PKB je pouze jednou z několika. K membránovým PI se váží další důležité molekuly, jako jsou proteiny rodiny Vav (zahajující cytoskeletální reorganizaci a produkci cytosinů), Tec rodiny RTKs anebo fofolipáza C γ (PLC γ) (Koyasu 2003). PLC γ štěpí PtdIns(4,5)P₂ na diacylglycerol (DAG) a inositoltrifosfát (IP₃), tím umožňuje zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ a následnou aktivaci PKC (prostřednictvím DAG), aktivující NF κ B závislou transkripci (Fruman 2004).

K objasnění vlivu PI3K-PKB dráhy na vývoj T a B lymfocytů přispěly především transgenické modely myši postrádajících některou PI3K podjednotku, PKB izoformu a také lipidové fosfatázy SHIP a PTEN (Koyasu 2003; Juntilla and Koretzky 2008). Ty jsou důležité při udržení rovnováhy PI3K aktivity v buňkách imunitního systému – důkazem je častá deficeience PTEN u leukemických buněk a v důsledku toho zvýšená bazální PKB aktivita. SHIP fosfatáza váže fosforylovaný imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv (ITIM) inhibičního Fc receptoru B buněk Fc γ RIIB. K jeho fosforylaci dochází po koligaci BCR s Fc γ RIIB komplexem Ag-protilátka (Cantrell 2002). Knockout SHIP u myši se tedy projevuje zvýšenou aktivitou B lymfocytů po jejich aktivaci (Koyasu 2003) a také narušením přirozené funkce makrofágů (Sly, Ho et al. 2007). Vzhledem k embryonální letalitě celkové deficeience PTEN fosfatázy je pro studium její role v jednotlivých buněčných typech nutné využít tkáňově specifickou delecii (např. pomocí Cre-Lox systému). B lymfocyty bez funkční PTEN fosfatázy mají defekt v přesmyku imunoglobulinových tříd a jsou více aktivní, stejně jako PTEN-deficientní T lymfocyty, což se projevuje autoimunitními reakcemi (Koyasu 2003).

T lymfocyty prochází ve svém vývoji v thymu několika fázemi, během kterých jsou selektovány thymocyty pro další vývoj. U raných thymocytů, exprimujících pouze pre-TCR a ani jednu z koreceptorových molekul CD4/CD8 (odtud označení „DN“ – double negativní

thymocyty, oproti tomu „DP“ – double pozitivní thymocyty exprimují CD4 i CD8), je testována funkčnost tohoto receptoru v tzv. β -selekcí². Té se PKB pravděpodobně účastní, neboť v thymech plodů z myši postrádajících PKB α a současně PKB β izoformu je blokován přechod z DN do DP stádia. Předpokládaným mechanismem je jednak narušený buněčný metabolismus, ale také přerušení signální dráhy Notch receptoru, která je esenciální v DN-DP přechodu a v které se PKB nachází, v důsledku PKB deficiencie (Juntilla and Koretzky 2008).

Význam PKB v imunitním systému je dán především, ale ne pouze, pozitivním působením na proliferaci buněk popsaným již dříve. S antiapoptotickým účinkem PKB je spojena aktivace NF κ B transkripčního faktoru skrze pozitivní fosforylaci komplexu kinázy NF κ B inhibitoru (I κ B kináza označovaná také zkratkou IKK) (Song, Lei et al. 2008). Na aktivaci IKK spolupracuje PKB společně s PKC (Fruman 2004). Dále je zvažována nepřímá inhibice jaderného faktoru aktivovaných T lymfocytů (NFAT) PKB. NFAT je rodina transkripčních faktorů ovlivňujících expresi např. genů pro cytokiny. Funkčnost NFAT je závislá na jejich jaderné lokalizaci regulované fosforylací – fosfatáza calcineurin udržuje NFAT v jádře, oproti tomu fosforylace např. GSK3 kinázou indukuje jaderný export NFAT. Vztah NFAT a PKB je v tomto ohledu ovšem paradoxní. GSK3 aktivita uváděná jako inhibiční pro NFAT je PKB kinázou suprimována (Cantrell 2002; Fruman 2004). PKB by tedy měla působit na NFAT lokalizaci pozitivně, čemuž tak není (Fruman 2004). Jako mechanismus PKB zprostředkované inhibice NFAT je tedy považován jednak přímý vliv PKB na NFAT (Patra, Na et al. 2004) anebo role jiných proteinů regulovaných PKB (Fruman 2004). Negativní vztah mezi PKB a NFAT se pravděpodobně uplatňuje také při vývoji lymfocytů v thymu vlivem na transkripci rekombinaci aktivujícího genu 1 (Rag1) (Juntilla and Koretzky 2008). NFAT inhibice prostřednictvím PKB byla popsána i na jiných než imunologických modelech (např. buňky karcinomu prsu) (Yoeli-Lerner, Yiu et al. 2005). PI syntetizované PI3K vedou ke vzniku IP₃, a následně aktivaci calcineurinu a NFAT lokalizaci v jádře (Gwack, Feske et al. 2007) – vzhledem k tomu může inhibice NFAT skrze PKB představovat obranu proti přílišné aktivaci buněk imunitního systému.

² Pre-TCR je totiž tvořen pre-T α a pre-T β řetězcem, který prošel procesem náhodné rekombinace, a je tedy možný vznik receptoru s nefunkčním β řetězcem - například v důsledku výskytu stop kodonu uprostřed proteinové sekvence. (Juntilla, M. M. and G. A. Koretzky (2008). "Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development." *Immunol Lett* **116**(2): 104-10.)

3 Materiál a metody

3.1 Sběr a kultivace oocytů

Vaječníky byly získány z 3-6 týdenních F1 hybridních myších samic (C57BL/6J x BALB/c), které byly 48 hod před odběrem stimulované PMSG (5IU PMSG/myš). Po usmrcení samic cervikální dislokací byla ovaria po izolaci přenesena do manipulačního média (MEM) vyhřátého na 37°C. MEM je minimální esenciální médium (Earle salt; E7510, Sigma) obohacené 3 mg/ml polyvinylalkoholu (PVA), 0.23 mM pyruvátu a 25 mM Hepes (pH 7.3). Aby nedocházelo ke spontánnímu znovuzahájení meiózy, byl k MEM médiu přidáván 0,1 mM 3-izobutyl-1-methylxanthin (IBMX). Meioticky kompetentní oocyty (tj. oocyty s kumulárními buňkami) byly z vaječnicků izolovány uvolněním z folikulů pod binokulární lupou a následně byly mechanicky zbaveny kumulů (oholeny). Oocyty byly kultivovány standardně v M16 médiu (Sigma) překrytém vrstvou minerálního oleje při 37,5°C v atmosféře s 5% CO₂, pro experimenty s látkami lipidové povahy bylo zvoleno médium M2 (Sigma), které má stejné složení jako M16 médium, ale pufrovací systém tvoří především HEPES místo bikarbonátu. „Oholené“ oocyty byly před započítáním vlastního experimentu kultivovány minimálně 1 hod v kultivačním médiu s IBMX.

Ke studiu úlohy PI3K-PKB signální dráhy při znovuzahájení meiózy a také studiu fosforylace PKB na Ser473 byly použity biologicky aktivní syntetické PtdIns(3,4,5)P₃ - Cayman Chemical (Lapetina, Billah et al. 1981) a následující inhibitory: pan-PI3K inhibitor LY294002 - Calbiochem (Vlahos, Matter et al. 1994), PKB inhibitor SH6 – Alexis Biochemicals (Kozikowski, Sun et al. 2003) a ATM inhibitor KU55933 - Calbiochem (Hickson, Zhao et al. 2004). Pro sledování efektu těchto látek byly oocyty nejprve tzv. preinkubovány s inhibitorem/PtdIns(3,4,5)P₃ v IBMX (preinkubace 1 hod s LY294002 a SH6, 1,5 hod s PtdIns(3,4,5)P₃ a 2 hod s KU55933) a teprve poté ponechány zrán v médiu s inhibitorem/PtdIns(3,4,5)P₃. Kromě sledování kinetiky zrání oocytů, byly také sbírány oocyty na detekci fosforylace PKB na Thr308 a Ser473 – po 50-ti oocytech na skupinu. Před zamražením v -80°C byly oocyty promyty v bezproteínovém MEM médiu.

Efekt jednotlivých farmakologických ošetření oocytů na kinetiku GVBD byl hodnocen pomocí Fisherova exaktního testu, chybové úsečky vyjadřují interval spolehlivosti odhadu procenta GVBD (Exact binomical calculation method). Statistické výpočty byly provedeny v programu NCSS 2004 vždy na hladině $\alpha=0,05$.

3.2 Western blot (WB)

Zamražené oocyty byly zlyzovány v 1x koncentrovaném SDS/PAGE vzorkovém pufru (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, při 25°C, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0.01% (w/v)

bromfenol blue a 41,6 mM DTT; Cell Signaling), vždy 25µl/50 oocytů. Oocyty byly povařeny 5 min při 100°C a stočeny. Vzorky byly rozděleny pomocí SDS/PAGE v 9% polyakrylamidovém separačním gelu o šířce 0,75 mm (systém MINI PROTEAN 3 - BioRad; 180V, 25mA/1gel) a rozdělené proteiny přeneseny z gelu na Immobilon P PVDF membránu (Millipore) „semi-dry“ blotovacím systémem (Biometra; přenos 30 min za konstantního proudu 5mA/cm² gelu). Membrány byly 1 hod blokovány a následně značeny primární protilátkou přes noc při 4°C (podmínky viz Tab. č. 1). Fosforylace PKB na Ser473 byla detekována králičí anti-pSer473 monoklonální protilátkou (anti-pSer473 mAb, Cell Signaling, katalogové číslo 4058), ke značení PKB fosforylované na Thr308 byla použita králičí polyklonální anti-pThr308 protilátka (anti-pThr308 polyAb, Santa Cruz, katalogové číslo SC16646) anebo králičí monoklonální anti-pThr308 protilátka (anti-pThr308 mAb, Epitomics, katalogové číslo 2214-1).

Následující den byly membrány 3x po 10 minutách promyty v TTBS (0.5% Tween-20 v Tris/HCl pufovaném NaCl, pH 7.4) a značeny 1 hod za pokojové teploty sekundární protilátkou anti-rabbit IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Po opětovném promytí byl signál značených proteinů vizualizován chemiluminiscencí (ECL - Amersham Pharmacia Biotech). Uvedené výsledky reprezentují výsledek minimálně tří experimentů.

Tab. č. 1: Použité fosfoprotilátky a podmínky značení

protilátka katalogové číslo	blokace	primární protilátka		sekundární protilátka	
		koncentrace	roztok	koncentrace	roztok
anti-pSer473 mAb 4058	2% BSA	1:250	2% BSA	1:7500	2,5% BSA
anti-pThr308 mAb 2214-1	2% BSA	1:1000	TTBS	1:7500	1% MILK
anti-pThr308 polyAb SC16646	2,5% MILK	1:500	TTBS	1:7500	2,5% MILK

Jako pozitivní kontrola fosforylace PKB byly použity myší embryonální fibroblasty kultivované v DMEM médiu s přidavkem 10% séra (FCS), oproti tomu fibroblasty kultivované 36 hod v 0,2% FCS sloužily jako negativní kontrola. Buňky byly 3x promyty v PBS a zamraženy nasucho v -80°C. Pro použití na WB byly buňky lyzovány v 1x koncentrovaném lyzačním pufru s inhibítorem proteáz PMSF. Po lyzaci byly změřeny proteiny metodou BCA (Smith, Krohn et al. 1985) a obě skupiny fibroblastů naředěny na stejnou koncentraci ve vzorkovém SDS/PAGE pufru (viz výše).

Ke kvantifikaci detekovaného signálu byl použit program Scion Image (Scion Corporation) a data byla vyhodnocena pomocí normalizace na průměr (mean-centering) - pro každý experiment byla spočítána celková intenzita signálu, a následně vypočítán podíl signálu

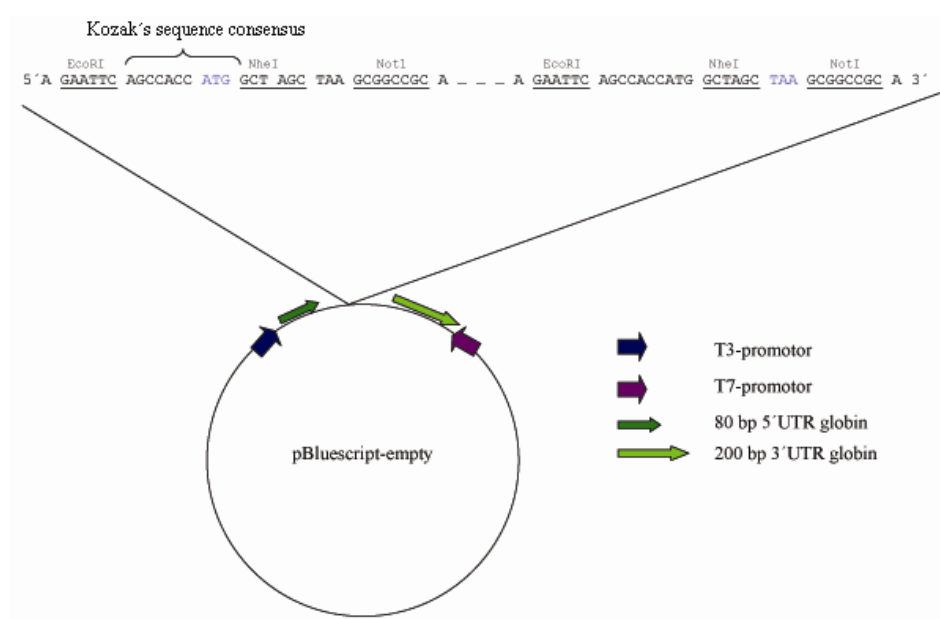
jednotlivých vzorků na této celkové intenzitě. Hodnoty jsou uváděny pod zobrazením western blotů ve Výsledcích.

3.3 DNA klonování a kultivace bakterií

K přípravě vektoru pro in vitro transkripci mRNA kódující PTEN-mCHERRY byla použita kompletní myší Pten cDNA (GI:18204775, MGC: 29353, IMAGE ID: 5038272; imaGenes GmbH Germany – RZPD) v pCMV-SPORT6 plazmidu, zdrojem pro přípravu vektoru k transkripci mRNA kódující konstitutivně aktivní PKB fúzovanou s GFP (ca-Akt-eGFP) byl pCMV-SPORT6 obsahující lidskou ca-Akt1 (dar Dr. Alessiho, The University Of Dundee).

Jako vektor vhodný pro in vitro transkripci byl použit modifikovaný vektor pBluescript (pBSK) obsahující sekvenci kódující mCherry anebo Gfp. Ve vektoru se nachází T3-promotor a dále oblasti pro mRNA stabilitu a účinnou iniciaci translace (5'UTR, 3'UTR oblasti a sekvence Kozakové z globinu z Xenopa) - obecné schéma pBluescript vektoru znázorňuje Obr. č. 1.

Obr. č. 1 Obecná mapa vektoru pBluescript



Tento vektor je vhodný pro in vitro transkripci. Obsahuje totiž 5'UTR, sekvenci Kozakové a 3'UTR oblast, které zvyšují účinnost transkripce a stabilitu mRNA. Syntéza RNA je možná z T3-promotoru anebo z T7-promotoru v opačné orientaci. V plazmidu se nachází úseky rozpoznávané několika různými restriktčními endonukleázami, umožňující vložení DNA fragmentu s genem pro transkripci.

cDNA pocházející z pCMV-SPORT6 plazmidů byly amplifikovány PCR reakcí pomocí Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, distribuováno společností New England Biolabs). Použitím klonovacích primerů uvedených v Tab. č. 2 bylo na konce genově-

specifických úseků připojeno SpeI restriční místo (při amplifikaci Pten byl v PCR programu navíc krok nasedání primerů při teplotě 65°C, v případě ca-Akt nebyl tento krok třeba). Získané PCR produkty byly štěpeny přes noc při 37°C SpeI restriční endonukleázou (New England Biolabs), stejně jako pBSK vektor. Restriční byly vytvořeny kohezní konce umožňující ligaci fragmentů do vektoru. Otevření vektoru štěpením bylo ověřeno elektroforézou, a vektor byl izolován vyčištěním z gelu pomocí kitu QIAEX II 150 (Qiagen). Ligace prostřednictvím enzymu T4 DNA ligáza (New England Biolabs) probíhala přes noc při 17°C. Po ligaci byly vektory přečištěny pomocí kitu PureExtreme DNA Extraction Kit (Fermentas).

Tab. č. 2 Sekvence primerů použitých při tvorbě expresního vektoru

primer	sekvence
pten	5' TGA CAT <u>ACT AGT ACA</u> GCC ATC ATC AAA GAG 3'
	5' CGA TAA <u>TCT AGT GAC</u> TTT TGT AAT TTG TGA ATG 3'
ca-akt	5' TAC CAG <u>ACT AGT AGC</u> GAC GTG GCT ATT GTG AA 3'
	5' AGA ATA <u>ACT AGT GGC</u> CGT GCC GCT GGC CGA GT 3'

Klonovací primery pro Pten a ca-Akt. Podtržené nukleotidy jsou SpeI rozpoznávané restriční místo, tučně uvedené nukleotidy označují genově specifickou část primeru, nezvýrazněné nukleotidy jsou náhodné hexamery přidané na 5' konec vzhledem k mechanismu nasednutí restriční endonukleázy.

Pro pomnožení pBSK vektorů obsahujících Pten-mCherry (pBSK-mCHERRY:PTEN) a ca-Akt-Gfp (pBSK-eGFP:CA-AKT1) byly využity bakterie kmene Escherichia coli (One Shot® TOP10 E. coli, Invitrogen). Po transformaci konstruktů elektroporací byly bakterie nejprve kultivovány při 37°C přes noc na misce s tuhým LB médiem (díky agaru), obsahujícím ampicilin (koncentrace zásobního roztoku 100 mg/1ml H₂O, kterého bylo použito 1μl/1ml média) - klony nesoucí vektor byly selektovány na základě ampicilinové rezistence. Nejprve byly vyselektované klony kultivovány 3 hod v tekutém LB médiu s ampicilinem a u kultur byla testována přítomnost pBSK se správně orientovaným úsekem cDNA (použita PCR s horním (upper) primerem proti C konci eGfp v případě ca-Akt nebo proti T3 promotoru v případě Pten, jako spodní (lower) primer byl použit klonovací primer. Pozitivní kultury byly přes noc pomnoženy kultivací v tekutém LB médiu také s ampicilinem. Následně z nich byl pomocí GenElute™ High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit (Sigma) izolován vektor, který byl ještě otestován PCR reakcí s klonovacími primery. Ověření identity inzertu bylo provedeno osekvenováním celého inzertu.

3.4 Příprava mRNA

mRNA byla syntetizována z vektorů pBSK-mCHERRY:PTEN a pBSK-eGFP:CA-AKT1, jejichž příprava je popsána v úseku DNA klonování, kultivace bakterií. Tyto vektory byly linearizovány AscI nukleázou. Po přečištění byla provedena in vitro transkripce použitím

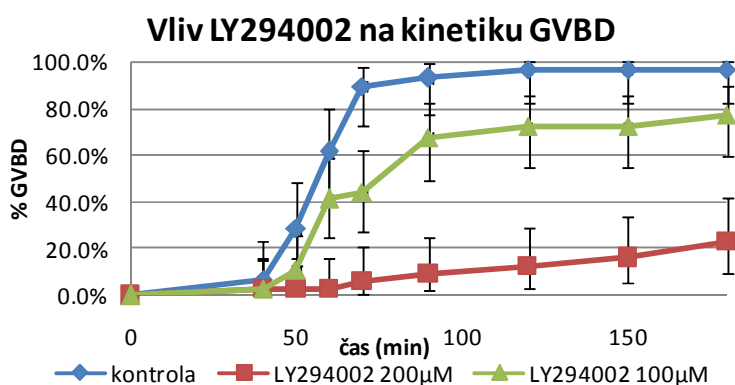
kitu mMESSAGE mMACHINE® T3 Kit (Ambion) a mRNA byly v přímé návaznosti na in vitro transkripci polyadenylovány pomocí Poly(A) Tailing Kit (Ambion). Posledním krokem v přípravě mRNA bylo jejich přečištění kitem RNeasy Mini Kit (Qiagen).

4 Výsledky

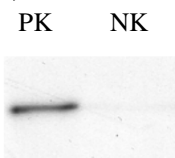
Ke studiu role PI3K-PKB signální dráhy byl nejprve sledován efekt inhibice celé rodiny PI3K kináz pan-PI3K inhibitorem LY294002. Kultivace oocytů s LY294002 v koncentracích 100 μ M a 200 μ M vede k průkazně opožděnému znovuzahájení meiózy, hodnocenému jako kinetika GVBD (v čase 70 min bylo pro koncentraci 100 μ M $p=0,0002$, pro 200 μ M LY294002 bylo $p=0,0000$), jak už bylo popsáno dříve, společně s inhibicí PKB aktivity (Obr. č. 1a) (Kalous, Solc et al. 2006). V souladu s těmito výsledky je inhibice fosforylace PKB na Ser473 a Thr308 u oocytů kultivovaných ve 150 μ M LY294002 (Obr. č. 1c a d) v porovnání s nárůstem fosforylace PKB na obou místech u kontrolních (GVBD) oocytů (mražených v čase, kdy jich cca 50% prošlo GVBD). (Obr. č.1e) 150 μ M koncentrace byla použita místo 200 μ M z důvodu ovlivnění dlouhodobější viability oocytů vyšší koncentrací LY294002. Při srovnání s oocyty v GV stádiu (tzv. GV oocyty) byla u kontrolních oocytů fosforylace 4,4krát vyšší na Ser473 a 2,3krát zvýšená pro Thr308, zatímco v oocytech kultivovaných s LY294002 byla fosforylace PKB stejná nebo dokonce nižší (intenzita fosforylace Ser473 byla 0,5 a pro Thr308 0,9 násobek intenzity fosforylace GV oocytů).

Obr. č. 1

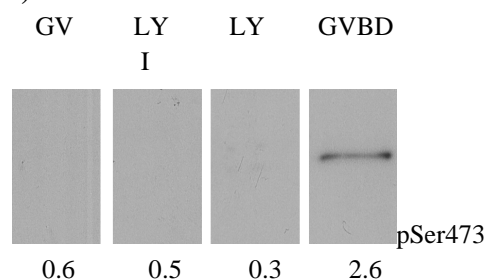
a)



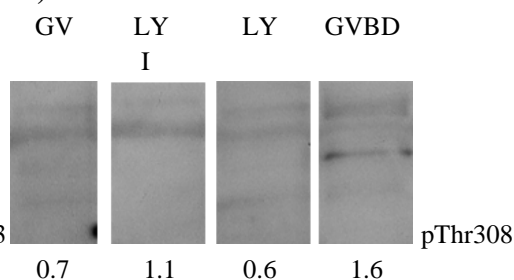
b)

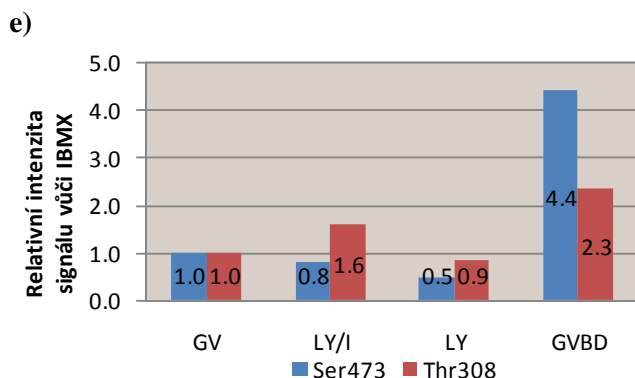


c)



d)



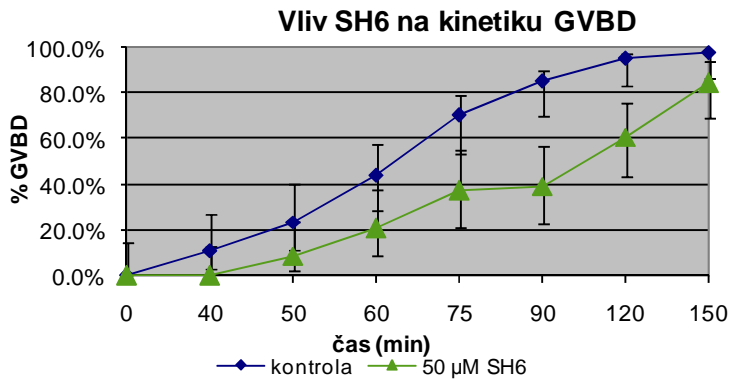


Obr. č. 1 Kinetika znovuzahájení meiózy oocytů a PKB fosforylace po inhibici PI3K-superrodiny. **a)** Procento GVBD v oocytech kultivovaných v M16 médiu samotném (kontrola) a v M16 médiu se 100 μ M nebo 200 μ M pan-PI3K inhibitorem LY294002. **b)** Příklad pozitivní (PK) a negativní kontroly (NK) fosforylace PKB na Ser473. Jako pozitivní kontrola byly použity fibroblasty kultivované v médiu s 10% FCS, fibroblasty kultivované 36 hod v médiu s 0,2% FCS byly použity jako negativní kontrola. Signál fosforylace Thr308 byl analogický, data jsou reprezentativní pro kontroly všech uváděných western blotů, a proto nejsou dále zobrazována. **c)** a **d)** Fosforylace PKB na Ser473 (**c)**) a Thr308 (**d)**). Po 1hod preinkubaci v M16 médiu se 100 μ M IBMX (GV) a M16 médiu se 100 μ M IBMX a 150 μ M LY294002 (LY/I) byly zamrazeny oocyty v GV stádiu; dále byly oocyty po 1 hod preinkubaci kultivované v M16 médiu se 150 μ M LY294002 (LY) a M16 médiu samotném (GVBD) a zamrazeny v čase, kdy cca 50% oocytů kultivovaných v M16 médiu dosáhlo GVBD (v tomto čase bylo v LY cca 20% GVBD). V každé skupině je 50 oocytů/fosforylační místo. Hodnoty níže odpovídají podílu intenzity signálu jednotlivých bandů na průměrné intenzitě. **e)** Grafické znázornění změn fosforylace PKB na Ser473 a Thr308 během znovuzahájení meiózy (GVBD) a po ošetření 150 μ M LY294002 samostatně (LY) anebo v kombinaci se 100 μ M IBMX (LY/I). Jako základní hodnota (tj. 1) byla zvolena intenzita fosforylace GV oocytů (GV skupina).

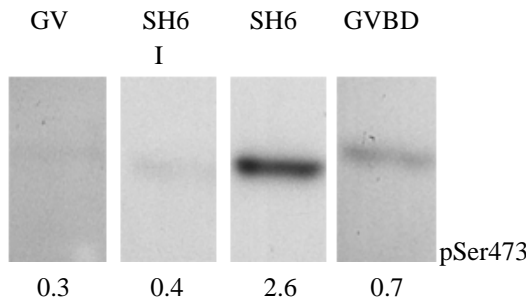
Dalším použitým inhibitorem byl SH6. SH6 je syntetický analog fosfatidylinositolů, který se ale neváže k membráně, protože nemá lipidovou kotvu. Proto SH6 působí jako tzv. PKB inhibitor, tím, že kompetuje s buňce vlastními PtdInsP₃ o vazbu na PH doménu PKB. Oocyty kultivované s 50 μ M SH6 zrály signifikantně pomaleji oproti kontrolním oocytům ($p=0,0000$ v čase 90 min). (Obr. č. 2a) Vliv SH6 ve stejné koncentraci na fosforylaci PKB na Ser473 a Thr308 byl rozdílný. Fosforylace Thr308 byla při kultivaci s SH6 nižší než fosforylace v kontrolních oocytech. (Obr. č. 2c a d) Oproti tomu signál fosforylovaného Ser473 byl v případě kultivace v inhibitoru („SH6“ oocyty) zvýšený (nárůst fosforylace byl u SH6 oocytů 10,3-násobný a u kontrol 2,9krát vyšší v porovnání s GV oocyty). (Obr. č. 2 b a d)

Obr. č. 2

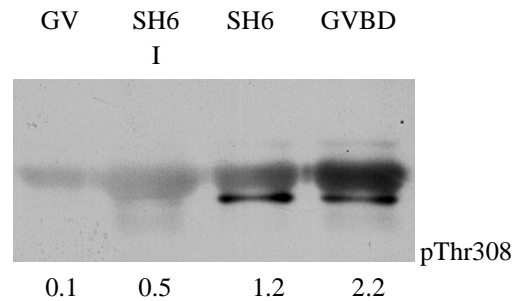
a)



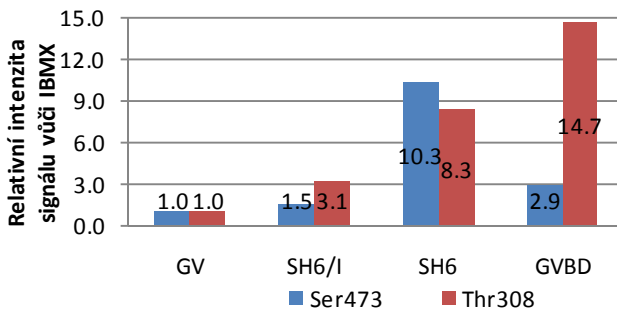
b)



c)



d)

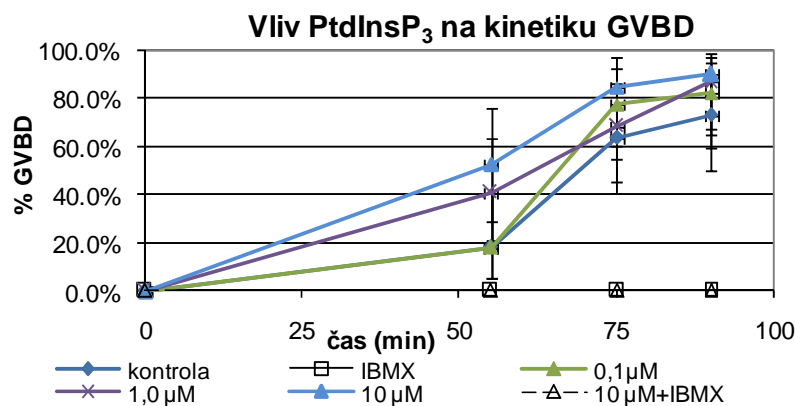


Obr. č. 2 Ovlivnění kinetiky GVBD a fosforylace PKB SH6 inhibitorem. **a)** Procento GVBD v oocytech kultivovaných v M2 médiu samotném (kontrola) a v M2 médiu s 50μM SH6. **b)** a **c)** Fosforylace PKB na Ser473 (**b)**) a Thr308 (**c)**). Po 1hod preinkubaci v M2 médiu se 100μM IBMX (GV) a M2 médiu s 100μM IBMX a 50μM SH6 (SH6/I) byly zamrazeny oocyty v GV stádiu; dále byly oocyty po 1 hod preinkubaci kultivované v M2 médiu s 50μM SH6 (SH6) a M2 médiu samotném (GVBD) a zamrazeny v čase, kdy cca 50% oocytů kultivovaných v M2 médiu dosáhlo GVBD. V každé skupině je 50 oocytů/fosforylační místo. Hodnoty níže odpovídají podílu intenzity signálu jednotlivých bandů na průměrné intenzitě. **d)** Grafické znázornění změn fosforylace PKB na Ser473 a Thr308 během znovuzahájení meiózy (GVBD) a po ošetření 50μM SH6 samotným (SH6) anebo v kombinaci se 100μM IBMX (SH6/I). Jako základní hodnota (tj. 1) byla zvolena intenzita fosforylace GV oocytů (GV skupina).

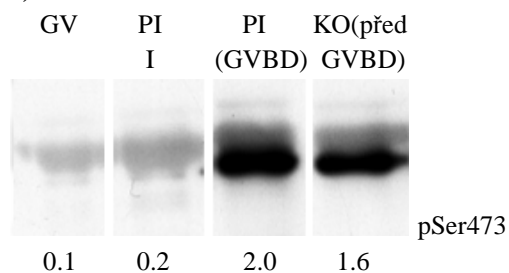
Syntetické PtdInsP₃ (dále jen PtdInsP₃) jsou narozdíl od SH6 dipalmitoylovány, mimikují tedy buněčné fosfoinositidy. 1μM a 10μM PtdInsP₃ urychlují znovuzahájení meiózy oocytů v závislosti na použité koncentraci (v čase 55 min bylo pro 1μM koncentraci p=0,1854 a pro 10μM PtdInsP₃ bylo p=0,0262), ovšem ani 10μM PtdInsP₃ nepřekonaly blok zrání oocytů fosfodiesterázovým inhibitorem (IBMX). (Obr. č. 3a) Vzhledem k pozitivnímu ovlivnění kinetiky GVBD fosfatidylinositolfosfáty byly oocyty na biochemickou analýzu PKB fosforylace mražené v čase, kdy dosáhlo GVBD cca 50% oocytů kultivovaných v PtdInsP₃, nikoliv v kontrole. U těchto oocytů byla fosforylace PKB na Ser473 v porovnání s GV oocyty zvýšená, stejně jako u oocytů kultivovaných v samotném kultivačním médiu. (Obr. č. 3b a d) K nárůstu fosforylace Thr308 oproti GV oocytům došlo pouze u oocytů kultivovaných v PtdInsP₃ (3,1 násobek intenzity fosforylace GV oocytů). (Obr. č. 3c a d)

Obr. č. 3

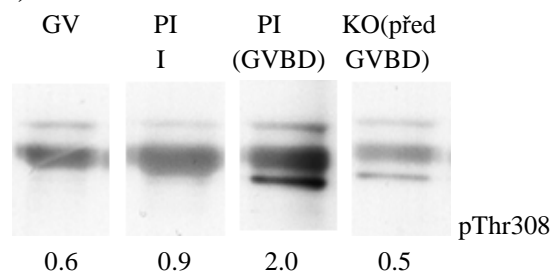
a)

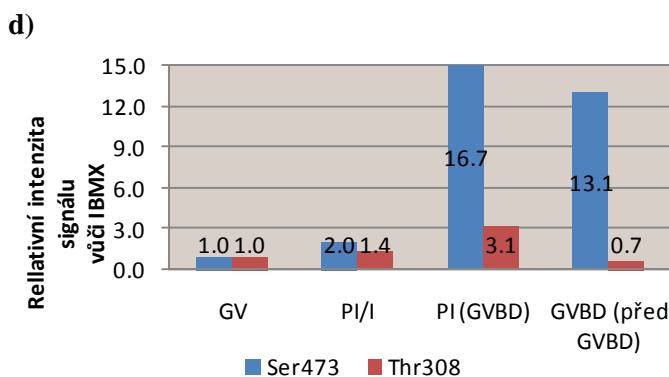


b)



c)



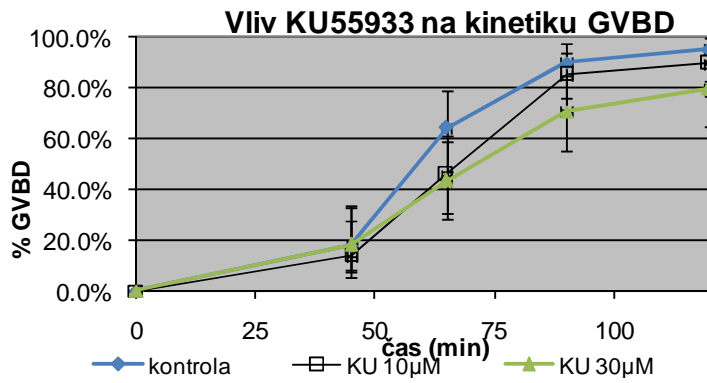


Obr. č. 3 Vliv PtdIns(3,4,5)P₃ na kinetiku GVBD a fosforylaci PKB. **a)** Procento GVBD v oocytech kultivovaných v M2 médiu samotném (kontrola) a v M2 médiu s 1μM nebo 10μM PtdInsP₃. **b) a c)** Fosforylace PKB na Ser473 (**b)**) a Thr308 (**c**). Po 1,5 hod preinkubaci v M2 médiu se 100μM IBMX (GV) a M2 médiu se 100μM IBMX a 1μM PtdInsP₃ (PI/I) byly zamraženy oocyty v GV stádiu; dále byly oocyty po 1,5 hod preinkubaci kultivované v M2 médiu s 1μM PtdInsP₃ (PI) a M2 médiu samotném (GVBD) a zamraženy v čase, kdy cca 50% oocytů kultivovaných v 1μM PtdInsP₃ dosáhlo GVBD. V každé skupině je 50 oocytů/fosforylační místo. Hodnoty níže odpovídají podílu intenzity signálu jednotlivých bandů na průměrné intenzitě. **d)** Grafické znázornění změn fosforylace PKB na Ser473 a Thr308 během zrání (GVBD-před GVBD) a po ošetření 1μM PtdInsP₃ samostatně (PI-GVBD) anebo v kombinaci se 100μM IBMX (PI/I). Jako základní hodnota (tj. 1) byla zvolena intenzita fosforylace GV oocytů (GV skupina).

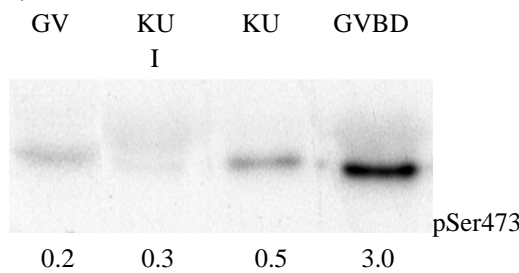
Po provedení výše popsaných experimentů zaměřených spíše na změnu PI3K signalizace obecně, bylo přistoupeno k inhibici potenciální Ser473 kinázy – ATM. KU55933, inhibitor ATM, neměl na znovuzahájení meiózy signifikantní vliv bez ohledu na použitou koncentraci (10μM a 30μM; v čase 65 min bylo pro 10μM KU55933 p=0,1226 a pro koncentraci 30μM bylo p=0,0782). (Obr. č. 4a) Podobně tomu bylo u fosforylace PKB na Thr308 – při kultivaci oocytů v 30μM KU55933 byla intenzita signálu pouze slabě zesílena oproti kontrolním oocytům. (Obr. č. 4c a d) Fosforylace Ser473 byla zráním oocytů v 30μM KU55933 výrazně redukována. (Obr. č. 4b a d)

Obr. č. 4

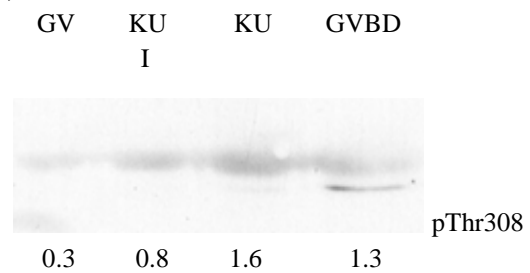
a)



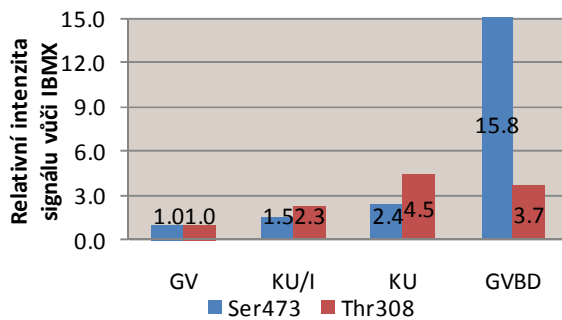
b)



c)



d)



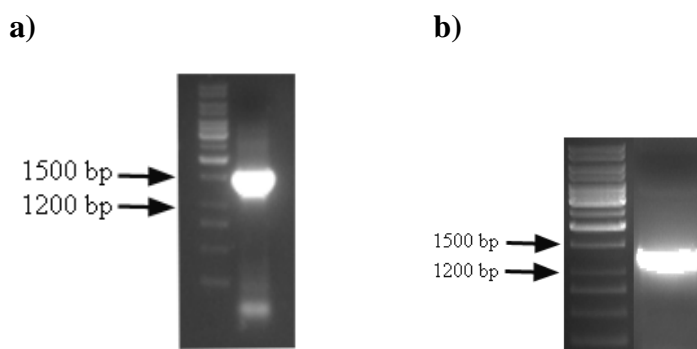
Obr. č. 4 Vliv ATM inhibice na kinetiku znovuzahájení meiózy a PKB fosforylaci. **a)** Procento GVBD v oocytech kultivovaných v M16 médiu samotném (kontrola) a v M16 médiu s 30µM ATM inhibitorem KU55933. **b)** a **c)** Fosforylace PKB na Ser473 (**b)**) a Thr308 (**c)**). Po 2 hod preinkubaci v M16 médiu se 100µM IBMX (GV) a M16 médiu se 100µM IBMX a 30µM KU (KU/I) byly zamraženy oocyty v GV stádiu; dále byly oocyty po 2 hod preinkubaci kultivované v M16 médiu s 30µM KU55933 (KU) a M16 médiu samotném (GVBD) a zamraženy v čase, kdy cca 50% oocytů kultivovaných M16 médiu dosáhlo GVBD. V každé skupině je 50 oocytů/fosforylační místo. Hodnoty níže odpovídají podílu intenzity signálu jednotlivých bandů na průměrné intenzitě. **d)** Grafické znázornění změn fosforylace PKB na Ser473 a Thr308 během zrání (GVBD) a po ošetření 30µM KU55933 samostatně (KU) anebo v kombinaci se 100µM IBMX (KU/I). Jako základní hodnota (tj. 1) byla zvolena intenzita fosforylace GV oocytů (GV skupina).

Druhým cílem diplomové práce byla příprava mRNA kódujících fúzní proteiny PTEN-mCHERRY a CA-Akt-GFP, které budou využity pro mikroinjekce v dalších experimentech,

týkajících se úlohy PKB při znovuzahájení meiózy. Konstitutivní aktivitu PKB zajišťují aktivační záměny klíčových PKB fosforylačních míst Thr308 a Ser473 za Asp, kódované v sekvenci mRNA.

Výchozím bodem v přípravě mRNA bylo vytvoření vektorů pro in vitro transkripci. Z pCMV plazmidů nesoucích Pten a ca-Akt cDNA byly PCR reakcí s klonovacími primery připraveny cDNA fragmenty obsahující kromě kódující sekvence také SpeI restriční místo. (Obr. č. 5a a b) Amplifikace fragmentů byla ověřena elektroforézou PCR reakce a fragmenty byly získány z vyříznuté odpovídající části gelu.

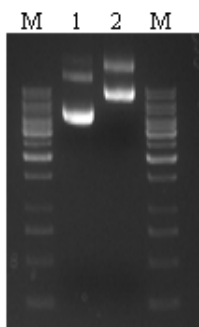
Obr. č. 5



Obr. č. 5 PCR produkt s vnesenými restričními místy. **a)** a **b)** Fragmenty ca-Akt cDNA (**a**) o velikosti 1466bp a Pten cDNA (velikost 1235bp) (**b**) amplifikované s využitím primerů obsahujících SpeI restriční místo (viz Materiál a metody).

Jako vektor vhodný pro in vitro transkripci byl použit pBluescript (schéma viz Obr. č. 1 v části Materiál a metody), respektive jeho modifikované varianty, ve kterých se již nachází sekvence pro eGFP anebo mCHERRY fluorescenční protein. Před samotným vkládáním fragmentů bylo nutné příslušný vektor naštěpit SpeI restriční endonukleázou a štěpení zkontrolovat elektroforézou restriční reakce. To zároveň umožnilo izolaci pouze naštěpeného vektoru, který na gelu domigruje dále než neštěpený vektor použitý jako kontrola. (Obr. č. 6) Restrikcí PCR produktů byly vytvořeny kohezní konce umožňující vložení do vektoru. Pten fragment byl ligován do pBSK-mCherry a ca-Akt fragment do pBSK-Gfp varianty původního vektoru.

Obr. č. 6 pBSK vektor

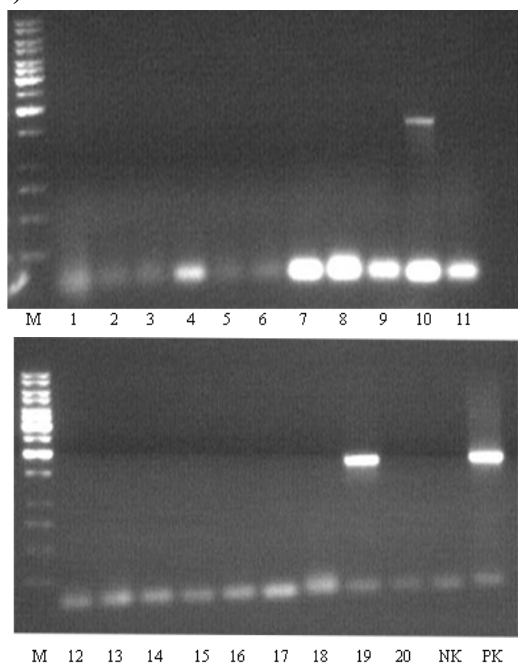


Obr. č. 6 pBSK vektor štěpený před ligací SpeI restriční endonukleázou (1) a kontrolní neštěpený pBSK (2).

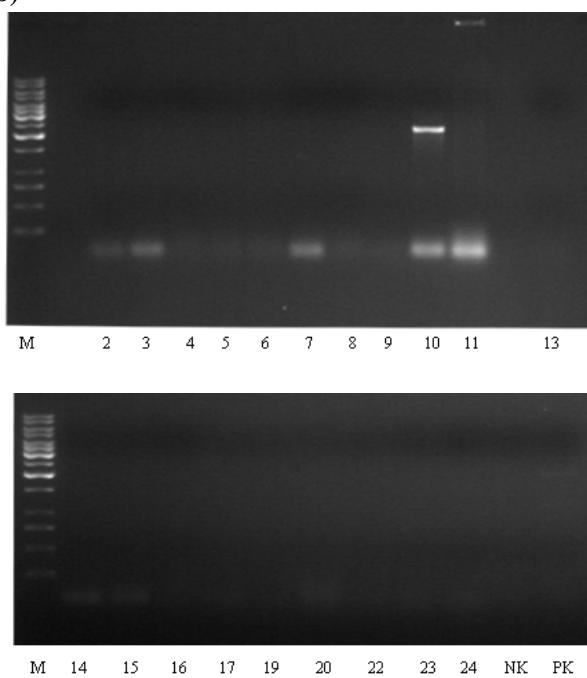
Vyčištěná ligační směs byla elektroporována do bakterií *E. coli*. Kultivací na misce s tuhým médiem s ampicilinem bylo možné druhý den odebrat vzorky jednotlivých transformovaných kolonií. Tyto kolonie byly pomnoženy a testovány na přítomnost vektoru se správně vloženým PCR produktem. Z kolonií transformovaných pBSK-eGFP:CA-AKT1 byly pozitivní kolonie 10 a 19, vzhledem k intenzitě signálu byla ke kultivaci přes noc a namnožení vektoru zvolena kolonie 19. (Obr. č. 7a) Pro testování pBSK-mCHERRY:PTEN transformovaných kolonií byly vzhledem k vyššímu počtu prvotně odebraných kolonií zvoleny jen kolonie se solidním nárůstem kultury. Jako kolonie obsahující vektor se správně vloženou cDNA detekována kolonie 10. (Obr. č. 7b) Z vybraných kolonií kultivovaných přes noc byly izolovány pBSK-eGFP:CA-AKT1 a pBSK-mCHERRY:PTEN vektory použité pro in vitro transkripci. Před vlastní in vitro transkripcí byly vektory linearizovány AscI štěpením. V průběhu přípravy mRNA byly odebírány alikvóty jako kontrola transkripce, polyadenylace a také konečné, vyčištěné mRNA. (Obr. č. 8a a b)

Obr. č. 7 Test transformovaných kolonií

a)



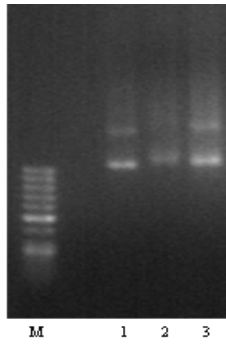
b)



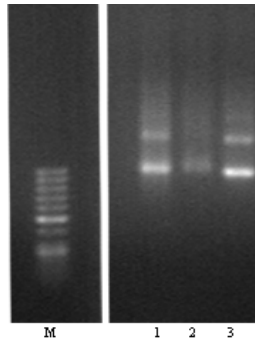
Obr. č. 7 Test transformovaných kolonií. **a)** a **b)** Jednotlivé kolonie bakterií transformovaných pBSK-eGFP:CA-AKT1 (**a)**) a pBSK-mCHERRY:PTEN (**b)**) byly pomnoženy 3 hod kultivací v tekutém LB médiu s ampicilinem a 2 μ l kultury použity jako templát pro PCR reakci testující přítomnost pBSK vektoru se správně orientovaným PCR fragmentem. V případě pBSK-mCHERRY:PTEN byly vzhledem k vyššímu počtu kolonií pro testování vybrány jen některé z pomnožovaných kultur. NK je negativní kontrola, tedy PCR reakce, ve které byla jako templát použita destilovaná voda (2 μ l; Ambion), PK označuje pozitivní kontrolu, tedy PCR reakci s 2 μ l nevyčištěné ligační směsi použité jako templát.

Obr. č. 8

a)



b)



Obr. č. 8 Fáze syntézy ca-Akt-Gfp a Pten-mCherry mRNA. **a)** a **b)** Z linearizovaných vektorů byly nasyntetizovány mRNA kódující eGFP-CA-AKT (**a)**) a mCHERRY-PTEN (**b)**) (1) Ty byly polyadenylovány (2) a přečištěny (3).

5 Diskuze

Význam PI3K-PKB signální dráhy při znovuzahájení meiózy myšimi oocyty byl již popsán (Kalous, Solc et al. 2006), a potvrzují ho i získané výsledky – opožděné GVBD po inhibici PI3K rodiny kináz pomocí LY294002 a naopak jeho urychlení v přítomnosti PtdInsP₃. (Obr. č. 1a a 3a) Data přináší především poznatky, týkající se mechanismu regulace PKB a funkčního významu Thr308 a Ser473 PKB fosforylace.

Fosforylace PKB na Thr308 a Ser473 jsou pravděpodobně na sobě nezávislé děje. Kultivace oocytů s biologicky neaktivním analogem fosfatidylinositolů redukuje fosforylací Thr308, což se buňka nejspíše snaží kompenzovat fosforylací PKB na Ser473, která je v přítomnosti SH6 výrazně zvýšená. (Obr. č. 2b, c a d) Oproti tomu významné snížení fosforylace PKB na Ser473 v důsledku inhibice ATM fosforylací Thr308 výrazně neovlivňuje. (Obr. č. 4b, c a d) Tato data tedy vyvrací původní teorii, že fosforylace Ser473 v HM doméně PKB vede, spolu s membránovou lokalizací PKB, k její interakci s PDK1, a tak umožňuje fosforylací PKB na Thr308 (Scheid and Woodgett 2003). Podle této teorie by inhibice fosforylace PKB na Ser473 měla vést k zablokování fosforylace Thr308 a tomu tak není - naopak bylo pozorované slabé zvýšení této fosforylace (Obr. č. 4c a d) Pravděpodobnější je jiný navrhovaný model PKB aktivace – vazba membránových lipidů k PH doméně PKB vede ke konformační změně, odhalující obě fosforylační místa a zároveň umožní kolokalizaci PKB s PDK1 (Brazil, Yang et al. 2004). Přímou závislost fosforylace Thr308 na membránových fosfoinositidech dosvědčuje její výrazný nárůst při kultivaci s PtdInsP₃ oproti kontrolním oocytům (Obr. č. 3c a d) a již zmíněná redukce fosforylace PKB na Thr308 fosfatidylinositolovým analogem kompetujícím s buněčnými fosfatidylinositoly o vazbu k PH doméně PKB. (Obr. č. 2c a d)

Vzhledem k urychlení znovuzahájení meiózy PtdInsP₃ byly oocyty v tomto typu experimentů mraženy v čase, kdy bylo GVBD pozorované u cca 50% oocytů kultivovaných s PtdInsP₃ (v ostatních experimentech byly oocyty mraženy podle zrání kontrolní skupiny). To je jasným vysvětlením nízké fosforylace (na úrovni GV oocytů) PKB na Thr308 v kontrolních oocytech kultivovaných v samotném médiu (Obr. č. 3c a d), výsledku odlišného od ostatních experimentů, ve kterých u kontrolních oocytů (zrajících pouze v médiu) fosforylace PKB na Thr308 a Ser473 vzrostla. Zajímavé je, že podobný efekt nebyl pozorován v případě fosforylace Ser473, která je oproti GV oocytům zvýšená jak u oocytů kultivovaných s PtdInsP₃ tak i bez nich. (Obr. č. 3b a d) Je možné, že k fosforylací PKB na Ser473 dochází dříve než na Thr308, což by bylo v souladu s nezávislostí fosforylace jednotlivých míst PKB. Na tuto nezávislost rovněž ukazuje detekce odlišné lokalizace PKB fosforylované na Thr308 a Ser473 (Kalous, Solc et al. 2006).

Pro aktivitu PKB ve vztahu k znovuzahájení meiózy je podstatná fosforylace na Thr308. Inhibice této fosforylace SH6 inhibitorem byla spojena s opožděním znovuzahájení meiózy (Obr. č. 2a a c), hyperaktivace této fosforylace pomocí syntetických PtdInsP₃ byla naopak spojena s urychlením GVBD. (Obr. č. 3b a d) Urychlení 1 μ M PtdInsP₃ bylo sice nesignifikantní, ovšem ani ošetření oocytů okadaikovou kyselinou (která inhibuje PP1A a PP2A, a způsobuje tak hyperfosforylaci PKB a zároveň překonává blok zrání oocytů fosfodiesterázovým inhibitorem) nevede ke statisticky významnému urychlení znovuzahájení meiózy (Kalous, Solc et al. 2006). Redukce fosforylace PKB na Thr308 tedy nebyla funkčně (v souvislosti s GVBD) kompenzována zvýšenou fosforylací na Ser473. (Obr. č. 2b) To, že Ser473 PKB fosforylace není pro znovuzahájení meiózy nezbytná ukazuje kinetika GVBD oocytů s výrazně nižší fosforylací PKB na Ser473 (při inhibici ATM) – tyto oocyty procházejí GVBD v časech srovnatelných s kontrolními oocyty. (Obr. č. 4a) Z těchto pozorování zároveň vyplývá, že pro aktivitu PKB ve vztahu ke znovuzahájení meiózy není nutná fosforylace na Ser473 a Thr308 zároveň, o čemž bylo původně uvažováno (Alessi and Cohen 1998).

Cílem diplomové práce bylo také pokusit se objasnit otázku identity PKB aktivační Ser473 kinázy (PDK2) na modelu myších oocytů. Přestože je Ser473K pravděpodobně buněčně specifická, společným jmenovatelem u různých buněčných linií je inhibice fosforylace PKB na Ser473 pan-PI3K inhibitorem LY294002 (Dong and Liu 2005). Také v oocytech kultivovaných s LY294002 byla fosforylace Ser473 téměř kompletně blokována oproti kontrolním oocytům. (Obr. č. 1b a d) Kultivace oocytů s SH6 inhibitorem fosforylaci PKB na Ser473 nesnížila. (Obr. č. 2b) Podstatou negativního efektu LY294002 na fosforylaci PKB v HM je proto spíše než narušení membránové lokalizace PKB, jeho inhibiční vliv na PI3K-příbuzné kinázy patřící do PI3K kinázové superrodiny. Potenciální Ser473K tedy pravděpodobně pochází z této skupiny PI3K-příbuzných kináz, zahrnujících např. DNA-PK, ILK, mTORC2 a ATM (Marone, Cmiljanovic et al. 2008). Pro počáteční test kandidátních PDK2 kináz v myších oocytech byla zvolena ATM. Jedním z důvodů tohoto výběru byla lokalizace Ser473 fosforylované PKB v oblasti jaderné membrány před GVBD (Kalous, Solc et al. 2006), a ATM je známa především jako jaderná kináza (možná je tu i souvislost s jaderným cyklem fosfoinositidů). Kinetika znovuzahájení meiózy byla ATM inhibitorem, KU55933, ovlivněna minimálně, stejně jako fosforylace PKB na Thr308, která byla pouze mírně zvýšena oproti kontrolním oocytům. (Obr. č. 4a, c a d) Ovšem fosforylace Ser473 byla u oocytů kultivovaných s KU55933 silně redukována oproti oocytům zrajícím v kultivačním médiu samotném. (Obr. č. 4b a d) Fosforylace PKB na Ser473 se tedy v myších oocytech účastní ATM kináza. Intenzita fosforylace na Ser473 byla ale i po ATM inhibici dvakrát vyšší než u GV oocytů, není tedy vyloučena existence a funkce ještě jiné Ser473K, než ATM. (Obr. č. 4d) Jak již bylo uvedeno, PKB fosforylovaná na Ser473 není podle získaných výsledků podstatná pro znovuzahájení meiózy. Vzhledem k asociaci této fosforylované PKB varianty s mikrotubuly dělicího vřetenka

v metafázích meiotického dělení (Kalous, Solc et al. 2006), je možný její význam v pozdějších fázích meiózy, které ale nebyly předmětem zájmu v této práci.

Základem dalších experimentů budou mikroinjekce již připravených mRNA, kódujících mCHERRY-PTEN a eGFP-CA-AKT a sledování jejich vlivu na kinetiku GVBD. PTEN se v buňce účastní defosforylace $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, overeexprese PTEN tedy podle naší hypotézy významně sníží výskyt těchto fosfatidylinositolů v buňce, což se projeví inhibicí PI3K-PKB signální dráhy a opožděným zráním oocytů. Tento efekt overexprese PTEN by měl být zvrátitelný souběžnou expresí exogenní CA-AKT. Podle výsledků těchto experimentů je možné provést experimenty založené na mikroinjekci Pten a Cdc25b mRNA. CDC25B totiž při poklesu cAMP v buňce translokuje do jádra (Pirino, Wescott et al. 2009) a CDC25B lokalizace se tak dá použít jako nepřímý marker cAMP poklesu vlivem PDE3A. PDE3A je pravděpodobně aktivovaná PKB - experimenty studující přímo vztah PKB-PDE3A byly prováděny na oocytech Xenopa (Andersen, Roth et al. 1998) i myši (Han, Vaccari et al. 2006). Navrhnuté experimenty by tedy mohly detailněji objasnit funkci PKB v signální dráze vedoucí k aktivaci cyklin B-CDK1 komplexu a znovuzahájení meiózy.

6 Souhrn

Pro znovuzahájení meiózy myších oocytů je nezbytná aktivace komplexu cyklin B-CDK1, které se nepřímo účastní PI3K-PKB signální dráha. Blok v profázi I je udržován vysokou hladinou cAMP, které spouští signalizaci udržující cyklin B-CDK1 komplex neaktivní. V procesu uvolnění bloku a aktivace CDK1 je klíčová aktivita PDE3A, štěpící cAMP. Aktivaci PDE3A v myších oocytech zprostředkovává fosforylace PKB (Akt).

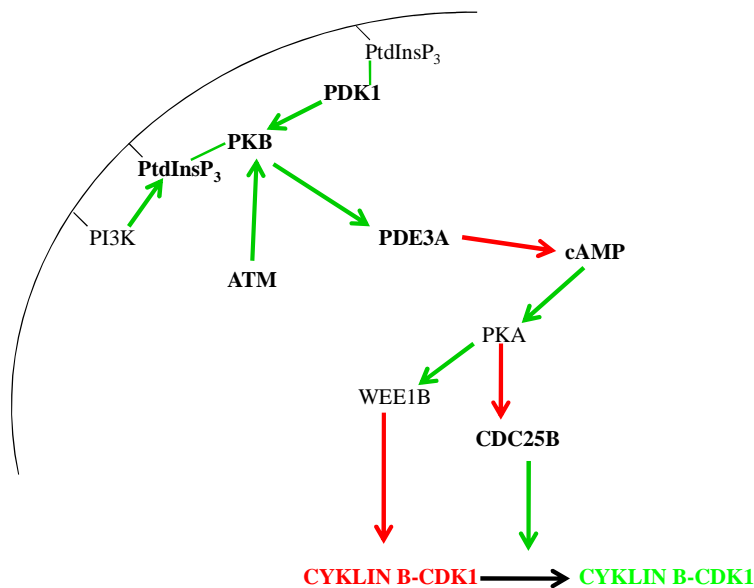
Aktivace PKB je spojena s fosforylací Thr308 a Ser473 – tyto fosforylace jsou pravděpodobně na sobě nezávislé (minimálně v námi použitém modelu). Při redukci fosforylace Thr308 není inhibována fosforylace Ser473 a naopak. Fosforylace Thr308 je závislá na PtdInsP₃, který se váže k PH doméně PKB a to vede k fosforylaci Thr308. Asociace s membránovými PtdInsP₃ není podstatná pro fosforylaci PKB na Ser473.

Pro znovuzahájení meiózy je důležitá fosforylace PKB na Thr308. Oocyty, u kterých byla tato fosforylace nižší, zrají výrazně pomaleji oproti kontrolním oocytům, ale oocyty s inhibovanou fosforylací PKB pouze na Ser473 mají kinetiku GVBD srovnatelnou s kontrolními oocyty.

Kináza fosforylující PKB na Ser473 je nejspíše buněčně specifická a pochází ze skupiny PI3K-příbuzných kináz. Fosforylace Ser473 je inhibována pan-PI3K inhibitorem i u jiných buněčných modelů, v myších oocytech je ale Ser473 fosforylace redukována také ATM inhibitorem, KU55933. Na modelu myších oocytů je tedy Ser473 kinázou ATM kináza.

Zjištěná fakta jsou zahrnuta v navrhovaném modelu regulace PKB v kontextu znovuzahájení meiózy myších oocytů. (Obr. č. 1)

Obr. č. 1: PI3K-PKB role při znovuzahájení meiózy myších oocytů a PKB aktivace



Aktivace fosfoinositid-3-kináz (PI3K) má za následek vznik fosfatididylinositol-3,4,5-trifosfátů (PtdIns(3,4,5)P₃). PtdInsP₃ umožní membránovou lokalizaci protein kinázy B (PKB) a fosfoinositid-dependentní kinázy 1 (PDK1) a zároveň změnu konformace PKB, umožňující aktivační fosforylace. PDK1 fosforyluje PKB na Thr308, na Ser473 je PKB fosforylovaná ATM kinázou. Aktivovaná PKB pozitivně fosforyluje fosfodiesterázu 3A (PDE3A), která štěpí cAMP. cAMP je nezbytné pro udržení prvního meiotického bloku v profázi I – aktivuje protein kinázu A (PKA), jejíž signalizace vede k inhibici cyklin B-CDK1 komplexu. PKA totiž aktivačně fosforyluje negativní CDK1 kinázu Wee1B a zároveň suprimuje CDC25B fosfatázu. Štěpením cAMP mizí negativní vliv PKA, CDC25B defosforyluje cyklin B-CDK1 komplex, který se tak stává aktivním.

Seznam citované literatury

- Alessi, D. R. and P. Cohen (1998). "Mechanism of activation and function of protein kinase B." *Curr Opin Genet Dev* **8**(1): 55-62.
- Andersen, C. B., R. A. Roth, et al. (1998). "Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes." *J Biol Chem* **273**(30): 18705-8.
- Araki, K., K. Naito, et al. (1996). "Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase." *Biol Reprod* **55**(6): 1315-24.
- Ashkenazi, H., X. Cao, et al. (2005). "Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response." *Endocrinology* **146**(1): 77-84.
- Auger, K. R., L. A. Serunian, et al. (1989). "PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells." *Cell* **57**(1): 167-75.
- Auld, C. A., C. D. Caccia, et al. (2007). "Hormonal induction of adipogenesis induces Skp2 expression through PI3K and MAPK pathways." *J Cell Biochem* **100**(1): 204-16.
- Baker, D. J., M. M. Dawlaty, et al. (2007). "Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex." *Cell Mol Life Sci* **64**(5): 589-600.
- Boehme, K. A., R. Kulikov, et al. (2008). "p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7785-90.
- Boonstra, J. (2003). "Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle." *J Cell Biochem* **90**(2): 244-52.
- Brazil, D. P., Z. Z. Yang, et al. (2004). "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts." *Trends Biochem Sci* **29**(5): 233-42.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.
- Brunet, S. and B. Maro (2005). "Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space." *Reproduction* **130**(6): 801-11.
- Cantrell, D. (2002). "Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes." *Semin Immunol* **14**(1): 19-26.
- Castrillon, D. H., L. Miao, et al. (2003). "Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a." *Science* **301**(5630): 215-8.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-9.
- Currie, R. A., K. S. Walker, et al. (1999). "Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1." *Biochem J* **337** (Pt 3): 575-83.
- De La Fuente, R., M. J. O'Brien, et al. (1999). "Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes." *Hum Reprod* **14**(12): 3060-8.
- de Vant'ery, C., A. C. Gavin, et al. (1996). "An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence." *Dev Biol* **174**(2): 335-44.
- Desai, D., H. C. Wessling, et al. (1995). "Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2." *Mol Cell Biol* **15**(1): 345-50.
- Diehl, J. A., M. Cheng, et al. (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." *Genes Dev* **12**(22): 3499-511.
- Dierich, A., M. R. Sairam, et al. (1998). "Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13612-7.
- Dong, L. Q. and F. Liu (2005). "PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**(2): E187-96.
- Donzelli, M. and G. F. Draetta (2003). "Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation." *EMBO Rep* **4**(7): 671-7.

- Downs, S. M., S. A. Daniel, et al. (1989). "Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity." Gamete Res **23**(3): 323-34.
- Doxsey, S., W. Zimmerman, et al. (2005). "Centrosome control of the cell cycle." Trends Cell Biol **15**(6): 303-11.
- Dutertre, S., M. Cazales, et al. (2004). "Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition." J Cell Sci **117**(Pt 12): 2523-31.
- Fang, G., H. Yu, et al. (1998). "Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1." Mol Cell **2**(2): 163-71.
- Feng, J., J. Park, et al. (2004). "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **279**(39): 41189-96.
- Fiorenza, M. T., S. Torcia, et al. (2008). "TCL1 promotes blastomere proliferation through nuclear transfer, but not direct phosphorylation, of AKT/PKB in early mouse embryos." Cell Death Differ **15**(2): 420-2.
- Fruman, D. A. (2004). "Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling." Curr Opin Immunol **16**(3): 314-20.
- Galaktionov, K., X. Chen, et al. (1996). "Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc." Nature **382**(6591): 511-7.
- Gwack, Y., S. Feske, et al. (2007). "Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes." Cell Calcium **42**(2): 145-56.
- Halaby, M. J., J. C. Hibma, et al. (2008). "ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells." Cell Signal **20**(8): 1555-63.
- Han, S. J. and M. Conti (2006). "New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate." Cell Cycle **5**(3): 227-31.
- Han, S. J., S. Vaccari, et al. (2006). "Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation." EMBO J **25**(24): 5716-25.
- Hansen, D. V., A. V. Loktev, et al. (2004). "Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1." Mol Biol Cell **15**(12): 5623-34.
- Hashimoto, N., N. Watanabe, et al. (1994). "Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice." Nature **370**(6484): 68-71.
- Hickson, I., Y. Zhao, et al. (2004). "Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM." Cancer Res **64**(24): 9152-9.
- Hirota, T., N. Kunitoku, et al. (2003). "Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells." Cell **114**(5): 585-98.
- Hochegger, H., A. Klotzbucher, et al. (2001). "New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation." Development **128**(19): 3795-807.
- Homer, H. A., A. McDougall, et al. (2005). "Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes." Genes Dev **19**(2): 202-7.
- Horner, K., G. Livera, et al. (2003). "Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest." Dev Biol **258**(2): 385-96.
- Hoshino, Y. and E. Sato (2008). "Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes." Dev Biol **314**(1): 215-23.
- Hresko, R. C. and M. Mueckler (2005). "mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **280**(49): 40406-16.
- Chen, M. S., J. Hurov, et al. (2001). "Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase." Mol Cell Biol **21**(12): 3853-61.
- Jackman, M., C. Lindon, et al. (2003). "Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase." Nat Cell Biol **5**(2): 143-8.
- Jeganathan, K. B., L. Malureanu, et al. (2005). "The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation." Nature **438**(7070): 1036-9.
- Jin, X., C. S. Han, et al. (2005). "Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction." Mol Reprod Dev **70**(1): 82-90.

- Jones, S. M. and A. Kazlauskas (2000). "Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells." *Oncogene* **19**(49): 5558-67.
- Juntilla, M. M. and G. A. Koretzky (2008). "Critical roles of the PI3K/Akt signaling pathway in T cell development." *Immunol Lett* **116**(2): 104-10.
- Kalous, J., P. Solc, et al. (2006). "PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes." *Biol Cell* **98**(2): 111-23.
- Kanatsu-Shinohara, M., R. M. Schultz, et al. (2000). "Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes." *Biol Reprod* **63**(6): 1610-6.
- Kandel, E. S., J. Skeen, et al. (2002). "Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage." *Mol Cell Biol* **22**(22): 7831-41.
- Kang, D., J. Chen, et al. (2002). "The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition." *J Cell Biol* **156**(2): 249-59.
- Kashiwada, M., P. Lu, et al. (2007). "PIP3 pathway in regulatory T cells and autoimmunity." *Immunol Res* **39**(1-3): 194-224.
- Kennedy, S. G., A J Wagner, et al. (1997). "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal." *Genes & Dev.* **11**(6): 701-713.
- Kieffer, I., C. Lorenzo, et al. (2007). "Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants." *Oncogene* **26**(57): 7847-58.
- King, F. W., J. Skeen, et al. (2004). "Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt." *Cell Cycle* **3**(5): 634-7.
- King, R. W., J. M. Peters, et al. (1995). "A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B." *Cell* **81**(2): 279-88.
- Kishimoto, T. (2003). "Cell-cycle control during meiotic maturation." *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 654-63.
- Kissel, H., I. Timokhina, et al. (2000). "Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses." *EMBO J* **19**(6): 1312-26.
- Kotani, S., S. Tugendreich, et al. (1998). "PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression." *Mol Cell* **1**(3): 371-80.
- Koyasu, S. (2003). "The role of PI3K in immune cells." *Nat Immunol* **4**(4): 313-9.
- Kozikowski, A. P., H. Sun, et al. (2003). "Novel PI analogues selectively block activation of the pro-survival serine/threonine kinase Akt." *J Am Chem Soc* **125**(5): 1144-5.
- Kramer, A., N. Mailand, et al. (2004). "Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase." *Nat Cell Biol* **6**(9): 884-91.
- Lapetina, E. G., M. M. Billah, et al. (1981). "The phosphatidylinositol cycle and the regulation of arachidonic acid production." *Nature* **292**(5821): 367-9.
- Lawlor, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2903-10.
- Ledan, E., Z. Polanski, et al. (2001). "Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation." *Dev Biol* **232**(2): 400-13.
- Liang, J. and J. M. Slingerland (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." *Cell Cycle* **2**(4): 339-45.
- Liang, J., J. Zubovitz, et al. (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." *Nat Med* **8**(10): 1153-60.
- Lim, M. A., C. K. Kikani, et al. (2003). "Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): a potential regulatory mechanism for PDK-1 function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14006-11.
- Lincoln, A. J., D. Wickramasinghe, et al. (2002). "Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation." *Nat Genet* **30**(4): 446-9.
- Lindqvist, A., H. Kallstrom, et al. (2005). "Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome." *J Cell Biol* **171**(1): 35-45.
- Liu, L., S. Rajareddy, et al. (2007). "Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a." *Development* **134**(1): 199-209.

- Lu, T. L., J. L. Chang, et al. (2007). "Tumor spectrum, tumor latency and tumor incidence of the Pten-deficient mice." *PLoS ONE* **2**(11): e1237.
- Lynch, D. K., C. A. Ellis, et al. (1999). "Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism." *Oncogene* **18**(56): 8024-32.
- Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, et al. (2002). "Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability." *EMBO J* **21**(21): 5911-20.
- Mamillapalli, R., N. Gavrilova, et al. (2001). "PTEN regulates the ubiquitin-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(KIP1) through the ubiquitin E3 ligase SCF(SKP2)." *Curr Biol* **11**(4): 263-7.
- Marangos, P., E. W. Verschuren, et al. (2007). "Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APC(Cdh1)." *J Cell Biol* **176**(1): 65-75.
- Marone, R., V. Cmiljanovic, et al. (2008). "Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy." *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 159-85.
- Martelli, A. M., I. Faenza, et al. (2006). "Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis?" *Cell Signal* **18**(8): 1101-7.
- Masciarelli, S., K. Horner, et al. (2004). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility." *J Clin Invest* **114**(2): 196-205.
- McDonald, P. C., A. Oloumi, et al. (2008). "Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival." *Cancer Res* **68**(6): 1618-24.
- McManus, E. J. and D. R. Alessi (2002). "TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation." *Nat Cell Biol* **4**(9): E214-6.
- Mehlmann, L. M. (2005). "Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes." *Dev Biol* **288**(2): 397-404.
- Mehlmann, L. M., T. L. Jones, et al. (2002). "Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte." *Science* **297**(5585): 1343-5.
- Mumby, M. (2007). "PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor." *Cell* **130**(1): 21-4.
- Nourse, J., E. Firpo, et al. (1994). "Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin." *Nature* **372**(6506): 570-3.
- Obaya, A. J. and J. M. Sedivy (2002). "Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells." *Cell Mol Life Sci* **59**(1): 126-42.
- Patra, A. K., S. Y. Na, et al. (2004). "Active protein kinase B regulates TCR responsiveness by modulating cytoplasmic-nuclear localization of NFAT and NF-kappa B proteins." *J Immunol* **172**(8): 4812-20.
- Pene, F., Y. E. Claessens, et al. (2002). "Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma." *Oncogene* **21**(43): 6587-97.
- Persad, S., S. Attwell, et al. (2001). "Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343." *J Biol Chem* **276**(29): 27462-9.
- Peters, J. M. (2002). "The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond." *Mol Cell* **9**(5): 931-43.
- Peters, J. M. (2006). "The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 644-56.
- Pines, J. (1999). "Four-dimensional control of the cell cycle." *Nat Cell Biol* **1**(3): E73-9.
- Pirino, G., M. P. Wescott, et al. (2009). "Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes." *Cell Cycle* **8**(4): 665-70.
- Reddy, P., L. Liu, et al. (2008). "Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool." *Science* **319**(5863): 611-3.
- Reddy, P., L. Shen, et al. (2005). "Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development." *Dev Biol* **281**(2): 160-70.

- Reimann, J. D., B. E. Gardner, et al. (2001). "Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins." *Genes Dev* **15**(24): 3278-85.
- Reis, A., H. Y. Chang, et al. (2006). "APCcdh1 activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division." *Nat Cell Biol* **8**(5): 539-40.
- Reis, A., S. Madgwick, et al. (2007). "Prometaphase APCcdh1 activity prevents non-disjunction in mammalian oocytes." *Nat Cell Biol* **9**(10): 1192-8.
- Richard, F. J. (2007). "Regulation of meiotic maturation." *J Anim Sci* **85**(13 Suppl): E4-6.
- Richard, F. J., A. Tsafiriri, et al. (2001). "Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation." *Biol Reprod* **65**(5): 1444-51.
- Rodrigues, P., D. Limback, et al. (2008). "Oogenesis: Prospects and challenges for the future." *J Cell Physiol* **216**(2): 355-65.
- Sadler, S. E. and J. L. Maller (1987). "In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1." *J Biol Chem* **262**(22): 10644-50.
- Sakai, T., S. Li, et al. (2003). "Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation." *Genes Dev* **17**(7): 926-40.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-101.
- Sears, R., F. Nuckolls, et al. (2000). "Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability." *Genes Dev* **14**(19): 2501-14.
- Sears, R. C. and J. R. Nevins (2002). "Signaling networks that link cell proliferation and cell fate." *J Biol Chem* **277**(14): 11617-20.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-12.
- Shoji, S., N. Yoshida, et al. (2006). "Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20." *EMBO J* **25**(4): 834-45.
- Shtivelman, E. (2003). "Promotion of mitosis by activated protein kinase B after DNA damage involves polo-like kinase 1 and checkpoint protein CHFR." *Mol Cancer Res* **1**(13): 959-69.
- Shtivelman, E., J. Sussman, et al. (2002). "A role for PI 3-kinase and PKB activity in the G2/M phase of the cell cycle." *Curr Biol* **12**(11): 919-24.
- Scheid, M. P., M. Parsons, et al. (2005). "Phosphoinositide-dependent phosphorylation of PDK1 regulates nuclear translocation." *Mol Cell Biol* **25**(6): 2347-63.
- Scheid, M. P. and J. R. Woodgett (2003). "Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt." *FEBS Lett* **546**(1): 108-12.
- Schindler, K. and R. M. Schultz (2009). "CDC14B Acts Through FZR1 (CDH1) to Prevent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes." *Biol Reprod* **80**(4): 795-803.
- Schmidt, A., N. R. Rauh, et al. (2006). "Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1213-8.
- Schultz, R. (2009). "PKA and CDC25B: at last connected." *Cell Cycle* **8**(4): 516-7.
- Schultz, R. M., R. R. Montgomery, et al. (1983). "Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone." *Dev Biol* **95**(2): 294-304.
- Sly, L. M., V. Ho, et al. (2007). "The role of SHIP in macrophages." *Front Biosci* **12**: 2836-48.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Solc, P., A. Saskova, et al. (2008). "CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes." *Dev Biol* **317**(1): 260-9.
- Solomon, M. J. and P. Kaldis (1998). "Regulation of CDKs by phosphorylation." *Results Probl Cell Differ* **22**: 79-109.
- Song, J., F. T. Lei, et al. (2008). "Intracellular signals of T cell costimulation." *Cell Mol Immunol* **5**(4): 239-47.
- Soucek, T., R. S. Yeung, et al. (1998). "Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15653-8.

- Stokoe, D., L. R. Stephens, et al. (1997). "Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B." *Science* **277**(5325): 567-70.
- Token, A. (2008). "Akt signaling: a damaging interaction makes good." *Trends Biochem Sci* **33**(8): 356-9.
- Trinkle-Mulcahy, L. and A. I. Lamond (2006). "Mitotic phosphatases: no longer silent partners." *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 623-31.
- Trouson, A. O. and R. G. Gosden (2003). *Biology and Pathology of the Oocyte: Its role in fertility and Reproductive Medicine*, Cambridge University Press.
- Troussard, A. A., N. M. Mawji, et al. (2003). "Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation." *J Biol Chem* **278**(25): 22374-8.
- Tsafiriri, A., S. Y. Chun, et al. (1996). "Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors." *Dev Biol* **178**(2): 393-402.
- Tunquist, B. J. and J. L. Maller (2003). "Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs." *Genes Dev* **17**(6): 683-710.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* **346 Pt 3**: 561-76.
- Vazquez, F. and W. R. Sellers (2000). "The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling." *Biochim Biophys Acta* **1470**(1): M21-35.
- Viglietto, G., M. L. Motti, et al. (2002). "Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization." *Cell Cycle* **1**(6): 394-400.
- Vigo, E., H. Muller, et al. (1999). "CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase." *Mol Cell Biol* **19**(9): 6379-95.
- Viniegra, J. G., N. Martinez, et al. (2005). "Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM." *J Biol Chem* **280**(6): 4029-36.
- Vogt, E., M. Kirsch-Volders, et al. (2008). "Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error." *Mutat Res* **651**(1-2): 14-29.
- Webb, R. J., F. Marshall, et al. (2002). "Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in." *Dev Biol* **246**(2): 441-54.
- Wiersma, A., B. Hirsch, et al. (1998). "Phosphodiesterase 3 inhibitors suppress oocyte maturation and consequent pregnancy without affecting ovulation and cyclicity in rodents." *J Clin Invest* **102**(3): 532-7.
- Wirbelauer, C., H. Sutterluty, et al. (2000). "The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cull1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cull1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts." *EMBO J* **19**(20): 5362-75.
- Yoeli-Lerner, M., G. K. Yiu, et al. (2005). "Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT." *Mol Cell* **20**(4): 539-50.
- Zachariae, W., M. Schwab, et al. (1998). "Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex." *Science* **282**(5394): 1721-4.
- Zeleznik, A. J. (2004). "The physiology of follicle selection." *Reprod Biol Endocrinol* **2**: 31.
- Zhou, B. P., Y. Liao, et al. (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." *Nat Cell Biol* **3**(3): 245-52.